

**FIOCRUZ**

**MINISTÉRIO DA SAÚDE**

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

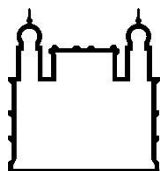
Doutorado em Biodiversidade e Saúde

**SEGURANÇA E EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum sanctum* L. var.  
*cubensis* PARA O CONTROLE DE DÍPTEROS MUSCOIDES**

**IDELSY CHIL NÚÑEZ**

**Rio de Janeiro**

**Maio de 2017**



FIOCRUZ

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

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

IDELSY CHIL NÚÑEZ

**SEGURANÇA E EFICÁCIA DO ÓLSEO ESSENCIAL DE *Ocimum sanctum* L.  
var. *cubensis* PARA O CONTROLE DE DÍPTEROS MUSCOIDES**

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

**Orientadores:** Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz.

Prof. Dr. Julio César Escalona Arranz

**RIO DE JANEIRO**

Maio de 2017

Chil-Núñez, Idelsy .

SEGURANÇA E EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum sanctum*  
L. var. *cupensís* PARA O CONTROLE DE DÍPTEROS MUSCOIDES / Idelsy  
Chil-Núñez. - , 2017.  
126 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biodiversidade e Saúde, 2017.

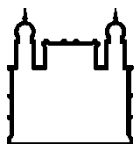
Orientadora: Margareth Maria de Carvalho Queiroz.

Co-orientador: Julio César Escalo-Arranz.

Bibliografia: f. 96-112

1. *Ocimum sanctum*. 2. Diptera Muscomorpha. 3. Controle de vetores. 4.  
Avaliação de óleo essencial. 5. Miíase. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados  
fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

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

**AUTOR: IDELSY CHIL NÚÑEZ**

### **SEGURANÇA E EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* PARA O CONTROLE DE DíPTEROS MUSCOIDES**

**ORIENTADORES: Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz.**

**Prof. Dr. Julio César Escalona Arranz**

**Aprovada em: 22 / 05 / 2017**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Rubens Pinto de Mello - Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ, RJ)

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Viviane Zahner** (Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ, RJ)

**Prof. Dr. José Mario d'Almeida** (Universidade Federal Fluminense UFF - RJ)

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Marise Maleck** (Universidade Severino Sombra -USS – Vassouras, RJ)

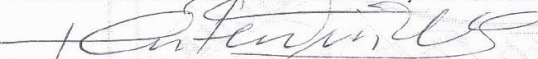
Rio de Janeiro, 22 de maio de 2017.

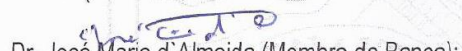


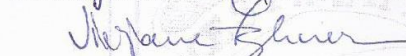
Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz


Ata da defesa de tese de doutorado em Biodiversidade e Saúde de **Idelsy Chil Nuñez**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Margareth Maria de Carvalho Queiroz. Ao vigésimo segundo dia do mês de maio de dois mil e dezessete, realizou-se às treze horas e trinta minutos, na Sala 9 - Módulo de Expansão do Pavilhão Arthur Neiva /FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **“SEGURANÇA E EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* PARA O CONTROLE DE DíPTEROS MUSCOIDES”** no programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Saúde Ambiental e Humana, na linha de pesquisa: Bionomia, monitoramento e controle de artrópodes vetores e de importância forense. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Rubens Pinto de Mello - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. José Mario d'Almeida - UFF/RJ, Dr<sup>a</sup>. Viviane Zahner - IOC/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Marise Maleck de Oliveira – USS/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Cleber Galvão Ferreira, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora, Rio de Janeiro, 22 de maio de 2017.

  
Dr. Rubens Pinto de Mello (Presidente da Banca):

  
Dr. José Mario d'Almeida (Membro da Banca):

  
Dr<sup>a</sup>. Viviane Zahner (Membro da Banca):

  
Dr<sup>a</sup>. Marise Maleck de Oliveira (Membro da Banca):

  
Dr. Cleber Galvão Ferreira (Coordenador do Programa):

Dedicatória

*À minha filha Elizabeth, o sel dos meus dias*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a meus orientadores Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz pelas suas lições valiosas, abrindo as portas de seu laboratório e sua casa, por sua sabedoria, conselhos e por sua paciência comigo; ao Dr. Julio César Escalona meu orientador e amigo de muitos anos por ser uma pessoa especial com sua inteligência e sabedoria, sempre disposto a ajudar (sem você este trabalho não teria sido possível, obrigada!).

A todos os colegas do Laboratório de Entomologia Medica e Forense (LEMEF) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), aos que me acolheram em minha chegada em 2013 e aqueles que chegaram posteriormente, obrigada por seus ensinamentos, ajuda e companhia. Em particular, agradeço à Dra. Paloma Martins Mendonça, por sua inestimável ajuda na realização deste trabalho, muito obrigada, você é uma excelente profissional e amiga.

Aos professores, coordenador e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde (IOC/FIOCRUZ).

À Clara Azalea Berenguer Rivas e Cristiani Franca da Silva por sua ajuda na realização dos testes de toxicidade e por sua amizade.

Ao Dr. Mário Geraldo de Carvalho por sua ajuda na caracterização química do óleo essencial.

Ao Yoandris Quintana Duany por sua ajuda na supervisão do estudo da miíase suína.

Aos meus colegas e amigos do Departamento de Farmácia da Universidad de Oriente que assumiram minhas tarefas, permitindo à minha estadia no Brasil e que tem me acompanhado e ajudado ao longo de muitos anos, vocês sabem que mais do que colegas somos uma família, muito obrigada a todos.

Ao Carlos Manuel Dutok Sánchez, Jesús Rodríguez Amado e Lisset Ortiz Zamora por tantas coisas impossíveis de ser mencionadas em apenas um parágrafo, vocês e eu sabemos quanto os devo e quanto eu os quero, obrigada meu povo.

A direção da Faculdade de Ciências Naturais e Exatas da Universidad de Oriente por a sua cooperação em todos os momentos.

À minha família, que tem sofrido todos esses meses sem a minha presença, assumindo minhas funções, sempre me incentivando, me amando e confiando em mim, especialmente minha filha Elizabeth por seu amor, compreensão e maturidade (**EU TE AMO**).

À minha família por adoção no Brasil, minha família de São Cristovão, pessoas excepcionais que me fazem sentir amada e protegida, sem vocês não poderia suportar ficar longe da minha casa (eu os levo no meu coração sempre).

Aos meus amigos, espalhados em grande parte do mundo, por sua companhia, por seu amor, por compartilhar comigo através da internet todos os dias, bons ou maus. Vocês têm sido o meu apoio e minha alegria e eu não tenho palavras para agradecer a vocês, eu espero que a vida nos permita continuar nos amando para sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro com a bolsa de estudos e pelo financiamento do Projeto (Nº 130/11) de Cooperação Internacional CAPES/MES-Cuba.

A todas as pessoas que apenas com um gesto e um sorriso forneceram uma estadia agradável neste país maravilhoso.

Agradeço aos membros da banca por aceitar avaliar esta tese e executar todas as críticas e sugestões que melhorem este trabalho, especialmente à Dra Viviane Zahner (pela revisão).

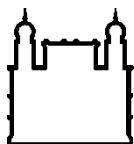
Agradeço eternamente a este país por permitir conquistar este sonho.

Obrigada à vida que me tem dado tanto.

Eternamente obrigada!

Idelsy





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### SEGURANÇA E EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* PARA O CONTROLE DE DÍPTEROS MUSCOIDES.

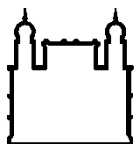
#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Idelsy Chil Núñez

*Ocimum sanctum* L. (OS) (syn. *Ocimum tenuiflorum* L.) é uma planta com enormes propriedades para curar e prevenir doenças. As espécies de *Ocimum* são popularmente conhecidas como basiliscos ou manjericões, claramente diferem não só morfológicamente, mas também em seus metabólitos secundários e, de fato, em suas potencialidades farmacológicas. OS tem reportado efeito inseticida em várias espécies de mosquitos, entretanto não tem estudos reportados sobre a atividade desta planta contra moscas. O objetivo deste estudo foi, portanto, avaliar a segurança e a eficácia do óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* para o controle alternativo de dípteros muscoides da família Calliphoridae (*Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya putoria*, *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala*, e *Lucilia cuprina*) e Muscidae (*Musca domestica*). O óleo essencial foi extraído por um aparelho do tipo de Clevenger e caracterizado por seus componentes químicos ajudados por um Cromatógrafo de Gás acoplado a um Espectrômetro de Massa (GC / MS). Para os estudos de Toxicidade Aguda Oral e Toxicidade Dérmica Aguda, foram utilizados os guias 423 e 402 da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico e do Comitê de Ética em Pesquisa. Para a avaliação da citotoxicidade, foram obtidas culturas primárias de células cardíacas embrionárias (ECC) de camundongos suíços, e as taxas de morte celular foram medidas pelo ensaio colorimétrico Presto Blue. Para avaliar os efeitos do óleo essencial de OS sobre o desenvolvimento pós-embrionário das moscas, o óleo essencial foi testado em seis concentrações (5, 10, 25, 50, 75 e 100%) em aplicação tópica 1µL /larva. O óleo essencial das folhas de *O. sanctum* L. var. *cubensis* que cresce selvagem na região leste de Cuba apresenta oito componentes principais, correspondendo a mais do que 94%. Os três componentes principais são eugenol 21,96%, β-cariofileno 20,79% e biciclogermacreno 20,37%, estes compostos químicos são reconhecidos pela atividade inseticida. Os estudos “in vivo” e “in vitro” não revelaram nenhuma toxicidade nas condições experimentais empregadas. Nos estudos da atividade inseticida do óleo essencial de *O. sanctum* var. *cubensis* em nas seis espécies de moscas avaliadas se comprovou que o óleo afetou os parâmetros: massa corporal em todas as espécies, duração do período neolarva-adulto (menos na espécie *M. domestica*), e não afetou o parâmetro razão sexual para nenhuma das espécies avaliadas. O óleo causou mortalidade em todas as espécies de moscas estudadas, causando também alterações morfológicas nas espécies *C. putoria* e *C. megacephala*. A atividade inseticida sobre adultos de *M. domestica* mostra que a mortalidade é dependente da dose, a concentração letal CL<sub>50</sub> foi estimada em 10,69% (9,41µg). O unguento a 15% de óleo essencial de *O. sanctum* avaliado numa mífase (facultativa cutânea ulcerante) suína produzida por larvas de *M. domestica*, mostrou efetividade conseguindo a cicatrização da lesão em sete (07) dias, conseguindo a cicatrização da lesão em sete (07) dias. Assim, estes resultados demonstraram que o óleo essencial de *O. sanctum* pode representar um método alternativo eficaz para controlar estas espécies de moscas.

**Palavras chaves:** *Ocimum sanctum*, Diptera Muscomorpha, Controle de vetores, Avaliação de óleo essencial, Calliphoridae, Muscidae, Mífase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### SAFETY AND EFFICIENCY OF ESSENTIAL OIL OF *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* FOR THE CONTROL OF MUSCOID DYPTEROS.

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN BIODIVERSIDAD E SAÚDE

**Idelsy Chil Núñez**

*Ocimum sanctum* L. (OS) (syn. *Ocimum tenuiflorum* L.) is a plant with enormous properties to heal and prevent diseases. *Ocimum* species are popularly known as basilisks or basils, they clearly differ not only morphologically, but also in their secondary metabolites, determined their pharmacological potentials. OS has an insecticidal effect reported on several species of mosquitoes, but there are no studies reported on the activity of this plant against flies. The objective of this study was to evaluate the safety and efficacy of essential oil of *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* for the alternative control of muscoid dipterans of the families Calliphoridae (*Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya putoria*, *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala* and *Lucilia cuprina*) and Muscidae (*Musca domestica*). The essential oil was extracted by a Clevenger apparatus and its chemical components were characterized using a Gas Chromatograph coupled to a Mass Spectrometer (GC / MS). For the Oral Acute Toxicity and Acute Dermal Toxicity studies, guides 423 and 402 of the Organization for Economic Cooperation and Development and the Research Ethics Committee were used. For the evaluation of cytotoxicity, primary cultures of embryonic heart cells (ECC) from Swiss mice were obtained, and cell death rates were measured by the PrestoBlue colorimetric assay. To evaluate the effects of OS essential oil on the post-embryonic development of flies, the essential oil was tested in six concentrations (5, 10, 25, 50, 75 and 100%) in topical application 1  $\mu$ L / larvae. The essential oil of the leaves of *O. sanctum* L. var. *cubensis* that grows wild in eastern Cuba has eight major components, corresponding to more than 94% of the total amount. The three main components are 21.96% eugenol,  $\beta$ -caryophyllene 20.79% and bicyclogermacrene 20.37%, these chemical compounds are recognized by the insecticidal activity. "In vivo" and "in vitro" studies did not reveal any toxicity under the experimental conditions applied. In the studies of the essential oil of *O. sanctum* var. *cubensis* insecticidal activity in the six species of flies evaluated showed that the oil affected the parameters: body mass in all species, duration of the newly hatched larvae to adult period (less in the species *M. domestica*), and the parameter sexual ratio was not affected in any of the species evaluated. The oil caused mortality in all species of flies studied, causing also morphological changes in *C. putoria* and *C. megacephala* species. The insecticidal activity on adults of *M. domestica* shows that mortality is dose dependent; the LC<sub>50</sub> lethal concentration was estimated to be 10.69% (9.41  $\mu$ g). The 15% ointment of *O. sanctum* essential oil evaluated in a myiasi (facultative cutaneous ulcer) produced by larvae of *M. domestica*, showed efficacy, achieving curation of the lesion in seven (07) days. Therefore, these results demonstrated that the essential oil of *O. sanctum* may represent an effective alternative method to control these species of flies.

**Key words:** *Ocimum sanctum*, Diptera Muscomorpha, Pest control, Essential oil, Calliphoridae, Muscidae, Myiasi.

# ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Inseticidas botânicos	4
1.1.1 Vantagens de usar inseticidas botânicos	5
1.1.2 Desvantagens de usar inseticidas botânicos	6
1.1.3 Como atuam os inseticidas botânicos	7
1.1.4 Inseticidas botânicos voláteis	8
1.1.5 Aspectos botânicos e morfológicos do gênero <i>Ocimum</i>	9
1.1.6 Composição química de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i>	11
1.1.7 Propriedades farmacológicas de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i>	12
1.1.8 Propriedades inseticida de <i>Ocimum sanctum</i> L.	13
1.2 Dípteros muscoides e sua importância na saúde pública	14
1.3 Ordem Diptera	16
1.3.1 Família Calliphoridae	17
1.3.2 Família Muscidae	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Material Vegetal	28
3.1.1 Obtenção e caracterização do óleo essencial	28
3.2 Manuseio de animais de laboratório e considerações éticas	29
3.3 Provas para determinação da segurança do óleo	30
3.3.1 Toxicidade aguda oral pelo Método das Classes (CTA)	30
3.3.2 Teste de Toxicidade Dérmica Aguda (TAD)	32
3.3.3 Teste de toxicidade <i>in vitro</i> em culturas de células cardíacas	34
3.3.4 Criação e manutenção no laboratório das colônias de dípteros muscoides	35
3.3.5 Bioensaio de atividade inseticida em dípteros muscoides	36
3.3.6 Bioensaio inseticida para adultos de <i>Musca domestica</i>	39

3.3.7 Avaliação de um unguento a 15% de óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> em uma míiassa suína .....	39
3.4 Obtenção, registro e análise estatística dos dados.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	41
4.1 Composição química do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> ....	41
4.2 Segurança da aplicabilidade do óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> ..	43
4.2.1 Toxicidade aguda oral em ratos tratados com o óleo essencial de <i>O. sanctum</i> pelo Método das Classes de Toxicidade (CTA).....	43
4.2.2 Potencial tóxico agudo do contato com a pele de ratos tratados com óleo de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> .....	46
4.2.3 Teste de toxicidade <i>in vitro</i> em culturas de células cardíacas .....	49
4.3 Avaliação da atividade inseticida do óleo essenciais de <i>O. sanctus</i> L. var. <i>cubensis</i> em cinco espécies de Calliphoridae ( <i>Cochliomyia macellaria</i> , <i>Chrysomya putoria</i> , <i>Chrysomya megacephala</i> , <i>Chrysomya albiceps</i> e <i>Lucilia cuprina</i> ) e <i>Musca domestica</i> (Muscidae): parâmetros determinantes e significação.....	50
4.3.1 Efeitos do tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Cochliomyia macellaria</i> . .....	50
4.3.2 Efeitos do tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Chrysomya putoria</i> .....	55
4.3.3 Efeitos do tratamento com óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Chrysomya albiceps</i> .....	61
4.3.4 Efeitos do tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Chrysomya megacephala</i> .....	66
4.3.5 Efeitos do tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Lucila cuprina</i> .....	73
4.3.6 Efeitos do tratamento com o óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário de <i>Musca domestica</i> .....	78

4.3.7 Análise comparativa do efeito do óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário das seis espécies de dípteros muscoides estudadas: <i>Cochliomyia macellaria</i> , <i>Chrysomya putoria</i> , <i>Chrysomya megacephala</i> , <i>Chrysomya albiceps</i> , <i>Lucilia cuprina</i> e <i>Musca domestica</i> .....	84
4.4 Efeito inseticida do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> sobre adultos de <i>Musca domestica</i> .....	86
4.5 Avaliação do unguento a 15% de óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> numa miasse suína. ....	89
5. CONCLUSÕES	95
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
APÊNDICES	113
ANEXOS	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . Fonte: <a href="http://www.costaricajungleretreats.com/herbs-to-support-your-cleanse/">http://www.costaricajungleretreats.com/herbs-to-support-your-cleanse/</a> .....	11
Figura 2. Adulto de <i>Cochliomyia macellaria</i> (Diptera: Calliphoridae). Fonte <a href="http://bugguide.net/node/view/212052">http://bugguide.net/node/view/212052</a> .....	19
Figura 3. Adulto de <i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera: Calliphoridae). Foto: Raquel Chagas do Nascimento.....	20
Figura 4. Adulto de <i>Chrysomya putoria</i> (Diptera: Calliphoridae). Fonte: Acervo LEMEF. ....	22
Figura 5. Adulto de <i>Chrysomya albiceps</i> (Diptera: Calliphoridae). Fonte: naturafotolocura 720 × 960 .....	22
Figura 6. Adulto de <i>Lucilia cuprina</i> (Diptera: Calliphoridae). ....	24
Figura 7. Adulto de <i>Musca domestica</i> (Diptera: Muscidae). Fonte: herramientas.educa.madrid.org .....	26
Figura 8. Diagrama de fluxo para obtenção do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> . ....	29
Figura 9. Ratos Sprague Dawley mantidos em condições de laboratório. Água e comida <i>ad libitum</i> , fotoperíodo 12/12, temperatura 25 °C, umidade relativa 60 ±5%. ....	31
Figura 10. Administração do óleo aos ratos com ajuda de uma sonda gástrica. ....	32
Figura 11. Diagrama de fluxo para avaliação in vitro óleo essencial de <i>O. sanctum</i> sobre culturas de cardiomiócitos. ....	35
Figura 12. Condições para criação e manutenção das colônias de Dípteros mucoides. A: Gaiola para contenção; B: Dieta para básica para alimentação e indução da cópula e postura. ....	36
Figura 13. Fluxo de trabalho do ensaio de atividade do óleo essencial de <i>O. sanctum</i> no desenvolvimento pós-embrionário de dípteros mucoides. ....	38
Figura 14. Diagrama de fluxo para o bioensaio inseticida para adultos de <i>Musca domestica</i> . ....	39
Figura 15. Órgãos e sistemas de animais pertencentes ao estudo de CTA ao ser examinado no Laboratório de Patologia. ....	45
Figura 16. Evolução dos animais no ensaio de Toxicidade Aguda dérmica. ....	47
Figura 17. Órgãos e sistemas dos animais estudados na TAD sem nenhuma alteração anatomopatológica encontrada. ....	48
Figura 18. Efeito do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> sobre o tempo de desenvolvimento de <i>Cochliomyia macellaria</i> . ....	52

Figura 19. Razão sexual de <i>Cochliomyia macellaria</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	53
Figura 20. Mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto de <i>Cochliomyia macellaria</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	54
Figura 21. Duração dos estágios larval e pupal, assim como do período de neolarva-adulto (dias) de <i>Chrysomya putoria</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	57
Figura 22. Razão sexual de <i>Chrysomya putoria</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	58
Figura 23. Mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto de <i>Chrysomya putoria</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	59
Figura 24. Alterações morfológicas de <i>Chrysomya putoria</i> (Diptera: Calliphoridae) adultos tratados por via tópica com concentrações de 5 e 10% de óleo essencial extraído de <i>Ocimum sanctum</i> (Lamiaceae). A - Abdome contratada e asas torcidas (x16). B - Ptilinium não retraída (x40). C - inseto do grupo controle (x16). .....	61
Figura 25. Duração dos estágios larval, pupal, e de neolarva a adulto da espécie <i>Chrysomya albiceps</i> tratada com óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	62
Figura 26. Razão sexual de <i>Chrysomya albiceps</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	64
Figura 27. Mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto de <i>Chrysomya albiceps</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	65
Figura 28. Duração dos estágios larval e pupal, assim como do período de neolarva-adulto de <i>Chrysomya megacephala</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	69
Figura 29. Razão sexual de <i>Chrysomya megacephala</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	70
Figura 30. Mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto de <i>C. megacephala</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	71
Figura 31. Alterações morfológicas de <i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera: Calliphoridae) adultos tratados por via tópica com concentrações de 10%, 25% e 50% do óleo essencial extraído de <i>Ocimum sanctum</i> (Lamiaceae). A - Ptilinium não retraída (x16); B - Asas torcidas (x16); C - Inseto do grupo controle (x16). .....	73
Figura 32. Efeito do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> sobre o tempo de desenvolvimento de <i>Lucila cuprina</i> . .....	74

Figura 33. Razão sexual de <i>Lucilia cuprina</i> após o tratamento com o com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	76
Figura 34. Mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto de <i>L. cuprina</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	77
Figura 35. Efeito do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> sobre o tempo de desenvolvimento de <i>Musca domestica</i> . .....	81
Figura 36. Razão sexual de <i>Musca domestica</i> após o tratamento com o com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	82
Figura 37. Mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto de <i>M. domestica</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	83
Figura 38. Unguento a 15% de óleo essência de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> embalado em potes de vidro de cor âmbar. .....	89
Figura 39. Lesão na pele do porco ao início do estudo. ....	89
Figura 40. Evolução da lesão de miíase suína tratada com o unguento de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> a 15%. .....	90
Figura 41. Estrutura química do Asuntol (Coumaphos). .....	91



## **LISTA DE QUADROS**

Quadro I. Biomodelo usado e condições do ensaio de Toxicidade aguda oral. ....	30
Quadro II. Biomodelo usado e condições do ensaio de Toxicidade aguda dérmica. ....	33
Quadro III. Classificação de acordo com o método de Draize para a classificação de eritema e edema. ....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela I. Classificação toxicológica das substâncias segundo a Diretriz 423 da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento (OECD/OCDE 423, 2012).....	31
Tabela II. Componentes identificados por GC-MS no óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	41
Tabela III. Variação de peso corporal (g) dos ratos no estudo da Toxicidade oral aguda pelo Método de Classe Toxicidade Aguda (CTA) do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L.....	44
Tabela IV. Variação individual do peso corporal (g) dos ratos tratados com o óleo essencial de <i>O. sanctum</i> no ensaio de Toxicidade Aguda Dérmica.....	48
Tabela V. Comportamento da viabilidade de células cardíacas após tratamento com o óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . ....	50
Tabela VI. Efeito sobre a massa corporal das larvas de <i>Cochliomyia macellaria</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . ....	51
Tabela VII. Mortalidade absoluta e mortalidade corrigida, pela fórmula de Abbott (1925), dos estágios de desenvolvimento de <i>Cochliomyia macellaria</i> (Diptera: Calliphoridae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> var. <i>cubensis</i> . ....	55
Tabela VIII. Efeito sobre a massa corporal das larvas de <i>Chrysomya putoria</i> após o tratamento com o óleo essenciais de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . ....	56
Tabela IX. Mortalidade absoluta e mortalidade corrigida, pela fórmula de Abbott (1925), dos estágios de desenvolvimento de <i>Chrysomya putoria</i> (Diptera: Calliphoridae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> var. <i>cubensis</i> . ....	60
Tabela X. Efeito sobre a massa corporal das larvas de <i>Chrysomya albiceps</i> após o tratamento com óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . ....	61
Tabela XI. Mortalidade absoluta e mortalidade corrigida, pela fórmula de Abbott (1925), dos estágios de desenvolvimento de <i>C. albiceps</i> (Diptera: Calliphoridae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . ....	66
Tabela XII. Efeito sobre a massa corporal das larvas de <i>Chrysomya megacephala</i> após o tratamento com o óleo essenciais de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . ....	67
Tabela XIII. Mortalidade absoluta e mortalidade corrigida, pela fórmula de Abbott (1925), dos estágios de desenvolvimento de <i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera: Calliphoridae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> (Lamiaceae). ....	72
Tabela XIV. Massa larval de <i>Lucilia cuprina</i> (Diptera: Calliphoridae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> (Lamiaceae). ....	73

Tabela XV. Mortalidade absoluta e mortalidade corrigida, pela fórmula de Abbott (1925), dos estágios de desenvolvimento de <i>Lucilia cuprina</i> (Diptera: Calliphoridae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> (Lamiaceae). .....	78
Tabela XVI. Efeito sobre o peso das larvas de <i>Musca domestica</i> após o tratamento com o óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . .....	79
Tabela XVII. Mortalidade absoluta e mortalidade corrigida, pela fórmula de Abbott (1925), dos estágios de desenvolvimento de <i>Musca domestica</i> (Diptera: Muscidae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Ocimum sanctum</i> (Lamiaceae). .....	84
Tabela XVIII. Resumo simplificado do comportamento, em forma comparativa, do efeito da aplicação tópica dose única do óleo essencial de <i>O. sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> sobre o desenvolvimento pós-embrionário de cinco espécies da família Calliphoridae ( <i>Cochliomyia macellaria</i> , <i>Chrysomya putoria</i> , <i>Chrysomya megacephala</i> , <i>Chrysomya albiceps</i> , e <i>Lucilia cuprina</i> ) e a espécie <i>Musca domestica</i> (Muscidae). Indivíduos por concentração: 200. Amostra tratada independente da dose: 1200 indivíduos. ....	86
Tabela XIX. Número de adultos de <i>Musca domestica</i> (Diptera: Muscidae) mortos e/ou paralisados usando diferentes concentrações de óleo essencial extraído de <i>Ocimum sanctum</i> L. var. <i>cubensis</i> . ....	87

# 1. INTRODUÇÃO

Na primeira metade do século XX, o Brasil foi um grande produtor e exportador de inseticidas botânicos, como piretro, rotenona e nicotina, que apresentam maior segurança em seu uso agrícola e de menor impacto ambiental. Os inseticidas botânicos foram muito populares e importantes entre as décadas de 1930 e 1940 para o controle de pragas. A importação de materiais botânicos ou derivados para uso como inseticidas representou um empreendimento comercial considerável. Por exemplo, acima de 6.700 toneladas de raízes de *Derris elliptica* foram importadas pelos Estados Unidos do sudeste da Ásia em 1947, mas diminuiu para 1.500 toneladas em 1963 (Wink 1993). Isto reflete a extensão pela qual os inseticidas botânicos foram substituídos pelos inseticidas químicos sintéticos, também conhecidos como agrotóxicos, dentre eles, os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, produzidos pelos países industrializados nas décadas de 1950 e 1960, especialmente quando se adotou o pacote tecnológico da Revolução Verde (Carson 1956, Kathrina e Antonio 2004). O volume de agrotóxicos usados no mundo chegou a ultrapassar 20.000 toneladas de ingredientes ativos na década de 1990, quando as importações de piretro para os Estados Unidos totalizaram apenas umas 350 toneladas (Isman 1997).

Os inseticidas químicos de origem sintética surgiram em meados da década de 1940. Atuam no sistema nervoso dos insetos causando sua morte (Buss e Park-Brown 2006). É o meio de controle mais utilizado para dípteros sinantrópicos, constituído principalmente por organoclorados e organofosforados (Vieira et al. 2001). Estes possuem diversas propriedades que os tornavam próprios para o uso em grande escala, como baixo custo de produção, longa ação residual e a toxicidade para um amplo espectro de pragas e vetores (Sethajintanin e Anderson 2006). Brasil se tornou o maior consumidor de agrotóxicos do planeta e uma das consequências disto são os resíduos nos alimentos que tem sido motivo de debates e estudos dos especialistas que alertam sobre o perigo destes compostos químicos para a saúde e ao meio ambiente. Cada vez mais surgem estudos que faz a associação dos agrotóxicos com doenças como câncer, má formação congênitas, mal de Parkinson, depressão, suicídios, diminuição da capacidade de aprendizagem em crianças, ataques cardíacos, problemas mentais e outros de ordem comportamentais e que não existem limite diário aceitável de ingestão dessas substâncias (Abrasco, 2012; Siqueira, 2014).

O uso de inseticidas químicos (sintéticos) para o controle de insetos é perigoso, afetando especificamente o homem e outros animais, podendo poluir o ar, a água e a cadeia

alimentar (Mendonça et al. 2011). São tóxicos tanto para animais vertebrados quanto para insetos polinizadores (Aktar et al. 2009). Devido à alta lipossolubilidade que apresentam, os compostos clorados são biocumulativos, ficando retidos no tecido vivo (Ritter et al. 1995; FUNASA 2001). Concentram-se em tecidos e fluidos animais com alta quantidade na gordura como a carne, o leite e seus derivados (Klaassen e Rozmam 1991), podendo gerar danos toxicológicos à população humana e a animais domésticos, tanto a curto quanto em longo prazo (Eyer et al. 2004; Faria 2003). Vários estudos realizados na América Latina observaram que a acumulação de organoclorados no sangue, tecido adiposo e leite materno são muito superiores aos níveis observados nos países desenvolvidos (Carvalho 1991). No Brasil, os inseticidas organoclorados foram amplamente utilizados na agricultura, porém seu emprego foi descontinuado pela Portaria n.º329, de 2/9/85, que permitiu sua utilização somente no controle de formigas (Aldrin) e em campanhas de saúde pública (DDT e BHC) (OPAS 1996).

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

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

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

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

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

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

Afortunadamente, o interesse em desenvolver e usar produtos botânicos para o manejo de pragas está novamente aumentando nos últimos anos (Isman, 1997; Mörner et al. 2002; Mathew 2009). Esse interesse vem ao encontro da necessidade de buscar por métodos alternativos de menor impacto ou riscos à saúde humana e ao meio ambiente, bem como pela crescente demanda por produtos alimentícios saudáveis e isentos de resíduos de agrotóxicos. São inúmeras as plantas possuidoras de poderes inseticidas, que deveriam não apenas ser pesquisadas sempre ser utilizada como modelos para síntese de novos princípios ativos. Os conhecimentos adquiridos com os mecanismos de defesa das plantas têm auxiliado no desenvolvimento de métodos de controle de pragas menos agressivos ao ambiente. Conforme anteriormente mencionando, muitos desses princípios ativos têm ação específica para alguns grupos de organismos, sem afetar outros, e essa característica é importante para controlar apenas os organismos alvos.

*Ocimum sanctum* (Lamiaceae), também conhecido como *Ocimum tenuiflorum*, manjerição sagrado, tulasi ou tulsi, é uma planta aromática nativa do subcontinente indiano e difundida como uma planta cultivada em todo o trópico do Sudeste Asiático, cultivada e naturalizada em outras áreas tropicais (Warrier et al. 1995; Staples-Kristiansen 1999). A planta é menos conhecida nos países ocidentais onde existe uma falta de informação sobre práticas culturais (Sims et al. 2014). Em Cuba, é cultivada em jardins e quintais como a erva

aromática. Suas sementes propagam-se facilmente pelo ar e então podem ser encontradas espontaneamente nos bairros das cidades e nas áreas rurais (Roig 2012).

O extrato desta espécie tem potencial em tratamentos para tosse, diarreia, disenteria e mau funcionamento dos rins, bronquite, doenças do fígado, febre catarral, otalgia, lombalgia, soluço, oftalmia, doença ocular dolorosa, distúrbios gástricos, distúrbios geniturinários, diabetes, doenças da pele, várias formas de envenenamento e distúrbios de estresse psicossomático, artrite, febre crônica e picada de inseto (Sakina et al. 1990; Singh-Majumdar, 1997; Prajapati et al. 2003; Rashid et al. 2013).

Os efeitos inseticidas do óleo essencial de *O. sanctum* foram testados em condições de laboratório contra as espécies de mosquitos *Anopheles stephensi* Liston, *Aedes aegypti* Linnaeus, *Culex quinquefasciatus* (Say) e *Anopheles minimus* (Phasomkusolsil e Soonwera 2010). Os óleos essenciais e seus constituintes principais (eugenol) foram mais tóxicos para *A. stephensi*, seguidos pelos mosquitos *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (Bhatnagar et al. 1993), também têm sido estudados como repelentes para outras classes de insetos, como *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* e *Prostephanus truncatus* (Obeng-Ofori-Reichmuth 1997).

Não foram encontrados relatos do uso de *Ocimum sanctum* no controle de moscas. As moscas possuem grande importância na saúde pública por ser responsáveis pela transmissão de enterobactérias patogênicas, vírus, fungos, helmintos e protozoários, tais como ameba e giárdia. Esses organismos são responsáveis também pela maioria dos casos de diarreia em crianças, e algumas espécies de moscas podem produzir miíase. Há mais de duas centenas de bactérias e patógenos que as moscas podem transmitir, alguns dos mais comuns são: *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Shigella* sp. Estes microrganismos podem transmitir aos seres humanos e animais vários agentes etiológicos de doenças tais como: cólera, hepatite, poliomielite, tuberculose e estes patógenos podem também causar diarreia, febre entre outras. Sempre que uma mosca pousa em algum lugar, pode depositar milhares de bactérias e outros microrganismos (Greenberg 1971 e 1973).

## **1.1 Inseticidas botânicos**

Alguma planta, ao longo de sua evolução, desenvolveu sua própria defesa química contra os insetos herbívoros, sintetizando metabólitos secundários com propriedades inseticidas; isto é, com atividade tóxica contra os insetos ou que causem sua morte por outros

modos de ação, ou mesmo sua repelência. Os inseticidas botânicos são produtos derivados dessas plantas ou partes das mesmas, podendo ser o próprio material vegetal, normalmente moído até ser reduzido a pó, ou seus produtos derivados por extração aquosa ou com solventes orgânicos, tais como álcool, éter, acetona, clorofórmio etc. ou destilação (Wiesbrook 2004).

O acervo bibliográfico a respeito das plantas inseticidas praticamente ficou estacionado desde os anos 1940, época em que eram bastante desenvolvidos o comércio e a pesquisa da rotenona e de outras plantas com propriedades inseticidas. As plantas inseticidas mais promissoras encontram-se nas famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Labiatae e Canellaceae (Jacobson, 1989; Miana et al. 1996; Escalona et al. 2001; Fernandes et al. 2005).

As informações disponíveis sobre a caracterização, o modo de ação, a toxicologia e os efeitos no ecossistema, para a maioria dos inseticidas botânicos, são ainda escassas, embora a maioria seja utilizada há mais de uma década. Um dos casos é da *Quassia amara*, a qual tem sido utilizada há muito tempo com bons resultados, mas não tem alcançado nível de produção industrial ou semi-industrial por falta de disponibilidade permanente de matéria prima. Outras plantas como o tabaco (*Nicotiana tabacum*), crisântemo (*Chrysanthemum*), derris (*Derris elliptica*), anona (*Annona squamosa*) e riania (*Riania speciosa*), com substâncias bioativas de ação eficiente contra insetos, apresentam graus diferenciados de toxicidade para o homem e mamíferos, recomendando-se seu uso com precaução (EMBRAPA 2005a).

### **1.1.1 Vantagens de usar inseticidas botânicos**

As principais vantagens da aplicação de inseticidas botânicos são:

**Degradação rápida:** Os inseticidas botânicos são rapidamente degradados pela luz solar, ar, umidade, chuva e enzimas desintoxicantes. Degradação rápida significa baixa persistência, menor risco de as pragas desenvolverem resistência e reduzido risco para organismos benéficos e não-alvo, o que permite que sua aplicação possa ser feita um pouco antes da colheita do alimento, por possuir baixo ou nenhum poder residual.

**Ação rápida:** Embora a morte possa não ocorrer em poucas horas ou dias, os insetos podem parar de se alimentar quase que imediatamente após a aplicação do inseticida botânico. Todavia, sua ação em geral é mais lenta que a dos inseticidas sintéticos.



Baixa a moderada toxicidade: Muitos inseticidas botânicos têm baixa a moderada toxicidade aos mamíferos, baseando-se na  $DL_{50}$  oral, um termo usado para descrever a dose do inseticida, administrado por via oral, requerida para matar 50% dos indivíduos da população dos animais em teste (geralmente, ratos e coelhos), sendo expresso em miligrama (mg) do ingrediente ativo por quilograma (Kg) de peso corpóreo.

Seletividade: A rápida degradação e o curto período residual fazem os inseticidas botânicos mais seletivos a certos insetos praga e menos prejudiciais aos insetos benéficos.

Fitotoxicidade: Muitos inseticidas botânicos não são fitotóxicos (tóxicos para as plantas) nas dosagens recomendadas. Todavia, os inseticidas saponáceos, sulfurosos e sulfato de nicotina podem ser tóxicos a alguns vegetais e ornamentais. Os extratos de nim podem causar fitotoxicidade em concentrações altas, embora dependa da espécie de planta sobre a qual o extrato foi aplicado, sua idade e fase de desenvolvimento. A fitotoxicidade causada por nim manifesta-se nas plantas tratadas como folhas enrijecidas, quebradiças, de cor verde-pálido, geralmente menores, com pontos necróticos. Geralmente, soluções aquosas de óleo emulsionável de nim acima de 1% causam fitotoxicidade. Essa característica é utilizada algumas vezes, para desenvolver herbicida, tendo como modelo, essas substâncias. Um exemplo de herbicida com o esqueleto químico semelhante à substância extraída de óleo essencial de plantas é a cinmetilina, cuja molécula é semelhante ao do eucaliptol, extraído de folhas de eucalipto (Kathrina e Antonio 2004; Wiesbrook 2004; EMBRAPA 2005<sup>a</sup>).

Custo e disponibilidade: Os inseticidas botânicos podem ser fabricados na propriedade rural a baixo custo quando se dispõe de material vegetal e que as substâncias sejam solúveis em água. Ainda o preço dos produtos botânicos disponíveis no mercado pode ser mais elevado do que os dos inseticidas sintéticos, em geral por serem poucos disponíveis no mercado por causa da carência de fornecedores comerciais ou por problemas associados ao fornecimento estável de matéria prima. (Buss e Park-Brown 2002; Kathrina e Antonio 2004; Wiesbrook 2004; EMBRAPA 2005a).

### **1.1.2 Desvantagens de usar inseticidas botânicos**

Entre as desvantagens dos inseticidas botânicos estão:

Necessidade de sinergistas: Alguns inseticidas botânicos rapidamente se degradam ou são metabolizados por enzimas desintoxicantes dos insetos-alvo. Como a desintoxicação

pode ocorrer rapidamente, o inseticida somente atordoa temporariamente o inseto, mas não causa sua morte. Para evitar que o inseto se recupere rapidamente, um sinergista deve ser adicionado ao inseticida para inibir certas enzimas desintoxicantes nos insetos. Isto aumenta a ação inseticida do produto. Os sinergistas apresentam baixa toxicidade, tem pouca ou nenhuma propriedade inseticida inerente, e tem atividade residual muito curta.

**Baixa persistência:** Os inseticidas botânicos são rapidamente degradados, e assim, apresentam baixa persistência, o que pode exigir aplicações mais frequentes e custos mais elevados. Todavia, essas características em conjunto permitem minimizar o impacto dessas aplicações (Buss e Park-Brown 2002; Kathrina e Antonio 2004).

**Modo de ação:** Os inseticidas botânicos raramente têm ação sistêmica, ação que é exercida por um inseticida que é absorvido por uma planta e translocado em quantidades suficientes para tornar o local de translocação tóxico para os insetos por um tempo ilimitado. Desse modo, os inseticidas botânicos podem não controlar eficientemente insetos que passam parte de sua vida no interior de frutos, ramos etc., embora haja exceções (por exemplo, extrato de alho) (EMBRAPA 2005<sup>a</sup>).

**Carência de Pesquisas:** Resultados científicos sobre eficiência e toxicidade crônica aos mamíferos não estão disponíveis para muitos inseticidas botânicos. Tolerância de resíduos tóxicos em alimentos para inseticidas botânicos não tem sido estabelecida. Dificuldade de Registro. No Brasil, os inseticidas botânicos não são registrados pelo Ministério da Agricultura (MAPA 2005), mas estão disponíveis no mercado sem registro para venda legal por isso existe a necessidade de se verificar a presença de rótulo antes de comprar ou aplicar esses produtos (Buss e Park-Brown 2002; Kathrina e Antonio 2004; Wiesbrook 2004; EMBRAPA 2005a).

### **1.1.3 Como atuam os inseticidas botânicos**

Algumas substâncias ou compostos de plantas podem atuar de várias formas, especialmente quando é um complexo que é responsável por sua ação sobre o inseto. Recentes estudos têm demonstrado que os metabólicos secundários de plantas com efeitos de inseticida podem agir como inibidores da alimentação de insetos ou de a síntese de quitina ou perturbadores do crescimento, desenvolvimento, reprodução, diapausa e comportamento. No geral, podemos distinguir três tipos que descrevem o modo de ação de uma substância de origem botânica sobre os insetos (Kathrina e Antonio 2004; EMBRAPA 2005a):

**Ação tóxica, repelente e/ou antialimentar:** por exemplo, os extratos de nim atuam como inseticida, que no sentido da própria palavra, causa a morte do inseto por intoxicação, mas, às vezes, são repelentes (fazem com que os insetos se afastem da planta, prevenindo a alimentação ou oviposição na mesma) ou agem como antialimentar (inibe o inseto se alimentar). A ação tóxica dos extratos botânicos provém da ação de seus ingredientes ativos no sistema nervoso central dos insetos, interferindo na transmissão (sináptica ou axônica) normal dos impulsos nervosos, quando são denominados de neurotóxicos. Os inseticidas botânicos (assim como os inseticidas químicos sintéticos) que atuam no sistema nervoso central dos insetos são também tóxicos para os seres humanos.

**Ação sobre órgãos ou moléculas-alvo:** Alguns inseticidas botânicos podem agir no sistema neuroendócrino, interferindo nos processos normais de troca de tegumento (ecdise) e/ou metamorfose, sendo denominados de reguladores de crescimento, ou podem interferir no metabolismo respiratório das células, interferindo na síntese de ATP (Kathrina e Antonio 2004; Wiesbrook 2004; EMBRAPA 2005<sup>a</sup>).

**Ação por contato ou ingestão:** As substâncias que atuam por contato, que caracteriza o modo de ação de um inseticida que age e é absorvido pela pele (tegumento) do inseto, como a nicotina, rotenona e piretrina, afetam o sistema nervoso central, que é acessível para essas substâncias em toda a superfície do corpo do inseto ou pelas vias respiratórias, causando rapidamente a morte do inseto. As substâncias repelentes com as do alho, atuam somente por contato, mas agem por contato com os quimiorreceptores do inseto e não por contato com a cutícula ou os neurônios. As substâncias que atuam por ingestão, que caracteriza o modo de ação de um inseticida que age e penetra no organismo por via oral, como a capsina (da pimenta), quássia (*Quassia amara*), azadiractina (nim) e fenilalanina (mucuna), afetam o sistema de digestão, o sistema de biosíntese dos hormônios da ecdise ou a formação da camada de quitina da cutícula do inseto. (Buss e Park-Brown 2002; Kathrina e Antonio 2004; Wiesbrook 2004; EMBRAPA 2005a).

#### **1.1.4 Inseticidas botânicos voláteis**

Uma classe de substâncias que tem merecido muita atenção são a das substâncias que fazem parte do óleo essencial de algumas plantas. Os óleos essenciais ou óleos voláteis estão presentes nas plantas aromáticas e podem apresentar atividade atraente, repelente, e até tóxica a insetos e microrganismos.

Entre as substâncias que têm sido empregadas para controle de insetos e microrganismos e que fazem parte da composição de óleos essenciais de plantas são, por exemplo, os terpenos ( $\alpha$ -pinenos e  $\beta$ -pinenos) presentes nos óleos extraídos da resina de pinheiro (*Pinus* sp), o nerol extraído do óleo essencial do capim limão (*Cymbopogon citratus* Stapf, Poaceae), o limoneno do óleo da casca do fruto de diversas espécies de *Citrus* (laranja, limão), e algumas substâncias obtidas de plantas utilizadas como condimento alimentar, como o eugenol do cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb., Myrtaceae), o mentol da hortelã (*Mentha piperita* L.; Labiatae), a piperina da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.; Piperaceae) e as substâncias sulfuradas obtidas do extrato do alho (*Allium sativum* L.). Algumas plantas consideradas “invasoras” também produzem substâncias aromáticas que tem apresentado alguma bioatividade contra insetos, como o mentrasto (*Ageratum conyzoides* L., Asteraceae), cujos extratos de folhas são repelentes a insetos ou agem como reguladores de crescimento, sendo ativos contra gorgulhos (*Sitophilus zeamais*), e a erva-de-santa-maria ou mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.; Chenopodiaceae), cujos frutos tem compostos bioativos contra insetos de grãos armazenados, especialmente gorgulhos (Escalona 2001; Menezes 2005; Rathi et al. 2008).

### **1.1.5 Aspectos botânicos e morfológicos do gênero *Ocimum***

Entre as ervas aromáticas, várias espécies do gênero *Ocimum*, pertencente à família Lamiaceae, por exemplo, o manjeriço, possuem importância econômica na obtenção de óleo essencial (Nolasco 1996), tendo uso na medicina popularmente em todos os continentes (Simon et al. 1990; Vieira et al. 2001). Compreende aproximadamente trinta espécies de ervas e subarbustos dispersos das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Américas Central e do Sul, sendo a África considerada o principal centro de diversidade deste gênero (Paton 1992).

Este gênero tem despertado a atenção de pesquisadores por apresentar espécies que são fontes de óleos essenciais com mais de vinte componentes, entre eles metil-chavicol, metil-cinamato, eugenol, citral, linalol, timol, cânfora e taninos (Simon et al. 1990; Simon et al. 1993; Morales et al. 1997).

Entre as espécies de manjeriço de maior importância encontram-se *Ocimum gratissimum* (manjeriço-doce), *Ocimum basilicum* (manjeriço branco), *Ocimum tenuiflorum* (syn. *Ocimum sanctum*), *Ocimum selloi* Benth que são produtores de óleos essenciais para produção de fármacos, perfumes e cosméticos (Matos 1998).

### **Classificação científica:**

#### *Ocimum sanctum*

- Reino : Plantae
- Divisão: Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Ordem : Lamiales
- Família : Lamiaceae
- Gênero : *Ocimum*
- Espécie : *O. tenuiflorum*
- Nome binomial: *Ocimum tenuiflorum* or *Ocimum sanctum* L. (Silva et al. 2016)

*Ocimum sanctum* (Syn. *Ocimum tenuiflorum* L.) é uma planta com propriedades enormes para curar e prevenir doenças. Popularmente, as espécies de *Ocimum* são conhecidas como basiliscos ou manjericões, mas claramente diferem entre eles, não só morfológicamente, também em seus metabólitos secundários e, de fato, em suas potencialidades farmacológicas (Singh- Majumdar 2007).

*Ocimum sanctum* L. (também conhecido como Tulsi) tem sido usado há milhares de anos na Ayurveda (Sistema tradicional indiano de medicina) por suas propriedades curativas diversas. Tulsi, a Rainha das ervas, o lendário “Incomparável” da Índia, é uma das mais sagradas e mais apreciadas das muitas ervas curativas e saudáveis do oriente. O manjericão sagrado, Tulsi, é conhecida pela sua santidade religiosa e espiritual, bem como pelo seu importante papel no sistema tradicional Ayurvédico e Unani de saúde holística e medicina herbal do Oriente. É mencionado por Charaka no Charaka Samhita; um texto ayurvédico. Marcado pelo seu aroma forte e sabor adstringente, é considerado na Ayurveda como uma espécie de "elixir da vida" e acredita-se para promover a longevidade. Os extratos de Tulsi são usados em Ayurveda para constipações comuns, dores de cabeça, distúrbios do estômago, inflamação, doenças cardíacas, várias formas de envenenamento e malária. Tradicionalmente, *O. sanctum* L. é tomado em muitas formas, como chá de ervas, energia seca ou folha fresca. Durante séculos, as folhas secas de Tulsi foram misturadas com grãos armazenados para repelir insetos (Biswas- Biswas 2005).

É pungente e sabor amargo e quente, leve e seco em vigor. As raízes, folhas e sementes possuem propriedades medicinais (Figura 1). Os óleos essenciais têm papel na atração de agentes polinizadores, de defesa contra herbívoros, como reguladores da taxa de decomposição da matéria orgânica no solo e como agentes antimicrobianos. Industrialmente, podem ser utilizados como antioxidantes ou aromatizantes dos alimentos e bebidas e poderá ser utilizado na indústria de cosméticos e perfumaria (Nolasco 1996).



**Figura 1.** Plantas de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*. Fonte: <http://www.costaricajunglertreats.com/herbs-to-support-your-cleanse/>

#### **1.1.6 Composição química de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis***

*Ocimum sanctum* (OS) tem um odor aromático específico devido à presença de um óleo essencial ou volátil, concentrado principalmente nas folhas. Este óleo volátil aromático contém uma variedade de terpenos com grupos fenóis e aldeídos, diferindo sua composição química de acordo com estudos em diferentes partes do mundo devido à diversidade genética, o habitat e os tratos culturais (Martins et al. 2000). Isto parece lógico, considerando que os óleos essenciais podem alterar sua composição de acordo com a região geográfica de onde provêm, o tempo de coleta da planta e o estado vegetativo (Cannon et al. 2013).

A espécie contém nutrientes e outros compostos biologicamente ativos, as proporções podem variar consideravelmente entre as linhagens e mesmo as plantas no mesmo campo. Os estudos revelam largas quantidades de fitoquímicos que têm sido constituintes isolados da planta, por exemplo, aesculectin, orientin, vallinin, eugenol, alcaloides, que podem ser responsáveis por vários dos seus efeitos terapêuticos (Mamun-or-Rashid et al. 2013).

As folhas de *O. sanctum* contem 0,7% de óleo volátil, cerca de 71% desse óleo e composto pelo eugenol e 20% de metil eugenol. O óleo também contém carvacrol e sesquiterpine caryophyllene e hidrocarbonetos. Folhas e caule desta planta em extrato

originaram alguns compostos fenólicos (antioxidantes) tais como cirsilineol, circimaritin, isothymusin, apigenina e ácido rosemarico e quantidades apreciáveis de eugenol (Shah-Qadry 1998; Yanpallewar et al. 2004); também tem sido isolados óxido aromadendreno, benzaldeído, borneol, acetato de bornilo, cânfora, óxido de cariofileno, cis- $\alpha$ -terpineol, Veridifloro, Cubenol, Cardinene, D-limoneno, eicosano, eucaliptol, eugenol, metil eugenol, farneseno, farnesol, furaldeído, germacreno, heptanol, humuleno, limoneno, N-butylbenzoato, ocimeno, ácido oleico, sabineno, selineno,  $\alpha$ -canfeno,  $\alpha$ -mirceno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -thujene,  $\beta$ -Guaiene,  $\beta$ -gurjuneno, metil chavicol, linalol, cirsilineol, circimaritin fitol, Isothymusin, apigenina, ácido Rosamerico, octano, nonano, benzeno, Iedol e cadineno (Vani et al. 2009; Singh et al. 2012; Kadian- Parle, 2012; Naquvi et al. 2012).

### **1.1.7 Propriedades farmacológicas de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis***

Esta planta tem sido recomendada para o tratamento de bronquite, asma brônquica, a malária, diarreia, disenteria, doenças de pele, artrite, doença ocular dolorosa, febre crônica, picada de inseto etc. Também foi sugerida a possuir atividade antifertilidade, anticâncer, anti-diabético, antifúngica, antimicrobiana, hepatoprotectiva, cardio-protector, antiemético, antiespasmódico, e atividade diaforética. Uma pesquisa científica atual revelou que a planta exibe uma atividade significativa contra o câncer reduzindo o potencial antioxidante o estresse de danos na mucosa gástrica; melhora resistência, estimula o sistema imunológico, reduz a inflamação; diminui fatores de envelhecimento; suporta o coração, pulmões e fígado (Rashid et al. 2013).

Ele tem uma ampla gama de ação sobre o corpo humano, também como aliviador da tosse, um indutor de suor e um mitigador de indigestão e anorexia. As propriedades medicinais de tulsi foram estudadas em centenas de estudos científicos, incluindo experimentos *in vitro*, animais e humanos. Estes estudos revelam que tulsi tem uma combinação única de ações que incluem: antimicrobiano (incluindo antibacteriano, antiviral, antifúngico, antiprotozoário, antipalúdico, anti-helmíntico), repelente de mosquitos, antidiarreico, anti-oxidante, anti-catarata, anti-inflamatório, quimiopreventivo, anti-hipertensivo, anti-carcinogénico, analgésico, antipirético, anti-alérgico, imunomodulador, depressor do sistema nervoso central, aumento da memória, anti-asmático, anti-tussivo, diaforetico, anti-tiroide antifertilidade, anti-úlceras, anti-emético, anti-espasmódico, anti-artrítico, anti-stress, anti-catarata. Estas ações farmacológicas ajudam o corpo e a mente a lidar com uma ampla gama de estresses químicos, físicos, infecciosos e emocionais e

restaurar a função fisiológica e psicológica (Mondal et al. 2009; Pattanayak et al. 2010; Mohan et al. 2011; Mahajan et al. 2013; Govind-Madhuri, 2014).

### **1.1.8 Propriedades inseticida de *Ocimum sanctum* L.**

Na busca por controle químico alternativo contra *Aedes aegypti* L., muitas pesquisas são desenvolvidas e estimuladas no intuito de se descobrirem novas substâncias inseticidas de origem vegetal. Num trabalho desenvolvido por Furtado e col. (2005), foi avaliado o efeito larvicida de dez óleos essenciais contra *A. aegypti*, entre eles o *O. sanctum*, determinando as concentrações letais para 50 e 90% das larvas de 3º instar de *A. aegypti* em 71,27 e 111,61 mg/mL, respectivamente.

Rathi et al. (2008) realizaram triagem fitoquímica de dez plantas com atividade inseticida, entre elas, *Adathoda vasica*, *Cynodon dactylon*, *Eclipta alba*, *Morinda pubescens*, *Ocimum tenuiflorum* (*O. sanctum*), *Phyllanthus amarus*, *Sesbania grandifolora*, *Solanum surattense*, *Solanum trilobatum* e *Vinca rosea*.

*O. sanctum* tem reportado efeito inseticida em as espécies de mosquitos *Anopheles stephensi* Liston, *Aedes aegypti* Linnaeus and *Culex quinquefasciatus* (Say) (Tawatsin et al. 2006). O óleo essencial e o seu maior constituinte eugenol são muito tóxicos contra *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* (Bhatnagar et al. 1993).

Sakthivadivel e Daniel (2008) utilizaram soluções de extrato etanólico de folhas de *O. sanctum* em concentrações até 200 ppm e verificaram o efeito larvicida para larvas de 4º estágio de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. As CL<sub>50</sub> obtidas, após 24 h de observação, para *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* ficaram entre 100 e 200 ppm. O estudo de Kamaraj et al. (2008) avaliou as propriedades larvicidas da planta *O. sanctum* da região de Chitheri Hills, Distrito de Dharmapuri, Índia. Utilizaram-se para isso os solventes acetona, clorofórmio, acetato de etilo, metanol e hexano para a produção de extratos de folhas desta planta. Os bioensaios foram realizados com larvas de 4º estágio de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. A mortalidade foi observada após 24 h de exposição. Todos os extratos apresentaram moderado efeito larvicida, no entanto, a mais elevada mortalidade larval ocorreu com a aplicação do extrato acetônico de *O. sanctum* contra as larvas de *Ae. aegypti* (CL<sub>50</sub>=81,56 ppm) e contra *Cx. quinquefasciatus* (CL<sub>50</sub>=38,30 ppm), respectivamente.



Foi comprovada a atividade repelente do eugenol o componente principal do óleo essencial de *O. sanctum* contra quatro espécies de coleópteros; *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* e *Prostephanus truncatus* (Obeng-Ofori et al. 1997).

Não tem estudos reportados sobre a atividade desta planta contra moscas.

## **1.2 Dípteros muscoides e sua importância na saúde pública**

Diversas espécies de moscas parasitam humanos e animais de criação causando irritação e levando a perdas na produção do gado; são ainda capazes de gerar doenças em ambos. Além disso, podem ser vetores mecânicos de agentes patogênicos do gado, como *Anaplasma marginale* e *Trypanosoma vivax* (Peter et al. 2005).

Moscas sinantrópicas, do tipo não picadoras e picadoras (Famílias Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae) vivem em associação ao homem e são capazes de se reproduzir em lixões e em matéria orgânica em decomposição. Devido aos seus hábitos, essas moscas podem veicular diversos microrganismos patogênicos, como vírus, bactérias e protozoários, fato que ressalta a importância do seu controle para a saúde pública. Sabe-se que a veiculação destes patógenos ocorre por meio da região externa de seu corpo (patas, asas e tórax), por regurgitação de seu alimento sobre superfícies e também por meio de suas fezes contaminadas (Greenberg 1973).

Poucos estudos haviam demonstrado o impacto positivo de medidas de controle de moscas na incidência de diarreia em países em desenvolvimento. No Japão, foi sugerida a transmissão mecânica por moscas do vírus H5N1 (subtipo do vírus influenza A), causador da gripe aviária. A revisão de Graczyk et al. 2001 mostra a importância das moscas não picadoras na transmissão de doenças infecciosas humanas, como *Chlamydia trachomatis*, bactéria causadora do tracoma, uma doença infecciosa que causa inflamação da conjuntiva, podendo levar à cegueira, principalmente em crianças na África Subsaariana. Além disso, os autores também relacionam as moscas à transmissão de infecções nosocomiais e também de enteropatógenos (Graczyk et al. 2001).

Estudo realizado na Nigéria sugeriu o envolvimento de moscas sinantrópicas na epidemiologia de helmintoses intestinais humanas. As espécies de dípteros foram expostas a fezes humanas contaminadas e foi feita análise posterior da sua superfície corporal e conteúdo intestinal, revelando a presença de ovos viáveis de *Ascaris lumbricoides*,

*Trichuris trichiura* e *Taenia* sp. (Adenusi e Adewoga 2013) em aves e humanos, contribuindo para disseminação do surto (Sawabe et al. 2011).

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

A classificação das miíases pode ser feita de duas formas, uma sob a perspectiva anatômica, baseada na parte do corpo infestada pelas larvas de moscas, e outra baseada em conceitos parasitológicos, de acordo com o tipo de relação entre o parasita e o hospedeiro (Patton 1922). De acordo com Zumpt (1965), a classificação da miíase baseada na anatomia pode ser dividida em cinco grupos: sanguinívora, dermal e subdermal, nasofaríngeal, intestinal e urogenital.

A classificação mais utilizada de miíase é baseada em conceitos da parasitologia, de acordo com o tipo de relação entre o parasita e o hospedeiro, o que auxilia no entendimento sobre a biologia da mosca. De acordo com esse conceito, existem três grupos de espécies causadoras de miíase: a parasita obrigatória, que se desenvolve em hospedeiros vivos, a parasita facultativa, que pode se desenvolver em matéria orgânica viva ou morta e que ainda pode ser subdividida em espécies primárias e secundárias. As espécies primárias conseguem iniciar a miíase e as secundárias só ocorrem após as obrigatórias ou primárias já terem iniciado a infestação. Por fim, o último grupo é denominado miíase acidental ou pseudomiíase que ocorre quando ovos ou larvas de mosca são acidentalmente ingeridos pelo hospedeiro (Zumpt 1965).

Desta forma, o interesse pelo estudo dos dípteros causadores de miíases vem crescendo em todo o continente americano, uma vez que os ataques de larvas destas espécies ao homem e aos animais é uma questão de importância médico-sanitária.

### 1.3 Ordem Diptera

A ordem Diptera possui mais de 151.000 espécies descritas, sendo a segunda maior ordem da classe Insecta, apenas sendo menos representativa que Coleoptera (Thompson 2008; Wiegmann et al. 2011). De acordo com Zhang (2013), 160.591 espécies são Diptera. Isto significa que, pelo menos, 15-20% de espécies animais conhecidas são Diptera. Porém aparentemente, esse número é subestimado, uma vez que se estima que deve ter entre 400.000 e 800.000 espécies. Alguns autores chegam a falar de 1.000.000 ou mais espécies (Zang 2013).

Essa ordem de insetos contém todas as moscas, mosquitos e mutucas de importância veterinária, se caracterizam por possuírem um par de asas funcionais. Algumas são importantes por serem ectoparasitas, enquanto em outras, são as larvas que parasitam os tecidos do hospedeiro ou por serem vetores de doenças. Todas as espécies são holometabólicas (Rafael et al. 2013). De acordo com Carvalho et al. (2012), no mundo, o número de espécies desta ordem, poder chegar a aproximadamente 400 mil, com uma estimativa de 60 mil para o Brasil. E segundo Amorim 2009, atualmente o número de espécies descritas no Brasil está em torno de 8.700, sendo um total de 31.000 reconhecidas na Região Neotropical.

Insetos pequenos ou grandes, com cabeça, tórax e abdome distintos. O mesonoto, que é o arco dorsal do segundo segmento do tórax, é desenvolvido e com um par de asas hialinas. Segundo par de asas transformado em balancins ou halteres. Há espécies ápteras. Peças bucais do tipo picador-sugador ou lambedor. Metamorfoses completas e larvas sem pernas (Mc Alpine 1987). Cabeça distinta do tórax, um par de antenas, um par de olhos compostos, um a três ocelos e o aparelho bucal. Mesotórax mais desenvolvido que o pró e o metatórax. As asas membranosas apresentam as estruturas chamadas veias, as primárias chamadas de costal (C), subcostal (Sc), rádio (R), média (M), cubital (Cu) e anal (A), cujas ramificações se conectam e formam áreas denominadas células. Às vezes apresenta junto à base da asa, na parte posterior, um lobo acessório e dobrado sobre si mesmo, a caliptra (Rafael et al. 2013).

Segundo McAlpine et al. (1981), esta ordem é dividida em duas subordens: Nematocera e Brachycera. Os nematóceros são os dípteros que possuem as antenas formadas por mais de seis artículos livremente articulados e palpos maxilares com três a cinco segmentos. Os Brachycera são os dípteros genericamente conhecidos por moscas, que se caracterizam por apresentarem corpo robusto quando comparado aos nematóceros, com

antenas formadas por três segmentos, sendo o último anelado e palpos maxilares com no máximo dois segmentos (Rafael et al. 2013).

Os Brachycera incluem, Muscidae, Calliphoridae, Sarcophagidae e outros dípteros de antenas curtas. Os Brachycera por sua vez são divididos em várias infra-ordens: Asilomorpha, Muscomorpha, Stratiomyomorpha, Tabanomorpha, Vermileonomorpha e Xylophagomorpha. Os Muscomorpha é a melhor representada em quanto a fauna sarcosaprófaga se refere. As Famílias Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae são comuns na decomposição de um corpo, tanto no estágio larval como adultos e, sendo assim, a famílias mais úteis nas provas forenses (Guarín 2005).

As moscas provavelmente desenvolveram a sinantropização (associação íntima com o ambiente modificado pelo homem) desde o início da jornada evolutiva de nossos ancestrais hominídeos, aproveitando os depósitos de restos alimentares, carcaças de animais e fezes acumuladas; com o início da domesticação dos animais também se associaram várias espécies de moscas coprófagas e sarcosaprófagas (Robinson 1996). Das numerosas espécies de dípteros, somente cerca de 20 espécies estão mais intimamente associadas ao homem nas áreas urbanas, distribuídas por 10 famílias, sendo as mais importantes as famílias Muscidae, Fanniidae, Calliphoridae e Sarcophagidae. O controle dessas moscas não é muito fácil. De um modo geral o uso exclusivo de praguicidas pode provocar o desenvolvimento da resistência aos inseticidas químicos e impactar o ambiente, contaminando o solo, a água e os alimentos. Em hospitais, restaurantes, hotéis e fábricas processadoras de alimentos os inseticidas são de uso limitado. A *M. domestica* é o exemplo clássico da espécie que desenvolveu resistência à maioria dos inseticidas químicos conhecida, além de possuir os genes necessários para o desenvolvimento de resistência aos produtos mais poderosos atuais (Kaufman et al. 2001; Learmount et al. 2002).

### **1.3.1 Família Calliphoridae**

Até o momento é representada na região Neotropical por aproximadamente 130 espécies distribuídas em 28 gêneros (Thompson 2006). São dípteros de médio a grande porte, de modo geral azulados, violáceos, esverdeados ou cúpreos, com reflexos metálicos. Calíptra bem desenvolvida, escudo podendo apresentar três faixas pretas longitudinais, pós-escutelo ausente ou pouco desenvolvido. Conhecidas popularmente como “moscas varejeiras”, as moscas da família Calliphoridae têm importante papel na natureza, participando da cadeia alimentar e da reciclagem da biomassa, podendo ainda veicular diversos agentes patogênicos

que causam enfermidades parasitárias ao homem e aos animais domésticos. Atuam como agentes mecânicos e/ou biológicos, causadores de miíases (Furusawa e Cassino 2006).

Nos adultos da família Calliphoridae, a arista é plumosa e os pelos geralmente são compridos até o ápice, sendo o pós-escutelo ausente. O mesonoto pode apresentar ou não faixas pretas longitudinais; nervura **M1+2** apresenta curva acentuada, estreitando a célula apical (James 1947).

Os califorídeos podem ser atraídos por substâncias em processo de fermentação, decomposição, sangue e feridas. Dessa forma, são encontrados em abatedouros, frigoríficos, curtumes, estábulos de gado leiteiro, aviários, feiras livres, frutos caídos, plantas em decomposição, lixo doméstico, aterros sanitários e em lixões a céu aberto (Dias 2008). Vários gêneros são de importância na medicina e medicina veterinária por serem produtores de miíases, entre as espécies destes gêneros de maior importância se acham *Cochliomyia*, *Lucilia*, *Chrysomya* e *Calliphora*.

#### **1.3.1.1 Gênero *Cochliomyia***

Dentro da família Calliphoridae o gênero *Cochliomyia* nos apresenta duas espécies muito importantes: *A Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria*. *A Cochliomyia hominivorax* é a chamada “mosca da bicheira”.

##### ***Cochliomyia macellaria***

A mosca *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) é uma das principais espécies causadoras de miíases cutâneas secundárias, comumente conhecidas por bicheiras. Sua distribuição original se limita às Américas, ocorrendo na região neotropical, desde o México até a Patagônia e, na região ártica até o sul do Canadá (Guimarães 1983). Os ovos são depositados em massas, em número que varia de 40 a 250 ovos (Hall 1995) no lixo, tecidos necrosados de ferimentos de animais, carcaças em putrefação etc. O período de pré oviposição é de 3 a 18 dias (Bishopp 1915).

São moscas azuis ou verdes metálicas com três faixas longitudinais no tórax (assim como a *C. hominivorax*) o que irá diferenciar é que a *C. macellaria* (Figura 2) terá uma particularidade, polinosidades claras no final de seu abdome, essas polinosidades também são conhecidas como manchas prateadas ou brancas e palpos maxilares reduzidos.



Figura 2. Adulto de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). Fonte <http://bugguide.net/node/view/212052>

Os registros desta espécie como causadora de miíases na América tropical devem ser atribuídos à *C. hominivorax*, pois *C. macellaria* é estrita saprófaga e se cria em abundância em carcaças. Deste modo, casos dessa espécie como causadoras de miíases são devidos a invasões secundárias. Em humanos, esta espécie pode causar miíase nosocomial (Smith 1986).

#### **1.3.1.2 Gênero *Chrysomya***

O gênero *Chrysomya* com moscas que se caracterizam por apresentarem caliptras recobertas por pêlos e pela presença de faixas púrpuras no abdome. As espécies que foram introduzidas recentemente no país e ocupam o nicho antes ocupado por *C. macellaria*, agora ausente de muitas regiões do país (Guimarães e Papavero 1999).

As espécies pertencentes ao gênero *Chrysomya* são moscas de tamanho médio (5,0-12,0mm), possuem coloração verde escura, azul metálica, cobre ou roxa. O tórax não apresenta faixas longitudinais no mesonoto. A caliptra inferior é coberta por curtos pelos e há a presença de faixas escuras nos tergitos abdominais.

O gênero contém cerca de 12 espécies originárias das regiões tropical e subtropical do velho mundo. Os adultos são considerados sinantrópicos; são ágeis e atraídos por matéria orgânica em decomposição. As larvas são saprófagas, desenvolvem-se em detritos orgânicos, tais como: fezes, carcaças de animais e também em tecido animal vivo, como parasita facultativo ou obrigatório (Oliveira-Costa et al. 2007).

Sabe-se que as relações de comércio entre os países asiáticos e o Brasil aumentaram, assim como o número de viagens internacionais de avião, fatores que podem explicar a introdução acidental de *C. megacephala* na América (Guimarães et al. 1979). Entre os anos de 1975 e 1976, vários navios com refugiados portugueses de Angola chegaram à costa

brasileira. Animais domésticos foram trazidos nos navios, como cabras, cachorros e galinhas, e tal ocorrência pode ajudar a explicar a introdução de *C. chloropyga* e *C. albiceps*, espécies que já se encontravam amplamente distribuídas no continente africano.

De acordo com Guimarães et al. (1979), as três espécies de *Chrysomya* introduzidas se dispersaram por todo o Brasil. Os autores, na época, ressaltaram a necessidade de medidas de controle dessas moscas, devido a sua rápida expansão e à vulnerabilidade das comunidades.

Espécies do gênero *Chrysomya* são consideradas moscas com alta capacidade autônoma de dispersão, facilitada pelos seus hábitos sinantrópicos. Uma vez que o movimento de dispersão das moscas pode ser aliado à mobilidade e à movimentação do ser humano, sua propagação e conquista de novos ambientes são potencializadas (Baumgartner e Greenberg 1984).

### *Chrysomya megacephala*

Sua distribuição estende-se por todo o mundo, tendo maior prevalência nas regiões orientais. Adultos de *C. megacephala* possuem coloração verde, azul ou roxa e o espiráculo torácico é escuro. As antenas e genas são amareladas (Oliveira-Costa et al. 2007); possuem um comprimento médio de 8,9 a 10 mm e são provenientes das regiões Oriental, Australiana e Paleártica (Prins 1982) (Figura 3).

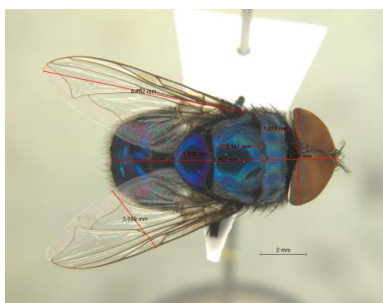


Figura 3. Adulto de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). Foto: Raquel Fernandes Silva Chagas do Nascimento.

Ocorre no Brasil. Espécie classificada por causar miíase ulcerativa de caráter facultativo. Geralmente é encontrada junto com outras espécies em uma mesma ferida, por ser causadora de miíase secundária, tendo preferência pelas bordas de ferimentos, pelo fato de estas já estarem necrosadas. Alimenta-se de carne em decomposição e fezes. Casos de miíases em humanos são relatados na literatura, tanto por causar miíase ulcerativa

(Fernandes et al. 2009), otomífase (Lee e Yong 1991) e por ser de importância na medicina forense (Chen et al. 2004).

A literatura científica ainda é escassa em relação ao controle de *C. megacephala* e não existem trabalhos científicos de revisão que discutam todas as medidas de controle utilizadas. Dentre esses poucos estudos, podemos destacar aqueles relacionados ao uso de inseticidas químicos, como os piretróides (deltametrina e permetrina) e os organofosfatos, que mostraram ter maior efeito inseticida em populações adultas de *C. megacephala* mantidas em laboratório, quando comparadas às populações coletadas em campo, consideradas sinantrópicas (Mihara e Kurahashi 1991; Sukontason et al. 2005).

Outras metodologias de controle incluem o uso de metabólitos secundários de plantas, como o óleo de eucalipto, que causa alterações ultraestruturais superficiais no tegumento larval (Sukontason et al. 2004), o uso de lignanas, como o yangambin, extraído das folhas de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) que causam inibição do desenvolvimento pós-embrionário de *C. megacephala* (Cabral et al. 2007), o uso de látex da planta *Parahancornia amapa* (Apocynaceae), que causa o mesmo tipo de efeito no desenvolvimento pós-embrionário de *C. megacephala* (Mendonça et al. 2011), e, ainda, a utilização de extrato de Neem contendo Azadiractina A, que causa diminuição na emergência dos adultos e redução da fecundidade na geração seguinte de moscas (Siriwattananarungsee et al. 2008).

### **Chrysomya putoria**

Em nível de descrição taxonômica a *Chrysomya putoria*, possui as estruturas chaves para identificação são as cerdas pró-pleuras e a cerda estigmática que se localizam na lateral do tórax do inseto (Carvalho e Ribeiro 2000). Introduzida na América Latina (Guimarães et al. 1978), porém nativa da África, com habitat da Tanzânia ao Congo (Zumpt 1965).

*Chrysomya putoria* seria idêntica à *C. chloropyga*? De acordo com Zumpt (1965), a terminália do macho de *C. chloropyga* e *C. putoria* é idêntica, mas Paterson (1977) atribuiu diferenças morfológicas nas formas estruturais do cerco, harpes e nos segmentos pré-genitais. Laurence (1988) realizou estudos com *C. putoria* e relatou na discussão de seus estudos que corrobora as conclusões de Paterson (1977) e relatou ainda que *C. chloropyga* e *C. putoria* representam duas espécies distintas, onde cada uma delas ocupa nichos ecológicos



também distintos. Wells *et al.* (2004) confirmaram a parafilia dessas duas espécies confirmando assim que são duas espécies diferentes (Figura 4).



**Figura 4. Adulto de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). Fonte: Acervo LEMEF.**

Tendo importância médica e sanitária por ser vetor mecânico de agentes patogênicos (Greenberg 1971 e 1973), também é mencionada como produtora de miíases secundárias no homem e nos animais domésticos.

#### ***Chrysomya albiceps***

É uma espécie nativa da Austrália, que se difundiram por todo o mundo. *Chrysomya albiceps* tem origem nos trópicos do Velho Mundo e foi introduzida no Brasil em 1975 e 1976, com o grande fluxo de refugiados angolanos em navios (Guimarães et al. 1983). Mosca de cor verde metálica, com espiráculo mesotorácico branco (**Figura 5**).



**Figura 5. Adulto de *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). Fonte: naturafotolocura 720 × 960**

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

É classificada como parasita causadora de miíases ulcerativas de caráter facultativo. Podem causar miíases primárias e secundárias em seres humanos, assim como em outros animais (Zumpt 1965). Causa miíase secundária em ovinos e seus hábitos alimentares variam de excrementos, lixo urbano, carne em decomposição a alimentos frescos. Em humanos, há relatos de que esta espécie causa miíases ulcerativas (Ferraz et al. 2010), nasais (James 1947), além de serem importantes também em medicina forense (Byrd-Castner 2001).

### **1.3.1.3 Gênero *Lucilia***

O gênero *Lucilia* é cosmopolita e possui 27 espécies com grande diversidade. Assim como os demais califorídeos, possui como características hábito sinantrópico, muitas espécies são saprófagas criando-se também em carcaças e organismos em decomposição, e alguns, especialmente machos, alimentam-se de néctar. Algumas de suas espécies naturais do Novo Mundo como *Lucilia eximia* (Wiedemman, 1819), sofreram um declínio populacional como resultado da invasão de outros califorídeos durante a década de 1970 (Moretti e Thyssen 2006; Gião e Godoy 2006).

O Gênero *Lucilia* pertence à família Calliphoridae, possui coloração azul ou verde metálica, podendo ter reflexos cúpricos e amarelados. Possui tamanho médio, cerca de 8 a 10 mm de comprimento. Cabeça castanho-escuro com a parafaciália coberta por uma pilosidade prateada ou amarelo-ouro. Olhos vermelho-pardacentos. Aristas longas e densamente pilosas. Tórax sem faixas longitudinais no mesonoto. Asas com o remígio sem pelos, dorsal e ventralmente (Serra-Freire e Mello 2006).

As espécies são muito semelhantes entre si e suas larvas da maioria das espécies são saprófagas. Entretanto, duas espécies atuam como principais ectoparasitas *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) e *Lucilia cuprina* e mais ocasionalmente *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758) e *Lucilia illustris* (Meigen, 1826) podem ser encontradas em miíases. Todas elas são mais comumente encontradas atuando em miíase cutânea de ovelhas, embora possam infestar outros animais e até mesmo homem e são predominantemente distribuídas pela região Paleártica e Oriental. Tem distribuição cosmopolita como é o caso de *L. cuprina* e *L. sericata* através do movimento de ovinos domésticos (Stevens e Wall 1997).

A espécie *L. eximia* foi registrada causando miíases em cães e gatos domésticos no Brasil (Ahid 2009).

### *Lucilia cuprina*

*Lucilia cuprina* é classificada por produzir miíase de caráter facultativo. Tem sua distribuição mais concentrada na África do Sul e Austrália, mas pode ser encontrada em outras partes do mundo, inclusive no Brasil. Moscas desse gênero preferem se alimentar de tecido morto, mas podem invadir tecidos vivos quando existem poucas opções (Visciarelli 2007). O mecanismo de infestação se dá por meio da deposição de ovos em cadáveres, em feridas negligenciadas e supuradas, ou ainda, em particular, sobre a lã de ovelhas que possam estar sujas com urina, fezes ou sangue. Pode causar miíase secundária em humanos (Visciarelli 2007; Francesconi- Lupi 2012). Foram relatados casos de miíase secundária humana provocados por *L. cuprina* no Rio de Janeiro, onde três pacientes que se encaminharam ao hospital para tratar de ferimentos tiveram larvas coletadas em áreas lesionadas (Figueiredo et al. 2012). Fernandes et al. (2009) relataram casos de miíase secundária humana em Goiás, também ocasionados por *L. cuprina*.

Esta espécie é caracterizada por apresentar coloração metálica com reflexos acobreados, genitália bem desenvolvida, frontália enegrecida e triângulo ocelar que possui dois pares de cerdas ocelares (Mello 1961 e 2003). De acordo com Oliveira-Costa e Queiroz (2007), o tamanho médio da mosca adulta varia de 8,0 a 10,0 mm (Figura 6).



**Figura 6. Adulto de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae).**

#### **1.3.2 Família Muscidae.**

Inclui moscas de tamanho médio, corpo cinza a amarelo escuro, algumas de cor azul a verde metálica. Compreendem os gêneros de aparelho bucal funcional, quatro faixas negras no mesonoto, 2 cerdas mesopleurais e o mesmo sim cerdas. Quarta nervura longitudinal da asa recurvada formando um cotovelo em ângulo reto (na espécie *M. domestica*). M1 geralmente curvada para a margem anterior da asa. Arista nua ou plumosa. Três estágios larvares, sendo que a larva é vermiforme e geralmente é esbranquiçada. Possui reflexos

amarelados no abdome. A larva, na extremidade anterior possui ganchos (para captar alimentos) e na posterior possui estigmas respiratórios com 1, 2 ou 3 aberturas, de acordo com a fase larvar (L1, L2, L3). A família apresenta uma subfamília Muscinae com os gêneros de interesse a *Musca domestica* (mosca doméstica), *Stomoxys calcitrans* (mosca-dos-estábulo) e *Haematobia irritans* (mosca-dos-chifres) (Ahid 2009).

#### **1.3.2.1 *Musca domestica***

*Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) é a espécie de maior interesse sanitário, atribuído ao seu caráter sinantrópico, sua abundância na região urbana, sua capacidade de desenvolver-se em vários tipos de substratos, seu alto poder reprodutivo e ao fato de ser apontada como veiculadora de patógenos ao homem e aos animais (Nakano e Leite 2000). Por isso, novas técnicas de controle têm que ser estudadas visando ao controle dessa mosca de interesse em saúde pública (Marchiori et al. 2000a).

Tem sido apontada como responsável pela transmissão de mais de 60 categorias de patógenos para o homem, animais domésticos e em cativeiro e por isso é uma espécie de grande interesse médico-sanitário. Não são parasitos obrigatórios, mas se nutre de secreções e são atraídos por feridas (Ahid 2009).

Os adultos de *M. domestica* apresentam grande capacidade de voo e têm hábitos diurnos, procurando locais bem iluminados e quentes para se estabelecerem. A mosca doméstica é atraída tanto pelo lixo e esterco como pelo leite, substâncias açucaradas, frutas e outros alimentos humanos, sendo um inseto comensal que frequenta uma série de substratos como carniças, secreções biológicas e fezes, acabam por contaminar a água e o alimento, que muitas vezes são consumidos pelo homem. Tem importância como: transporte forético de microrganismos que levam à febre tifoide, disenteria, cólera e mastite bovina, e de protozoários como *Entamoeba*, *Giardia* e helmintos como *Taenia* sp. e *Dipylidium*. Essa espécie é também veiculadora de ovos da *Dermatobia hominis* além de ser hospedeiro intermediário de endoparasitos como *Habronema* em cavalos e *Raillietina* em aves (Marchiori et al. 2003b; Ahid 2009).

As fêmeas realizam a ovipostura sobre matéria orgânica fermentável, como lixo e fezes. Os ovos são brancos, alongados e medem menos de um milímetro. A eclosão ocorre de oito a 24 horas após a postura. Assim que nasce, a larva começa a se alimentar do substrato, sofrendo duas ecdises (mudas). Após, aproximadamente, cinco dias, a larva abandona o substrato de desenvolvimento e se enterra no solo para pupar. Se o clima for

quente, o adulto estará formado em quatro ou cinco dias. O ciclo completo dura, em média, de dez a 14 dias. Nas estações frias, o período do ciclo completo pode prolongar-se por várias semanas, já que o desenvolvimento do inseto é influenciado pela temperatura. A *Musca domestica* apresenta coloração acinzentada, com quatro faixas longitudinais negras no mesotono (ITIS 2015). Ela possui o abdome de coloração creme ou amarelada e uma faixa mediana longitudinal dorsal negra (**Figura 7**).



**Figura 7. Adulto de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Fonte: [herramientas.educa.madrid.org](http://herramientas.educa.madrid.org)**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a segurança e a eficácia do óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* para o controle alternativo de dípteros muscoides das famílias Calliphoridae (*Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya putoria*, *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala* e *Lucilia cuprina*) e Muscidae (*Musca domestica*).

### 2.2. Objetivos Específicos

1. Determinar a composição química do óleo essencial de *Ocimum sanctum* var. *cubensis*;
2. Determinar os efeitos indesejáveis da ingestão e o contato do óleo essencial de *Ocimum sanctum* var. *cubensis*, através da realização dos testes de: Toxicidade Aguda Oral pelo Método das Classes, Toxicidade Dérmica Aguda e Toxicidade *in vitro* em culturas de células cardíacas;
3. Caracterizar o efeito do óleo essencial de *Ocimum sanctum* var. *cubensis* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de cinco espécies de Calliphoridae (*C. macellaria*, *C. putoria*, *C. albiceps*, *C. megacephala* e *L. cuprina*) e uma espécie de Muscidae (*M. domestica*) mediante o estudo do comportamento das variáveis de cada estágio e alterações morfológicas macroscópicas evidenciadas;
4. Determinar o efeito inseticida do óleo essencial de *Ocimum sanctum* var. *cubensis* sobre adultos de *Musca domestica*;
5. Avaliar o efeito de um unguento a 15% de óleo essencial de *Ocimum sanctum* var. *cubensis* em uma miasse suína.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

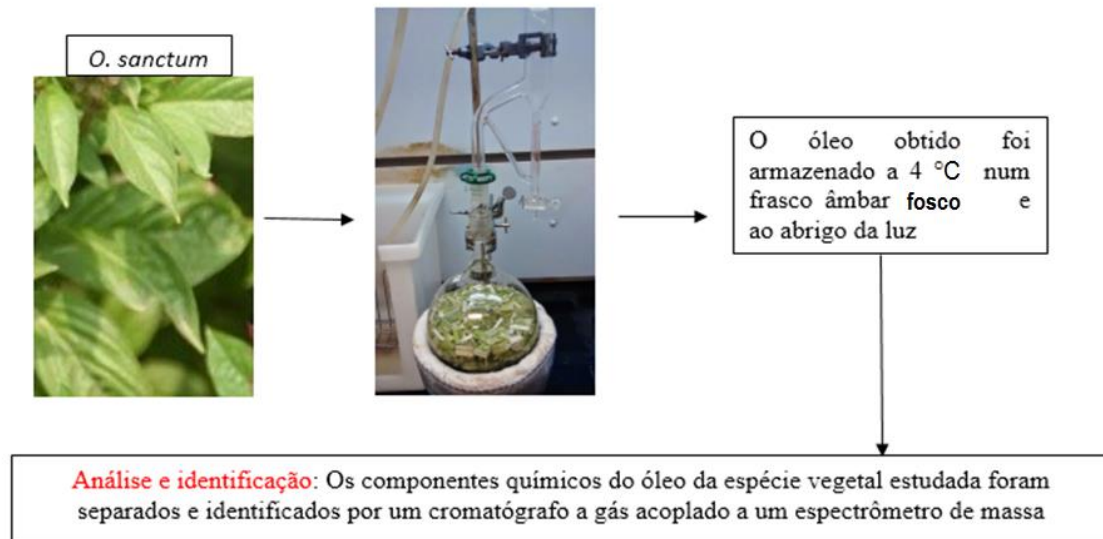
### 3.1 Material Vegetal

As folhas de *Ocimum sanctum* var. *cubensis* foram coletadas no mês de setembro do ano 2013 no município San Luis província de Santiago de Cuba, Cuba. As folhas foram identificadas por taxonomistas especializados do “*Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO)*” do Museu de Historia Natural “Tomás Romay” da Cidade de Santiago de Cuba. Este material seco também foi depositado no herbário desta instituição sob o número de registro 3247 (Anexo I).

#### 3.1.1 Obtenção e caracterização do óleo essencial

A extração do óleo: usando a armadilha Clevenger e utilizando a técnica de hidro destilação, foram removidos os óleos essenciais das partes aéreas (folhas essencialmente) de cada uma das plantas. Após a conclusão do processo de extração do óleo, que foi armazenado a 4 °C num frasco âmbar reafixável e ao abrigo da luz.

Análise e identificação: a composição química do óleo essencial foi determinada num cromatografo de gases série Mega 2 coplado a um espectrómetro de massa (GC / MS) Hewlett Packard modelo 5890 (EUA). 5MS (Agilent Technologies, EUA) de 30 m × 0,32 m e 0,25 mm de espessura - foi utilizada coluna capilar VF. O programa de temperatura foi de 60 ° C (2 min), com um aumento de 3 ° C / min até 110 °C, 15 ° C / min até 150 °C e, finalmente, com um aumento de 17 ° C / min até 290 °C. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL com uma razão de divisão de 100: 1, usando hélio como gás transportador, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL por minuto. Tanto a temperatura de entrada e o detector foram mantidas a 220 e 250 °C, respectivamente. Se utilizou um analisador de espectrometria de massa quádruplo por ionização por impacto de elétrons a 70 eV para caracterizar os compostos, identificando e comparando os seus dados espectrais de massa com a biblioteca de espectrometria de massa do National Institute of Standards and Technology e de acordo com os seus índices retenção de Kovats (**Figura 8**).



**Figura 8. Diagrama de fluxo para obtenção do óleo essencial de *Ocimum sanctum*.**

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

Todos os animais incluídos no estudo receberam água e comida *ad libitum* durante todo o período de vida. Foram mantidos em condições ambientais favoráveis com temperatura de 25°C, umidade relativa variando entre 40 e 70% e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. Os experimentos foram conduzidos seguindo as diretrizes internacionais estabelecidas para o manuseio de animais de laboratório baseadas nos princípios de redução do número de animais e refinamento no trato do mesmo. A execução dos estudos foi aprovada pelo Comitê de Ética da “*Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente – Cuba*” 1 (Anexo II) para serem realizados no “*Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED) - Cuba*” 2 centro de pesquisa credenciado para tais fins (Anexo III) e no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Para o teste de Toxicidade Aguda Oral foram utilizados seis ratos fêmeas *Sprague Dawley* (que nunca tiveram contato sexual) com idade entre cinco e seis semanas de vida e com massa corporal entre 170 e 206 gramas. No caso do teste de Toxicidade Dérmica Aguda foram utilizados dez ratos (cinco fêmeas e cinco machos) com mesma idade, também *Sprague Dawley* com massa corporal entre 200 e 300 g, fornecidos em todos os casos pelo

1 Faculdade de Ciências Naturais da Universidade de Oriente – Cuba.

2 Centro de Toxicologia e Biomedicina (TOXIMED) – Cuba.



“Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) – Cuba”  
com Certificado de Saúde N°. 08001414.

### 3.3 Provas para determinação da segurança do óleo

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

Toxicidade aguda é determinada pelos efeitos de uma única dose de uma substância muito alta. Geralmente, o ponto final do estudo é a morte do animal, expressada pela dose letal 50 (DL<sub>50</sub>), que representa mais ou menos a dose da substância que provoca a morte de 50% dos animais. A observação dos animais é realizada após a administração da substância e dura até 14 dias, após o qual os animais são sacrificados e autopsiados. Em geral, o ensaio é realizado com 5 grupos de 10 animais de cada sexo, embora haja alguns atalhos que tentam reduzir o número de animais abatidos como em nosso trabalho aplicando o princípio das 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement - Redução, refinamento e substituição).

Para determinar os possíveis efeitos tóxicos de *O. sanctum* utilizou-se a Diretriz 423 para a avaliação de substâncias químicas emitida pela Organização Para A Cooperação e o Desenvolvimento Econômico, seguindo o Método das Classes de Toxicidade Aguda (CTA) (OECD/OCDE 423, 2012) (Quadro I)

**Quadro I. Biomodelo usado e condições do ensaio de Toxicidade Aguda Oral.**

<b>ESPÉCIES / LINE</b> Rato <i>Sprague Dawley</i>	<b>NÚMERO</b> 6	<b>SEXO</b> Feminino	<b>IDADE</b> 5 – 6 sem	<b>PESO</b> 170g - 206g	<b>ÁGUA</b> Livre demanda	<b>ALIMENTOS</b> Livre demanda
<b>PROVENIÊNCIA</b> Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB)		<b>Nº CERTIFICADO SANITÁRIO</b> 00114		<b>DISTRIBUIÇÃO</b> 3 ratos x caixa	<b>CONDIÇÕES AMBIENTAIS</b> 25 °C; UR = 70%	
<b>DOSE INICIAL</b> 2 000 mg/Kg de peso corporal		<b>DOSAGEM INTERVALO (N<sub>1</sub>)</b> Dose única		<b>VIA DE ADMINISTRAÇÃO</b> Oral	<b>NÚMERO DE PASSOS</b> 1	

Este modelo permite a estimação da DL<sub>50</sub> com um intervalo de confiança e a classificação da substância de ensaio de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado, onde se estabelecem as faixas das substâncias em classes tóxicas desde: Não Classificada, Perigosa, Tóxica, Muito Tóxica e Altamente Tóxica (Tabela I).

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

Faixa da DL <sub>50</sub> (mg/Kg)	CTA	Classificação
DL <sub>50</sub> > 2000 mg/Kg de peso	CTA 5	Não Classificada
300 < DL <sub>50</sub> ≤ 2000 mg/Kg de peso	CTA 4	Perigosa
50 < DL <sub>50</sub> ≤ 300 mg/Kg de peso	CTA 3	Tóxica
5 < DL <sub>50</sub> ≤ 50 mg/Kg de peso	CTA 2	Muito Tóxica
DL <sub>50</sub> < 5 mg/Kg de peso	CTA 1	Altamente Tóxica

Os animais foram selecionados aleatoriamente e colocados em dois grupos de três ratos por caixa (Figura 9), um grupo controle e um grupo experimental tratado com o óleo. Foi retirado o alimento de todos os animais 12 horas antes de iniciar o estudo e se determinou a massa corporal momentos antes numa balança *Sartorius* de origem alemã.



**Figura 9. Ratos Sprague Dawley mantidos em condições de laboratório. Água e comida *ad libitum*, fotoperíodo 12/12, temperatura 25 °C, umidade relativa 60 ±5%.**

Ao grupo experimental foi administrada uma dose de 2000 mg/Kg com ajuda de uma sonda gástrica N° 10 Vygón de origem francesa (Figura 10). As observações clínicas dos animais realizaram-se de 2 a 4 vezes por dia, prestando atenção ao: comportamento, estado físico geral, as mucosas nasais, mudanças na pele e na pelagem, sinais que mostrassem alterações nos sistemas respiratório, circulatório, nervoso central e autônomo e a atividade somatomotora. Além de possíveis aparecimentos de sinais como tremores, convulsões, diarreia, letargia, salivação, pouco reflexo aos estímulos, sono, fotofobia e coma. Realizou-se ainda a palpação do abdômen.



**Figura 10. Administração do óleo aos ratos com ajuda de uma sonda gástrica.**

No sétimo e décimo quarto dia se determinou novamente a massa corporal dos animais. Ao chegar ao ponto final do estudo, os animais foram sacrificados de forma humanizada por administração de uma superdose do anestésico ketamina por via intraperitoneal. Posteriormente foram estudados macroscopicamente os órgãos internos.

### **3.3.2 Teste de Toxicidade Dérmica Aguda (TAD).**

De acordo com o Manual de 402 OECD, a toxicidade aguda dérmica (TAD) refere-se a efeitos adversos de um curto período de tempo após a aplicação de uma dose única de uma substância na pele. Este teste é útil para a estimativa e avaliação das características tóxicas de uma substância quando a exposição a que pode ocorrer por esta via e fornece informações sobre os riscos de saúde que podem causar exposição dérmica a curto prazo. Tais resultados podem formar a base para a classificação e rotulagem da substância e também um primeiro passo no estabelecimento de um regime de dosagem em estudos subcrônicos e outros. Eles também fornecem informações sobre a absorção cutânea da mesma e seu mecanismo de ação tóxica.

Considerada toda a informação disponível sobre a substância de ensaio antes de desenvolver o estudo: identificação, estrutura química, propriedades físico-químicas, os resultados de outro estudo de toxicidade *in vivo* ou *in vitro*, dados toxicológicos de substâncias relacionadas e utilização proposta para a protecção da saúde humana, que é tomado em conta quando se selecciona de forma adequada o teste e a dose inicial mais adequada. O limite de teste pode também ser empregado com uma única dose de pelo menos 2000 mg/Kg de peso corporal, em grupos de 5 machos e 5 fêmeas (Quadro II).

A  $DL_{50}$  é uma única dose da substância que provoca 50% de mortalidade com animais tratados quando aplicado na pele.

**Quadro II. Biomodelo usado e condições do ensaio de Toxicidade Aguda Dérmica.**

<b>ESPÉCIE/ LÍNEA</b> Rato <i>Sprague Dawley</i>	<b>NÚMERO</b> 10 (F:5 y M:5)	<b>SEXO</b> Ambos os sexos	<b>IDADE</b> 5 – 6 semanas	<b>PESO</b> 200g - 300g	<b>ÁGUA</b> Livre demanda	<b>ALIMENTOS</b> Livre demanda
<b>PROVENIÊNCIA</b> Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB)		<b>Nº CERTIFICADO SANITÁRIO</b> 00114		<b>DISTRIBUIÇÃO</b> 1 rato x caixa	<b>CONDIÇÕES AMBIENTAIS</b> 25 °C; UR = 70%	
<b>DOSE INICIAL</b> 2 000 mg/Kg de peso corporal		<b>INTERVALO DOSAGEM (N<sub>1</sub>)</b> Dose única		<b>VIA DE ADMINISTRAÇÃO</b> Dérmica		<b>NÚMERO DE PASSOS</b> 1

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

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

O Quadro III, a seguir mostra as categorias de acordo com o método de Draize para a classificação de eritema e edema.

**Quadro III. Classificação de acordo com o método de Draize para a classificação de eritema e edema.**

<b>Eritema e escara</b>	<b>Formação do edema</b>	<b>Grão</b>
Ausência de eritema	Ausência de edema	0
Eritema muito ligeiro	Edema muito ligeiro (Escassamente perceptível)	1
Eritema bem definido	Edema ligeiro (margens da área bem definida por uma de elevação dos bordes)	2
Eritema moderado a grave	Edema moderado (elevado a cerca de 1 mm)	3
Eritema grave a escara	Edema grave (elevação de mais que 1 mm, se estende além do local de exposição)	4

Uma vez transcorridos os 14 dias, os animais foram enviados ao Laboratório de Anatomia Patológica de TOXIMED, onde se realizou a eutanásia, o sacrifício humanizado foi realizado através da administração de uma sobredose intraperitoneal do anestésico ketamina. Então seguiu o estudo macroscópico todos os órgãos, incluindo a pele.

### **3.3.3 Teste de toxicidade *in vitro* em culturas de células cardíacas**

#### **3.3.3.1. Culturas de células de mamíferos**

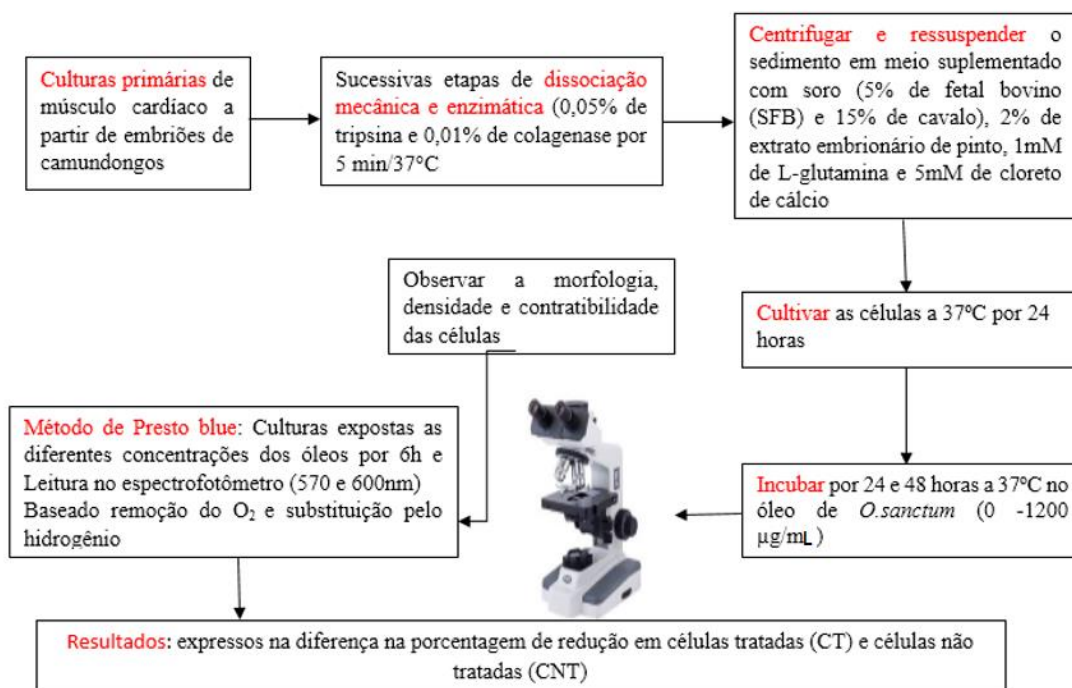
A obtenção de culturas primárias de músculo cardíaco foi realizada a partir de embriões de camundongos retirados de fêmeas grávidas com 18-20 dias de gestação. Após eutanásia das fêmeas grávidas, os corações dos embriões foram removidos e dissecados em solução salina. Os ventrículos foram submetidos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

Culturas primárias de células de mamífero foram analisadas em microscópio ótico (observação da morfologia, densidade e contratibilidade das células); as células foram cultivadas a 37°C por 24 horas e então incubadas por 24 e 48 horas a 37°C com diferentes concentrações do do óleo essencial (0 -1200 ug/mL.) diluídas em meio de cultura. Os controles foram realizados pela omissão das drogas ou pela adição de DMSO (na concentração final relativa à dose de 1200ug/mL  $\mu$ M).

O teste de viabilidade foi realizado pelo método de Presto Blue: as culturas expostas aos compostos foram incubadas com o substrato por 6h e em seguida realizada leitura no espectrofotômetro (570 e 600nm), segundo recomendação dos fabricantes e como descrito anteriormente (Timm et al. 2014). Os resultados serão expressos na diferença na

porcentagem de redução em células tratadas (CT) e células não tratadas (CNT) (Figura 11), através da seguinte equação:

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



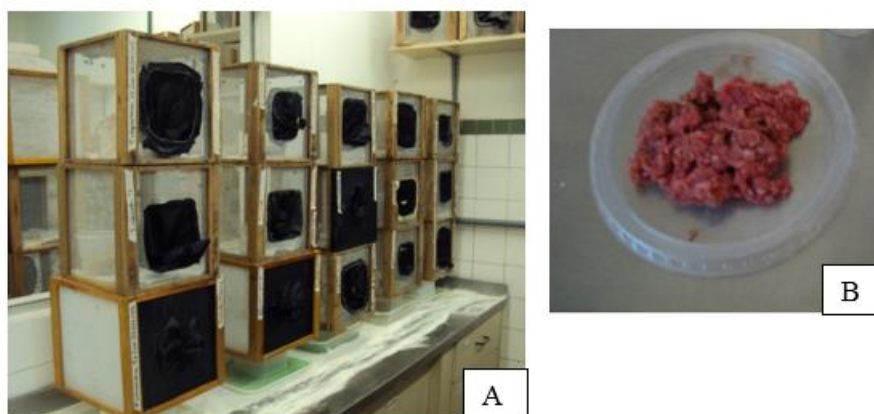
**Figura 11. Diagrama de fluxo para avaliação *in vitro* óleo essencial de *O. sanctum* sobre culturas de cardiomiócitos.**

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

A criação dos dípteros muscoides incluídos no estudo foi estabelecida a partir de adultos coletados em diferentes pontos do Brasil: Campus da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP (*C. albiceps* e *C. macellaria*), no Campus da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, no Rio de Janeiro – FIOCRUZ (*C. putoria* e *C. megacephala*) e numa caçamba de lixo encontrada no Bairro do Amorim, próximo ao campus da FIOCRUZ/RJ (*L. cuprina* e *M. domestica*). A metodologia utilizada para o estabelecimento e manutenção das colônias foi a estabelecida por Queiroz e Milward-de-Azevedo (1991), que consiste em manter os adultos em gaiolas de madeira, com telas de náilon nas laterais e uma abertura frontal contendo uma manga de tecido preto para o manuseio dos insetos, o volume da gaiola é de aproximadamente 2,7 m<sup>3</sup> (30x30x30 cm) (Figura 12A). Esta mesma metodologia preconiza

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

Os dípteros utilizados foram provenientes de novas colônias, feitas a partir da primeira geração dos adultos coletados. Para substrato de postura e maturação das fêmeas da família Calliphoridae foi oferecida carne moída putrefata (Figura 12B) e no caso especial da espécie *M. domestica*, uma mistura de carne bovina moída putrefata e farelo de trigo na proporção 5g de carne/1g de farelo, dieta preconizada no Laboratório de Entomologia Médica e Forense do Instituto Oswaldo Cruz – LEMEF/FIOCRUZ.



**Figura 12. Condições para criação e manutenção das colônias de dípteros muscoides. A: Gaiola para contenção; B: Dieta para básica para alimentação e indução da cópula e postura.**

### 3.3.5 Bioensaio de atividade inseticida em dípteros muscoides

Após aproximadamente 12 horas de induzida a postura com carne bovina putrefata em cada colônia se obtiveram quantidades suficientes de larvas em instar L1 para testar seis doses (quatro repetições com 50 larvas cada) totalizando 1600 larvas em total. As concentrações foram preparadas utilizando sulfóxido de dimetilo (DMSO) como solvente (5, 10, 25, 50, 75 e 100% de óleo essencial). Dois grupos foram utilizados como controle; em um deles só DMSO foi adicionado, e no outro, nenhuma substância foi adicionada (controle puro), sendo a aplicação feita imediatamente após a diluição.

Foram aplicados 50 $\mu$ L de cada concentração de óleo topicamente sobre 50 larvas recém-eclodidas a uma relação de 1 $\mu$ L/larva aproximadamente. Após a aplicação as larvas foram transferidas para um recipiente contendo 50g de dieta e este recipiente foi acondicionado dentro de um segundo recipiente de maior volume, contendo vermiculita

como substrato de pupação. Estes foram cobertos por tecido de náilon (escaline) preso por elástico.

Em todos os tratamentos, as pupas foram coletadas, pesadas em balança de precisão e acondicionadas três por cada tubo de ensaio, contendo até ¼ de seu volume de vermiculita e tampados com escaline, para pupação e posterior emergência dos adultos. As observações foram registradas numa planilha adequada ao desenvolvimento dos dípteros desenhada no Laboratório de Entomologia Médica e Forense (Apêndice I)

Foi calculada a viabilidade larval através da seguinte fórmula:

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

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

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

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

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

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

A mortalidade absoluta (aqueles indivíduos que não emergiram) foi calculada através da inversão da viabilidade. A mortalidade foi corrigida usando a formula de Abbott (1925).

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



$$\text{Mortalidade corrigida} = \frac{(\% \text{ Mortalidade observada} - \% \text{ Mortalidade na testemunha}) \times 100}{100 - \% \text{ Mortalidade na testemunha}}$$

O fluxo de trabalho do ensaio é mostrado na Figura 13.

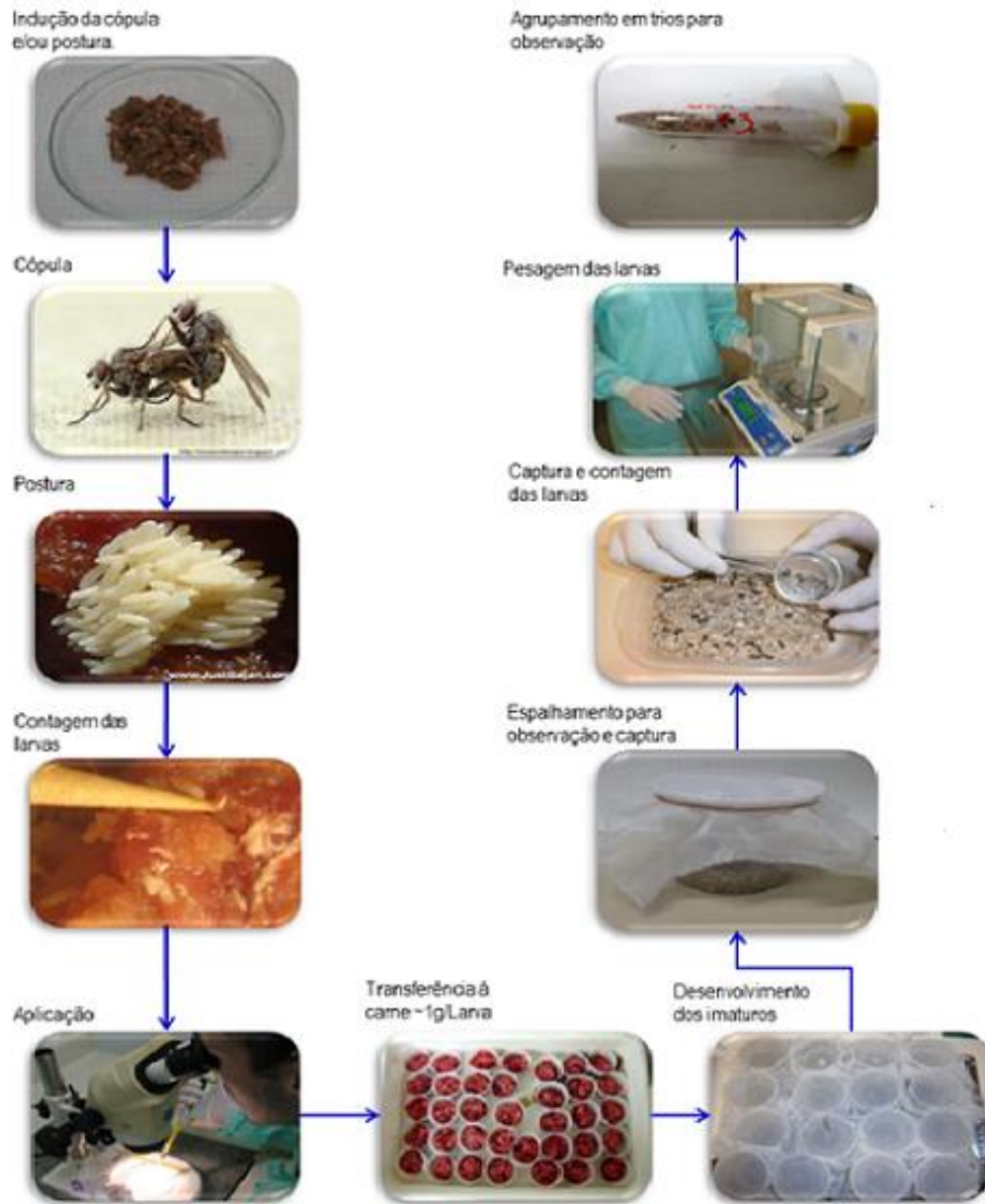


Figura 13. Fluxo de trabalho do ensaio de atividade do óleo essencial de *O. sanctum* no desenvolvimento pós-embriônico de dípteros mucoides.

### 3.3.6 Bioensaio inseticida para adultos de *Musca domestica*

Se utilizou um pedaço de papel filtro (2 × 2 cm), impregnado com 30 µL de óleo essencial de *O. sanctum* nas mesmas concentrações testadas em larvas, que inserido em um tubo Falcon (50 mL). A cada tubo, 30 adultos moscas com 15-20 dias de idade foram colocadas e os tubos foram cobertos com um tecido de nylon pressionado com a banda de borracha. Este ensaio biológico foi realizado cinco vezes e as observações para a mortalidade de adultos foram feitas até 120 minutos após a aplicação cada 10 minutos (Figura 14).

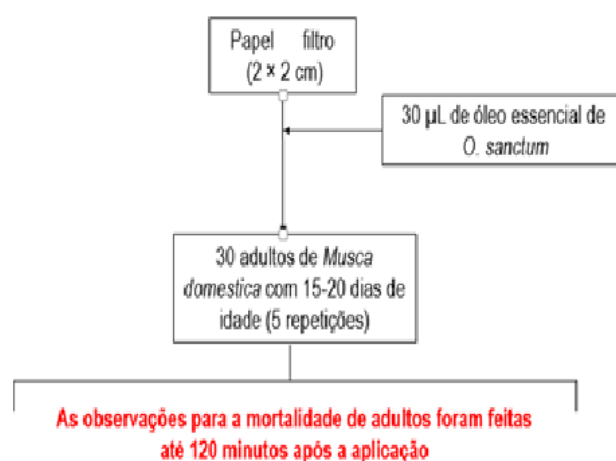


Figura 14. Diagrama de fluxo para o bioensaio inseticida para adultos de *Musca domestica*.

### 3.3.7 Avaliação de um unguento a 15% de óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis* em uma míasse suína

Desde 2 de agosto a 12 de agosto de 2016 foi realizado o estudo de um caso de miíase natural em porco na Fazenda do proprietário Juan Bautista Chil Estupiñán (15°47'30,9'' S; 47°53'06,89'' O) no município de San Luis, na província Santiago de Cuba no Oriente do Cuba. Foram coletadas algumas das larvas da miíase. Foi solicitado o preenchimento da ficha epidemiológica, com as seguintes informações sobre o hospedeiro: idade, sexo, raça, peso, local da lesão e tipo de miíase. As larvas foram acondicionadas em recipientes biológicos de 50 mL contendo um quarto de vermiculita, a seguir o material foi remetido para o Laboratório de Entomologia do departamento de Biologia da Universidade de Oriente. As larvas foram inicialmente identificadas com as chaves proposta por Florez e Wolff (Florez e Wolff 2009) e mantidas em estufas tipo B.O.D., quando ocorria a emergência dos adultos era refeita a identificação com as chaves de Mello (Mello 2003) e Guimarães e Papavero (Guimarães e Papavero, 1999). O trabalho foi supervisionado pelo Doutor em Medicina Veterinária e Zootecnia Yoandris Quintana Duany com número de licença 2329.

Depois da coleta (não se retiraram as outras larvas) foi aplicada na lesão um unguento composto de vaselina e lanolina a 15% de óleo essencial de *Ocimum sanctum*, elaborado conforme procedimento geral (Vila Jato 2001), aquecendo-se todos os componentes da fase oleosa à cerca de 70°C diminuindo a temperatura até 60°C para adicionar o óleo essencial de OS, mantendo a agitação, até resfriamento, à temperatura ambiente (30°C). O unguento foi embalado em potes de vidro de cor âmbar com capacidade para 30g, armazenados em refrigeração (8-12 °C).

Foi aplicada em outra lesão do mesmo animal a base da formulação (vasolanolina) como controle. O unguento e o controle foram aplicados duas vezes no dia no horário das 8 horas da manhã e as 16 horas da tarde, registrando o progresso da lesão antes a aplicação da tarde.

### **3.4 Obtenção, registro e análise estatística dos dados**

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

Os resultados da atividade inseticida sobre o desenvolvimento post embrionário 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 (Tukey, 1953).

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

Os resultados da atividade inseticida sobre adulto de *Musca domestica* foram analisados através da análise de Probit, os dados de concentração-mortalidade foram conduzidos para estimar os valores  $DL_{50}$  e limites associados confiança de 95% para cada tratamento usando SPSS para Windows 18.0/2009 (Finney 1971).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

### 4.1 Composição química do óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*

A análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massas permitiu conhecer a composição química e abundância relativa dos principais constituintes do óleo estudado. A **Tabela II** mostra os componentes identificados.

**Tabela II.** Componentes identificados por GC-MS no óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis*.

Nº	KI <sup>(a)</sup>	COMPOSTOS <sup>(b)</sup>	RI <sup>(c)</sup>	% ÁREA
1	960	Benzaldehído	962	0,44
2	1031	Cineol < 1,8 >	1031	0,13
3	1096	Linalool	1101	7,13
4	1359	Eugenol	1357	21,96
5	1388	Borurboneno < $\beta$ >	1375	1,25
6	1388	Cubebeno < $\beta$ >	1386	0,14
7	1390	B-elemeno	1388	1,52
8	1419	B-cariofileno	1419	20,79
9	1434	Bergamoteno < $\alpha$ -trans >	1432	0,29
10	1454	$\alpha$ -humuleno	1454	4,20
11	1460	Aromandreno < allo >	1459	1,16
12	1479	$\gamma$ -Muuroleno	1480	5,81
13	1490	$\beta$ -Selileno	1488	7,69
14	1500	Bicyclogermacreno	1496	20,38
15	1505	Bisaboleno < $\beta$ >	1510	4,12
16	1522	Cadineno < $\delta$ >	1524	0,30
17	1522	Sesquifelandreno < $\beta$ >	1531	0,20
18	1561	Germacreno B	1569	0,25
19	1582	Cariofileno oxido	1585	1,18
20	1590	Globulol	1588	1,05

(A) Índice de Kovats da Literatura; (B) Os compostos listados em ordem de eluição; (C) Índice de retenção calculada.

O carácter aromático de cada tipo de planta de manjeriço depende da genética, do seu estado de crescimento vegetativo, os fatores agroclimatológicos e compostos químicos na síntese dos óleos essenciais (Cannon et al. 2013, Kumar et al. 2014).

Os resultados mostram um óleo essencial de cor amarelo pálido com um rendimento de 0,5% (m / v). O óleo de *O. sanctum* apresenta oito componentes principais, correspondendo a mais do que 94%. Os três componentes principais, eugenol 21,96%,  $\beta$ -

cariofileno e 20,79% Bicyclogermacreno 20,37% representam mais de 60% dos compostos identificados. Os outros componentes principais correspondem a: linalol 7,13%  $\beta$ -Selileno 7,69%,  $\gamma$ -Muuroleno 5,81%  $\alpha$ -humuleno 4,20% e  $\langle\beta\rangle$  bisaboleno 4,12%. Enquanto os compostos sesquiterpenos representam 70% da composição total.

Resultados similares foram encontrados em estudos feitos ao óleo de *Ocimum tenuiflorum* L. f. (Syn. *O. sanctum* L.) cultivado na região ocidental de Cuba onde foram identificados quarenta compostos, representando 90% e Eugenol (34,3%),  $\beta$ -elemeno (18,0%)  $\beta$ -cariofileno (23,1%) foram os principais constituintes (Pino et al. 1998) e no nordeste do Brasil, determinando que o óleo da folha continha eugenol (79,0-82,7 %) e  $\beta$ -cariofileno (7,9-9,8 %) como principais constituintes (Lacerda et al.1999). Assim num estudo realizado na região sul da Índia se obteve que o l eugenol foi o principal constituinte de todos os óleos (72,5%, 75,3%, 83,7% e 65,2% nos óleos de erva inteira, folhas, caule e inflorescências, respectivamente) e o  $\beta$  - cariofileno foi o segundo constituinte mais dominante e a respectiva concentração em cada óleo (5,5%, 6,4%, 2,7% e 12,0%) (Kothari et al. 2005).

Como podemos ver independentemente da área a partir da qual essas plantas foram obtidas, os óleos essenciais sempre tem alta concentração de eugenol (21,96% em nossa pesquisa), este composto é amplamente conhecido por suas propriedades anestésicas, antiplaquetárias, antiedêmicas, anti eméticas, carminativas , antiácidas, antioxidantes, gastroprotectiva, gastrorregenerativas, bactericidas, antifúngica, antisséptico, antiviral, herbicidas, pesticidas, inseticidas, insetífugos, desparasitação, sedativo, perfumado e aromatizantes (Marotti 1996).

Todos estes compostos químicos são encontrados em concentrações elevadas frequentemente em óleos essenciais com propriedades inseticidas (Hantan e Zaki 1998). Repetidamente eugenol bem como sesquiterpenos (Koul et al. 2008) é descrito como composto inseticida em muitas espécies de insetos como *M. domestica* L e *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830).

Os insetos variam enormemente em suas respostas aos metabólitos secundários de plantas e a sensibilidade de diferentes espécies de insetos pode ser bastante diferente para a mesma substância. Além disso, os principais componentes dos óleos essenciais dentro de uma espécie de planta são diretamente afetados pela localização geográfica, estação de coleta, forma de cultivo, as condições climáticas e da idade da planta (Farias 1999).

## **4.2 Segurança da aplicabilidade do óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis***

As propriedades medicinais de *Ocimum sanctum* L. são conhecidos por milhares de anos por várias civilizações do mundo. O uso acumulado do “manjeriço” como remédio etnobotânico, em Índia, Cuba, Brasil e outros países são indícios de uma baixa ou nula toxicidade (Kirtikar 1975; Anonymous. Wealth of India 1991; Ghosh 1995; Lacerda 1999; Harsa 2003; Roig 2012).

No entanto, para amparar cientificamente a aplicação e aplicabilidade de qualquer produto, metabólito ou princípio ativo torna-se indispensável realizar testes que demonstrem sua segurança (OECD/OCDE 423 2012). É por isso que a seguir se apresentam os resultados dos efeitos provocados pelo óleo estudado ao interagir *in vitro* com células de mamíferos, ao serem administrados por via oral, bem como ao serem colocados em contato com a pele.

### **4.2.1 Toxicidade aguda oral em ratos tratados com o óleo essencial de *O. sanctum* pelo Método das Classes de Toxicidade (CTA)**

De acordo com Gad, o peso corporal é muitas vezes o parâmetro mais sensível para indicar um efeito adverso (Gad 2007). Outros autores, como Mosberg, argumentaram que os dados relativos ao peso corporal têm uma alta sensibilidade para detectar alterações devido aos produtos químicos de baixa toxicidade (Mosberg 1989), enquanto na Harvard Medical Asea, se considera que a rápida perda de peso corporal está entre os indicadores de maiores informações previstas em estudos toxicológicos (perda de cerca de 15 a 29% de peso corporal num período de cinco a sete dias) (Harvard Medical Asea 1999).

O comportamento do peso corporal dos animais do estudo não foi afetado após a administração da substância (Tabela III).

**Tabela III. Variação de peso corporal (g) dos ratos no estudo da Toxicidade Oral Aguda pelo Método de Classe Toxicidade Aguda (CTA) do óleo essencial de *Ocimum sanctum* L.**

Grupo	Animais	Sexo	Doses	Peso (gramas)			Variação de peso	
				Dia 0	Dia 7	Dia 14	D7-D0	D14-D0
Controle	1	F	-	167,4	214,7	243,6	47,3	76,2
	2			167,8	220,9	238,9	53,1	71,1
	3			166,9	227,8	253,8	60,9	86,9
Experimental	1	F	2000 mg/Kg	170,6	198,5	229,7	27,9	59,1
	2			172,2	223,6	246,7	51,4	74,5
	3			171,7	209,3	233,7	37,6	62,0

Legenda: F = feminino, D= Dia

Se observou um aumento normal de peso, sem diferenças significativas entre as médias das duas amostras para um nível de confiança de 95%, o que corresponde aos argumentos apresentados pelos padrões de referência para o uso e cuidado de animais de laboratório, em relação à espécie utilizada (Alemán 1998 e 2000; CCAC 1993).

### *Sinais clínicos*

Um indicador importante para determinar a toxicidade de uma substância consiste na avaliação das manifestações clínicas, uma vez que é possível saber danos associados com lesões de órgãos e sistemas que permitam obter resultados em alterações nas suas funções. Além disso, propõe-se que qualquer substância tóxica produz alterações anátomo-fisiológica, que se manifesta em mudanças no quadro clínico geral, e eles dependem da gravidade e extensão da lesão e de sistemas de órgãos envolvidos, duração da exposição, concentração da substância no sangue, idade e estado geral de saúde do animal (Wallace-Hayes 1994).

Os animais utilizados no teste foram mantidos sob estreita observação e avaliação clínica no prazo de 14 dias de duração, não apresentaram sinais clínicos indicativos de toxicidade durante toda a duração do ensaio. Conseqüentemente a análise no Laboratório de Patologia do TOXIMED não encontrou nenhuma alteração dos corpos.

### *Os achados de necropsia*

Nenhuma alteração patológica foi encontrada em órgãos e sistemas dos animais pertencentes ao estudo quando foi examinado no Laboratório de Patologia (Figura 15).



**Figura 15. Órgãos e sistemas de animais pertencentes ao estudo de CTA ao ser examinado no Laboratório de Patologia.**

Estudos que avaliam os efeitos tóxicos de extratos de *Ocimum sanctum* em mamíferos, principalmente para extratos aquosos e alcoólicos. Tais como Bhargava e Singh (1981) informaram uma baixa toxicidade para o extrato etanoico de *Ocimum sanctum* em camundongos adultos, estabelecendo a concentração letal em DL<sub>50</sub> de 4505 ± 80 mg/Kg e 3241 ± 71 mg/Kg por via oral ou intraperitoneal, respectivamente (Bhargava e Singh 1981). Utilizando o mesmo modelo animal, outros estudos confirmam que o extrato etanólico tem LD<sub>50</sub> de 4600 mg/Kg, enquanto o extrato aquoso foi depositado em 6200 mg/Kg (Singh e Majumdar 1994; Devi e Ganasoundari 1995). Recentemente, Gautam e Goel (2014) corroboram esta baixa toxicidade quando em doses de teste de toxicidade aguda e subaguda abaixo de 2000 mg/Kg não evidenciam quaisquer sintomas perigosos ou morte em ratos durante os 28 dias do estudo.

Sabe-se que a toxicidade dos óleos essenciais (OE) em mamíferos é baixa e são bem estudados experimental e clinicamente devido à sua utilização como medicamentos. A maioria dos OE, incluindo camomila (*Chamaemelum nobile*), citronela (*Cymbopogon* sp.), lavanda (*Lavandula angustifolia*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus*), anis (*Pimpinella anisum*) e manjerona (*Majorana hortensis*) têm um valor de DL<sub>50</sub> oral em ratos de 2000 mg/Kg a 5000 mg/Kg. Menos de uma dúzia de óleos essenciais, entre os quais se encontra o manjeriçã, têm valores de LD<sub>50</sub> variando de 1000 a 2000 mg/Kg, mas alguns são moderadamente tóxicos a muito tóxicos (Regnault-Roger 2012) . Este valor de 2000 mg/Kg foi testado em nosso trabalho e foi demonstrado que o *O. sanctum* var. *cubensis* nessa dose não é tóxico.

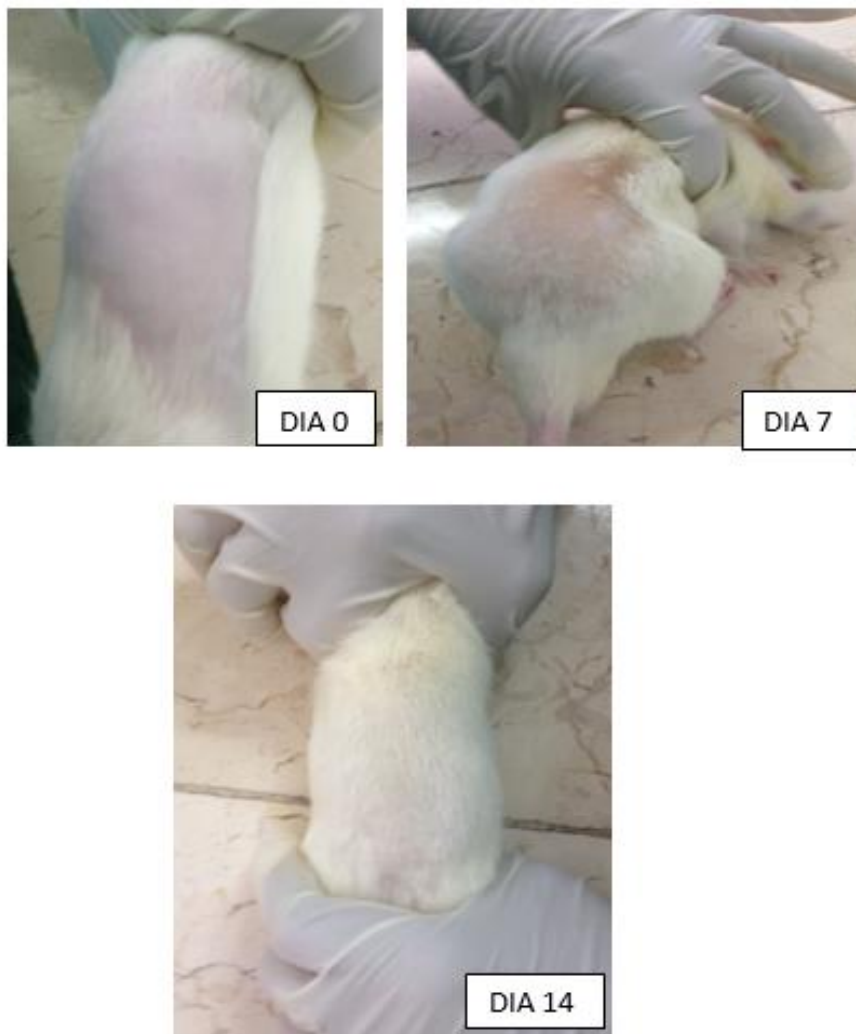


Tendo em conta estes resultados, podemos argumentar que apesar de ser o Eugenol o principal componente do óleo essencial analisado, a concentração encontrada esta substância não é suficiente para produzir alterações relatadas por alguns autores, tais como dano tecidual direto, reações alérgicas, disfunção hepática, coagulação intravascular disseminada, hipoglicemia grave, convulsões, náuseas, batimentos cardíacos rápidos e tonturas e até mesmo morte por falência múltipla dos órgãos (ACOFARMA 2008; Pavithra 2014), esta abordagem é consistente com as opiniões expressas pelo Padilla et al. 1998, quando afirma que o Eugenol pode até causar lesão cáustica ou queimaduras superficiais quando colocados diretamente e em altas concentrações nos tecidos moles, mas a gravidade da lesão é proporcional ao tempo de exposição, a dose e a concentração (Padilla et al. 1998).

Podemos concluir afirmando que o ensaio da toxicidade oral pelo Método de Toxicidade Aguda (CTA) mostrou que o óleo essencial de *O. sanctum* avaliado por via oral, dose única, é enquadrado como **não classificado**, no modelo nível de dose de animais utilizados nas condições experimentais empregadas, segundo estabelecido pela Diretriz 423 da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE).

#### **4.2.2 Potencial tóxico agudo do contato com a pele de ratos tratados com óleo de *O. sanctum* L. var. *cubensis***

A dose administrada (2000 mg/Kg de massa corporal) ao grupo experimental, não ocasionou mudanças significativas nos sinais clínicos dos ratos durante as primeiras 24 horas. Uma vez transcorrido este tempo, se procedeu a retirar os emplastos com cuidado de não ferir a pele e se lavou bem a área de aplicação não se observando nenhuma mudança aparente, e se manteve intacta. Os animais foram submetidos a uma estrita observação e valoração clínica durante todo o período do ensaio (Figura 16).



**Figura 16. Evolução dos animais no ensaio de Toxicidade Aguda dérmica.**

O comportamento da massa corporal nos ratos incluídos no estudo não foi afetado depois da administração do óleo (Tabela IV). Observou-se um incremento estatisticamente significativo entre as variâncias ( $p > 0,05\%$ ) entre os dias 0, 7 e 14. Estas diferenças significativas foram estabelecidas entre o peso corporal variações entre o dia 0, 7 e 14 para o sexo masculino; no entanto, foram observadas nas fêmeas as únicas diferenças significativas entre os dias 0 e 14. No entanto, estes resultados são consistentes com as Normas de Referência para o uso e cuidado de animais de laboratório em relação à espécie utilizada (CCAC 1993; Alemán 1998 e 2000).

**Tabela IV. Variação individual do peso corporal (g) dos ratos tratados com o óleo essencial de *O. sanctum* no ensaio de Toxicidade Aguda Dérmica.**

Grupo	Animais	Sexo	Doses	Peso (gramas)			Variação de peso	
				Dia 0	Dia 7	Dia 14	D7-D0	D14-D0
1	1	F	2000 mg/Kg	173,6	194,9	214,9	21,3	41,3
	2			200,7	216,7	236,8	16	36,1
	3			210,2	225,6	252,4	15,4	42,2
	4			214,4	229,3	242,6	14,9	28,2
	5			200,9	221,5	239,6	20,6	38,7
2	1	M	2000 mg/Kg	267,2	307,6	342,7	40,4	75,5
	2			280,3	316,3	361,6	36	81,3
	3			280,6	322,4	346,1	41,8	65,5
	4			242,6	287,6	329,3	45	86,7
	5			281,2	319,3	358,8	38,1	77,6

Legenda: F = feminino, M = Masculino, D= Dia

Nos exames realizados pelo Laboratório de Anatomia Patológica não foi encontrada nenhuma alteração anatomopatológica nos órgãos e sistemas dos animais quando analisados macroscopicamente os seguintes órgãos: coração, pulmões, rins, fígado, estômago, baço e pele.

Também não foi observado nenhum sinal clínico atribuído à administração do óleo essencial e *O. sanctum* (Figura 17).



**Figura 17. Órgãos e sistemas dos animais estudados na TAD sem nenhuma alteração anatomopatológica encontrada.**

Com alguns óleos essenciais ou, pelo menos, com os monoterpenos que os constituem, observou-se toxicidade dérmica, dentre eles o cravo-da-índia, o eucalipto, o gaivérico (*Gaultheria procumbens*), conhecidos pela sua irritabilidade (Hammer e Carson 1999). Os óleos essenciais de bergamota e angelica (*Angelica archangelica*) causam

fotossensibilidade (Bakkali et al. 2008) , o D-limoneno produz absorção transdérmica muito irritante (Okabe et al. 1990) o óleo da árvore do chá pode causar alergias cutâneas (Rubel et al. 1998; Rutherford et al. 2007).

Este resultado corrobora a afirmação feita anteriormente, que a concentração de eugenol presente no óleo não é o suficiente para causar lesões cáusticas ou queimaduras superficiais quando colocada diretamente sobre a pele.

Como resultado do ensaio de Toxicidade Dérmica Aguda, dos animais tratados com o óleo essencial de *O. sanctum* que foi realizado segundo a Diretriz N° 402 da Organização para a Cooperação Econômica e o Desenvolvimento (OECD), este óleo é classificado como **Não Tóxico** para a pele, após aplicação tópica em dose única nos ratos da linha *Sprague- Dawley*. Este resultado obtido indica que o óleo pode ser considerado inócuo topicamente por não ser tóxico ao contato com a pele.

#### **4.2.3 Teste de toxicidade *in vitro* em culturas de células cardíacas**

Os resultados apresentados refletem a média e desvio padrão de três ensaios individuais (realizados em triplicatas). A análise da toxidade sobre cultivo primário de cardiomiocitos avaliou a toxicidade do óleo essencial de *O. sanctum* L. var *cubensis* com a finalidade de verificar o perfil de viabilidade celular através de ensaio que identificação danos em nível mitocondrial. O teste identifica o potencial citotóxico dos extratos pela medida da metabolização celular pelo método do Presto Blue: o princípio do ensaio é a reação de oxi-redução (REDOX) através sistema de transporte de elétrons (remoção do oxigênio e substituição pelo hidrogênio) e citocromos (Xu et al. 2015).

Os conjuntos de dados revelam nenhuma toxicidade em relação a alterações morfológicas, fisiológicas e de densidade celular, tão bem como, de viabilidade mitocondrial das frações testadas e nos tempos de 24, 48 e 72h de incubação (Tabela V).

**Tabela V. Comportamento da viabilidade de células cardíacas após tratamento com o óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis*.**

Substância	24 h	48 h	72 h
Controle	0,00± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1200 mg/mL	5,22 ± 0,03	5,09 ± 0,33	4,84 ± 3,65
600 mg/mL	0,56 ± 0,01	0,49 ± 0,49	0,31 ± 0,09
300 mg/mL	0,05 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
150 mg/mL	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,09	0,00 ± 0,00
DMSO	6,83 ± 0,05	2,04 ± 1,18	5,68± 0,00

### **4.3 Avaliação da atividade inseticida do óleo essenciais de *O. sanctus* L. var. *cubensis* em cinco espécies de Calliphoridae (*Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya putoria*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps* e *Lucilia cuprina*) e *Musca domestica* (Muscidae): parâmetros determinantes e significação.**

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

#### **4.3.1 Efeitos do tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Cochliomyia macellaria*.**

Os valores determinados de massa corporal das larvas maduras de *C. macellaria* ao abandonarem a dieta para pupar estão representadas na Tabela VI. Observou-se que somente os grupos controles não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre eles, uma vez aplicado o teste de comparação múltipla de médias de Tukey ( $p < 0,01$ ). De forma geral, todos os tratamentos mostraram valores de massa corporal menores quando comparadas com o grupo controle.

Cunha-e-Silva e Milward-de-Azevedo (1994) obtiveram peso médio de 0,056g, em larvas de *C. macellaria*, quando criadas em carne equina, peso muito parecido ao presente trabalho para as larvas dos grupos controles, o que sugere a influência do óleo aplicado na

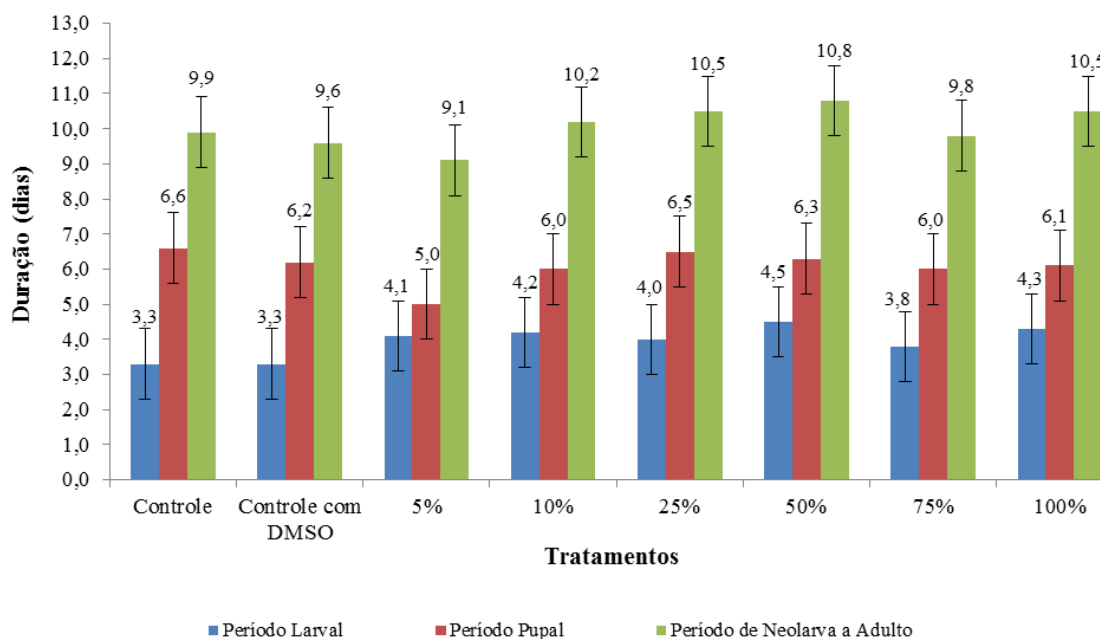
redução do peso das larvas tratadas. Alguns autores referem se a ação tóxica, repelente e/ou antialimentar dos extratos obtidos de plantas, por exemplo, os extratos de nim atuam como inseticida, que no sentido da própria palavra, causa a morte do inseto por intoxicação, e podem agir também como antialimentar ou seja inibe o inseto a iniciar a alimentação (Kathrina e Antonio 2004).

**Tabela VI. Efeito sobre a massa corporal das larvas de *Cochliomyia macellaria* após o tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.**

Tratamentos	Massa larval Média ±DP (mg)	Intervalo de variação da massa larval (mg)
Controle puro	54,4 ± 7,7 <sup>a</sup>	33,4 – 78,7
Controle com DMSO	55,1 ± 16,2 <sup>a</sup>	36,3 – 82,2
Óleo 5%	46,0 ± 4,2 <sup>b</sup>	35,7 – 53,6
Óleo 10%	34,5 ± 7,4 <sup>c</sup>	23,7 – 47,7
Óleo 25%	47,9 ± 9,2 <sup>b</sup>	26,0 – 54,4
Óleo 50%	31,2 ± 6,3 <sup>c</sup>	19,5 – 48,4
Óleo 75%	49,5 ± 7,1 <sup>b</sup>	28,0 – 59,8
Óleo 100%	46,5 ± 5,9 <sup>b</sup>	36,8 – 56,0

Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo Teste de Tukey,  $p < 0,05$ . **DP:** Desvio padrão; **mg:** miligramas.

A análise da duração dos estágios larval e pupal, assim como do período de neolarva - adulto evidenciou primeiro que no estágio larval houve um comportamento que estabelece uma diferença entre os grupos tratados e os grupos controles (Figura 18). Foi possível observar neste período que existem diferenças estatisticamente significativas para todas as concentrações quando aplicado o teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). Sendo maiores o período de desenvolvimento larval (4-5 dias) para os grupos tratados em quanto comparado aos controles (3-4 dias).



**Figura 18.** Efeito do óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* sobre o tempo de desenvolvimento de *Cochliomyia macellaria*.

Este comportamento pode estar relacionado com o fato de que as larvas tratadas com o óleo essencial foram mais leves, ou seja que a substância aplicada de alguma forma influenciou a pouca assimilação de nutrientes pelas larvas o que provocou a demora maior para passar ao estágio de pupa. Vale ressaltar que a nutrição larval exerce uma forte influência sobre o tamanho dos adultos, existindo uma correlação direta entre o tamanho do adulto e a taxa de oviposição (Thomas 1993). Este tempo de desenvolvimento larval obtido para os grupos controles é similar ao observado por Silva et al. (2012) para esta espécie de moscas quando determinaram um período larval médio de  $4,17 \pm 0,13$  dias.

No estágio pupal o comportamento apresentou também diferenças, o controle puro apresentou diferenças estatísticas com todos os grupos tratados, sendo maior o período médio de desenvolvimento quanto comparado com os tratamentos, sendo este período entre 6-7 dias para o controle puro e entre 5-7 dias para os grupos tratados. Alguns inseticidas botânicos podem agir no sistema neuroendócrino, interferindo nos processos normais de metamorfose, sendo denominados de reguladores de crescimento (Kathrina e Antonio 2004).

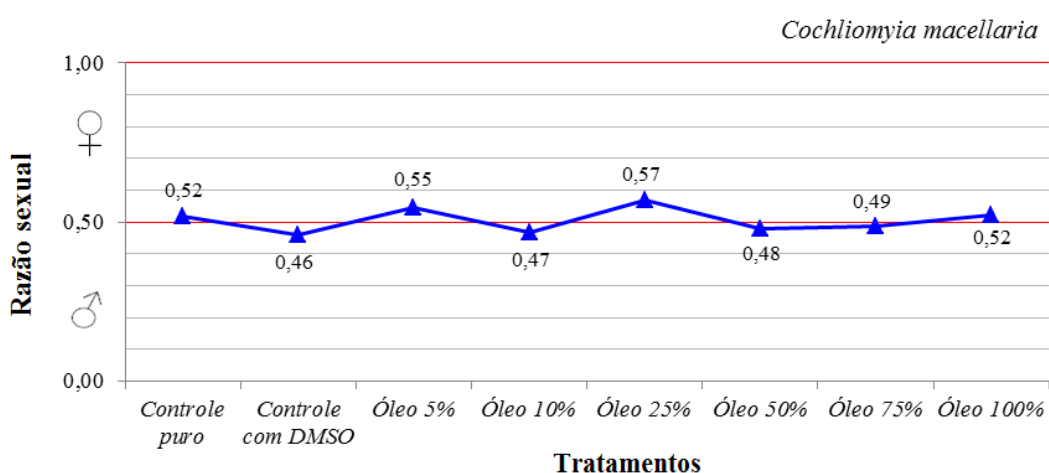
Quando se comparou este resultado com aqueles da literatura, foi possível constatar que o comportamento irregular evidenciado na duração do estágio larval já foi evidenciado por outros autores, como por exemplo, Khater e Khater (2009) ao avaliarem a atividade inseticida de quatro plantas medicinais contra *L. sericata* (Diptera: Calliphoridae), concluíram que alguns extratos de plantas podem causar anomalias em larvas e pupas,

associando este comportamento a possíveis distúrbios ocasionados no sistema endócrino que poderia interferir nos processos fisiológicos ligados à metamorfose.

Ao analisar o período completo de neolarva a adulto, foi observado que todos os grupos tratados, diferiram estatisticamente de forma significativa quando comparados com o grupo controle puro ao realizar o teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). O grupo tratado com o óleo ao 5% apresentou um valor médio menor que o grupo controle puro, e os outros grupos tratados apresentaram valores médios maiores o que demonstra a influência deste óleo no desenvolvimento desta espécie de mosca.

Em todos os casos se obteve um período maior de desenvolvimento que o obtido por Silva et al. (2012), que notaram que o período total de desenvolvimento de *C. macellaria*, criadas em dieta de carne bovina em condições controladas (30°C dia/ 28°C noite, 70±10% UR e 12h de fotofase) foi de  $8,16 \pm 0,054$  dias, o que pode indicar que o óleo essencial de *O. sanctum* pode atuar como um regulador de crescimento nesta espécie.

Em relação ao parâmetro de razão sexual, nenhuma diferença estatística foi encontrada, de acordo com o teste do qui-quadrado. Desta forma, a utilização deste óleo essencial não tem uma influência nesta variável biológica. Pode se observar na Figura 19, que todos os grupos tratados tiveram um comportamento bastante estável, com valores de razão sexual próximos a 0,5 e na mesma faixa que o grupo controle como estabelecido por Fisher (1930).

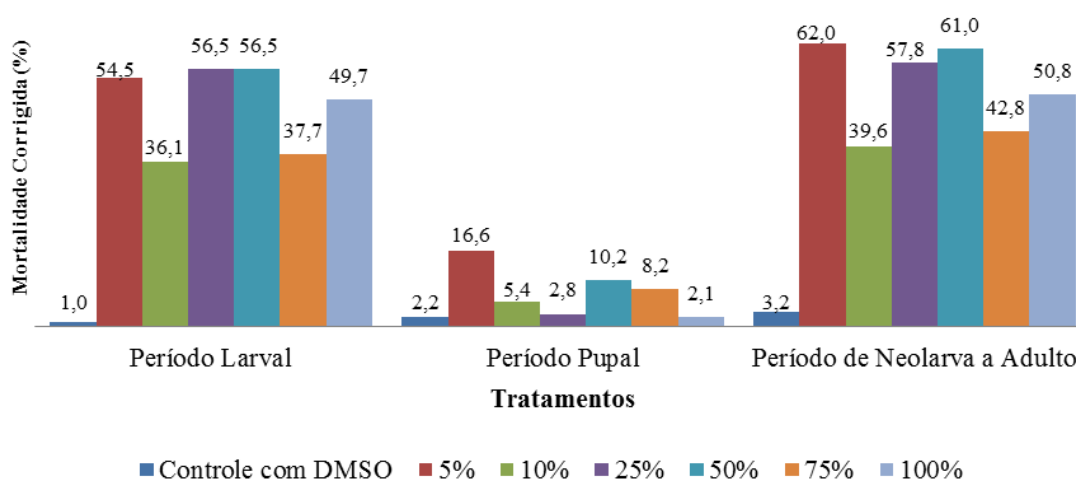


**Figura 19. Razão sexual de *Cochliomyia macellaria* após o tratamento com o óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis*.**



Os resultados do presente estudo corroboram o estudo realizado por Silva et al. (2010) ao testarem o extrato etanólico do caule de *C. linearifolius* em *C. macellaria* no qual não observaram variações nos índices de razão sexual (Controle: 1,52/1, 20mg/mL: 1,2/1, 40mg/mL:1,03/1 e 60mg/mL: 1/1,15) em nenhuma das concentrações quando comparadas com o grupo controle. O mesmo que foi achado por Dutok (2015) ao avaliar o comportamento da razão sexual desta espécie após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*.

Foram observados efeitos de mortalidade maiores que 39% com a aplicação do óleo de *O. sanctum* em todas as concentrações testadas (Figura 20), não se observando relação dose/efeito.



**Figura 20. Mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto de *Cochliomyia macellaria* após o tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.**

Na fase de larva, se observem valores de mortalidade corrigida próxima ao 50% para a maioria das concentrações, as mais eficazes foram: 50% e 25% (56,5% de mortalidade), 5% (54,5%), e 100% (49,7%). A mortalidade durante o período de pupa foi muito menor do que no período de larvas, para todas as concentrações, sendo ligeiramente apreciável para as concentrações 5% (16,6%), 50% (10,2%) e 75% (8,2%).

Em todos os casos se obtiver valores de mortalidade corrigida superiores ao 39% quando se analisou o período de neolarva até adulto. Os grupos com maiores concentrações de óleo essencial não sempre foram mais eficazes do que os grupos com menores concentrações. As maiores mortalidades foram para 5% (62%), 50% (61%), 25% (57,8%) e 100% (50,8%). A possibilidade do efeito do DMSO ajuda a explicar este comportamento

particular. Em 2006, Notman et al. relataram que o DMSO é capaz de induzir poros na membrana, enquanto Andrey et al. 2007 referem que esta substância pode desbastar a expansão de uma bicamada de fosfolípidios aumentando a sua fluidez. Este núcleo hidrofóbico pode explicar porque DMSO promove a permeação de solutos, particularmente em entidades hidrofóbicas. Mesmo assim; e a despeito de qualquer explicação teórica, o óleo essencial em todas as concentrações testadas a provou ser eficaz contra o desenvolvimento de insetos e em especial nesta espécie de mosca.

Quando comparamos o efeito do óleo essencial de OS com estudos realizados nesta mesma espécie observamos no mesmo que Dutok em 2015, que existe um efeito agudo que causa a mortalidade no estágio larval, com uma transcendência menos influente no estágio pupal, assim como do período neolarva a adulto. Neste estudo onde se avaliou a Mortalidade (absoluta) larval, pupal e do período neolarva-adulto de *Cochliomyia macellaria* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* obtive se que todos os tratamentos possuem mortalidades para o período neolarva a adulto acima de 60%, mais a mortalidade do grupo controle também foi alta, a diferença de nosso estudo onde as mortalidades dos grupos controles não são apreciáveis como se pode observar na Tabela VII.

**Tabela VII. Mortalidade absoluta e mortalidade corrigida, pela fórmula de Abbott (1925), dos estágios de desenvolvimento de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum sanctum* var. *cubensis*.**

Tratamentos	Período Larval		Período Pupal		Período de Neolarva a Adulto	
	Absoluta (%)	Corrigida (%)	Absoluta (%)	Corrigida (%)	Absoluta (%)	Corrigida (%)
Controle	4,5	-	2,1	-	6,5	-
Controle com DMSO	5,5	1,0	4,2	2,2	9,5	3,2
5%	56,5	54,5	18,4	16,6	64,5	62,0
10%	39,0	36,1	7,4	5,4	43,5	39,6
25%	58,5	56,5	4,8	2,8	60,5	57,8
50%	58,5	56,5	12,0	10,2	63,5	61,0
75%	50,5	37,7	10,1	8,2	46,5	42,8
100%	52,0	49,7	4,2	2,1	54,0	50,8

#### 4.3.2 Efeitos do tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya putoria*

O peso das larvas foi afetado diretamente pelo óleo essencial de manjeriço. Larvas de grupos de controle ( $36,5 \pm 10,17$  e  $34,7 \pm 5,24$  mg, controle puro e com DMSO,

respectivamente) foram mais leves do que as larvas tratadas com óleo essencial de *O. sanctum* em todas as concentrações (todas acima de 50 mg), com diferenças altamente significativas ( $p < 0,001$ ). A utilização de óleo essencial de manjerição além de reduzir o período de larvas (Tabela VIII) também causou as larvas a ganhar mais peso num tempo mais curto.

**Tabela VIII. Efeito sobre a massa corporal das larvas de *Chrysomya putoria* após o tratamento com o óleo essenciais de *O. sanctum* L. var. *cubensis*.**

Tratamentos	Massa larval Média $\pm$ DP (mg)	Intervalo de variação da massa larval (mg)
Controle puro	36,59 $\pm$ 10,17 <sup>a</sup>	14,0 – 55,0
Controle com DMSO	34,71 $\pm$ 5,24 <sup>a</sup>	15,0 – 47,7
Óleo 5%	52,58 $\pm$ 4,65 <sup>b</sup>	29,2 – 63,6
Óleo 10%	54,85 $\pm$ 4,38 <sup>b</sup>	44,0 – 69,0
Óleo 25%	53,30 $\pm$ 5,45 <sup>b</sup>	38,0 – 64,0
Óleo 50%	52,95 $\pm$ 4,44 <sup>b</sup>	37,0 – 67,2
Óleo 75%	54,35 $\pm$ 3,43 <sup>b</sup>	38,2 – 65,6
Óleo 100%	54,44 $\pm$ 7,63 <sup>b</sup>	26,0 – 57,0

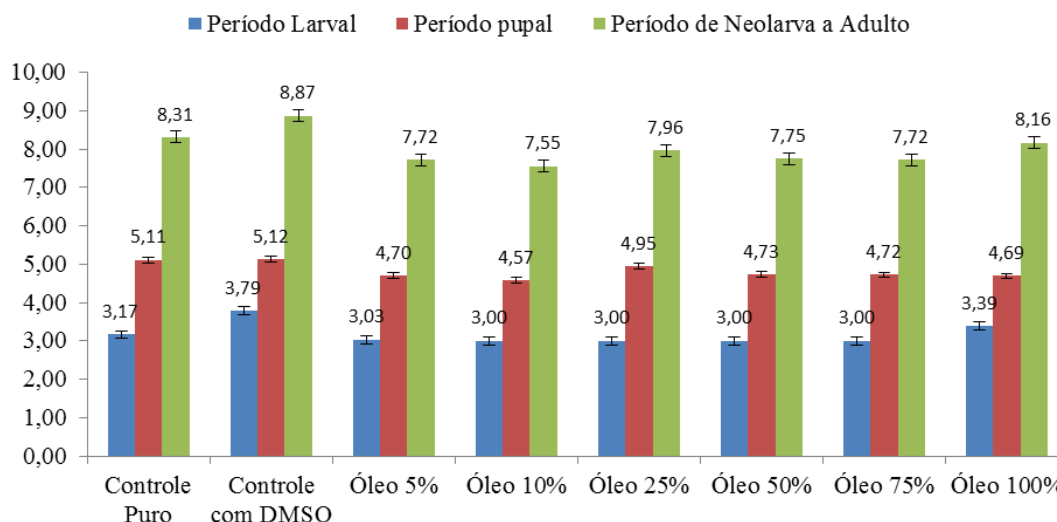
Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo Teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

DP: Desvio padrão; mg: miligramas.

Isto também foi observado por Carriço et al. (2014) quando se utilizou extrato aquoso bruto de *P. sapota* nas mesmas espécies varejeiras. Além disso, Carvalho et al. (2012) ao testarem os efeitos da cocaína sobre a taxa de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e *Chrysomya putoria*, encontrou os mesmos efeitos. Eles consideraram que este desempenho foi devido a algum efeito sobre o sistema endócrino das moscas; isso também poderia ser a causa deste comportamento particular em nosso estudo.

As seis concentrações avaliadas afetaram o tempo de desenvolvimento (**Figura 21**). Neste estudo, todas as concentrações do óleo essencial *O. sanctum* mostrou uma diminuição significativa na duração do período de larval de *C. putoria* quando comparado com o grupo controle puro e controle com DMSO. É aceito internacionalmente que o período larval é o mais importante no ciclo de vida da mosca varejeira. Isto é, quando as larvas ingerem tanta comida quanto possível no menor intervalo de tempo (Goodbrod e Goff 1990). Além disso, as larvas permanecem na dieta por um tempo mais curto se a quantidade e a qualidade dos nutrientes são suficientes para a pupação e atingem o peso mínimo necessário para pupação (Santos e Borja 1997). No entanto, as condições padrão em que todos os grupos experimentais e de controle foram realizados nos permitiu deduzir que os efeitos observados eram devido ao efeito do óleo essencial de OS. Carriço et al. (2014) testaram os efeitos

larvicida de um extrato bruto aquoso de *Pouteria sapota* (Jacq.) (Sapotaceae) na mesma espécie de mosca varejeira, usado neste estudo e também encontraram uma diminuição da duração do período larval.



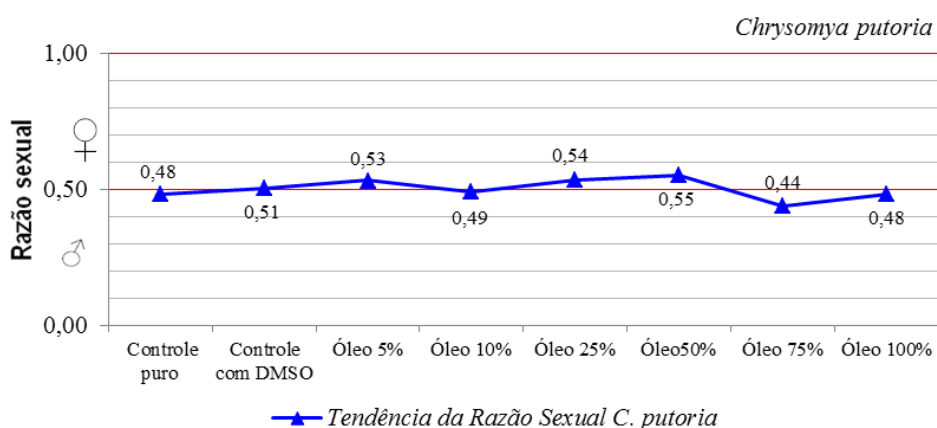
**Figura 21. Duração dos estágios larval e pupal, assim como do período de neolarva-adulto (dias) de *Chrysomya putoria* após o tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.**

A duração do período de pupa também foi significativamente mais baixa para os insetos tratados com todas as concentrações de óleo essencial, quando comparado com os grupos de controle, exceto para o grupo de 25%. O estágio de pupa é quando as mais importantes alterações hormonais estão ocorrendo em insetos holometábolos, como as moscas varejeiras. Cabral et al. (2007) sugeriram que os compostos extraídos de plantas e testados para o controle de insetos pode modificar processos fisiológicos específicos, tais como o controle endócrino do crescimento de insetos, o sistema neuroendócrino ou a produção de alguns hormônios. O óleo essencial de *O. sanctum* poderia estar, de alguma forma, afetando esses processos fisiológicos. Kostyukovsky et al. (2002) afirmaram que os tratamentos com óleos essenciais ou seus constituintes purificados resultou em sintomas visíveis que apontavam para um modo neurotóxico de ação, semelhantes aos produzidos por organofosforados e carbamatos.

Alguns autores observaram que os terpenos dos óleos essenciais têm sido mostrados como inibidores competitivos da acetilcolinesterase isolada a partir de enguias elétricas, bem como colinesterase isolada de mosca doméstica e de cabeças de barata (Ryan e Byrne 1988).

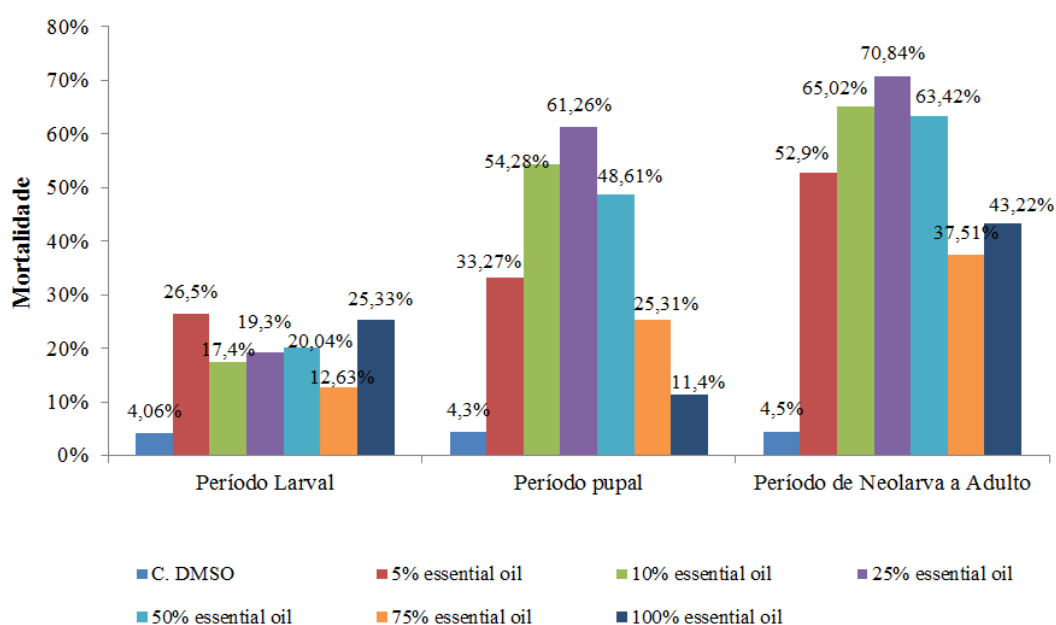
O período de neolarvas até adultos ou o período de desenvolvimento completo é o parâmetro mais eficaz para avaliar a eficácia de substâncias como um inseticida, pois evita distorções entre os períodos de larva e pupa (d'Almeida et al. 2001). De acordo com a Figura 21, a concentração mais elevada afetou essa variável menos que os limites inferiores, o que não é usual. Uma possível explicação para este fato é a de considerar a natureza da substância aplicada. Neste caso particular, a aplicação de um óleo essencial puro torna-o mais susceptível à evaporação sob condições de laboratório do que quando dissoluções em DMSO são usadas. Assim, as larvas tratadas com concentrações mais baixas poderiam estar em contato com a substância testada por longos períodos de tempo, ao passo que as concentrações mais elevadas podem perder as substâncias ativas por meio de evaporação. Outra possibilidade pode estar relacionada com a utilização de DMSO. Alguns autores sugeriram a capacidade de DMSO para aumentar a permeabilidade da membrana. A possibilidade do efeito DMSO novamente ajuda a explicar este comportamento particular, mas é claro que o óleo essencial de *O. sanctum* tem um marcado efeito sobre esta espécie de mosca.

Em relação ao parâmetro de razão sexual, nenhuma diferença estatística foi encontrada, de acordo com o teste do qui-quadrado. Desta forma, a utilização deste óleo essencial não tem uma influência medida nesta variável biológica (figura 22).



**Figura 22.** Razão sexual de *Chrysomya putoria* após o tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.

Foram observados efeitos de mortalidade de óleo de OS em todas as concentrações testadas. Na fase de larva, a concentração mais eficaz de o óleo essencial foi de 5% e menos eficaz foi a concentração de 75%. A mortalidade durante o período de pupa foi maior do que no período de larvas, para todas as concentrações, exceto para o grupo tratado com óleo essencial de 100% e o mesmo foi observado para a o período de neolarva até adulto (Figura 23). A maior mortalidade nesta fase foi com óleo essencial de 25%. Mais uma vez, os grupos com maiores concentrações de óleo essencial foram menos eficazes do que os grupos com menores concentrações. A possibilidade de a evaporação do óleo essencial e/ou o efeito DMSO novamente ajuda a explicar este comportamento particular.



**Figura 23. Mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto de *Chrysomya putoria* após o tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.**

Quando comparamos nossos resultados com os obtidos por outros autores como Pinto (2014) quando comparou a mortalidade (%) dos estágios pós-embrionários de *Chrysomya putoria* (Diptera: Caliphoridae), tratados com óleo essencial de *Pinus caribaea* Morelet coletado no Brasil observamos que o óleo de OS foi muito mais efetivo nesta espécie que o óleo de *Pinus*, já que este atingiu valores de mortalidade absoluta no período de neolarva até adulto entre 35 e 58% e o OS superou estes valores como pode observar-se na Tabela IX.

**Tabela IX. Mortalidade absoluta e mortalidade corrigida, pela fórmula de Abbott (1925), dos estágios de desenvolvimento de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum sanctum* var. *cubensis*.**

Tratamentos	Período Larval		Período Pupal		Período de Neolarva a Adulto	
	Absoluta (%)	Corrigida (%)	Absoluta (%)	Corrigida (%)	Absoluta (%)	Corrigida (%)
Controle	6,4	-	3,1	-	7,5	-
Controle com DMSO	7,50	4,06	6,20	4,30	11,30	4,50
5%	37,50	26,50	35,40	33,27	66,50	52,90
10%	29,00	17,40	67,40	54,8	73,70	65,02
25%	38,50	19,30	74,80	61,6	81,40	70,84
50%	48,40	20,04	62,00	48,61	74,10	63,42
75%	30,70	12,63	34,30	25,31	49,30	37,51
100%	32,80	25,33	25,20	11,40	58,60	43,22

Além de todas as modificações do ciclo pós-embriônico, *O. sanctum* também causou alterações morfológicas em adultos cujas larvas foram tratadas com concentrações 5% e 10%. No grupo tratado com 5%, de um total de 92 moscas que emergiram como adultos 13,04% (12 moscas) resulta em algum tipo de alteração morfológica; enquanto que para o segundo grupo (10% do óleo essencial) 7 moscas de 67 (10,44%) aparecem com também com alguma deficiência. Este comportamento aparece apenas nos grupos tratados com concentrações menores, indicando como o tóxico pode ser o óleo essencial para o ciclo pós-embriônico desta mosca desde que quando; se não é capaz de matar, produz alguma alteração que afete o seu desenvolvimento normal. As alterações morfológicas mais comuns encontradas foram uma contração do abdômen, ptilinum não retraída, e asas torcidas (Figura 24A e Figura 24B). Todos os insetos do grupo controle foram normais (Figura 24). As alterações morfológicas afetaram diretamente a capacidade de voar, e, conseqüentemente, para encontrar comida e se reproduzir. Assim, estes resultados demonstraram que o óleo essencial de *O. sanctum* pode representar um método alternativo eficaz para controlar as moscas varejeiras.

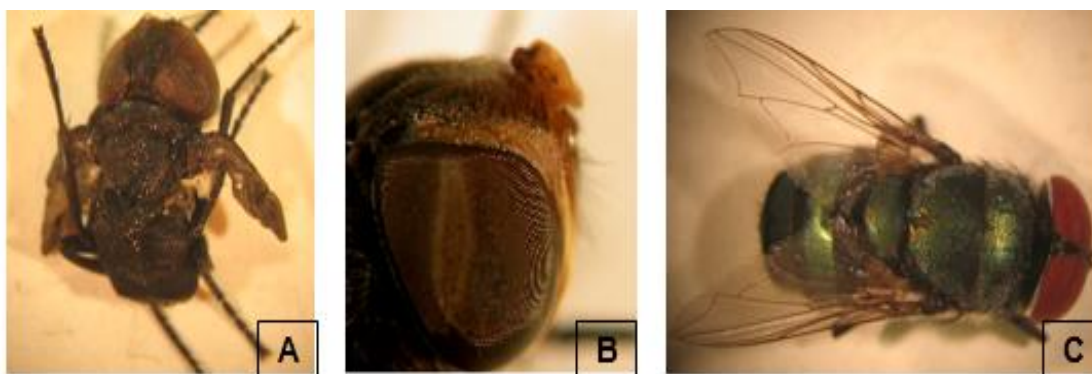


Figura 24. Alterações morfológicas de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) adultos tratados por via tópica com concentrações de 5 e 10% de óleo essencial extraído de *Ocimum sanctum* (Lamiaceae). A - Abdome contratada e asas torcidas (x16). B - Ptilinium não retraído (x40). C - inseto do grupo controle (x16).

#### 4.3.3 Efeitos do tratamento com óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cupensis*. sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya albiceps*

Uma vez aplicado o óleo sobre larvas de primeiro instar de *C. albiceps* foi avaliada a variável massa corporal.

Como pode se conferir na Tabela X, todos os grupos submetidos ao tratamento resultaram com uma massa corporal maior quando comparados com o grupo controle puro e controle com DMSO, sendo as concentrações de 50 e 100% nesta ordem, as de uma maior significação estatística ao aplicar o teste de Tukey ( $p < 0,01\%$ ). Todos conseguiram o peso mínimo necessário (42 mg) para o início da fase de pupa (Queiroz e Milward-de Azevedo 1991). O grupo controle puro e controle com DMSO também apresentaram diferenças significativas.

Tabela X. Efeito sobre a massa corporal das larvas de *Chrysomya albiceps* após o tratamento com óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cupensis*.

Tratamentos	Massa larval Média $\pm$ DP (mg)	Intervalo de variação da massa larval (mg)
Controle puro	46,290 $\pm$ 8,652 <sup>a</sup>	32,200 – 62,000
Controle com DMSO	80,152 $\pm$ 13,512 <sup>b</sup>	57,250 – 105,80
Óleo 5%	93,167 $\pm$ 8,017 <sup>c</sup>	77,200 - 110,00
Óleo 10%	96,059 $\pm$ 9,812 <sup>c</sup>	75,000 - 114,50
Óleo 25%	94,711 $\pm$ 6,197 <sup>c</sup>	89,000 - 117,00
Óleo 50%	104,61 $\pm$ 6,712 <sup>d</sup>	82,000 - 116,60
Óleo 75%	94,223 $\pm$ 12,274 <sup>c</sup>	66,200 - 122,60
Óleo 100%	106,13 $\pm$ 6,174 <sup>d</sup>	92,200 - 122,00

Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo Teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

DP: Desvio padrão; mg: miligramas.

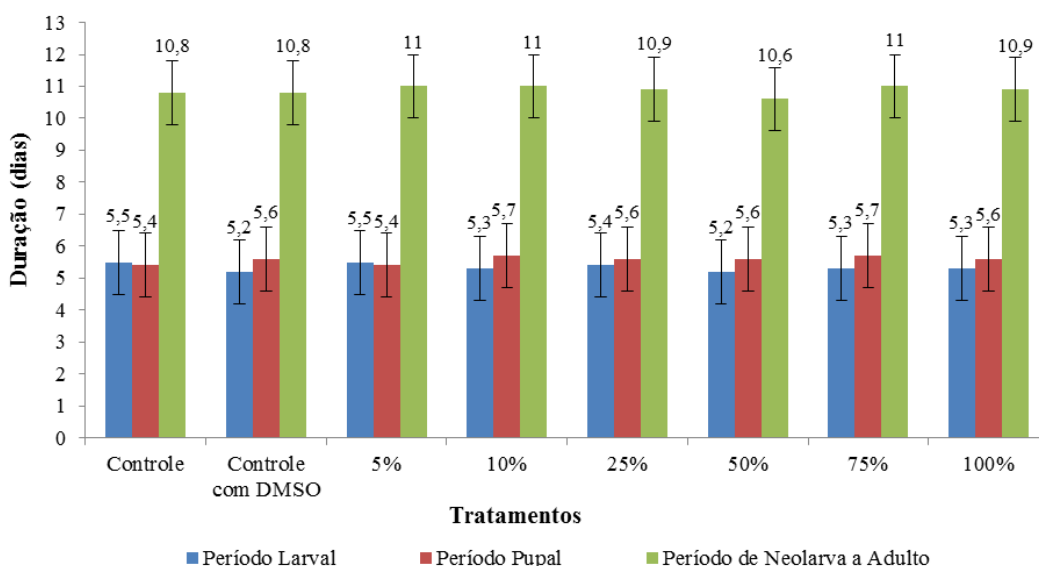


Pode-se observar que de alguma forma DMSO influencia o aumento na massa corporal das larvas, mas em todos os tratamentos com o óleo essencial larvas foram ainda mais pesadas do que as tratadas com apenas DMSO. Trabalhos demonstram a influência do DMSO sobre as membranas biológicas. Um estudo de simulação utilizando modelos de granulação grossa tem sugerido que esta substância induz poros na membrana. Vale ressaltar que neste trabalho para concentrações de 12,5; 15,0 e 20,0% de DMSO, aconteceram formação de múltiplos poros (Norman et al. 2006).

Um afinamento da membrana induzido por DMSO, expansão de uma camada dupla de fosfolípido e o aumento da fluidez do seu núcleo hidrofóbico é capaz de explicar porque DMSO promove a permeação de solutos, em especial, as unidades hidrofóbicas, através da membrana: o comprimento do percurso é reduzido e a própria difusão é facilitada porque dá fluidez melhorada da membrana interior (Andrey et al. 2007).

A duração dos estágios larval e pupal, assim como do período de neolarva a adulto da espécie *C. albiceps* uma vez tratada com o óleo podem ser observados na **Figura 25**.

No caso do período larval, todos os grupos abandonaram a dieta no período entre cinco e seis dias para todos os casos. No grupo controle puro se observaram diferenças com os grupos controle com DMSO, 10 e 50%, sendo estes períodos ligeiramente menores, verificado estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $p < 0,01\%$ ).



**Figura 25.** Duração dos estágios larval, pupal, e de neolarva a adulto da espécie *Chrysomya albiceps* tratada com óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.

Estes resultados concordam com o referido na literatura para o tempo de desenvolvimento larval desta espécie de mosca (Queiroz e Milward-de Azevedo 1991; Estrada et al. 2009; Dutok, 2015) e mostram que o óleo essencial de *O. sanctum* não influencia neste período.

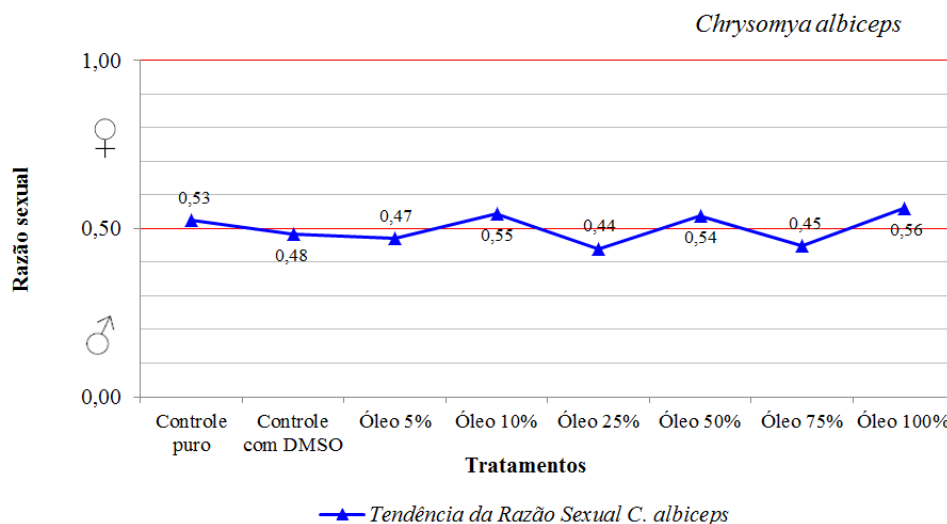
Quando se avaliou o comportamento da duração do estágio pupal, se observaram diferenças entre o controle puro e o controle com DMSO, 10% e 75%, estes apresentaram uma duração superior (5,64; 5,74; 5,72 dias) quando comparados com o grupo controle puro (5,40 dias). Esta diferença foi estatisticamente confirmada através do Teste de Tukey ( $p < 0,01\%$ ).

O período de neolarva-adulto esteve compreendido entre 10 e 11 dias para todos os casos, se observaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle puro e o óleo ao 50% (10,84 e 10,61 dias, respectivamente), a concentração do 50% foi a que teve um período menor de desenvolvimento resultando também diferente com todas as outras concentrações testadas e com o grupo controle com DMSO.

Tem estudos realizados que avaliam o efeito de extratos naturais sob o desenvolvimento desta espécie de mosca onde se obtiveram resultados parecidos. Em o estudo feito por Dutok (2015) para avaliar o efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o tempo de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* como resultado final obteve que as doses de 25, 50 e 100% conseguiram manter uma duração similar sem mostrar diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o grupo controle. No caso das concentrações 5, 10 e 75% tiveram uma duração total do período de desenvolvimento inferior ao grupo controle. Num estudo realizado por Baptista-da-Silva et al. (2010) utilizando o extrato aquoso de *Mentha crispa* nas concentrações de 25, 50, 75 e 100% em *C. albiceps*, acharam evidências de que os grupos tratados apresentaram um encurtamento na duração média do período larval. Unicamente encontrou que o tratamento de 25%, não teve o mesmo comportamento que os outros, não apresentando diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao grupo controle.

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

Em relação ao parâmetro de razão sexual, nenhuma diferença estatística foi encontrada, de acordo com o teste do qui-quadrado. Desta forma, a utilização deste óleo essencial não tem uma influência medida nesta variável biológica (Figura 26).

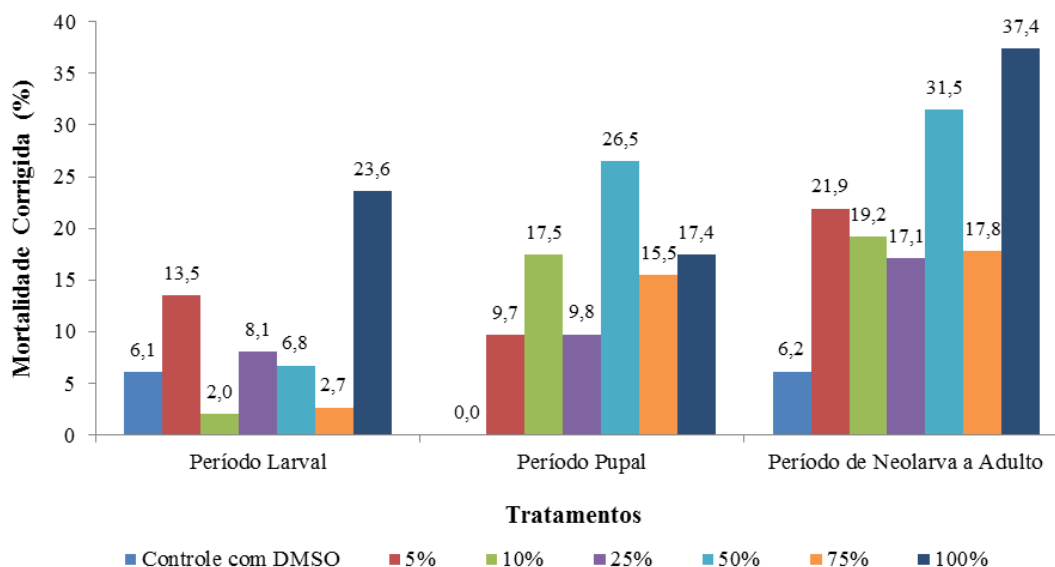


**Figura 26.** Razão sexual de *Chrysomya albiceps* após o tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.

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

A **Figura 27** apresenta a mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto resultante em *C. albiceps* após o tratamento com o óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis*. Pode-se observar que se obteve efeitos do óleo em todos os estádios de desenvolvimento desta espécie. Os efeitos mais marcantes do óleo sobre esta espécie foram observados para as concentrações de 50 e 100%, sendo a mortalidade larval maior quando tratada com o óleo ao 100% e a mortalidade pupal maior com o óleo ao 50%, resultando em

mortalidades corrigidas superiores ao 31% no período de neolarva a adulto para ambas concentrações. Para as outras concentrações testadas foram observados mortalidades acima de 17%.



**Figura 27.** Mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto de *Chrysomya albiceps* após o tratamento com o óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis*.

Não é possível estabelecer uma relação dose/efeito. Ainda assim, este resultado é similar ao obtido por Baptista-da-Silva et al. (2010), que observaram que o aumento da concentração do extrato de *M. crista* ocasionou mortalidade em *C. albiceps*, sendo a concentração de 100% a que atingiu maior mortalidade, corroborando aos encontrados neste estudo, onde a concentração mais efetiva também foi 100%.

No estudo de Abdel-Shafy et al. (2009), dependendo do extrato e a espécie de planta testada foram encontrados resultados similares ao do presente trabalho, pois esse estudo gerou uma combinação de 32 grupos de resultados variados, o que demonstra uma resposta variada da espécie frente a diferentes metabólitos. A maioria dos extratos testados por Abdel-Shafy et al. (2009), resultaram em uma maior mortalidade na maior concentração estudada.

No estudo de Dutok (2015) a mortalidade larval, pupal e do período de neolarva-adulto resultante em *C. albiceps* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa*, foi observado que os efeitos mais marcantes do extrato sobre esta espécie estão relacionados ao período larval, dando como resultado que os índices de mortalidades no período neolarva-adulto são similares. Nesste estudo também não se encontrou relação dose/efeito e a maior mortalidade foi também obtida para o extrato ao 100%. Quando

comparamos os valores de mortalidade absoluta obtidos por Dutok (2015) (entre 34 e 52,5%) podemos observar que o intervalo é muito similar ao obtido por nós, ainda com valores superiores para o óleo essencial de OS como pode ter comprovado na Tabela XI.

**Tabela XI. Mortalidade absoluta e mortalidade corrigida, pela fórmula de Abbott (1925), dos estágios de desenvolvimento de *C. albiceps* (Diptera: Calliphoridae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis*.**

Tratamentos	Período Larval		Período Pupal		Período de Neolarva a Adulto	
	Absoluta (%)	Corrigida (%)	Absoluta (%)	Corrigida (%)	Absoluta (%)	Corrigida (%)
Controle	6,00	-	0	-	10,50	-
Controle com DMSO	13,50	6,10	2,30	0,03	15,50	6,20
5%	56,00	13,50	1,10	9,70	56,50	21,90
10%	65,50	2,00	4,40	17,50	66,50	19,20
25%	61,00	8,10	0,00	9,80	61,00	17,10
50%	59,00	6,80	0,00	26,50	60,50	31,50
75%	45,50	2,70	0,00	15,50	46,00	17,80
100%	31,50	23,60	0,70	17,40	41,80	37,40

#### 4.3.4 Efeitos do tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala*.

Na Tabela XII, estão apresentados os resultados obtidos para a massa corporal de *C. megacephala* tratadas com o óleo essencial de *O. sanctum*. Pode-se observar que os grupos tratados em todas as concentrações resultaram em larvas mais pesadas ao abandonarem a dieta quando comparados com o grupo controle puro, que apresentou uma massa larval média de  $59,724 \pm 10,76$  mg, gerando uma diferença altamente significativa quando se comparou o grupo controle puro com o controle com DMSO e os demais tratamentos. O grupo controle com DMSO apresentou diferença significativa quando se comparou com as concentrações aos 5, 75 e 100%. As concentrações com maior efeito sobre a massa corporal foram 25, 50 e 10%, respectivamente.

Quando analisados os intervalos de variação observou-se que a concentração de 100% gerou as larvas mais leves ( $67,49 \pm 8,68$  mg) sendo essas muito mais pesadas que as do grupo controle puro.

**Tabela XII. Efeito sobre a massa corporal das larvas de *Chrysomya megacephala* após o tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.**

Tratamentos	Massa larval Média ±DP (mg)	Intervalo de variação da massa larval (mg)
Controle puro	59,72 ± 0,81 <sup>a</sup>	33,90 – 76,70
Controle com DMSO	72,97 ± 0,64 <sup>b</sup>	37,20 – 85,60
Óleo 5%	69,46 ± 0,69 <sup>c</sup>	34,00 – 83,00
Óleo 10%	70,75 ± 0,48 <sup>b</sup>	61,60 – 85,00
Óleo 25%	74,93 ± 0,66 <sup>b</sup>	60,00 – 87,8
Óleo 50%	72,24 ± 0,64 <sup>b</sup>	37,00 – 78,80
Óleo 75%	68,84 ± 0,36 <sup>c</sup>	59,00 – 73,80
Óleo 100%	67,49 ± 0,74 <sup>c</sup>	34,00– 79,60

Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo Teste de Tukey,  $p < 0,05$ . DP: Desvio padrão; mg: miligramas.

Em todos os casos se obtiveram pesos maiores que o Peso Larval Mínimo para Pupação (PLMP) estabelecido por Von Zuben em 1998, quando determinou que o PLMP para emergência de machos desta espécie é 30,5 mg e no caso das fêmeas de 32 mg.

Mendonça et al. (2011) quando testaram topicamente os efeitos do látex liofilizado de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) em *C. megacephala* encontraram flutuações no valor médio da massa corporal das larvas, com valores inferiores e superiores ao grupo controle (Controle: 61 mg, concentração 1%: 60,2 mg e a concentração 3%: 76 mg). Resultados diferentes foram achados no trabalho apresentado por Dutok em 2015 quando avaliou efeitos do tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* donde foram geradas, em todos os tratamentos, larvas mais leves (médias entre 43,77 e 57,10 mg) que as geradas após a aplicação de látex de Amapazeiro (Dutok, 2015). Também no trabalho desenvolvido por Pinto em 2014 quando avalio o óleo essencial de *P. caribaea* coletado no Brasil e em Cuba sobre esta espécie de mosca obteve que quase todas as concentrações apresentaram diminuição da ingestão da carne, com exceção da concentração de 5% (77,44 ± 1,49mg óleo/Brasil e 76,83 ± 1,65mg óleo/Cuba) que tiveram o peso aumentado, além devemos assinalar que neste estudo o peso médio dos grupos controles foi muito superior aos achados pelos autores antes citados, encontrando-se em valores de 74, 51 ± 4,11g e 74,27 ± 4,05mg para o controle puro e com DMSO, respectivamente, o que dificulta a comparação.

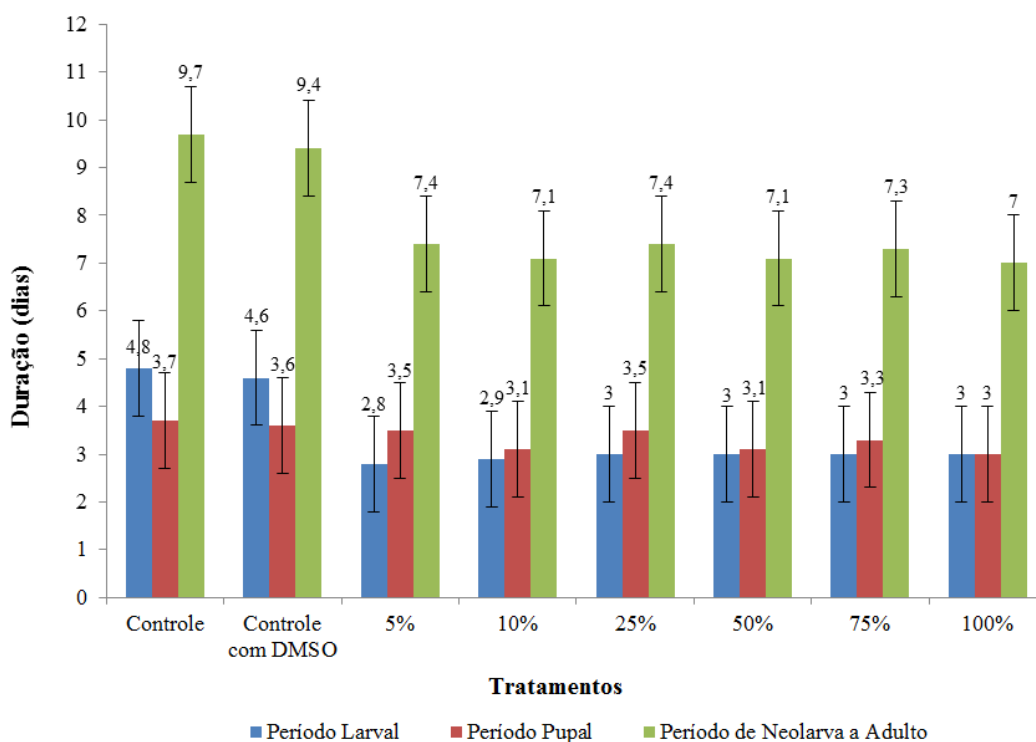
Contrariamente, no presente estudo foram geradas, em todos os tratamentos, larvas mais pesadas (médias entre 67,49 e 74,93 mg) que as do grupo controle puro, além do que

no estudo de Pinto em 2014 com o óleo de *P. caribaea* os pesos médios das larvas tratadas se encontraram entre  $53,53 \pm 1,54g$  e  $76,83 \pm 1,65g$ , intervalo onde ficam também os pesos das larvas tratadas com óleo essencial de *O. santum*.

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

Na **Figura 28** se encontram representados a duração dos estágios larval e pupal, assim como do período de neolarva-adulto de *C. megacephala* após o tratamento com o óleo essencial de *O. sanctum* var. *cubensis*.

A duração do estágio larval foi menor em todos os grupos tratados, quando comparados com o grupo controle (4,82 dias) e o grupo controle com DMSO (4,57 dias), com diferenças estatísticas significativas. Este comportamento pode estar relacionado com o fato das larvas terem uma maior massa corporal o que garantiu um desenvolvimento mais rápido para chegar à seguinte etapa de desenvolvimento (Santos e Moya-Borja 1997). Resultados similares foram obtidos por Mendonça et al. (2011) ao estudarem o látex liofilizado de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) ao 1.0% resultando em uma diminuição de os períodos larval, pupal e neolarva/adulto.



**Figura 28.** Duração dos estágios larval e pupal, assim como do período de neolarva-adulto de *Chrysomya megacephala* após o tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var.  *cubensis*.

A duração do estágio pupal foi menor em todos os grupos tratados, quando comparados com o grupo controle (3,7 dias) e o grupo controle com DMSO (3,6 dias), com diferenças estatísticas significativas entre o grupo controle puro e todas as concentrações avaliadas, sendo maiores estas diferenças com as concentrações 10% (3,1 dias), 50% (3,1 dias) e 100% (3,0 dias).

Quando é realizada a análise final da duração do período total (de neolarva até adulto) que inclui os dois estágios antes analisados, observou-se que todos os grupos tratados com o óleo essencial emergiram antes do que os grupos controles, pois quando os tratamentos foram comparados com o grupo controle puro (9,79 dias) e controle com DMSO (9,39 dias) tiveram, uma duração de dois dias a menos (entre 7,00 e 7,46 dias). Este resultado apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparados os tratamentos com o grupo controle, sendo as concentrações de 100, 10 e 50% aquelas que mais aceleraram este estágio, diminuindo, dessa forma, a duração de 7,00; 7,19 e 7,14 dias, respectivamente.

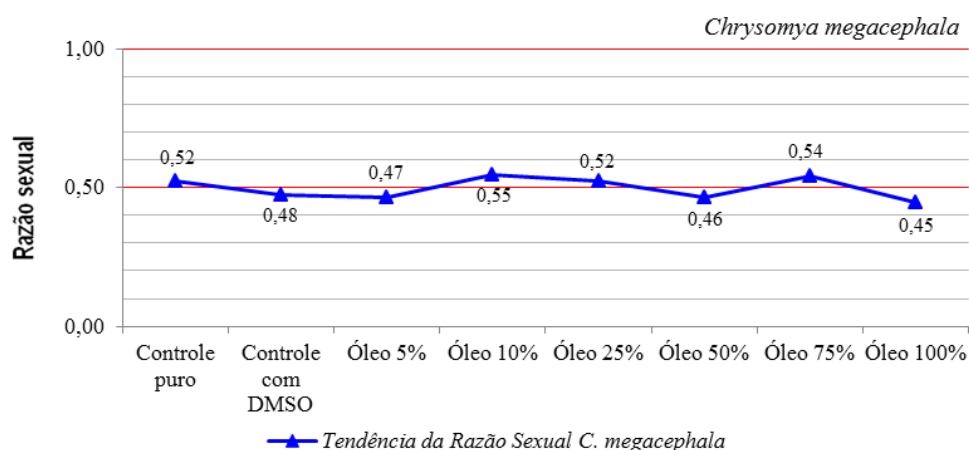
Num estudo que refere o uso de lignanas, como o yangambin, extraído das folhas de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) mostrou que elas causam inibição do desenvolvimento pós-embrionário de *C. megacephala* (Cabral et al. 2007). Quando se avaliou o uso de latex



da planta *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) ao 1%, que causa o mesmo tipo de efeito no desenvolvimento pós-embrionário de *C. megacephala* (Mendonça et al. 2011).

No presente ensaio a colônia de *C. megacephala* mostrou um elevado grau de estabilidade após a aplicação do óleo de *O. sanctum* (Figura 29), resultando numa razão sexual muito próxima de 0,50 para todos os tratamentos, inclusive para os grupos controles como preconizado por Fisher (1930). Resultados similares foram encontrados por Dutok em 2015 quando avaliou esta espécie tratada com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria* e por Pinto em 2014 quando determinou que não houve diferença significativa entre as razões sexuais dos grupos controle (com/sem DMSO) e dos grupos tratados com o óleo essencial de *P. caribaea* (Brasil e Cuba) nesta espécie.

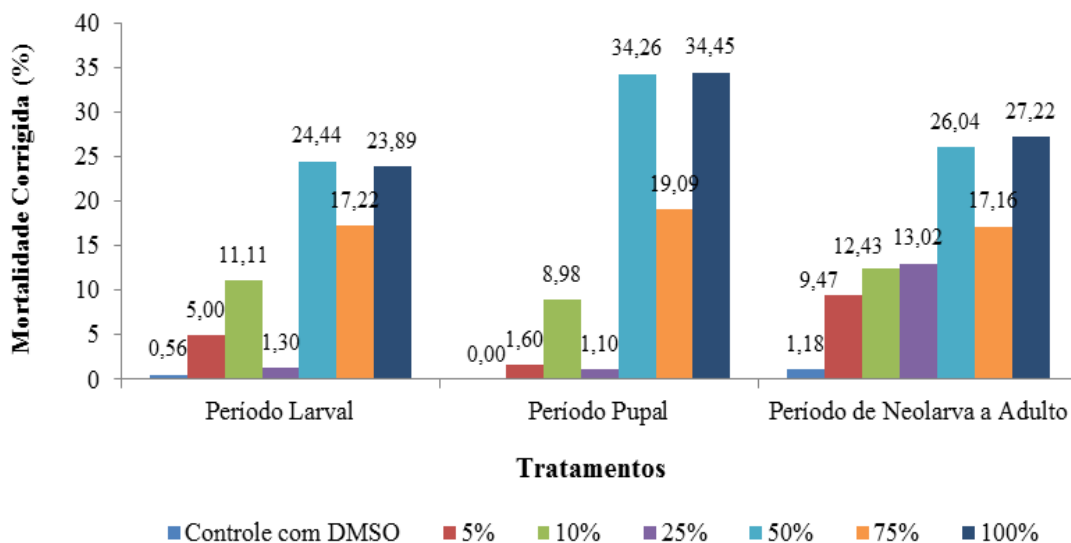
No entanto, para esta mesma espécie, Cabral et al. (2007a,b) observaram diferenças com relação à razão sexual, tanto para o grupo controle, quanto para os grupos tratados com as quatro neolignanas testadas, índice que variou desde 0,37 até 0,75.



**Figura 29.** Razão sexual de *Chrysomya megacephala* após o tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.

Na Figura 30, pode-se observar os valores de mortalidade em porcentagem dos estágios larval, pupal e do período de neolarva-adulto de *C. megacephala* após o tratamento com diferentes concentrações do óleo essencial de *O. sanctum* var. *cubensis*.

No estágio larval, todos os grupos tratados apresentaram valores de mortalidade corrigida superiores ao grupo controle, sendo as concentrações 50, 100 e 75% as mais efetivas, com 24,44; 23,89 e 17,22 % como médias de mortalidade, respectivamente. No estágio pupal também se observou influência do extrato, pois os valores de mortalidade dos grupos tratados com o óleo a 50 e 100% atingiram valores de 34% de mortalidade.



**Figura 30.** Mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto de *C. megacephala* após o tratamento com o óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis*.

Os resultados de mortalidade corrigida não são dose/dependente, mais a porcentagem de mortalidade corrigida durante o período total mostrou maior eficácia para causar mortalidade nesta espécie de moscas nas concentrações 100, 50 e 75, respectivamente. Nossos resultados concordam com os obtidos por Dutok (2015) quando avaliou a mortalidade de *Chrysomya megacephala* após a aplicação tópica do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*, as médias de mortalidade absolutas obtidas estão entre 32 e 43%. As médias de mortalidade absoluta obtida ao aplicar o óleo essencial de *O. sanctum* nesta espécie se encontram entre 23,5 e 38,5% (

Tabela XIII), observando se mortalidade absoluta acima de 30% para as concentrações de 50, 75 e 100%.

**Tabela XIII. Mortalidade absoluta e mortalidade corrigida, pela fórmula de Abbott (1925), dos estágios de desenvolvimento de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum sanctum* (Lamiaceae).**

Tratamentos	Período Larval		Período Pupal		Período de Neolarva a Adulto	
	Absoluta (%)	Corrigida (%)	Absoluta (%)	Corrigida (%)	Absoluta (%)	Corrigida (%)
Controle	10	-	17,65	-	15,50	-
Controle com DMSO	10,5	0,56	16,96	0,00	16,50	1,18
5%	14,50	5,00	16,96	1,60	23,50	9,47
10%	20,00	11,11	25,00	8,98	26,00	12,43
25%	9,50	1,30	10,50	1,10	26,50	13,02
50%	32,00	24,44	45,99	34,26	37,50	26,04
75%	25,50	17,22	33,33	19,09	30,00	17,16
100%	31,50	23,89	45,99	34,45	38,50	27,22

### *Alterações Morfológicas*

Além de todas as modificações do ciclo pós-embrionário, *O. sanctum* também causou alterações morfológicas em adultos cujas larvas foram tratadas com concentrações 10, 25 e 50%. No grupo tratado com 10%, de um total de 146 moscas que emergiram como adultos 11,64% (17 moscas) resulta em algum tipo de alteração morfológica; enquanto que para o grupo tratado com 25% do óleo essencial 23 moscas de 145 (15,86%) aparecem com também com alguma deficiência e no grupo tratado com 50% do óleo o 11,38% (14 moscas das 123 que emergiram) apresentam alguma malformação. As alterações morfológicas mais comuns encontradas foram uma ptilinum não retraída, e asas torcidas (Figura 31A e Figura 31B). Todos os insetos do grupo controle foram normais (Figura 31C). As alterações morfológicas afetaram diretamente a capacidade de voar, e, conseqüentemente, para encontrar comida e se reproduzir. Assim, estes resultados demonstraram que o óleo essencial de *O. sanctum* pode representar um método alternativo eficaz para controlar as moscas da espécie *C. megacephala*.



Figura 31. Alterações morfológicas de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) adultos tratados por via tópica com concentrações de 10%, 25% e 50% do óleo essencial extraído de *Ocimum sanctum* (Lamiaceae). A - Ptilinium não retraída (x16); B - Asas torcidas (x16); C - Inseto do grupo controle (x16).

#### 4.3.5 Efeitos do tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Lucila cuprina*.

A Tabela XIV mostra o efeito do óleo essencial de OS sobre a massa corporal das larvas de *Lucila cuprina* após o tratamento por aplicação tópica. Pode-se observar que os grupos controles (puro e com DMSO) apresentaram as menores médias das massas (33,3 mg e 32,7 mg, respectivamente) sem diferenças estatísticas quando aplicado o teste de Tukey ( $p < 0,01\%$ ) entre eles, e todas as concentrações testadas apresentaram diferenças estatísticas quando comparados com os controles com médias de massas superiores em todos os casos, por enquanto os tratamentos onde as larvas foram mais pesadas foram com o óleo ao 5%, 10% e 25% apresentando diferenças estatísticas também quando comparados com os outros tratamentos. As larvas tratadas com o 100% de óleo essencial foram as mais leves com massa média de 38,9 mg.

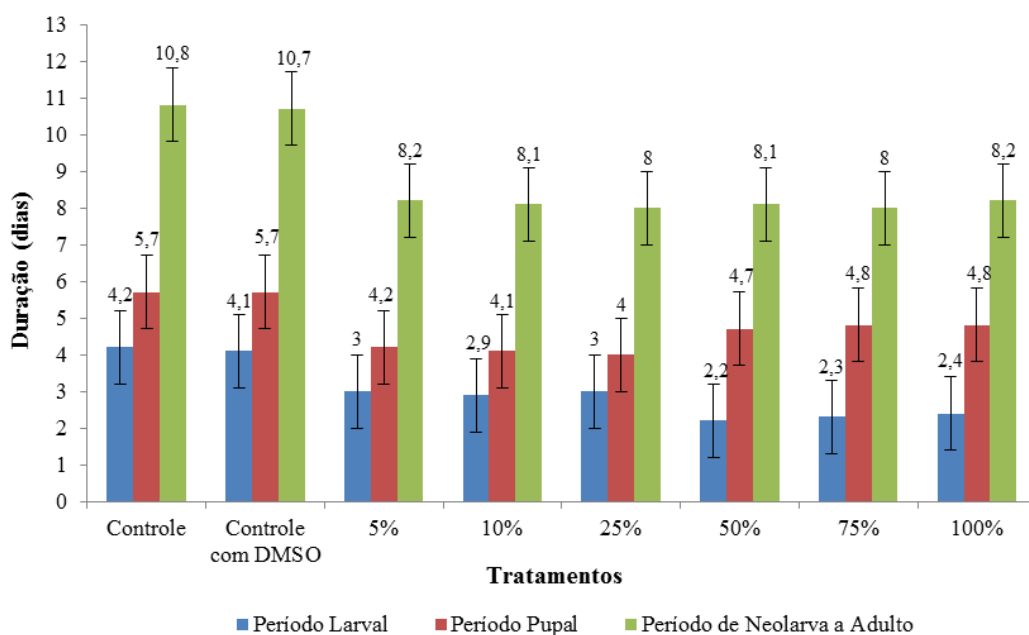
Tabela XIV. Massa larval de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum sanctum* (Lamiaceae).

Tratamentos	Peso Larval (mg) Média $\pm$ DP	Intervalo de variação da massa larval (mg)
Controle puro	33,3 $\pm$ 7,1 <sup>f</sup>	18,5 – 38,0
Controle com DMSO	32,7 $\pm$ 3,2 <sup>f</sup>	26,5 – 39,3
Óleo 5%	54,5 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	51,4 – 58,1
Óleo 10%	52,9 $\pm$ 4,0 <sup>ab</sup>	40,8 – 57,4
Óleo 25%	51,7 $\pm$ 3,3 <sup>b</sup>	45,0 – 57,2
Óleo 50%	42,1 $\pm$ 7,6 <sup>c</sup>	29,0 – 64,0
Óleo 75%	45,1 $\pm$ 6,3 <sup>d</sup>	26,5 – 61,0
Óleo 100%	38,9 $\pm$ 6,4 <sup>e</sup>	26,0 – 47,8

Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo Teste de Tukey,  $p < 0,05$   
 DP: Desvio padrão; mg: miligramas.

Os resultados obtidos para os grupos controles são similares aos apresentados por Pessanha et al. (2015) quando estudo o peso (mg) de larvas maduras (L3) de *Lucilia cuprina* em grupos controle e tratados com cepas de *Brevibacillus laterosporus*, nesse trabalho as larvas do grupo controle puro atingiram uma massa média de 31,3 mg. Nossos resultados também concordam com os de Pinto (2014) quando analisou o desenvolvimento pós embrionário de *L. cuprina* tratada com óleo essencial de *Pinus caribaea* coletado no Brasil e em Cuba, as larvas do grupo controle puro apresentaram massa média de 33,19mg e as de o grupo controle com DMSO 32,45 mg.

Na **Figura 32** o gráfico mostra o efeito do óleo de O.S sobre a duração dos estágios larval, pupal e do período de neolarva até adulto de *L. cuprina*. Os grupos controles (puro e com DMSO), no estágio larval, tiveram uma duração média de  $4,2 \pm 0,5$  e  $4,2 \pm 0,5$  dias, respectivamente, período maior quando comparado com todos os tratamentos, que tem valores  $3,0 \pm 0,1$  dias para o 5% até  $2,2 \pm 0,4$  dias para o 50%, sendo o tempo de desenvolvimento larval ligeiramente menor para as larvas tratadas com as maiores concentrações, mostrando diferenças estatísticas entre os controles e os tratamentos quando aplicado o teste de Tukey. Este comportamento pode ter devido ao fato das larvas tratadas com o óleo ter atingido maior peso e por tanto estar mais preparadas para abandonar a dieta em um menor tempo.

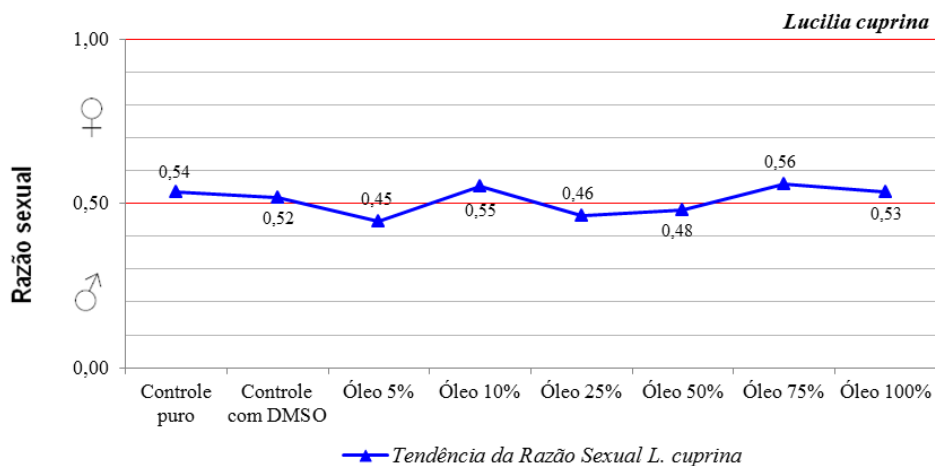


**Figura 32.** Efeito do óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* sobre o tempo de desenvolvimento de *Lucilia cuprina*.

O mesmo aconteceu nos períodos pupal e de neolarva até adulto. A duração do estágio pupal foi maior para os grupos controles  $5,7 \pm 0,9$  dias, com diferenças estatísticas quando comparadas com todos os grupos tratados, os que oscilaram entre  $4,8 \pm 0,6$  dias e  $4,0 \pm 0,2$  dias, sendo este período ligeiramente maior para as maiores concentrações testada. O período de neolarva até adulto foi de  $10,8 \pm 0,8$  dias e  $10,7 \pm 0,7$  dias para o controle puro e o controle com DMSO, mostrando também diferenças estatísticas com todos os tratamentos os que tiveram duração deste estágio com valores entre  $8,0 \pm 0,2$  dias e  $8,2 \pm 0,6$  dias sem diferenças entre eles já que as ligeiras diferenças entre os períodos anteriores compensaram o período total de desenvolvimento.

Quando comparados nossos resultados com os obtidos por Pinto (2014) ao testar o óleo essencial de *Pinus caribaea* Morelet coletado no Brasil e em Cuba as mesmas concentrações avaliadas por nós, observamos resultados diferentes, eles acharam que o período de desenvolvimento de esta espécie de mosca foi menor para as moscas do grupo controle que para as tratadas com os óleos, além que para os grupos tratados com os óleos aos 75% e 100% obtiveram resultados muitos parecidos aos nossos com um tempo de desenvolvimento de  $8,31 \pm 0,65$  dias e  $8,33 \pm 0,97$  dias, respectivamente. No trabalho realizado por Dutok (2015) quando avaliou o efeito do extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa* sobre o tempo de desenvolvimento de *Lucilia cuprina* obteve para o controle resultados similares a nos ( $10,87 \pm 0,76$  dias), para as larvas tratadas sempre o desenvolvimento se viu retardado até atingir valores até de 22 dias. Também quando Pinto et al. (2015) avaliaram o efeito do óleo essencial de *Cymbopogo citratus* coletados em Cuba e no Brasil observaram um retardou no tempo de desenvolvimento desta espécie chegando em alguns casos até 14 dias.

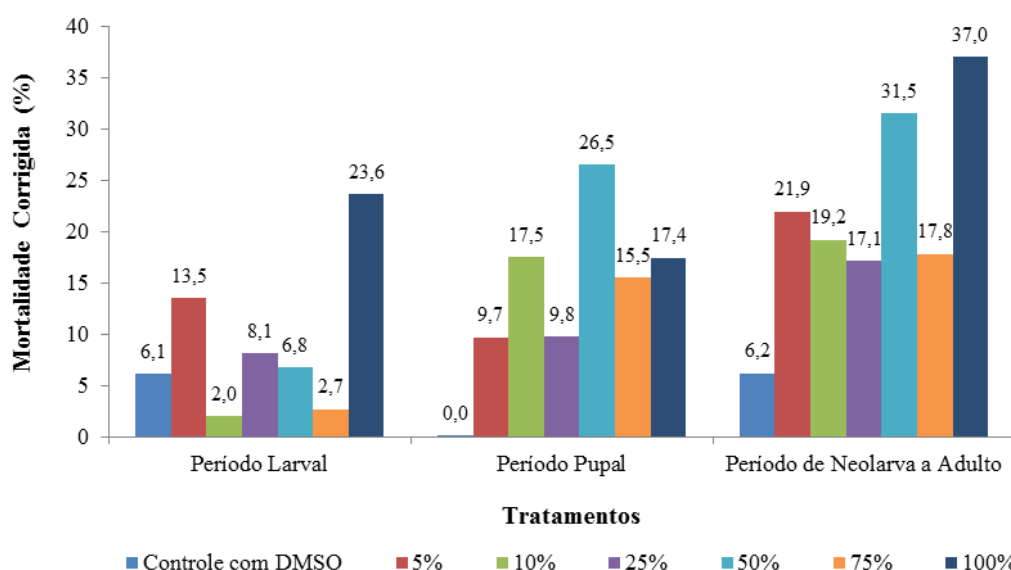
O comportamento da razão sexual nos grupos tratados quando comparados com o grupo controle foi estável (Figura 33).



**Figura 33. Razão sexual de *Lucilia cuprina* após o tratamento com o com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.**

A razão sexual da colônia não apresentou diferença, indicando que há estabilidade dentro da população (Esser 1991; Gabre et al. 2005). Resultados similares foram obtidos por Pinto (2015) ao testar nesta espécie de mosca diferentes tratamentos de óleo essencial de *P. caribaea* coletado no Brasil e em Cuba assim como o grupo controle; o mesmo aconteceu na pesquisa de Dutok (2015) quando avalio o efeito após aplicação tópica de *P. mammosa* sobre *L. cuprina*, se evidenciando que todos os grupos tratados e o grupo controle apresentaram valores muito próximos de 0,5, o que quer dizer que houve uma relação bem perto de 1:1 entre o número de fêmeas com relação ao número de machos emergidos. Estes resultados conferem com o preconizado por Fisher (1930), confirmando a estabilidade dentro da população.

Novamente os resultados de mortalidade corrigida não são dose/dependente (Figura 34), se obtive mortalidade por acima de 17% para todos os tratamentos além de que as larvas tratadas com óleo ao 100% foram as mais afetadas (37% de mortalidade corrigida), seguidas por 50% (31,5%) e 5% (21,9%).



**Figura 34. Mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto de *Lucilia cuprina* após o tratamento com o óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cupensis*.**

Os resultados de mortalidade obtidos coincidem com os de Pinto (2014) quando avaliou as larvas de *L. cuprina* tratadas com o óleo essencial de *P. caribaea* coletado em Cuba, não sendo igual para esta mesma espécie quando tratada com o óleo essencial de *P. caribaea* coletado no Brasil, onde o período larval a partir da concentração de 10% se apresentou dose dependente.

Obteve-se mortalidade tanto larval como pupal. As maiores mortalidades larvais foram para os tratamentos ao 100% (23,6%) e 5% (13,5%). Entretanto, no período pupal as outras concentrações se viram mais afetadas, atingindo sempre valores superiores a 9,7% e chegando até valores de 26,5 % para o tratamento com 50% de óleo, tomando em conta que para o controle com DMSO não se observou mortalidade neste estágio, demonstrando também um efeito crônico do óleo.

Quando comparamos os por centos de mortalidade com os obtidos por outros autores como Pinto et al. (2015) ao estudar o efeito do óleo essencial de *Cymbopogo citratus* coletados em Cuba e no Brasil, podemos observar que eles obtiveram mortalidades maiores, mais esses dados são de mortalidade absoluta o que faz difícil a comparação já que por exemplo para o óleo essencial de *O. sanctum* estudado a mortalidade absoluta no período de neolarva até adulto para as larvas tratadas com o 100% de óleo essencial encontrada foi de 54%, mais este valor diminui quando comparado com a mortalidade do controle. O mesmo acontece quando comparamos com os resultados de Dutok (2015), onde encontrou que todos



os tratamentos provocaram mortalidade absoluta média acima de 45%, sendo o maior (55%) observado na concentração de 5% quando foi tratada com extrato o aquoso bruto de sementes de *P. mammosa*, resultado muito parecido com os deste trabalho, se nos referimos aos dados de mortalidade absoluta como pode se observar na **Tabela XV**.

**Tabela XV. Mortalidade absoluta e mortalidade corrigida, pela fórmula de Abbott (1925), dos estágios de desenvolvimento de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum sanctum* (Lamiaceae).**

Tratamentos	Período Larval		Período Pupal		Período de Neolarva a Adulto	
	Absoluta (%)	Corrigida (%)	Absoluta (%)	Corrigida (%)	Absoluta (%)	Corrigida (%)
Controle	26,0	-	1,4	-	27,0	-
Controle com DMSO	30,5	6,1	1,4	0	31,5	6,2
5%	36,0	13,5	10,9	9,7	43,0	21,9
10%	27,5	2,0	18,6	17,5	41,0	19,2
25%	32,0	8,1	11,0	9,8	39,5	17,1
50%	31,0	6,8	27,5	26,5	50,0	31,5
75%	28,0	2,7	16,7	15,5	40,0	17,8
100%	43,5	23,6	18,6	17,4	54,0	37,0

Todos os tratamentos provocaram mortalidade sobre as larvas de *L. cuprina*, o que nos permite concluir que o tratamento tópico com o óleo essencial de *O. sanctus* induz alterações em diferentes níveis do ciclo de desenvolvimento desta espécie de mosca pelo que pode considerar-se uma alternativa para o controle destes insetos.

#### **4.3.6 Efeitos do tratamento com o óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cupensis* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica***

É uma mosca não-hematófaga, que possui distribuição geográfica mundial. Vive habitualmente no domicílio e peridomicílio humanos, na zona urbana e rural. O tamanho da população local depende muito das condições sanitárias vigentes, ocorrendo sempre em maior quantidade sempre que há deficiência no serviço de coleta de lixo urbano ou tratamento do esterco dos animais. Esta espécie possui esse nome por ser uma, ou a mais adaptada aos ambientes antrópicos.

A **Tabela XVI** nos mostra os valores do peso obtidos para as larvas desta espécie, após a aplicação tópica do óleo essencial de *O. sanctum*, nas larvas do primeiro instar (L1).

**Tabela XVI. Efeito sobre o peso das larvas de *Musca domestica* após o tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.**

Tratamentos	Massa larval Média $\pm$ DP (mg)	Intervalo de variação da massa larval (mg)
Controle	24,10 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	21,3 – 26,8
Controle com DMSO	22,80 $\pm$ 1,84 <sup>b</sup>	19,0 – 25,4
Óleo 5%	22,85 $\pm$ 2,24 <sup>b</sup>	17,5 – 26,4
Óleo 10%	22,92 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>	16,0 – 32,4
Óleo 25%	22,87 $\pm$ 2,83 <sup>b</sup>	16,0 – 26,3
Óleo 50%	23,47 $\pm$ 1,67 <sup>ab</sup>	21,3 – 26,2
Óleo 75%	20,37 $\pm$ 2,38 <sup>c</sup>	16,6 – 24,2
Óleo 100%	21,14 $\pm$ 1,88 <sup>c</sup>	15,5 – 23,0

Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo Teste de Tukey,  $p < 0,05$

DP: Desvio padrão; mg: miligramas.

As larvas do grupo controle foram as mais pesadas (24,10  $\pm$  1,26 mg) com diferença estatística do controle com DMSO e todas as concentrações testadas. Conforme observado na **Tabela XVI**, nas maiores concentrações (75% e 100%) foram encontradas as larvas mais leves (20,37  $\pm$  2,38 mg e 21,14  $\pm$  1,88 mg, respectivamente). Todas as concentrações estudadas mostraram diferenças estatisticamente significativas ao aplicar o teste de Tukey, pois as larvas que abandonaram as dietas nestes tratamentos eram mais leves.

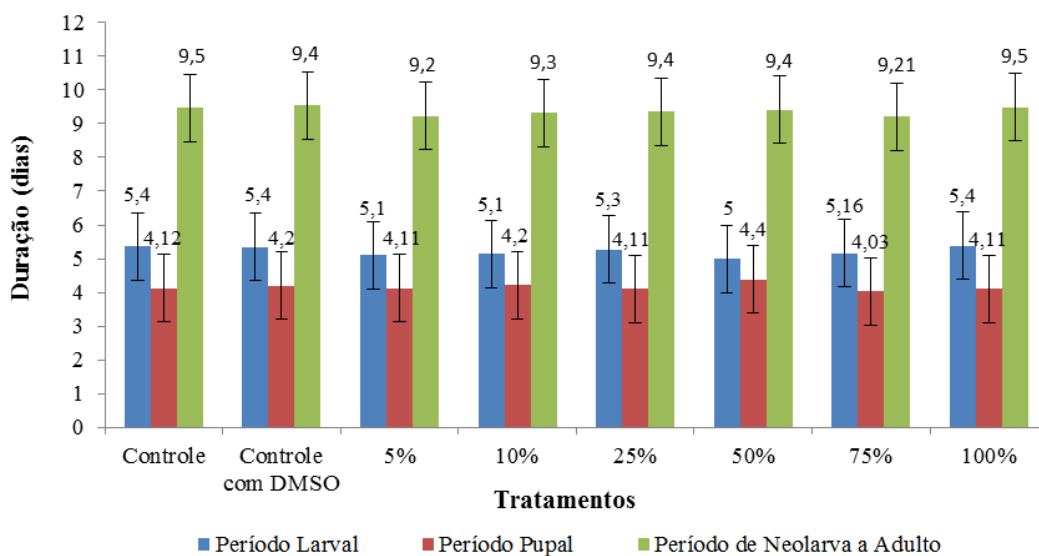
Estes resultados coincidem com o estudo realizado por Freitas (2008) quando observou diferenças significativas nas médias da massa das pupas de *M. domestica* quando comparou com o grupo controle, ao utilizar extratos de *Eucalyptus* sp. Entretanto, este autor notou que existiam variações significativas ao testar o extrato aquoso de *M. azedarach* nesta mesma espécie com a formação de pupas que resultaram significativamente mais leves que o grupo controle (20mg). Resultados similares foram obtidos por Cabral et al. (2008) quando testaram diferentes extratos de *M. azedarach* sobre *M. domestica*, onde também se formaram pupas mais leves nos tratamentos (A: 20,17mg; B: 20,88mg; C: 21,52mg; D: 20,41mg), quando comparados com o grupo controle que resultou atingindo a massa de 22,10 mg.

Resultados um tanto diferentes foram apresentados por Dutok (2015) ao estudar o efeito sobre o peso das pupas de *Musca domestica* após o tratamento com o extrato aquoso bruto de sementes de *Pouteria mammosa*, observando que o grupo controle alcançou uma média de peso igual a 16,80  $\pm$  0,95 mg e as concentrações mais altas (75%: 17,14  $\pm$  0,95 e 100%: 16,94  $\pm$  1,44 mg) apresentaram peso maior do que o grupo controle porém os valores de desvio padrão não resultam em diferenças estatísticas. Outros resultados contraditórios foram obtidos por Pinto (2015) ao analisar a atividade inseticida do óleo essencial de

*Cymbopogon citratus* de Cuba e Brasil e seu efeito no desenvolvimento pós-embriônico de *Musca domestica*, encontrando que as larvas mais leves ( $17,53 \pm 1,23$  mg de óleo/Brasil e  $17,49 \pm 1,27$  mg de óleo/Cuba) pertencem à concentração de 10%, enquanto as larvas mais pesadas ( $27,01 \pm 2,18$  mg de óleo/Brasil e  $26,97 \pm 2,38$  mg de óleo/Cuba) pertencem à concentração de 50%, quando comparada com os grupos controle com DMSO ( $21,59 \pm 1,39$  mg) e sem DMSO ( $21,50 \pm 1,76$  mg).

No estudo realizado por Pinto (2015) ao comparar o peso das larvas maduras (mg), de *Musca domestica* tratadas com óleo essencial de *Pinus caribaea* Morelet. coletado no Brasil e em Cuba, obteve resultados similares aos nossos onde as larvas tratadas foram mais leves que as do controle, foi observado que somente a concentração de 50% teve o seu peso aumentado ( $25,97 \pm 2,19$ mg/óleo/Brasil e  $25,91 \pm 2,45$ mg/óleo/Cuba) com diferença significativa quando comparada com os grupos controle sem DMSO ( $21,50 \pm 1,76$ mg) e com DMSO ( $21,59 \pm 1,39$ mg). Os grupos tratados apresentaram diferença significativa no peso quando comparados com os grupos controles.

A análise da duração dos estágios larval e pupal, assim como do período de neolarva - adulto evidenciou que não houve um comportamento que estabelece uma diferença entre os grupos tratados e os grupos controles (Figura 35). Foi possível observar que não existem diferenças estatisticamente significativas para todas as concentrações quando aplicado o teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). Em todos os casos o período de desenvolvimento esteve compreendido entre nove (9) e dez (10) dias sem diferenças entre os grupos controles e os tratados.



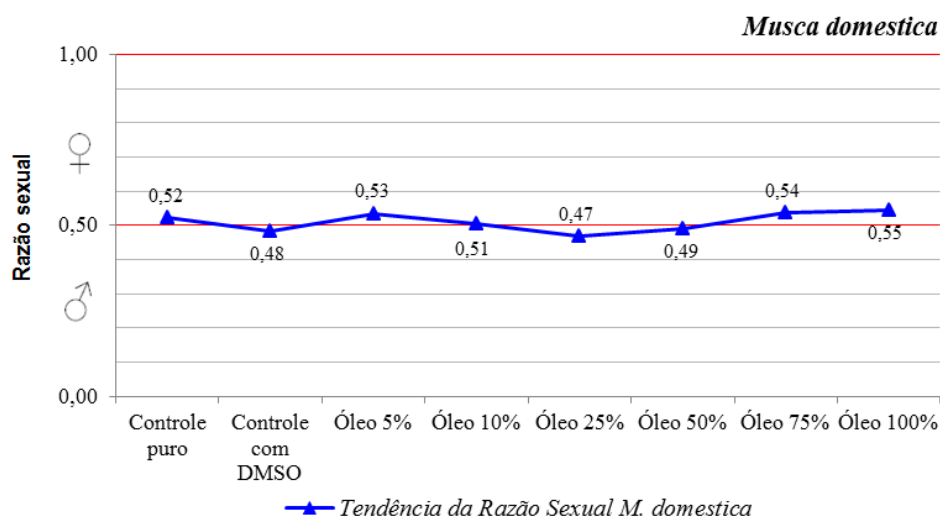
**Figura 35. Efeito do óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* sobre o tempo de desenvolvimento de *Musca domestica*.**

Estes resultados diferem dos obtidos por Pinto (2015) quando estudou a atividade inseticida do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* de Cuba e Brasil e seu efeito no desenvolvimento pós-embrionário desta espécie de mosca, encontrando que o desenvolvimento pós-embrionário de *M. domestica* pareceu estar drasticamente influenciado pelo tratamento com óleos essenciais do Brasil e Cuba, sem diferença entre eles: o período larval em concentrações de 5, 10, 25 e 100% mostrou um atraso no desenvolvimento, enquanto 50 e 75% reduziram a duração do período. No período de neolarva a adulto foi observado que todas as concentrações atrasaram este período, bem como também foi observado o mesmo no período pupal. Em outro estudo realizado por este mesmo autor (Pinto 2015) quando analisou os dados obtidos em relação à duração do período pós - embrionário (larval, pupal e de neolarva a adulto) de *M. domestica* tratadas com óleo essencial de *Pinus caribaea* coletado no Brasil e em Cuba, foi observado também que nos grupos tratados houve um atraso no tempo de desenvolvimento com diferença significativa quando comparado com os grupos controle (com e sem DMSO).

No estudo realizado por Dutok (2015) com o extrato aquoso bruto de sementes de *P. mammosa* também com *M. domestica*, os resultados mostraram que este extrato não possui efeito sobre a duração do estágio pupal da referida espécie e sim sobre a duração do estágio larval e no período completo (desde larva até adulto) e todos os grupos tratados apresentam diferenças estatisticamente significativas ao se aplicar o teste de comparação

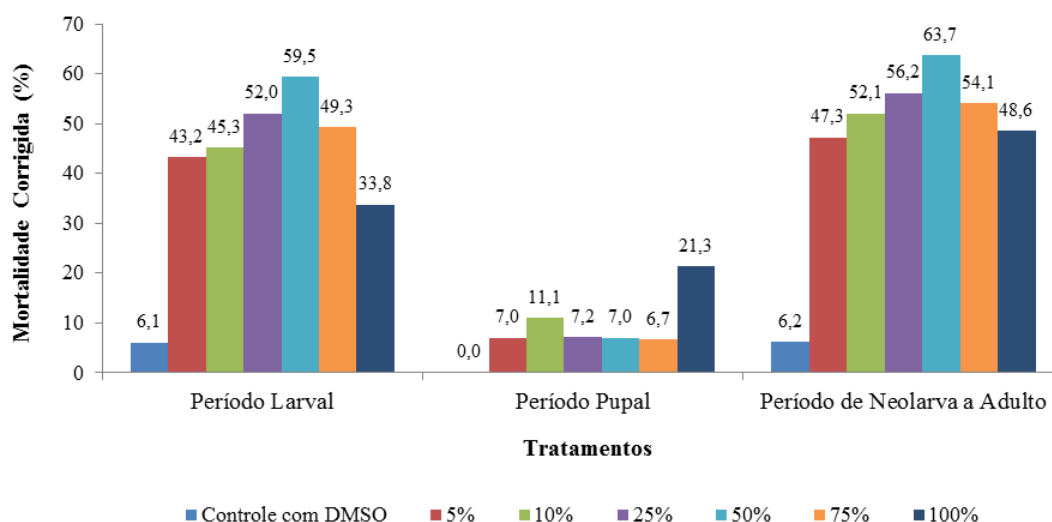
múltipla de médias de Tukey ( $p < 0,01$ ), quando comparados com o grupo controle, retardando ligeiramente o tempo de desenvolvimento.

No presente ensaio a colônia de *M. domestica* mostrou um elevado grau de estabilidade após a aplicação do óleo de *O. sanctum* (Figura 36), resultando numa razão sexual muito próxima de 0,50 para todos os tratamentos, inclusive para os grupos controles, sugerindo uma relação macho/fêmea de 1:1 como preconizado por Fisher (1930).



**Figura 36.** Razão sexual de *Musca domestica* após o tratamento com o com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.

Em nosso estudo o óleo essencial de *O. sanctum* não teve influência sobre o tempo de desenvolvimento de *M. domestica*, porém apresentou influência sobre a mortalidade desta espécie. Na Figura 37 pode-se observar os valores de mortalidade corrigida em porcentagem dos estágios larval, pupal e do período de neolarva-adulto de *M. domestica* após o tratamento com diferentes concentrações do óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis*.



**Figura 37. Mortalidade corrigida larval, pupal e do período de neolarva-adulto de *Musca domestica* após o tratamento com o óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis*.**

No estágio larval, todos os grupos tratados apresentaram valores de mortalidade corrigida superiores ao grupo controle, sendo as concentrações 50, 25 e 75% as mais efetivas. No estágio pupal os valores maiores foram obtidos para as concentrações de 100 e 10%, observando um efeito acumulativo do óleo no período de neolarva até adulto, onde se obteve mortalidade superior a 47% para todas as concentrações testadas.

Neste trabalho não se encontrou relação dose/efeito, o que difere dos resultados encontrados por Pinto (2015) quando avaliou diferentes concentrações do óleo essencial de *P. caribaea* coletado no Brasil e em Cuba nesta espécie, pois a mortalidade no período larval e de neolarva a adulto se apresentou dose dependente. Neste mesmo estudo no período de neolarva até adulto a mortalidade absoluta foi acima de 60% em todas as concentrações em ambos óleos essenciais (Brasil e Cuba), ficando as maiores mortalidades para as concentrações de 100% do óleo.

Quando comparou-se os dados de mortalidade corrigida no período de neolarva até adulto após a aplicação do óleo essencial de *O. sanctum*, se observou que os maiores valores foram para os tratamentos com o óleo a 50, 25 e 75% (63,7; 56,2 e 54,1, respectivamente), mas se mostrarmos os dados de mortalidade absoluta obtidos com os testes com *O. sanctum*, valores acima de 60% (Tabela XVII), estes são muito similares aos obtidos por Pinto (2015) para o óleo essencial de *P. caribaea* e também por Dutok (2015) para o extrato acuoso de *P. mammosa* onde os porcentagens de mortalidade absoluta estiveram entre 44,5% e 61,5%.

**Tabela XVII. Mortalidade absoluta e mortalidade corrigida, pela fórmula de Abbott (1925), dos estágios de desenvolvimento de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum sanctum* (Lamiaceae).**

Tratamentos	Período Larval		Período Pupal		Período de Neolarva a Adulto	
	Absoluta (%)	Corrigida (%)	Absoluta (%)	Corrigida (%)	Absoluta (%)	Corrigida (%)
Controle puro	16,00	-	0,0	-	16,00	-
Controle com DMSO	19,50	6,10	0,00	0,00	19,50	6,20
5%	58,00	13,50	8,30	9,70	61,50	47,30
10%	59,50	2,00	12,30	17,50	65,00	52,10
25%	64,50	8,10	8,50	9,80	68,00	56,20
50%	70,00	6,80	8,30	26,50	73,50	63,70
75%	62,50	2,70	8,00	15,50	66,50	54,10
100%	51,00	23,60	22,40	17,40	62,50	48,60

#### **4.3.7 Análise comparativa do efeito do óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cupensis* sobre o desenvolvimento pós-embrionário das seis espécies de dípteros muscoides estudadas: *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya putoria*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps*, *Lucilia cuprina* e *Musca domestica***

Na Tabela XVIII se ilustra de forma comparativa o efeito da aplicação tópica (dose única) das 6 concentrações de OS avaliadas sobre os diferentes parâmetros determinados: massa corporal, duração do período neolarva-adulto (que inclui o estágio larval e o estágio pupal), razão sexual e mortalidade absoluta e corrigida.

Todas as espécies foram sensíveis ao tratamento com óleo essencial de OS para o parâmetro massa corporal. Nas espécies *Cochliomyia macellaria* e *Musca domestica* em todos os tratamentos as larvas mostraram valores de massa corporais menores quando comparadas com os grupos controles. Nas espécies *Chrysomya putoria*, *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala* e *Lucilia cuprina* todos os grupos submetidos ao tratamento resultaram com uma massa corporal maior quando comparados com os grupos controles. Estes achados indicam que o óleo essencial de *O. sanctum* poderia estar, de alguma forma, afetando o modificando processos fisiológicos específicos dos insetos, tais como o controle endócrino do crescimento de insetos, o sistema neuroendócrino ou a produção de alguns hormônios.

Os valores calculados da razão sexual para cada espécie indicaram que todas as colônias (amostras incluídas no estudo) se mantiveram estáveis após a aplicação do óleo. Desta forma, a utilização deste óleo essencial não tem uma influência nesta variável biológica.

A duração do período pós-embrionário de um díptero muscoide pode variar uma vez que estes insetos são submetidos a tratamentos com substâncias e/ou extratos que podem acelerar (diminuir o tempo) ou retardar (aumentar o tempo) de desenvolvimento. Quando analisada a duração dos estágios de todas as espécies estudadas se observou que:

Para a espécie *Cochliomyia macellaria* o período de desenvolvimento larval para os grupos tratados foi maior em quanto comparado aos controles. Para as espécies *Chrysomya putoria*, *Chrysomya megacephala* e *Lucila cuprina* este período foi menor quando comparado aos grupos controles. O óleo teve muito pouco efeito sobre a espécie *Chrysomya albiceps* no período larval, diminuindo ligeiramente o período para as concentrações de 10% e 50%, e não teve nenhum efeito para este parâmetro na espécie *M. domestica*.

O período de desenvolvimento pupal foi maior para os grupos tratados com concentrações de 10 e 75%, para a espécie *Chrysomya albiceps* e menor para as espécies *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya putoria* (exceto 25%), *Chrysomya megacephala* e *Lucila cuprina*. A espécie *Musca domestica* não foi afetada neste período pelo óleo de OS.

Como resultado se obteve que o período de neolarva a adulto apresentou valores médios maiores para a espécie *Cochliomyia macellaria* (exceto ao 5%) e menores para *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya putoria*, *Chrysomya megacephala* e *Lucila cuprina*, o que demonstra a influência deste óleo sobre o desenvolvimento destas cinco espécies de moscas. A análise da duração do período de neolarva a adulto para *Musca domestica* evidenciou que não houve um comportamento que estabeleça uma diferença entre os grupos tratados e os grupos controles.

Ao se analisar o parâmetro mortalidade corrigida no estágio total (neolarva a adulto), a espécie mais sensível foi *C. putoria* (70,84%), seguida pela seguinte ordem: *M. domestica* (63,7%), *C. macellaria* (62%), *C. albiceps* (37,4%), *L. cuprina* (37%), *C. megacephala* (27%).



**Tabela XVIII. Resumo simplificado do comportamento, em forma comparativa, do efeito da aplicação tópica dose única do óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis* sobre o desenvolvimento pós-embrionário de cinco espécies da família Calliphoridae (*Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya putoria*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps* e *Lucilia cuprina*) e a espécie *Musca domestica* (Muscidae). Indivíduos por concentração: 200. Amostra tratada independente da dose: 1200 indivíduos.**

Espécie	Estabilidade da colônia		Duração do período de desenvolvimento pós-embrionário			Mortalidade	Efeitos pós-emergência
	Massa corporal	Razão Sexual	Estágio Larval	Estágio Pupal	Período Neolarva - adulto		
<i>Cochliomyia macellaria</i>	↓	~	↑	↓	↑	Absoluta-Corrigida MA:64,5% MC:62%	---
<i>Chrysomya putoria</i>	↑	~	↓	↓	↓	Absoluta-Corrigida MA:81,4% MC:70,84%	C5% (13,04%) C10% (10,44%)
<i>Chrysomya megacephala</i>	↑	~	↓	↓	↓	Absoluta-Corrigida MA:38,5% MC:27%	C10% (11,64%) C 25%(15,86%) C50% (11,38%)
<i>Chrysomya albiceps</i>	↑	~	↓10e 50%	↑10 e 75%	↓	Absoluta-Corrigida MA:66,5% MC:37,4%	---
<i>Lucilia cuprina</i>	↑	~	↓	↓exceto 25%	↓	Absoluta-Corrigida MA:54% MC:37%	---
<i>Musca domestica</i>	↓	~	---	---	---	Absoluta-Corrigida MA:73,5% MC: 63,7 %	---

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

Além de todas as modificações do ciclo pós-embrionário, *O. sanctum* também causou alterações morfológicas em adultos de *C. putoria* nas concentrações de 5% (13,04% de moscas com malformações) e 10% (10,44% também com alguma deficiência) e na espécie *C. megacephala* nos grupos tratados com as concentrações 10% (11,64% insetos malformados, 25 (15,86% moscas com malformações) e 50% (11,38% com deficiência). Para ambas espécies as alterações morfológicas mais comuns encontradas foram o ptilinum não retraído e asas torcidas. As alterações morfológicas afetaram diretamente a capacidade de voar, e, conseqüentemente, para encontrar comida, se reproduzir, bem como serão presas fáceis aos predadores. Assim, estes resultados demonstraram que o óleo essencial de *O. sanctum* pode representar um método alternativo eficaz para controlar as moscas destas espécies.

#### 4.4 Efeito inseticida do óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* sobre adultos de *Musca domestica*

A Tabela XIX apresenta o número de moscas domésticas mortas e / ou paralisadas após os testes usando as mesmas seis concentrações de óleo essencial de manjeriço. A atividade biológica observada mostra que a mortalidade é também dependente da dose.

**Tabela XIX. Número de adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) mortos e/ou paralisados usando diferentes concentrações de óleo essencial extraído de *Ocimum sanctum* L. var.  *cubensis*.**

Tratamento / tempo	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
	min	min	min	min	min	Min	min	min	min	min	min	min
5%	paralisadas						29	33	34	39	43	52
	mortas											
10%	paralisadas						32	34	37	42	53	61
	mortas											
25%	paralisadas	30	57	19	22	29	25	21	29	24	22	24
	mortas			51	71	74	86	97	99	106	111	122
50%	paralisadas	58	90	89	87	64	79	42	17			
	mortas			11	29	52	65	101	133	150		
75%	paralisadas	50	70	51	52	72	64	33	19			
	mortas			39	60	78	86	117	131	150		
100%	paralisadas	100	30	22	5	3						
	mortas	21	115	123	145	147	150					
DMSO	paralisadas											
	mortas											

As concentrações mais baixas (5 e 10%) provocaram apenas paralisção 70 minutos após a aplicação e nenhuma morte no final do experimento (120 minutos). Por outro lado, na maior concentração (100%) todas as moscas morreram após uma hora de exposição. A concentração letal LC<sub>50</sub> foi estimada em 10,69% (9,41µg) e, segundo o teste de Pearson, observou-se uma relação causa-efeito (p <0,0001).

Não foram encontrados na literatura estudos sobre a atividade inseticida do óleo essencial de *O. sanctum* sobre *M. domestica*. Os resultados do presente estudo concordam com a descrição de Sinthusiri e Soonwera (2013) quando estudaram o efeito inseticida do óleo essencial de *O. basilicum*. Em ambas investigações, percebeu-se que em concentrações de 10% do óleo essencial, o efeito sobre as moscas adultas é pequeno, mesmo após 60 minutos. Entretanto, Sinthusiri e Soonwera (2013) não experimentaram concentrações maiores (acima de 10%), nas quais o óleo de *O. sanctum* se mostrou muito efetivo não apenas no momento em que os efeitos aparecem, mas também no número de moscas afetadas, de acordo com os resultados desta investigação.

Note-se que o óleo essencial puro afeta 81% das moscas (67% paralisadas e 14% mortas) nos primeiros 10 minutos (Tabela XIX). É importante observar que as moscas relatadas como paralisadas nunca recuperam sua vitalidade; estando mortas todas em

períodos mais longos de tempo. Este evento (morte da mosca) ocorre geralmente 20 minutos depois que as moscas começam a ficar paralisadas. Esta sequência (o efeito da paralisia antes da morte) foi atribuída a sesquiterpenos em outros estudos (Viegas Junior 2003; Bertoni 2012) e estes tipos de substâncias são bastante abundantes no óleo essencial de *O. sanctum*.

Este comportamento pode sugerir o possível mecanismo de ação deste óleo, o que poderia estar atuando por contato nestes insetos. Visto que estas substâncias que atuam por contato, caracterizam o modo de ação de um inseticida que age e é absorvido pela pele (tegumento) do inseto, como por exemplo, a nicotina, rotenona e piretrina, que afetam o sistema nervoso central, que é acessível para essas substâncias em toda a superfície do corpo do inseto ou pelas vias respiratórias, causando rapidamente a morte do inseto (Kathrina e Antonio 2004).

Em relação às doses letais, Pavela (2008) relatou uma  $CL_{50}$  para aplicação tópica de *O. basilicum* em adultos de *M. domestica* de 15  $\mu\text{g}$  / mosca. Em nosso estudo obtivemos uma  $CL_{50}$  equivalente a 9,41  $\mu\text{g}$  / mosca (10,69%), menor à de Pavela (2008). Ambos os estudos também corroboram aos resultados encontrados por Bertoni (2012) nesta espécie, quando experimentou um óleo essencial de manjeriço colombiano, obtendo um valor de  $CL_{50}$  de 10,4  $\text{mg} / \text{dm}^3$ . Este mesmo autor informou a atividade inseticida de alguns compostos puros que normalmente são encontrados em óleo de *O. basilicum* e que também se encontram no óleo essencial de *O. sanctum*. Para o linalol, o quinto composto mais abundante em nossa amostra, foi estimada uma atividade de  $LC_{50} = 13,6 \text{ mg} / \text{dm}^3$ , este valor é próximo àqueles relatados para a atividade de toda a mistura que implica o óleo essencial de manjeriço (10,4  $\text{mg} / \text{dm}^3$ ). Por outro lado, o composto principal (eugenol) só atinge a atividade a  $CL_{50} = 98,4 \text{ mg} / \text{dm}^3$ . Esses achados confirmam que a atividade de um óleo essencial não só está relacionada com a atividade do composto principal, mas também pelo efeito sinérgico de todos os constituintes químicos do composto.

À luz de todos esses achados, podemos concluir que o óleo essencial de *O. sanctum* coletado em Cuba possui uma composição química capaz de ter um efeito em todas as fases do ciclo de vida de *M. domestica*, exaltando suas potencialidades como um inseticida eficaz contra esse vetor, tendo em conta que *M. domestica* é o exemplo clássico da espécie que desenvolveu resistência à maioria dos inseticidas químicos (sintéticos) conhecidos, além de possuir os genes necessários para o desenvolvimento de resistência aos produtos mais poderosos da atualidade (Kaufman et al. 2001; Learmount et al. 2002).

#### 4.5 Avaliação do unguento a 15% de óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* numa miasse suína.

A miíase cutânea é uma doença da pele muito comum em animais, (Guimarães 1999). Neste trabalho foi utilizada uma porca da raça Yorklan, de 18 meses de idade e de 160 kg de peso corporal, como hospedeiro para o estudo de eficácia de um unguento a 15% de óleo essencial de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* (Figura 38), em uma miíase (natural) facultativa cutânea ulcerante classificada pelo médico veterinário Yoandris Quintana Duany.



**Figura 38.** Unguento a 15% de óleo essência de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* embalado em potes de vidro de cor âmbar.

Na **Figura 39** pode-se observar a lesão na pele de porco, sem tratamento, ao início do estudo. No 1 dia do estudo a lesão apresentava um diâmetro de 5 cm aspecto úmido, bordas regulares, com exsudação de sangue e fluidos, odor de sangue e tecido em decomposição.

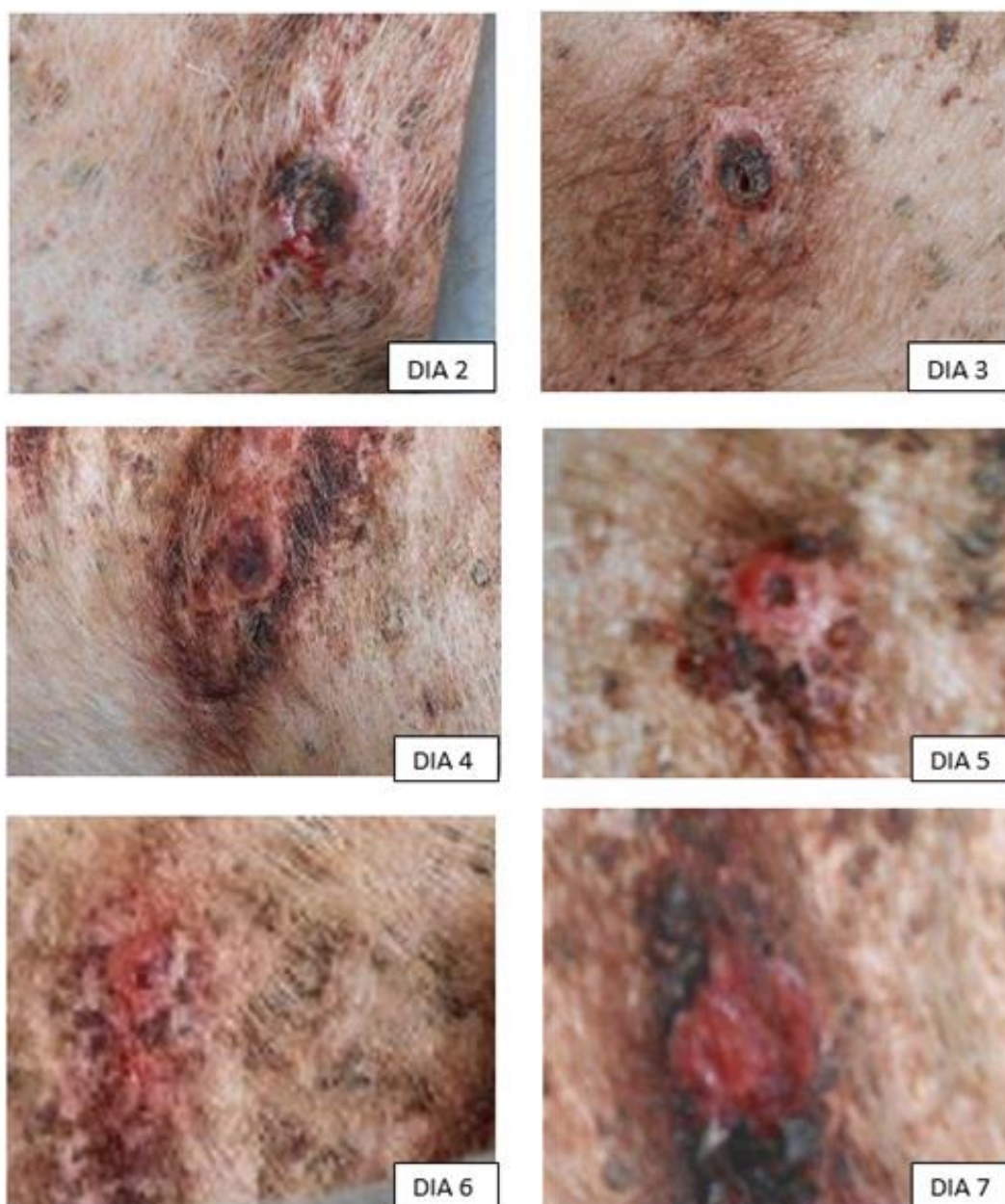


**Figura 39.** Lesão na pele do porco ao início do estudo.

Foi realizada a coleta de algumas das larvas presentes na lesão. O estudo de identificação realizado mostrou que pertencem a espécie *Musca domestica* (Carvalho et al. 2002). Este resultado foi confirmado durante a emergência dos insetos. Este inseto é

considerado um parasita facultativo que pode causar miíase em animais e no homem (Manfrim et al. 2007; Cansi e Demo 2011).

Como foi mencionado acima, no primeiro dia de tratamento a lesão tinha um diâmetro aproximado de 5 cm (figura) com exsudação de sangue e fluidos. Ao segundo dia, já não apresentava umidade (ausência de fluidos) e seu diâmetro diminuiu até aproximadamente 4,1 cm e continuou diminuindo até fechar completamente no dia 7 (**Figura 40**).

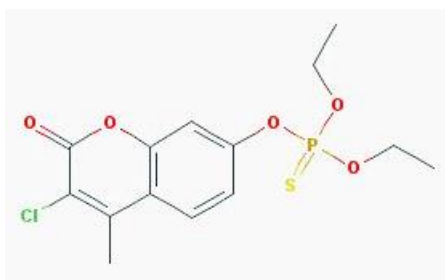


**Figura 40.** Evolução da lesão de miíase suína tratada com o unguento de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* a 15%.

O unguento utilizado para este estudo estava composto por vaselina, lanolina e óleo essencial de OS. Todos os componentes da base tem sido classificados como inócuos segundo (Vila Jato 2000) e foi demonstrado neste trabalho que o óleo essencial não é tóxico. O princípio ativo utilizado no unguento (óleo essencial de *Ocimum sanctum*) conseguiu reduzir a lesão da miíase num período de sete dias só. Após o segundo dia de tratamento, não se observaram larvas vivas na lesão tratada com o unguento, no entanto, na lesão que foi tratada com a base do unguento só (o controle) apresentou um tamanho maior com as mesmas características do primeiro dia, com fluido sanguinolento, aspecto podre e com cheiro de tecido podre e ainda as larvas ficavam vivas. Por esta causa, o médico veterinário decidiu aplicar nesta lesão o Asuntol líquido.

Em Cuba, as infestações causadas por larvas de moscas são normalmente tratadas com o Asuntol. Este produto é uma emulsão que possui como princípio ativo um composto organofosforado (OP) (**Figura 41**) chamado de Coumaphos (Deken et al. 2017).

Segundo a experiência do médico veterinário com o uso de o Asuntol, a miíase cutânea em porco é curada normalmente em sete dias. A metabolização do coumaphos é mais rápida em mamíferos do que em artrópodes (normalmente os alvos), o que significa que o produto é menos tóxico em mamíferos (DL<sub>50</sub> ratos: 56 mg/Kg). Asuntol é usado para mergulhos e pulverizações, bem como para a lavagem pessoal. O Asuntol é bastante estável e possui efeito residual de 4 dias. Da sua desintegração resulta na formação do potasan que é um produto tóxico. Segundo a classificação das Classes de toxicidad pela OMS, o coumaphos líquido pertence à classe II, ou seja, moderadamente perigoso (Garcia-Garcia 2008, Bayer Health Care 2017, OMS 2017).



**Figura 41. Estrutura química do Asuntol (Coumaphos).**

Os inseticidas OF ligam-se ao centro esterásico da acetilcolinesterase (AChE), impossibilitando-a de exercer sua função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético. A AChE está presente no sistema nervoso central (SNC), sistema

nervoso periférico (SNP) e também nos eritrócitos. Inativa a acetilcolina, responsável pela transmissão do impulso nervoso no SNC, nas fibras pré-ganglionares, simpáticas e parassimpáticas e na placa mioneural. Isto inativa a enzima e bloqueia a degradação do neurotransmissor acetilcolina, divulgado pelo que é a célula pré-sináptica do nervo a um impulso subsequente (despolarização). A acetilcolina se liga ao receptor de acetilcolina nicotínica pós-sináptica e ativa um canal de catião intrínseca resultando numa despolarização da célula pós-sináptica devido ao influxo de íons sódio e cálcio. Se acetilcolina não é hidrolisada pela acetilcolinesterase, a concentração do neurotransmissor aumenta, levando a hiperexcitação do sistema nervoso central (SNC) (Carvalho e Miranda 2015).

A *Musca domestica* possui mecanismos de adaptação que tem facilitado o aparecimento de resistência aos inseticidas (Kaufman et al. 2001; Learmount et al. 2002). Esta espécie possui um ciclo de vida curto, apresentando fácil adaptação ao meio. Esse lhe confere um alto potencial de resistência quando são aplicados no meio deles intensivamente alguns inseticidas como o DDT, o Malathion e outros comumente usados na Europa, Ásia e América (WHO 1992; Shono e Scott 2003; Srinivasan et al. 2008). Martiradonna e Soto (2007) reportaram uma variabilidade na linha de base aos inseticidas organofosforados (fenitrotiom e malathion) de populações adultas de *Musca domestica* L. O estudo evidenciou que o inseticida fenitrotião apresentava maior toxicidade, pois necessitou de menor concentração para se obter o efeito desejado. O contrário aconteceu com o malathion que precisou de concentrações maiores para produzir a mortalidade esperada (resistência).

Outros estudos têm também analisado a resistência aos organofosforados. A resistência de carrapatos *Boophilus* e moscas do chifre (*Haematobia irritans*) para organofosforados é bastante comum em muitos países. O que pode reduzir com frequência à eficácia destes produtos (EMBRAPA 2005b, Silveira 2014, Veríssimo 2015).

Tomando em conta que a resistência aos inseticidas está aumentando mundialmente e constitui um dos mais complexos problemas de controle de pragas na atualidade. Já foram documentadas 447 espécies de insetos e de ácaros que desenvolveram resistência a um ou mais grupos químicos e orgânicos (Georghiou e Mellon 1983; Georghiou 1986; Roush e Tabashnik 1990), sendo importante achar produtos naturais capazes de substituí-los. Desta forma o óleo essencial de OS pode ser um bom candidato, visto que neste estudo mostrou ter uma ação similar ao Asuntol no tratamento da mífase.

Os resultados obtidos na rápida evolução da miíase suína tratada se devem aos achados em nossa pesquisa quando se avaliou a ação do óleo essencial de OS a 15%, sendo capaz de ter uma mortalidade absoluta em *M. domestica* no período larval de 59,5%, o que garante sua efetividade para o controle das larvas produtoras da miíase avaliada, ainda que ele pode atuar sobre o inseto adulto, já que na avaliação da atividade inseticida se obteve aos 120 min. de aplicado o óleo que 61 moscas encontravam-se paralisadas, o que pode também ter ajudado para que não ocorresse reinfecção na lesão.

Também com certeza influenciaram as propriedades farmacológicas do OS, que resulta da interação sinérgica de diversos fitoquímicos ativos. Investigações fitoquímicas desta planta mostraram que os fenóis presentes nela (Eugenol, cirsilineol, isotimucina, apigenina e Ácido rosamarínico) e flavonoides (orientina e vicenina) possuem potentes atividades antioxidantes (inibidor da ciclo-oxigenase) (Geetha e Vasudevan 2004), e o Eugenol é o componente maioritário do óleo estudado por nós.

Tem sido reportado também que esta planta apresenta um efeito de cura de ferida. Foi avaliado o efeito sobre o fator de necrose tumoral Alfa (TNF-Alfa) de um extrato aquoso de folhas de *Ocimum sanctum* L. pelo modelo de excisão de reparo de feridas em ratos Wistar albinos, mostrando após a aplicação do extrato um aumento da taxa de epitelização com aumento na contração das feridas (Shetty et al. 2008). Neste estudo de Shetty et al. (2008) também foi avaliado o efeito de um extrato etanólico sobre as feridas, mostrando que o mesmo aumentou significativamente a resistência à ruptura. As feridas tratadas com extrato epitelizaram mais rapidamente e a taxa de contração da ferida foi significativamente aumentada em comparação com as feridas do grupo controle. Foi achado também um aumento significativo no peso do tecido de granulação úmido e seco.

Em outro estudo desenvolvido por Govind e Madhuri (2006), OS apresentou atividade anti-úlceras em ratos. O óleo fixo de *Ocimum sanctum* L. administrado por via intraperitoneal provocou atividade anti-ulcerosa significativa contra a aspirina, indometacina, álcool (etanol a 50%), histamina, reserpina e serotonina das úlceras induzidas pelo estresse em ratos. O óleo fixo possuía significativamente atividade anti-ulcerosa como inibidor da lipoxigenase, antagonista da histamina e anti-secretórios.

*Ocimum sanctum* mostrou também resposta ao efeito imune. Um destilado a vapor das folhas frescas de *O. sanctum* mostraram modificação na resposta imune humoral em ratos albinos que poderiam ser atribuídos a produção de anticorpos, liberação de mediadores



de reações de hipersensibilidade e respostas dos tecidos aos mediadores nos órgãos alvos (Mediratta et al. 1998). Outros autores têm relatado que OS mostrou suplementação da resposta de imunogenicidade humoral representado por um aumento no título de anticorpos dentro do teste de aglutinação de eritrócitos de Windal em ovinos, bem como pela resposta imunológica celular representada por formação de roseta e linfocitose.

Tendo em conta a rápida evolução da lesão e que avaliamos, também a falta de toxicidade dérmica deste óleo, podemos recomendar continuar com os estudos que permitam patentear esta nova formulação para o tratamento das míases provocadas por as espécies de moscas estudadas por nós.

## 5. CONCLUSÕES

1. O óleo de *Ocimum sanctum* L. var. *cubensis* apresenta oito componentes principais, correspondendo a mais do que 94%. Os três componentes principais, eugenol 21,96%,  $\beta$ -cariofileno 20,79% e biciclogermacreno 20,37% representam mais de 60% dos compostos identificados. Estes compostos químicos são reconhecidos pela atividade inseticida.
2. Os ensaios de Toxicidade Aguda Oral, Toxicidade Dérmica e o Teste de toxicidade “*in vitro*” em células cardíacas mostraram que o óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis* não é tóxico nas condições experimentais empregadas.
3. Nos estudos da atividade inseticida do óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis* em cinco espécies de Calliphoridae (*Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya putoria*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps*, *Lucilia cuprina*) e Muscidae (*Musca domestica*) se comprovou que o óleo afetou os parâmetros: massa corporal em todas as espécies, duração do período neolarva-adulto (estágio larval e o estágio pupal), com exceção da espécie *M. domestica* e não afetou o parâmetro razão sexual para nenhuma das espécies avaliadas.
4. O óleo de *O. sanctum* L. var. *cubensis* causou mortalidade em todas as espécies de moscas estudadas, a mortalidade corrigida no período de desenvolvimento de neolarva até adulto foi maior para *C. putoria* (70,84%), seguida pela seguinte ordem: *M. domestica* (63,7%), *C. macellaria* (62%), *C. albiceps* (37,4), *L. cuprina* (37%), *C. megacephala* (27%), respectivamente, causando também alterações morfológicas nas espécies *C. putoria* e *C. megacephala*.
5. A atividade inseticida sobre os adultos de *M. domestica* mostrou que a mortalidade é dependente da dose e a concentração letal CL<sub>50</sub> foi estimada em 10,69% (9,41  $\mu$ g) mostrando que o óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis* coletado em Cuba possui uma composição química capaz de ter um efeito em todas as fases do ciclo de vida desta espécie.
6. O unguento a 15% de óleo essencial de *O. sanctum* L. var. *cubensis* avaliado numa miíase (facultativa cutânea ulcerante) suína produzida por larvas de *M. domestica*, mostrou efetividade conseguindo a cicatrização da lesão em sete (07) dias.

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 1925; 18: 265–267.

Adams RP. Identifications of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry, 4th Ed. Allured Publ., Carol Stream,IL. 2007.

Adenusi AA, Adewoga TOS. Studies on the potential and public health importance of non-biting synanthropic flies in the mechanical transmission of human enterohelminths. Trans R Soc Trop Med Hyg 2013; 107: 812–818.

Ahid SMM. Apostila Didática em Entomologia Veterinária. Apostila, Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2009.

Aktar W, Sengupta D e Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdisc Toxicol. 2009; 2:1–12.

Alemán C. Reference database for the principal physiological indicators in three species of laboratory animal Lab. Anim 2000; 34(1):358-378.

Alemán C. Reference database of mains physiological parameters in Sprague Dawley rats from 6 to 32 months. Lab. Anim 1998;32(4):457-466.

Almeida JEM e Batista-Filho, A. Banco de Microorganismos Entomopatogênicos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 2001; 20: 30-33.

Amorim DS. Neotropical Diptera Diversity: Richness, patterns and perspectives. p. 71-97. In: Pape T, Bickel D, Meier R. Diptera Diversity: Status, challenges and tools. Koninklijke Brill NV, Leiden. 459p. 2009.

Andrey A. Gurtovenko, Jamshed A .Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. J. Phys. Chem. B. 2007; 111: 10453-10460.

Associação Brasileira de Saúde Coletiva – Abrasco. DOSSIÊ ABRASCO. Não há dúvidas estamos diante de uma verdade cientificamente comprovada: OS AGROTÓXICOS FAZEM MAL À SAÚDE DAS PESSOAS E AO MEIO AMBIENTE. 2012.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. “Biological effects of essential oils—a review”. Food Chem. Toxicol. 2008; 46: 446–75.

Baumgartner DL, Greenberg B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae). J Med Entomol 1984; 21: 105-113.

Bayer Health Care Asuntol <https://www.sanidadanimal.bayer.com.mx/es/abc-productos/ectoparasiticidas/asuntol-liquido-y-asuntol-polvo/index.php> Acessado em março 2017.

Bertoni, AO. Insecticida natural para el control de *Musca domestica* en base a aceites esenciales y sus componentes. PhD thesis, Universidad Católica de Córdoba. 2013.

Bhargava KP, Singh N. “Anti-stress activity of *Ocimum sanctum* Lin.” Indian J Med Res. 1981; 73: 443–451.

Bhatnagar M, Kapur KK, Jalees S, Sharma S.K., Laboratory evaluation of insecticidal properties of *Ocimum basilicum* Linnaeus and *O. sanctum* Linnaeus plant's essential oils and their major constituents against vector mosquito species. Journal of Entomological Research. 1993; 17: 21- 29.

Bishopp FC. Flies which cause myiasis in man and animals. Some aspects of the problem. Journal of Economic Entomology, Lanham; 19158, (3): 317-329.

Biswas NP, Biswas AK. Evaluation of some leaf dusts as grain protectant against rice weevil *Sitophilus oryzae* (Linn.) Environ Ecol. 2005; 23:485–8.

Brindley WA, Selim AA. Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. Environ. Entomol. 1984; 13: 349-353.

Buss e. a.; Park-Brown, S. G. Natural products for insect pest management. Gainesville: UF/IFAS, 2002. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/IN197>. Consultado em: 15 out. 2013.

Byrd J, Castner J. Forensic entomology, the utility of arthropod in legal investigations. Washington: CRC Press, 418 p, 2001.

Cabral MMO, Crescente ERF, Mendonça PM, Gomes CMS, Oliveira VC, Kelecom A. *Melia azedarach* L. extracts and their activity on *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2008. 18 (Supl.): 699-702.

Cabral MMO, Mendonça PM, Barbosa-Filho JM, Queiroz MMC, Mello RP. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1974) (Diptera: Calliphoridae). Fitoterapia. 2007; 78: 20-24.

Campbell PM, Trott JF, Claudianos C, Smyth KA, Russell R J e Oakeshott JG. Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* with comparisons to putative orthologues in other Diptera. Biochem. Genet. 1997; 35: 17–40.

Canadian Council on Animal Care. Guideline for selecting appropriate end points in specific areas of biomedical research and testing. Guide to the care and use of Experimental Animal. 2nd. Ed. Chapter VI Canada; 1: 22-24. 1993.

Cannon JB, Cantrell CL, Astatkie T, Zheljzakov VD. “Modification of yield and composition of essential oils by distillation time”, *Ind. Crops Prod.* 2013; 41: 214–220.

Cansi ER, Demo C. Ocorrência de míases em animais de companhia no Distrito Federal, Brasil.

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

Carson, R. Primavera silenciosa, Munique: Biederstein, 1961.

Carvalho A, Miranda D. Organofosforados e Carbamatos. Geagra UFG, Grupo de Estudos Agrônômicos em Grãos e Algodão na Universidade Federal de Goiás (UFG), 2015. Em <https://pt.slideshare.net/GeagraUFG/organofosforados-e-carbamatos>. Acessado em março de 2015.

Carvalho CJB, Moura MO, Ribeiro PB. Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia.* 2002; 46(2): 107-114.

Carvalho CJB, Rafael JA, Couri MS, Silva VC. Diptera, p. 702-744. In: Rafael JA, Melo GAR, Carvalho CJB, Casari AS, Constantino R. *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia.* Ed. Holos. 810p, 2012.

Carvalho CJB, Ribeiro PB. Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do sul do Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2000; 9(2): 169-173.

Carvalho WA. Fatores de Risco Relacionados com Exposição Ocupacional e Ambiental a Inseticidas Organoclorados no Estado da Bahia, Brasil, 1985. *Bol. Of Sanit. Panam.* 1991; 111(6): 512-524.

Chen WY, Hung TH, Shiao SF. Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. *Journal of Medical Entomology, Columbia,* 2004; 41(1): 47-57.

Cunha-E-Silva SL, Milward de Azevedo EMV. Controle de qualidade de imaturos de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em estoque. *Parasitologia al Día, Santiago.* 1999; 23: 1-2.

De Deken R, Horak I, Madder M, Stoltsz H. Organophosphorous compounds. [http://www.afrivip.org/sites/default/files/Ticks\\_control/chemical\\_products\\_organophosphorous.html](http://www.afrivip.org/sites/default/files/Ticks_control/chemical_products_organophosphorous.html). Acessado em janeiro 2017

Devi PU, Ganasoundari A. Radioprotective effect of leaf extract of Indian medicinal plant *Ocimum sanctum*. *Indian J Exp Biol.* 1995; 33: 205–208.

Dias LS. Biodiversidade de moscas Calliphoridae e Muscidae no depósito de lixo urbano de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. 40 f. Dissertações (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente. 2008.

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

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Documentos 205. Inseticidas Botânicos: Seus Princípios Ativos, Modo de Ação e Uso Agrícola. ISSN 1517-8498 dezembro/2005 a.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aspectos do Controle da Moscadão-chifres e Manejo de Resistência. Documentos 77. ISSN 1517-1981 setembro, 2005 b.

Entomologia Forense - Quando os insetos são vestígios. 2 ed. Campinas, SP: Millenium. 2008. 420p.

Escalona MH, Fiallo VRF, Hernández MMA, Pacheco RA, AJA ETP. Plaguicidas naturales de origen botánico. 2. ed. Habana: INIFAT, 2001.

Eyer F, Felgenhauer N, Jetzinger E, Pfab R e Zilker TR. Acute endosulfan poisoning with cerebral edema and cardiac failure. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 2004. 42(6): 927-32.

Familias de dípteros de interés forense. Disponível em: [http://www.colpos.mx/entomologiaforense/familias\\_de\\_interes\\_forense.htm](http://www.colpos.mx/entomologiaforense/familias_de_interes_forense.htm). Acessado em: Janeiro/2017.

Fariás JM, Mascher D, Paredes-Carbajal MC, Torres-Duran PV e Juárez-Oropeza MA. Uso de los fármacos en oftalmología. Colombia Médica. 2010; 29 (2): 29–38.

Farias MR. Farmacognosia da planta ao medicamento: Avaliação da Qualidade de matéria primas vegetais. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (Eds.) 5ª ed., UFSC e UFRGS Ed.: Porto Alegre. 1999.

Fernandes LF, Pimenta FC, Fernandez FF. First report of human myiasis in Goiás state, Brazil: frequency of different types of myiasis, their various etiological agents, and associated factors. Journal of Parasitology, Amsterdam. 2009; 95(1): 32–38.

Fernandes MCA, Ribeiro RLD, Aguiar-Menezes EL. Manejo agroecológico de fitoparasitas. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. (Ed.). Agroecologia: Princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. cap. 13. p. 273-322. 2005.

Ferraz et al. First record of human myiasis caused by association of the species *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae), and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, Lanham. 2010; 47(3): 487-490.

Ficha de Datos de Seguridad ACOFARMA. Conforme al Reglamento (CE) N° 1907/2006 (REACH). Acofarma Distribución S.A. Llobregat, 2008223-Terrassa. España. Tel: 93 736 00 88 / Fax: 93 785 93 62.

Figueiredo AL, Felipe TG, Vinhas FA, Carvalho RP, Azevedo WTA, Lessa CSS, Aguiar VM. *Lucília cuprina* (Weid, 1830) (Diptera: Calliphoridae) associada à miíase humana em pacientes atendido no Hospital Federal do Andaraí no Rio de Janeiro, RJ. CBE 2012.

Florez E, Wolff M. Descripción y Clave de los Estadios Inmaduros de las Principales Especies de Calliphoridae (Diptera) de Importancia Forense en Colombia. *Neotropical Entomology*. 2009; 38(3): 418-429.

Francesconi F, Lupi O. Myiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, Kansas, 2012; 25(1): 79-105.

Freitas SRQ de. Bioatividade de extratos aquosos de *Eucalyptus* sp. L'Hér. (Myrtaceae) e *Melia azedarach* L. (Meliaceae) sobre *Musca domestica* L. (Diptera, Muscidae). 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

FUNASA. Controle de Vetores: procedimentos de segurança. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

Furtado RF, DE Lima MGA, Andrade M, Bezerra NS, DE Silva MG. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*. 2005; 34(5).

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. *Revista de Biologia e Ciências da Terra, Campina Grande*, 2006; 6(1): 152-164.

Gad SC, Frith ChH, Goodman DG. The Mouse. In: Gad SC editor. *Animal Models in Toxicology*. 2nd ed. Taylor and Francis Group, LLC. New York. p. 25-46, 48-51, 58-72. 2007.

Garcia-Garcia E, Bussacos MA, Fischer FM. Harmonization and toxicological classification of pesticides in 1992 in Brazil and the need to foresee the impacts from the forthcoming introduction of GHS. *Ciênc. Saúde coletiva*. 2008; 13 (2 ): 2279-2287.

Gautam MK, Goel R K. Toxicological Study of *Ocimum sanctum* Linn Leaves: Hematological, Biochemical, and Histopathological Studies. *Journal of Toxicology*. 2014:9.

Geetha RK, Vasudevan DM. Inhibition of lipid peroxidation by botanical extracts of *Ocimum sanctum*: In-vivo and in-vitro studies. *Life Sci.* 2004; 76:21-8.

Gião, JZ, Godoy, WAC. Seasonal Population Dynamics in *Lucilia eximia* Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Neotrop. Entomol.* 2006. 35(6):753-756.

Govind P, Madhuri S. Medicinal plants: better remedy for neoplasm. *Indian Drug.* 2006; 43(11):869-74.

Graczyk TK Knight R, Gilman RH, Cranfield MR. The role of non-biting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Microbes Infect* 2001; 3: 231-5.

Greenberg B. Flies and Disease. Ecology, classification and biotic association. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1971. 83 (6): 1210-1214.

Greenberg B. Flies and Disease. Vol. II: Biology and Disease Transmission. New Jersey: Princeton University Press; 447 pp. 1973.

Guarín Vargas EG. Insectos de importancia forense asociados a la descomposición cadavérica del cerdo *Sus domesticus*, expuesto a sol, sombra total y sombra parcial, en Mayagüez, Puerto Rico. Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de Maestro en Ciencias en Biología. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez. 2005.

Guimarães JH, Papavero N, Prado AP. As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Revista Brasileira de Zoologia, São Paulo.* 1983; 1(4): 239-416.

Guimarães JH, Papavero N. Myiasis Caused by Facultative Parasites. In: Myiasis in man and animals in the Neotropical Region. Plêiade, Bibliographic database, São Paulo. 35p. 1999.

Guimarães JH, Papavero N. Myiasis in man and animals in the Neotropical region. Bibliographic database. São Paulo: FAPESP/Editora Plêiade, 308p. 1999.

Guimarães JH, Prado AP, Buralli GM. Dispersal and distribution of the three newly introduced species of *Chrysomya Robineau-Desvoidy* in Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 1979; 23: 245–255.

Guimarães JH, Prado AP, Linhares AX. Three newly introduced blowflies species in southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia.* 1978; 22: 59-6.

Gullan PJ, Cranston PS. *Os Insetos: um resumo de entomologia.* São Paulo, Rocca. 2007.

Hall MJ. Trapping the flies that cause myiasis: their responses to host stimuli. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 1995; 89(4): 333-357.



- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 1999; 86: 985–90.
- Hantan I, Zaki MZ. Development of environment friendly insect repellents from the leaf oils of selected Malaysian plants. *Rev. Biod. Environ. Cons.* 1998; 1: 1-7.
- Harvard Medical Asea, Guideline. Guidelines for Animal Studies involving death as an end point; 1999.
- Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 2000. 45:371–391.
- Isman, M. B. Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. *Phytoparasitica, Rehovot.* 1997; 25(4):339- 344.
- ITIS, Integrated Taxonomic Information System (ed.). [«\*Musca domestica\* Linnaeus, 1758»](#). Acessado em maio 2015.
- Jacobson M. Insecticides from plants; A review of the literature - 1954-1971. Washington DC: USDA, 1975. (Agriculture Handbook, 461).
- James MTA Catalogue of the Diptera of the Americas south of the United States. São Paulo: Departamento de Zoologia, Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1970, 28 p.
- James, MT. The flies that cause myiasis in man. Washington: U.S. Department of Agriculture miscellaneous publication n. 631, 175 p. 1947.
- Jantan I, Zaki MZ. Development of environment friendly insect repellents from the leaf oils of selected Malaysian plants. *Rev. Biod. Environ. Cons.* 1998; 1: 1-7.
- Kadian R, Parle M. Therapeutic potential and phytopharmacology of Tulsi. *Int J Pharm Life Sci.* 2012; 3: 1858-1867.
- Kamaraj C, Rahuman AA, Bagavan A. Antifeedant and larvicidal effects of plant extracts against *Spodoptera litura* (F.), *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Parasitol Res.* 2008; 103: 325-331.
- Kathrina GA, Antonio LOJ. Controle biológico de insetos mediante extractos botánicos. In: Carball, M.; Guaharay, F. (Ed.). *Control biológico de plagas agrícolas*. Managua: CATIE, 2004. p. 137-160. (Serie Técnica. Manual Técnico/CATIE, 53).
- Kaufman PE, Scott JG, Rutz, DA. Monitoring insecticide resistance in house flies from New York dairies. *Pest Manag. Sci.* 2001; 57:514-521.
- Klaassen CD, Rozman K. Absorption, distribution and excretion of toxicants. In: Casarrett; Doull's Toxicology: The basic science of poisons. New York: Mc Graw-Hill, 1991.

- Kothari SK, Bhattacharya KA, Ramesh S, Garg SN, Khanuja SPS. Volatile Constituents in Oil from Different Plant Parts of Methyl Eugenol-Rich *Ocimum tenuiflorum* L.f. (syn. *O. sanctum*L.) Grown in South India. Journal of Essential Oil Research. Volume 17. 656-658.
- Koul, O., Walia, S., Dhaliwal, G.S. 2008. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints; Biopestic. Int. 2005; 4: 63–84.
- Kuramoto H, Shimazu M. Control de las poblaciones de la mosca de la casa por *Entomophthora muscae* (Zygomycotina: Entomophthorales) en el gallinero. Appl. Entomol. Zool. 1997; 32: 325-331.
- Lacerda M MI, Vasconcelos S MG, Abreu M FJ, Aragão C A, Wilson AJ. Volatile Constituents from Leaves and Inflorescence Oil of *Ocimum tenuiflorum*L. f. (syn. *O. sanctum* L.) Grown in Northeastern Brazil. Journal of Essential Oil Research. 1999; 11:324-326.
- Laurence BR. The tropical African latrine blowfly, *Chrysomya putoria* (Wiedemann). Medical and Veterinary Entomology. 1988; 2:285 – 291.
- Learmount J, Chapman P, Macnicoll A. Impact of an insecticide resistance strategy for house fly (Diptera: Muscidae) control in intensive animal units in the United Kingdom. J. Econ. Entomol.2002; 95(6):1245- 1250.
- Lee HL, Yong YK. Human aural myiasis. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine e Public Health, Taiwan.1991; 22(2):274-275.
- Mahajan N, Rawal S, Verma M, Poddar M, Alok S. A phytopharmacological overview on *Ocimum* species with special emphasis on *Ocimum sanctum*. Biomed Prev Nutr. 2013; 3:185–92.
- Mallikarjuna K. *Ocimum sanctum*: a review on the pharmacological properties. Int J Basic Clin Pharmacol. 2016; 5(3):558-565.
- Mamun-OR-Rashid ANM, Moshiul Azam MD, Kumar BD, Binte HF, Kumer SM. Ethnomedicobotanical study on *Ocimum sanctum* L. (TULSI) - A REVIEW. Mintage journal of Pharmaceutical e Medical Sciences. 2013:37-42.
- Manfrim AM, Cury A, Demeneghi P, Jotz G, Roithmann R. Nasal Myiasis: Case Report and Literature Review. Arq. Int. Otorrinolaringol. / Intl. Arch. Otorhinolaryngol, São Paulo. 2007; 11(1):74-79.
- Marchiori CH, Castro MEV, Paiva TCG. et al. Dípteros muscóides de importância médica e veterinária e seus parasitóides em Goiás. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2000; 52:350- 353.
- Marchiori CH, Silva Filho OM, Borges MP. Parasitóides de *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) de Itumbiara, Goiás, Brasil. Rev. Patol. Trop. 2003b; 32:263-266.

- Marotti M, P Iccaglia R, G Iovanelli E. Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *J. Agr. Food Chem.* 1996; 14: 3926–3929.
- Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. *Plantas medicinais*. Viçosa, MG: Editora UFV, 220 p. 2000.
- Martiradonna G, Soto VA. Toxicidad de insecticidas organofosforados en *Musca domestica* Linnaeus, 1758, (Diptera: Muscidae), cepa El Limón, estado Aragua, Venezuela. *Bol Mal Salud Amb.* 2007;47(2): 237-244. ISSN 1690-4648.
- Mathew N, Anitha MG, Bala TSL, Sivakumar SM, Narmadha R e Kalyanasundaram M. Larvicidal activity of *Saraca indica*, *Nystanthes arbortristis* and *Clitoria ternatea* against three mosquito vector species. *Parasitology Res.* 2009. 104: 1017–1025.
- Matos FJA. *Farmácias vivas*. 3. ed. Fortaleza: UFC. 220 p. 1998.
- Mc Alpine JF. et al. *Manual of Nearctic Diptera*. Vol 1. Research Branch Agriculture Canada Monograph. 1981. 27: 74.
- McAlpine, J. F., Peterson, B. V., Shewell, G. E. Teskey, H. J., Vockeroth, J. R. e Wood, D M. (coords.). *Manual of Nearctic Diptera*. Ottawa, Ontario: Research Branch Agriculture Canada, v. 2, Monograph 28, 1987.
- Mediratta PK, Dewan V, Bhattacharya SK, Gupta VS, Maiti S, Sen P. Effect of *Ocimum sanctum* Linn. On humoral immune responses. *Indian J Med Res.*1998; 87:384.
- Mello R.P. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorhapha) Encontradas no Brasil. *Entomologia e Vectores.* 2003; 10(2): 255-268.
- Mello RP. Contribuição ao estudo do gênero *Phaenicia* R.-D., 1863 (DIPTERA, CALLIPHORIDAE). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 1961. 59(3): 259-278.
- Mendonça PM, Lima MG, Albuquerque LRM, Carvalho MG e Queiroz MMC. Effects of latex from “Amapazeiro” *Parahacornia amapa* (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development. *Veterinary Parasitology.* 2011. 178:379-382
- Menezes ELA. *Inseticidas Botânicos: Seus Princípios Ativos, Modo de Ação e Uso Agrícola*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Seropédica – RJ. 2005.
- Miana, GA, Rahman AU, Iqbal CMI, Jilani G, Bibi H. Pesticides nature: present and future perspectives. In: COPPING, L. G. (Ed.). *Crop protection agents from nature: Natural products and analogues*. Cambridge: RSC, 1996. p. 241-253.

Mihara M, Kurahashi H. Base-line susceptibility of the oriental latrine fly, *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), to five insecticides. *Med Vet Entomol.* 1991; 5: 51-4.

Mohan L, Amberkar MV, Kumari M. *Ocimum sanctum* linn. (TULSI)-an overview. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2011; 7:51–3.

Mondal S, Mirdha BR, Mahapatra SC. The science behind sacredness of Tulsi (*Ocimum sanctum* Linn.) *Indian J Physiol Pharmacol.* 2009; 53:291–306.

Morales, MR.; Simon, JE. Sweet Dani: a new culinary and ornamental lemon basil. *HortScience*, v. 32, n.1, p.148-149, 1997.

Moretti TC, Thyssen PJ. Mííase primária em coelho doméstico causada por *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil: relato de caso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2006; 58(1):28-30.

Mörner J, Bos, Fredrix M. Reducing and eliminating the use of persistent organic pesticides. Guidance on alternative strategies for sustainable pest and vector management. 2002. 91p. Disponível em: [ttp://www.who.int/heli/risks/vectors/vectordirectory/en/index.html](http://www.who.int/heli/risks/vectors/vectordirectory/en/index.html). Acessado em: Maio/2015.

Mosberg AT, Hayes WA. Subchronic toxicity testing En: Principles and methods of toxicology. 2da. Ed, editado por A Wallace Hayes. Raven Press, Ltd; New York. 1989.

Nakano O, Leite CA. Armadilhas para insetos. Piracicaba: FEALQ, 2000.

Naquvi JK, Dohare SL, Shuaib M, Ahmad IM. Chemical composition of volatile oil of *Ocimum sanctum* Linn. *Int J Biomed Adv Res.* 2012; 3: 129-131.

Nolasco, F. Deficiências nutricionais em manjeriço (*Ocimum* spp.) sob hidroponia. 19 f. Monografias (Graduação). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1996.

Notman R, Noro MG, O'Malley B, Anwar J. Molecular Basis for Dimethylsulfoxide (DMSO) Action on Lipid Membranes. *Journal of the American Chemical Society.* 2006; 128:13982-1398.

Obeng-Ofori D, Reichmuth Ch. Bioactivity of eugenol, a major component of essential oil of *Ocimum suave* (Wild.) against four species of stored-product Coleoptera. *International Journal of Pest Management.* 1997; 43:89-94.

OECD/OCDE 402. Guideline for Testing of Chemicals. Test Guideline 402: Acute Dermal Toxicity. In: OECD/OCDE - Organization for Economic Cooperation and Development Guideline for Testing of Chemicals, OECD, 1987. [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788)

OECD/OCDE 423. Guideline for Testing of Chemicals. Test Guideline 423: Acute oral toxicity - acute toxic class method. In: OECD/OCDE - Organization for Economic Cooperation and Development Guideline for Testing of Chemicals, OECD, 2012. [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788)

Okabe H, Obata Y, Takayama K, Nagai T. “Percutaneous absorption enhancing effect and skin irritation of monocyclic monoterpenes. Drug Des. Deliv. 1990; 6: 229–238.

Oliveira-Costa J e Queiroz MMC. Bionomia de Dípteros de Interesse Forense. In: Janyra de Oliveira-Costa. (Org.). Entomologia Forense - Quando os insetos são Vestígios. 2ed. Campinas, SP: Millenium. 2007. 1: 197-218.

Oliveira-Costa J, Mello-Patiu CA, Carvalho LM, Thyssen PJ, Gomes L, Queiroz MMC, Milano S, Fontes LR, Celino TB, Dias GS, Pessanha RR, Santana DO. Entomologia Forense - Quando os insetos são vestígios. 2 ed. Campinas, SP: Millenium. 420p. 2007.

Oliveira-Costa J. Entomologia Forense – Quando os insetos são vestígios. Campinas: Millennium. ISBN: 85-7625-001-2. 2003.

OMS. Clasificación Toxicológica de los Plaguicidas. Toxicidad del asunto [http://parasitipedia.net/index.php?option=com\\_contentview=articleid=485Itemid=527](http://parasitipedia.net/index.php?option=com_contentview=articleid=485Itemid=527). Acessado em janeiro 2017.

OMS. Classificação dos praguicidas. <http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/programas/arquivos-seguranca-do-trabalho/sequi2.pdf>. Acessado janeiro de 2017.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas à Agrotóxicos. Brasília, 1996. 72p.

Padilla GE, Toranzo JM. Revista ADM, Asociación Dental Mexicana. 87 Congreso Mundial FDIXXV Congreso Nacional e Internacional. ADM; 1998; 55:46-50. Vol. LV;46-50.

Pandey G, Sharma M. Pharmacological activities of *Ocimum sanctum* (Tulsi): A review. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2014; 61(1).

Paterson HE. The status of *Chrysomya chloropyga* and *Chrysomya putoria* (Diptera, Calliphoridae). Proc. 2<sup>nd</sup> Natl Ent Congr, Pretoria 13-16 september 1977:5-6. 1977.

Paton AA. Synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in Africa. Kew Bul. 1992; 47: 403-435.

Pattanayak P, Behera P, Das D, Panda SK. *Ocimum sanctum* Linn. A reservoir plant for therapeutic applications: An overview. Pharmacogn Rev. 2010; 4: 95–105.

Patton WS. Notes on the myiasis-producing Diptera of man and animals. Bull of Ent Res 1922; 12: 239-261.

Pavela R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica*). *Phytother. Res.* 2008; 22: 274-278.

Pavithra B. Eugenol-A Review. *J. Pharm. Sci. e Res.* 2014; 63:153-154.

Pessanha RR; Carramaschi IN; Santos-Mallet JR; Queiroz MMC; Zahner V. Evaluation of larvicidal activity and effects on post embryonic development of laboratory reared *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae), treated with *Brevibacillus laterosporus*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 2015; 128: 44-46.

Peter RJ, Van den Bossche P, Penzhorn BL, Sharp B. Tick, fly, and mosquito control—Lessons from the past, solutions for the future. *Vet Parasit.* 2005; 132: 205–215.

Pino JA, Rosado A, Rodriguez, Garcia Dinah. Composition of the Essential Oil of *Ocimum tenuiflorum* L. Grown in Cuba. *Journal of Essential Oil Research.* 1998; 10: 437-438.

Pinto ZT, Sanches FF, Santos AR, Amaral ACF, Ferreira JLP, Escalona Arranz JC, Queiroz, MMC. Chemical composition and insecticidal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against *Musca domestica*. *Rev. Bras. Par. Vet.* 2015; 24: 36-44.

Pinto ZT. Caracterização Química e Atividade Inseticida dos Óleos Essenciais de Plantas Aromáticas Procedentes do Brasil e de Cuba sobre o Desenvolvimento Pós-embrionário de Dípteros Muscoides. Doutorado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Brasil. 2015.

Prajapati ND, Purohit SS, Sharma AK, Kumar T. *A Hand Book of Medicinal Plant.* 1st edn. Agrobios, India. 2003.

Prins AJ. Morphological and biological notes on six South African blow-flies (Diptera: Calliphoridae) and their immature stages. *Ann S Afr Mus.* 1982; 90: 201–217.

Queiroz MMC. Aspectos da bioecologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. Tese de Mestrado, Parasitologia Veterinária, UFRRJ. 72 pp. 1991.

Rafael JA, Melo, Gabriel AR, Carvalho CJB, Casari AS, Constantino R. *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia.* 1. ed. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2012. v.1. 810p.

Rashid Md H Al, Banerje A, Jyoti MN. The queen of herb with potent therapeutic constituent in various disease states: A reappraisal. *International Journal of Phytomedicine.* 2013. 5 (2): 125-130.

Rashid MH Al, Banerjee A, Maiti NJ. The queen of herb with potent therapeutic constituent in various disease states: A reappraisal. *International Journal of Phytomedicine.* 2013; 5: 125-130.

Rathi JM. Qualitative phytochemical screening of some locally available insecticidal plants. *Journal of Biopesticides*. 2008; 1(1): 52-4.

Regnault-Roger C, Vincent C, Thor J. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. *Annu Rev. Entomol*. 2012; 57: 405-424.

Ritter L, Solomon KR, Forget J, Stemeroff M, O'leary C. A. Review of Selected Persistent Organic Pollutants. Draft Interim Report: International Program on Chemical Safety, WHO, Geneva, Switzerland, 1995.

Robinson WH. *Urban entomology: insect and mite pests in the human environment*. London: Chapman e Hall, 1996. 430p.

Roel AR. Utilização de Plantas com Propriedades Inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*. 2001; 1(2): 43-50.

Roig MJT. *Plantas Medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*. Ed. Científico-Técnica. La Habana. 2: 622 p. 2012.

Rubel DM, Freeman S, Southwell A. Tea tree oil allergy: What is the offending agent? Report of three cases of tea tree oil allergy and review of the literature. *Aust. J. Dermatol*. 1998; 39:244-47.

Rutherford T, Nixon R, Tam M, Tate B. Allergy to tea tree oil: retrospective review of 41 cases with positive patch tests over 4.5 years. *Aust. J. Dermatol*. 2007; 48: 77-83.

Sakina MR, Dandiya PC, Hamdard HE, Hameed A. Preliminary psychopharmacological evaluation of *Ocimum sanctum* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 1990; 28(2): 143-150.

Sakthivadivel M, Daniel T. Evaluation of certain insecticidal plants for the control of vector mosquitoes viz. *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Appl. Entomol Zool*. 2008; 43 (1): 57-63.

Santos MJP, Moya-Borja GE. Estudo Comparativo do Desenvolvimento Pós-embrionário de *Fannia pusio* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Fanniidae) em Diferentes Substratos. *Arq. Biol. Tecnol*. 1997. 40: 253- 61.

Sawabe K, Hoshino K, Isawa H, et al. Blow Flies Were One of the Possible Candidates for Transmission of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus during the 2004 Outbreaks in Japan. *Influenza Research and Treatment*. 2011; 2011: 652652. doi:10.1155/2011/652652.

Serra-Freire, NM, Mello, RP. *Entomologia e acarologia na medicina veterinária*. Rio de Janeiro, RJ. L. F. Livros. 200p. 2006.

Sethajintanin D, Anderson KA. Temporal bioavailability of organochlorine pesticides and PCBs. *Environ. Sci. Technol.* 2006. 15: 3689-3695.

Shah CS, Qadry JS. *A Text Book of Pharmacognosy.* 1998, p. 216. 5.

Shetty SS, Udupu S, Udupu A. Evaluation of antioxidant and wound healing effects of alcoholic and aqueous extract of *Ocimum sanctum* Linn. In rats evid based complement. *Alternat Med.* 2008; 5: 95-110.

Shono, T. e Scott, J.G. Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 2003; 75, 1–7.

Silva CF, Batista MM, Batista Dda G, de Souza EM, da Silva PB, de Oliveira GM, Meuser AS, Shareef AR, Boykin DW, Soeiro Mde N. 2008. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(9):3307-14.

Silva DC, Aguiar CVM, da Cunha e Silva SL, Carvalho RP, Gonzalo E MB. Desenvolvimento pós-embriônico de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), criada em duas dietas naturais, sob condições controladas. *Biotemas.* 2012; 25 (4): 131-137.

Silva JOA, Carvalho-Filho FS, Esposito MC, Reis GA. First record of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera, Calliphoridae) from Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo.* 2012; 56(1): 115-118.

Silveira WH, Carvalho GD, Peconick AP. Medidas de controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: uma breve revisão. *PUBVET, Londrina.* 2014; 8(10): 259.

Simon JE, James Q; Renee GM. Basil: a source of essential oils. In: Janick, J.; Simon, J. E. (Ed.). *Advances in new crops.* Portland: Timber, 1990. p. 484-489.

Simon JE. New crop introduction: exploration, research and commercialization of aromatic plants in the new world. *Acta Horticulturae, Bélgica.* 1993(331): 209-221.

Sims CA, Juliani HR, Mentreddy SR, Simon JE. Essential Oils in Holy Basil (*Ocimum tenuiflorum* L.) as Influenced by Planting Dates and Harvest Times in North Alabama. *Journal of Medicinally Active Plants.* 2014(2): 33-41.

Singh E, Sharma S, Dwivedi J, Sharma S. Diversified potentials of *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi): An exhaustive survey. *J Nat Prod Plant Resour* 2012; 2(1): 39-48.

Singh S, Majumdar DK. Evaluation of anti-inflammatory activity of fatty acids of *Ocimum sanctum* fixed oil. *Indian Journal of Experimental Biology.* 19973(5): 380-383.

Singh S, Majumdar DK. Toxicological studies of the fixed oil of *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi). *New Botanist.* 1994; 21: 139–146.



Singh S, Malhotra M, Majumda DK. Antibacterial activity of *Ocimum sanctum* L. fixed oil. Indian Journal of Experimental Biology. 2005; 43: 835–837.

Singh S, Taneja M, Majumdar DK . Biological activities of *Ocimum sanctum* L. fixed oil- An overview. Indian J Exp Biol. 2007; 45: 403-412.

Sinthusiri J, Soonwera M. Insecticides against the housefly *Musca domestica* L. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2013; 44: 28-39.

Siqueira JM. Agrotóxicos no Brasil. Uso e impactos ao meio ambiente e a saúde pública - novembro 25, 2014. Fonte:<http://br.monografias.com/trabalhos3/agrotoxico-brasil-impactos-ambiente-saude/agrotoxico-brasil-impactos-ambiente-saude.shtml>.

Siriwattananarungsee S, Sukontason KL, Olson JK, Chailapakul O, Sukontason K. Efficacy of neem extract against the blowfly and housefly. Parasitol Res. 2008; 103: 535- 44.

Siva M, Shanmugam KR, Shanmugam B, Venkata Subbaiah G, Ravi S, Sathyavelu Reddy K,

Smith KA. Manual of forensic entomology. Londres: The Trustees of the British Museum (Natural History), 1986. 205 p.

Srinivasan R, Jambulingam P, Gunasekaran K, Boopathidoss P. Tolerance of housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to dichlorovos (76% EC) an insecticide used for fly control in the tsunami-hit coastal villages of southern India. Acta Tropica. 2008; 105: 187–190.

Staples G, Kristiansen MS. Ethnic Culinary Herbs. 1st edn. University of Hawaii Press, Hawaii 1999.

Stevens J, Wall R. The Evolution of Ectoparasitism in the Genus *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae). Int. J. Parasitology. 1997. Vol. 27; 1: 51 -59.

Sukontason K, Chaiwong T, Tayutivutikul J, Somboon P, Choochote W, Piangjai S, Sukontason KL. Susceptibility of *Musca domestica* and *Chrysomya megacephala* to Permethrin and deltamethrin in Thailand. J Med Entomol 2005; 5: 812-4.

Sukontason KL, Boonchu N, Sukontason K, Choochote W. Effects of eucalyptol on house fly (diptera: muscidae) and blow fly (diptera: calliphoridae). Rev Inst Med Trop S Paulo 2004; 46: 97-101.

Sukontason KL, Narongchal P, Sripakdee D, Boonchu N, Chaiwong T, Ngern-Klun R, Piangjai S, Sukontason K. First report of human myiasis caused by *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Thailand, and its implication in forensic entomology. Journal of Medical Entomology. 2005; 42: 702–704.

Tawatsin Apiwat , Asavadachanukorn Preecha, Thavara Usavadee, Wongsinkongman Prapai, Bansidhi Jaree, Boonruad Thidarat, Chavalit-tumrong Pranee, Soonthornchareonno Noppamas, Komalamisra Narumon, Mir S Mulla. Repellency of essential oils extracted from plants in Thailand against four mosquito vectors (Diptera: Culicidae) and oviposition deterrent effects against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006; 37(5): 915-931.

Thomas DB. Fecundity and oviposition in laboratory colonies of the screwworm fly (Diptera, Calliphoridae). Journal of Economic Entomology. 1993; 86 (5): 1464-1472.

Thompson FC. Nomenclator Status Statistics. Retrieved January, 2006, from The Diptera site. The Bio Systematic Database of World Diptera. Disponível em: <http://www.sel.barc.usda.gov/Diptera/names/Status/bdwdstat.html>. Acessado em 26 agosto 2013.

Thompson FC. *The Diptera site*. The biosystematic database of world Diptera. Nomenclator status statistics. Version 10.5 [www.sl.barc.usda.gov/diptera/names/Status/bdwdstat.htm](http://www.sl.barc.usda.gov/diptera/names/Status/bdwdstat.htm) . Acessado em maio 2015.

Timm BL, da Silva PB, Batista MM, da Silva FH, da Silva CF, Tidwell RR2, Patrick DA, Jones SK, Bakunov SA, Bakunova SM, Soeiro Mde N. 2014. In vitro and in vivo biological effects of novel arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 58(7): 3720-6.

Tukey JW. Teste de Comparação Múltipla de Tukey. Teste de Tukey.1953.

Ullerich F. Geschlechtschromosomen ug geschlechtsbestimmung bei einigen Calliphorinen (Calliphoridae, Diptera). Chromosoma. 1963. 14: 46-110.

Vani RS, Cheng SF, Chuah CH. Comparative Study of Volatile Compounds from Genus *Ocimum*. Am J Appl Sci 2009; 6: 523-528.

Veríssimo CJ. Resistência e Controle do Carrapato-do-boi. Nova Odessa, SP Instituto de Zootecnia 2015. 135p.

Viegas-Júnior C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. Quim. Nova. 2003; 26: 390-400.

Vieira PC, Mafezoli J, Biavatti MW. Inseticidas de Origem Vegetal. In: Ferreira, J. T. B.; Corrêa, A. G.; Vieira, P. C. (org.). Produtos Naturais no Controle de Insetos. 1ª ed. São Carlos: Editora da UFSCar. 2001. Cap. 2: 23 – 45

Vieira RF, Simon JE. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.). Found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. Economic Botany. 2000; 54: 207-16.

Visciarelli E, Costamagna S, Lucchi L, Basabe N. Human myiasis in Bahía Blanca, Argentina: periodo 2000/2005. Neotropical Entomology. 2007; 36(1): 605-611.

Warrier PK, Nambiar VPK, Ramankutty C. Indian Medicinal Plants, Orient Longman Ltd., Madras. 1995.

Wells JD. Recent African derivation of *Chrysomya putoria* from *C. chloropyga* and mitochondrial DNA parafly of cytochrome oxidase subunit one in blowflies of forensic Importance. Medical and Veterinary Entomology. 2004; 18: 445 - 448.

Whalon ME, Mota SD, Hollingworth RM. Global Pesticides Resistance in Arthropods. Londres: Oxfordshire. 2008.

WHO (1992). Vector Resistance to Pesticide. 15th Report of the WHO Tech. Rep. Ser. 818, Geneve.

Wiegmann BM, Trautwein MD, Winkler IS, Barr NB, Kim JW, Lambkin C, Bertone MA, Cassel BK, Bayless KM, Heimberg AM, Wheeler BM, Peterson KJ, Pape T, Sinclair BJ, Skevington JH, Blagoderov V, Caravas J, Kutty SN, Schmidt-Ott U, Kampmeier GE, Thompson FC, Grimaldi Wiesbrook ML. Natural indeed: Are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? Illinois Pesticide Review. 2004; 17(3).

Wink M. Production and application of phytochemicals from an agricultural perspective. In: van BEEK TA; BRETELER H (Ed.). Phytochemistry and agriculture. Oxford: Clarendon, 1993. p. 171- 213.

Xu M, McCanna DJ, Sivak JG. Use of the viability reagent Presto Blue in comparison with alamar Blue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. J Pharmacol Toxicol Methods. 2014; 71: 1-7.

Yanpallewar SU, Rai S, Kumar M, Acharya SB. Evaluation of antioxidant and neuroprotective effect of *Ocimum sanctum* on transient cerebral ischemia and long term cerebral hypoperfusion. Pharmacol Biochem Behav. 2004; 79(1): 155-164.

Zhang Z.-Q. 2013. Phylum Arthropoda: 17-26. In Zhang, Z.-Q. (ed.): Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness Addenda Zootaxa, 2013; 3703: 1- 82.

Zumpt F. Myiasis in man and animals in the Old World. Butterworths, London. 1965. 267 p.

# APÊNDICES

**APÊNDICE I. Obtenção, registro dos dados e variáveis determinadas (Razão sexual, Duração dos estágios larval, pupal e do período neolarva a adulto, Viabilidade – Mortalidade, Número de indivíduos malformados, Mortalidade corrigida.**

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).**

# ANEXOS

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

BIOECO  
HERBARIO DEL CENTRO ORIENTAL DE  
ECOSISTEMAS Y BIODIVERSIDAD (BSC)

No. 3247

Nombre científico *Peimom sanctum* L. var. *pubens*  
Nombre vulgar "Albahaca cimarrona" "Albahaca moribunda"  
Familia Lamiaceae = Labiatae  
Localidad San Luis

Prov. Stgo de Cuba Coord. \_\_\_\_\_  
Leg. ✓  
Fecha \_\_\_\_\_ Hábito \_\_\_\_\_  
Formación vegetal \_\_\_\_\_  
Sustrato \_\_\_\_\_ Altitud \_\_\_\_\_  
Fenología Fructificando Det. Felici Acosta Castillo  
DIRECCION  
—000—  
SANTIAGO Ing. Forstal

## ANEXO II. Aprobación do Comité de Ética “Facultad de Ciencias Naturales Universidad de Oriente” Cuba.



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
COMITÉ DE ÉTICA

### AVAL PARA INVESTIGACIÓN

Santiago de Cuba, 16 de Febrero de 2012

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

El estudio que se somete a consideración constituye una investigación novedosa y necesaria ya que contribuir al conocimiento de los aspectos bioecológicos y bionómicos de las diversas especies de dípteros muscoides de las familias *Calliphoridae* y *Muscidae*, de modo que permita el uso de estos insectos como modelos biológicos en diversos experimentos en instituciones de investigación, así mismo para dar subsidios al conocimiento de la biología de las diferentes especies de muscoides de importancia sanitaria y forense que es incipiente en la literatura y reducir los casos de enfermedades parasitarias e infecciosas transmitidas y causadas por moscas (dípteros muscoides), tanto para el hombre como para los animales domésticos, con el uso de insecticidas naturales.

Dentro de este proyecto, como parte de la Tesis de Doctorado de la M.Sc. Idelsy Chil Núñez se prevé: Evaluar la eficacia y seguridad del aceite esencial de *Ocimum sanctum* L. en el control alternativo de dípteros muscoides de importancia sanitaria. Para lograr este objetivo se realizará la extracción y caracterización química del aceite esencial de las hojas de *Ocimum sanctum* L.; se evaluará el efecto del aceite esencial de las hojas de *Ocimum sanctum* L. sobre el desarrollo post-embriionario de seis especies de moscas de importancia sanitaria: *Chrysomya patoría* (Wiedemann, 1818), *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830), y *Musca domestica* (Linnaeus 1913) y se evaluará la toxicidad asociada al empleo de esta sustancia como insecticida botánico.

La Albalaca mondonguera (*Ocimum sanctum*), es una hierba aromática anual de la familia de las labiadas nativa de Irán, India y otras regiones tropicales de Asia. En Cuba se cultiva en patios y jardines como hierba aromática. Como se propaga fácilmente por sus semillas se ha escapado del cultivo y se le encuentra espontánea en las cercanías de las poblaciones y de las viviendas campesinas, Precisamente esa fácil propagación, permite la utilización de sus hojas sin que surja el riesgo de causar daño de extinción a esta especie, ni al medio ambiente.



Considerando además los efectos colaterales que causa la exposición a los pesticidas tradicionales, así como su acumulación en los diferentes biomas, se hace necesario la realización de estudios toxicológicos en modelos *in vivo* que confirmen el uso seguro del aceite esencial de *Ocimum sanctum* como un nuevo producto, tanto para el hombre, animales y ecosistema en general.

Por lo que los miembros de este Comité Científico reunidos en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente el día 16 de Febrero de 2012 (16022012), aprueban la colecta del material vegetal (hojas de *Ocimum sanctum*) para la presente investigación, así como los ensayos con animales de laboratorio, siempre que sean realizados en un centro acreditado para esos estudios y por personal calificado.

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

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



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

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

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



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



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

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

Dr. Ernesto Alvarez Fontanet

Dr. Ernesto AlvarezFontanet  
Director  
TOXIMED

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

