

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Janaína Brand Dillmann

***Stomoxys calcitrans*: FENO DE ALFAFA COMO SUBSTRATO LARVAL E
ATIVIDADE ADULTICIDA DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* COM ALTO TEOR
DE 1,8-CINEOLE**

Santa Maria, RS, Brasil
2018

Janaína Brand Dillmann

***Stomoxys calcitrans*: FENO DE ALFAFA COMO SUBSTRATO LARVAL E
ATIVIDADE ADULTICIDA DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* COM ALTO TEOR
DE 1,8-CINEOLE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Silvia Gonzalez Monteiro

Santa Maria, RS
2018

Dillmann, Janaína Brand

Stomoxys calcitrans: FENO DE ALFAFA COMO SUBSTRATO
LARVAL E ATIVIDADE ADULTICIDA DO ÓLEO DE Melaleuca
alternifolia COM ALTO TEOR DE 1,8-CINEOLE / Janaína Brand
Dillmann.- 2018.

59 p.; 30 cm

Orientadora: Silvia Gonzalez Monteiro

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2018

1. mosca-do-estábulo 2. árvore-do-chá 3.
desenvolvimento 4. colônias 5. óleo essencial I. Monteiro,
Silvia Gonzalez II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2018

Todos os direitos autorais reservados a Janaína Brand Dillmann. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

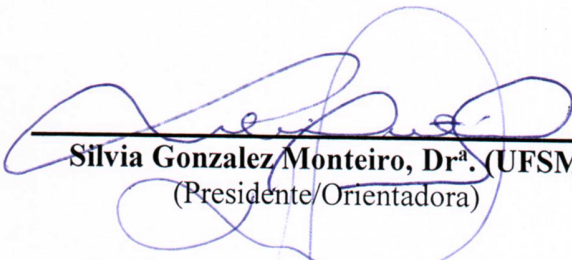
Fone: (55) 98100-7473 - e-mail: medvetjana@gmail.com

Janáina Brand Dillmann

***Stomoxys calcitrans*: FENO DE ALFAFA COMO SUBSTRATO LARVAL E
ATIVIDADE ADULTICIDA DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* COM ALTO TEOR
DE 1,8-CINEOLE**

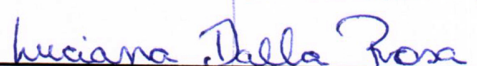
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 21 de fevereiro de 2018:



Silvia Gonzalez Monteiro, Dr.^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Luis Antonio Sangioni, Dr. (UFSM)



Luciana Dalla Rosa, Dr.^a. (UNICRUZ)

Santa Maria, RS

2018

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Irineu Luiz Dillmann e Ladi Brand Dillmann, meu porto seguro, que sempre me apoiaram e incentivaram a busca pelo conhecimento, por todo amor, carinho, dedicação e principalmente pelas palavras em momentos turbulentos, onde eu precisava lembrar que “não se coloca a carroça na frente dos bois”.

Ao meu melhor amigo e namorado, Vitor da Silva, pelo apoio, companheirismo, amor e confiança em mim e no meu potencial, por estar sempre ao meu lado “segurando as pontas”.

Ao meu amor maior nessa vida, meu melhor amigo de quatro patas, Duque, que ouviu pacientemente todas as minhas angustias e tirou a maioria delas apenas com seu olhar ou na liberdade de um galope.

À toda a equipe da Escola de Equitação Universitária de Santa Maria (EQUISM), pelo apoio, companheirismo, disponibilização dos animais, por me proporcionar momentos únicos em cima do dorso de um cavalo e, principalmente, por me dar os melhores amigos que eu poderia ter, porque “quando os estribos se tocam, esta formada a amizade”.

Ao Flecha Dourada, vulgo Baio, o cavalo que possibilitou a obtenção da grande maioria dos exemplares de mosca, pela paciência e tranquilidade em permitir a captura das mesmas.

À minha orientadora Professora Dra. Silvia Gonzalez Monteiro pela confiança depositada em uma aluna com pouco conhecimento de pesquisa, por incentivar e permitir que houvesse o envolvimento de cavalos para me manter estimulada, além de todos os ensinamentos, paciência, dedicação e amizade.

À toda a equipe do Laboratório de Parasitologia Veterinária, pela amizade e apoio durante o mestrado.

Ao CNPQ, por possibilitar a execução deste trabalho por meio da bolsa a mim concedida, permitindo minha total dedicação ao Curso de Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM, por permitir a realização de mais uma etapa de minha vida profissional.

*“Somewhere in time's own space
There must be some sweet pastured place
Where creeks sing on and tall trees grow
Some paradise where horses go,
For by the love that guides my pen
I know great horses live again.”*

~Stanley Harrison

RESUMO

***Stomoxys calcitrans*: FENO DE ALFAFA COMO SUBSTRATO LARVAL E ATIVIDADE ADULTICIDA DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* COM ALTO TEOR DE 1,8-CINEOLE**

AUTORA: Janaína Brand Dillmann
ORIENTADORA: Silvia Gonzalez Monteiro

A mosca-do-estábulo, *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758), pertencente a família Muscidae, gênero *Stomoxys*, é um díptero hematófago responsável por provocar perdas produtivas e de desempenho em bovinos e equinos, além de causar impactos sanitários através da disseminação de microrganismos patogênicos. Atualmente, o controle do díptero conta com inseticidas sintéticos, manejo sanitário, controle biológico e armadilhas, porém, nenhum desses métodos isoladamente se mostra eficaz. Os surtos frequentes no Brasil, relacionados principalmente à expansão das plantações de cana-de-açúcar, demonstram a necessidade de buscar alternativas ao controle convencional e uma opção promissora são os óleos essenciais, que têm sido amplamente estudados em relação às suas atividades inseticidas. Para isso, o primeiro estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do feno de alfafa como substrato para o desenvolvimento e sobrevivência das fases larvais até a fase adulta da mosca-do-estábulo, visando a manutenção de colônias em laboratório para futura realização de testes de controle desde inseto. Para isso foram coletados 65 ovos de uma colônia estabelecida em laboratório e colocados sobre substrato larval contendo feno de alfafa (100g) e água destilada (200ml), em seis repetições. A média de dias para a eclosão dos ovos foi de 1,4 ($\pm 0,5$), o período larval foi de 11,33 dias ($\pm 1,75$) e o período pupal foi de 5,83 dias ($\pm 0,51$). O ciclo completo de ovo a adulto foi de 18,66 ($\pm 2,06$). A média de viabilidade larval foi de 91,03% ($\pm 3,14$), de pupação 88,71% ($\pm 3,17$) e a porcentagem de emergência (pupas para adultos) foi de 91,13% ($\pm 3,0$). Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram que a utilização de substrato larval com feno de alfafa propiciou o desenvolvimento de estágios imaturos de *S. calcitrans* em laboratório, demonstrando bons percentuais de desenvolvimento larval, pupação e emergência de adultos. O segundo estudo objetivou investigar a atividade inseticida do óleo de *Melaleuca alternifolia*, com alto teor de 1,8-cineole, frente à espécie *S. calcitrans*. Pelo método de exposição ao papel impregnado, foi possível observar que os tratamentos de 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p > 0,05$) demonstraram ação fumigante. A taxa de mortalidade em relação ao tempo de exposição ao óleo após os tratamentos foi melhor em comparação com o Diazinon entre os tratamentos de 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($96,6 \pm 3,3\%$ e 100% , respectivamente) nos primeiros 15 minutos. Pelo método de aplicação superficial o único tratamento que demonstrou ação adulticida foi o de 5% ($p > 0,05$). A toxicidade, CL_{50} (%; p/v), foi de $1,06 \pm 0,02$ e $3,82 \pm 0,65$ para os métodos de papel filtro impregnado e aplicação superficial, respectivamente. Assim, o óleo essencial de *M. alternifolia* demonstrou ter ação adulticida contra *S. calcitrans*.

Palavras-chave: mosca-do-estábulo, árvore-do-chá, desenvolvimento, óleo essencial, colônias

ABSTRACT

***Stomoxys calcitrans*: USE OF ALFALFA HAY AS A LARVAL SUBSTRATE FOR REARING IN LABORATORY AND ADULTICIDAL ACTIVITY OF *Melaleuca alternifolia* ESSENTIAL OIL WITH HIGH 1,8-CINEOLE**

AUTHOR: Janaína Brand Dillmann
ADVISOR: Silvia Gonzalez Monteiro

Stomoxys calcitrans (Linnaeus, 1758), known as stable fly, belonging to Muscidae family, genus *Stomoxys*, is a hematophagous dipteran responsible for causing performance and productive losses in horses and cattle, as well as causing health impacts through the dissemination of pathogenic microorganisms. Currently, the control of this fly makes use of synthetic insecticides, sanitary management, biological control and traps, but none of these methods alone is effective. The frequent outbreaks in Brazil, related mainly to the expansion of sugarcane plants, demonstrate the need to seek alternatives to conventional control and a promising option are the essential oils, which have been widely studied in relation to their insecticidal activities. The first study aimed at the effects of alfalfa hay as a substrate for the development and survival of larval stages up to adult stage of the stable fly, in order to maintain colonies in laboratory and further conduct bioassays for the control of this insect. For this, 65 eggs were collected from a colony established in laboratory and placed on a larval substrate containing alfalfa hay (100g) and distilled water (200ml), replicated six times. The mean number of days for egg hatching was 1.4 (± 0.5), the larval period was 11.33 days (± 1.75) and the pupal period was 5.83 days (± 0.51). The complete cycle from egg to adult was 18.66 days (± 2.06). The mean larval viability was 91.03% (± 3.14), pupation 88.71% (± 3.17) and the percentage of emergence (pupae to adults) was 91.13% (± 3.0). The results obtained in the present work indicated that the use of larval substrate with alfalfa hay allowed the development of immature stages of *S. calcitrans* in laboratory, demonstrating good percentages of larval development, pupation and emergence of adults. The second study aimed to investigate the insecticidal activity of the oil of *Melaleuca alternifolia*, with a high content of 1,8-cineole, to the *S. calcitrans* specie. By the method of impregnated paper, it was possible to observe that the treatments of 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p > 0.05$) showed fumigant action. The mortality rate in relation to the time of exposure to oil after treatments was better compared to Diazinon between treatments of 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($96.6 \pm 3.3\%$ and 100% , respectively) in the first 15 minutes. In superficial application test, the only treatment that demonstrated adulticidal action was 5% ($p > 0.05$). The lethal concentration, LC_{50} (%; w/v) was 1.06 ± 0.02 and 3.82 ± 0.65 for the impregnated paper and surface application methods, respectively. Thus, *M. alternifolia* essential oil has a potential for adulticidal action against *S. calcitrans*.

Keywords: stable fly, tea tree, development, botanical-based insecticidal, essential oil, colonies

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 - Range and standard deviation (S.D.) of *Stomoxys calcitrans* development days in laboratory conditions ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, $70\% \pm 10\text{ RH}$, 12:12 photophase) with supply of larval alfalfa hay substrate.....30

Table 2 - Range and standard deviation (S.D.) of percentage between the developmental periods of *Stomoxys calcitrans* under laboratory conditions ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, $70\% \pm 10\text{ RH}$, 12: 12 photophase) with supply of alfalfa hay larval substrate.....31

ARTIGO 2

Table 1 - Chemical composition of *Melaleuca alternifolia*. Where RT = retention time; CKI = Calculated Kovats Index; LKI= Literature Kovats Index (NIST, 2008 (Mass spectral library); Adams, 2009); NI = non-identified compound.....44

Table 2 - Adulticidal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (average number of deaths \pm standard deviation) in *Stomoxys calcitrans* by impregnated paper test at different concentrations of oil (5, 10, 25 and $50\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (n=10, in triplicate for each group).....45

Table 3 - Adulticidal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (average number of deaths \pm standard deviation) in *Stomoxys calcitrans* by surface application at different concentrations of oil (0.5, 1, 2.5 and 5%) (n=10, in triplicate for each group).....46

Table 4 - Lethal concentration of *Melaleuca alternifolia* essential oil against *Stomoxys calcitrans* adults after a 15 minutes period by superficial application method and from exposure to impregnated paper.....47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 A MOSCA-DO-ESTÁBULO (<i>Stomoxys calcitrans</i>): HISTÓRICO E BIOLOGIA.....	13
2.2 A IMPORTÂNCIA DA MOSCA-DO-ESTÁBULO, <i>Stomoxys calcitrans</i> , NA SAÚDE ANIMAL E PÚBLICA.....	14
2.3 CRIAÇÃO EM LABORATÓRIO DE <i>S. CALCITRANS</i>	16
2.4 CONTROLE DE <i>S. calcitrans</i>	17
2.5 CONTROLE ALTERNATIVO: ÓLEOS ESSENCIAIS	18
2.5.1 Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	20
3 MANUSCRITOS	21
3.1 ARTIGO 1 – USE OF ALFALFA HAY AS A LARVAL SUBSTRATE FOR REARING OF STABLE FLY IN LABORATORY	21
3.2 ARTIGO 2 - ADULTICIDAL ACTIVITY OF <i>Melaleuca alternifolia</i> ESSENTIAL OIL WITH HIGH 1,8-CINEOLE ON STABLE FLY	33
4 DISCUSSÃO	48
5 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO A	58
ANEXO B	59

1. INTRODUÇÃO

A mosca-do-estábulo, *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: *Muscidae*), é um díptero hematófago de importância veterinária principalmente para equinos e bovinos, sendo responsável pela disseminação de microrganismos patogênicos, perdas de produção e desempenho, além de ser hospedeiro intermediário de endoparasitas (VALGODE, 1992). Ela afeta tanto animais estabulados, quanto animais em pastagem e no Brasil sua importância econômica e sanitária cresceu muito devido aos surtos desse díptero nas regiões sudeste e centro-oeste do país, em decorrência ao uso da vinhaça pelas usinas sucroalcooleiras (CANÇADO et al., 2012).

No controle de *S. calcitrans* vários métodos já foram testados, incluindo inseticidas sintéticos, controle biológico e iscas, sendo que nenhuma dessas técnicas isoladamente proporcionou adequado controle da população dessas moscas. Além disso, mais de 80% das fases imaturas da mosca se localizam em matéria vegetal em decomposição nas instalações de gado confinado (GUILLES, 2005). Sabe-se que o controle de pragas a partir do uso de inseticidas sintéticos tem provocado aumento no número de espécies resistentes a esses agentes, entre elas, inclui-se *S. calcitrans* (BALDACCHINO et al., 2013) e que entre os produtos químicos utilizados para combater esses insetos estão inclusos os agentes das classes de organofosforados, piretróides sintéticos e carbamatos (SHONO et al., 2003). Além disso, o controle das moscas a partir de produtos químicos quando utilizados de forma incorreta podem contaminar o meio ambiente, gerando riscos à saúde humana e animal (SAILLENFAIT et al., 2015).

Pesquisas com componentes naturais, particularmente compostos de óleos essenciais, vem sendo realizadas como alternativas no controle de *S. calcitrans*. Óleos essenciais de plantas contêm em sua composição química metabólitos secundários ativos, tais como os terpenos, e a ação desses compostos em sinergia ou isoladamente é capaz de produzir efeito inseticida ou repelente (YANG et al., 2003). O óleo essencial comercial de *Melaleuca alternifolia* possui o terpinen-4-ol como componente majoritário e é utilizado para testes inseticidas, porém, o clima, manejo e idade da planta interferem em seus componentes, acarretando no aumento de outros compostos, tais como o 1,8-cineole.

Assim, o primeiro objetivo deste estudo foi testar a utilização do feno de alfafa como substrato larval para a criação e manutenção da mosca-do-estábulo em laboratório, visando seu uso futuro em testes inseticidas, principalmente de instares imaturos. Em seguida, objetivou-se testar a susceptibilidade de adultos de *S. calcitrans* frente ao óleo essencial de *Melaleuca*

alternifolia com componente majoritário 1,8-cineole, em busca de novas opções de controle e desenvolvimento de abordagens alternativas ao uso de inseticidas químicos, com componentes que não agridam o meio ambiente ou causem danos a saúde dos animais e humanos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A MOSCA-DO-ESTÁBULO (*Stomoxys calcitrans*): HISTÓRICO E BIOLOGIA

Stomoxys calcitrans, conhecida como “mosca-do-estábulo”, é classificada taxonomicamente em: Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Subordem Brachycera, Infraordem Muscomorpha, Subsecção Calyptratae, Família Muscidae e Subfamília Stomoxydinae (MONTEIRO, 2011). Muir (1914) relata que esse díptero teve sua origem na África ou Índia e Brues (1913) confirma que o primeiro relato de *S. calcitrans* nos Estados Unidos ocorreu em 1776, mesma época em que a mosca foi introduzida nas Américas.

De distribuição mundial, a mosca-do-estábulo tem causado importantes impactos ambientais pelo aumento considerável da sua população, principalmente na África Central, onde tem levado diversas espécies de animais a óbito devido ao seu hábito hematófago (ELKAN et al., 2009). No Brasil, as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de *S. calcitrans*, (FREITAS, 1985) além da temperatura adequada para manutenção dos adultos e a expansão da indústria sucroalcooleira acarreta em ocorrência de surtos da mosca em diferentes regiões do país (BARROS et al., 2010; KASSAB, 2012).

Anatomicamente as moscas adultas possuem quatro listras longitudinais negras no tórax e coloração acinzentada, medem em torno de seis milímetros e ambos os sexos são dotados de aparelho bucal (probóscida) picador, junto a palpos curtos (CAMPBELL, 1993). Bittencourt (2012), relata que tanto a fêmea quanto o macho são hematófagos e tem preferência por sangue equino e bovino, embora ocasionalmente possam se alimentar do sangue de outros mamíferos, como o homem e até mesmo de aves. Seu nome vulgar, “mosca-do-estábulo”, se deve ao fato de que na maior parte do tempo permanece pousada em árvores, cercas, estruturas próximas de cocheiras e estábulos ricos em fezes e matéria orgânica, onde ocorre sua postura e desenvolvimento larval.

A mosca-do-estábulo possui um ciclo de vida com metamorfose completa que varia de 14 a 21 dias, dependendo da temperatura da região (MONTEIRO, 2011). Possuem uma alta capacidade de dispersão, sendo que as fêmeas podem percorrer 29,11 km em 24 horas. Após a cópula colocam seus ovos, de coloração branca ou amarela clara e medindo aproximadamente um milímetro, em áreas onde haja acúmulo de dejetos e resto de alimentação de equinos e bovinos, além de poças de vinhaça, canais de dreno utilizados na fertilização de plantas e matéria orgânica vegetal em decomposição (BURALLI E GUIMARÃES, 1985; CASSOL et al., 2010).

As larvas de primeiro estágio eclodem após 12-24 h, são saprófagas e realizam três ecdises. As larvas L3 medem aproximadamente dez milímetros, possuem corpo afilado, placas estigmáticas separadas e espiráculos respiratórios em formato de “S” (SOULSBY, 1987). O período larval tem variação média de 14 a 26 dias e a pupação ocorre quando as larvas de terceiro estágio estiverem bem desenvolvidas, levando em torno de 7-14 dias para os adultos emergirem (GUIMARÃES, 1983). Os adultos saíam em busca de alimentação e abrigo e após 3-5 dias dão início a fase de acasalamento, sendo que tanto macho quanto fêmea devem realizar repasto sanguíneo para que ocorra a maturação sexual (FRAENKEL et al., 1973; GUIMARÃES, 1983). As fêmeas só estarão aptas a ovipor quando atingirem 5-8 dias de idade e tiverem realizado mais de um repasto sanguíneo, devido a estimulação da oogênese (FOIL & HOGSETTE, 1994). Os machos, como Anderson (1978) descreveu, precisam se alimentar para que ocorra a maturação da glândula acessória, responsável pela inoculação do esperma no corpo da fêmea.

Embora o díptero tenha preferência por depositar seus ovos em fezes de equinos e bovinos, Gonçalves e Veiga (1998) verificaram nos aviários do município de Araucária, no Paraná, um ótimo local para criação das moscas, uma vez que as fezes acumuladas sob as gaiolas formavam o ambiente ideal para postura. Além disso, Bittencourt et al. (2012) e Cançado et al. (2013b) encontraram larvas de *S. calcitrans* no interior de colmos de cana-de-açúcar em decomposição, dificultando ainda mais seu controle em lavouras. Tanto os ovos quanto as larvas precisam de um ambiente com abundância de microorganismos, onde haja matéria orgânica com adequado gradiente de fermentação e muita umidade (LAM et al., 2007; MACEDO, 2001).

2.2 A IMPORTÂNCIA DA MOSCA-DO-ESTÁBULO, *Stomoxys calcitrans*, NA SAÚDE ANIMAL E PÚBLICA

Stomoxys calcitrans tem sido responsabilizada pela disseminação de microrganismos patogênicos ao homem e aos animais domésticos por ser um inseto hematófago obrigatório, além de atuar como hospedeiro intermediário de endoparasitas (VALGODE et al., 1992). É uma espécie cosmopolita, que afeta principalmente equinos e bovinos (WALL et al., 1997), possui hábito agressivo e persistente, podendo realizar repasto sanguíneo em humanos na ausência de seus hospedeiros favoritos (BALDACCHINO et al., 2013).

Tanto para equinos quanto bovinos, a perturbação provocada pela mosca-do-estábulo acarreta em perdas de peso e desempenho produtivo. Esses insetos provocam irritação no animal pelo seu hábito de voo, pouso e pela picada dolorosa, induzindo a movimentos defensivos e de fuga, acarretando em perda de energia, redução do tempo de alimentação e do total consumido além de estresse (BALDACCHINO et al., 2013). Em equinos, as moscas provocam dermatite exsudativa, principalmente nos membros, acarretando riscos de contaminação secundária (YERUHAM & BRAVERMAN, 1995) e possivelmente eliminando os animais de competições regulamentadas pela FEI (Federação Equestre Internacional).

Na bovinocultura brasileira os prejuízos são estimados em cerca de 350 milhões de dólares por ano, devido aos custos anuais infringidos ao produtor com a profilaxia, além dos prejuízos com a redução do ganho de peso e produção diária de leite (GRISI et al., 2014; KOLLER et al., 2009). Campbell et al. (2011) relataram redução no peso animal de 19% e na produção de leite de 40 a 60% em fazendas altamente infestadas. Além disso, *S. calcitrans* é capaz de consumir uma média de 11-15 μ L de sangue por repasto, o que, em uma grande infestação, pode provocar anemia nos animais (SCHOWALTER et al., 1979). Sendo assim, esses efeitos diretos não só influenciam na produção, mas também na transmissão de doenças (DESQUESNES, 2004), uma vez que, como consequência secundária a infestação, há uma aproximação entre os animais, como meio de proteção, que permite que as moscas piquem vários hospedeiros gerando estresse e imunossupressão.

Baldacchino et al. (2013) comprovaram a transmissão de patógenos mecanicamente pela *S. calcitrans*, através da contaminação de sua estrutura bucal e pela regurgitação de conteúdo digestivo anterior. Além disso, sabe-se que por mais que os patógenos não sobrevivam muito tempo nas estruturas do inseto, a mosca-do-estábulo se alimenta frequentemente, variando o intervalo de refeições entre 4 a 72 horas (FOIL et al., 1994).

A mosca-do-estábulo tem sido apontada como transmissora de diversos patógenos, tais como: Vírus da Anemia Infecciosa Equina (GREEN et al., 1996), Vírus do Nilo Ocidental (DOYLE et al., 2011), Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (WEBER et al., 1988), *Anaplasma marginale* (SCOLES et al, 2005) e *Trypanosoma evansi* (MIHOK et al., 1995). Também é hospedeira intermediária de *Habronema muscae* (TRAVERSA et al, 2008) e pode ainda ter envolvimento na transmissão de algumas espécies de *Onchocerca* sp. e *Dirofilaria* sp. a humanos e animais (BALDACCHINO et al., 2013).

Muito embora sua preferência seja por animais de produção, a mosca-do-estábulo pode ser um transtorno em propriedades próximas de áreas agrícolas, pois também se alimentam de

açúcar de frutas e flores, como relatado por Guimarães (1986), nos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Paraná onde a utilização de palha de arroz em cafezais como, cama de aviário e o vinhoto em culturas de cana-de-açúcar acabou potencializando a reprodução desta espécie. A abundância de *S. calcitrans* na torta de filtro e palha com vinhaça indica um importante papel das usinas sucroalcooleiras no desenvolvimento da mosca (CORRÊA et al., 2013), sendo que surtos desse díptero foram registrados em Mato Grosso do Sul, região produtora de cana-de-açúcar, recorrentes desde o ano de 2009 (BARROS et al., 2010; KASSAB et al., 2012), causando diversos prejuízos econômicos para a pecuária.

2.3 CRIAÇÃO EM LABORATÓRIO DE *S. calcitrans*

Em condições de laboratório, *S. calcitrans* demonstra uma melhor adaptação e desenvolvimento em temperatura entre 25°C (± 1), umidade relativa de 70% (± 10) e fotoperíodo de 12:12 horas (L/E) (BAILEY et al., 1975; GUILLES et al., 2005). Estudos como de Ashrafi (1964) e Valgode & Azevedo (1992) optaram por um período de luz de 14 horas, pois o período estendido intensifica a atividade reprodutiva, conseqüentemente aumentando a produção de ovos por colônia. Em condições laboratoriais com temperatura de 26,7°C e umidade relativa de 80%, as larvas podem eclodir após 24 horas de incubação e o período de pupa é de dois dias (PARR, 1962).

Valgode e Azevedo (1992) relataram que o desenvolvimento de imaturos possui dependência na variação de temperatura e dieta alimentar, sendo que para o desenvolvimento pós-embrionário a temperatura ideal é de 25°C, se tornando inviável em temperaturas acima de 35° C. Esse estudo concorda com Gilles et al. (2005) e Angulo & Leucona (2014), concluindo que quanto mais elevada a temperatura, menor será o tempo de transição entre uma fase de desenvolvimento e a seguinte, porém, diminui a pupação.

A dieta alimentar das larvas deve mimetizar o ambiente natural em que essas se encontram, contendo umidade e fermentação adequadas, sendo que na preparação do substrato, autores como Barros et al. (2014), fazem uso de bicarbonato de sódio e água no substrato larval para que ocorra adequada fermentação para controle de umidade. Cançado et al. (2014) concluíram que a maturação do substrato larval por 3 dias (72h) ofereceu melhores condições para eclosão, desenvolvimento larvar, pupação e emergência de adultos.

Quanto a alimentação de adultos de *S. calcitrans*, não há diferença no desenvolvimento do díptero quanto ao fornecimento de sangue de origem bovina ou equina citratado (0,38%)

(BARROS et al., 2014). Esse sangue deve ser fornecido através de algodão, de uma a duas vezes por dia, sendo que Salem et al. (2012) recomendam a administração em dois horários para que corresponda ao que ocorre na natureza.

A criação de mosca-do-estábulo em laboratório continua sendo um desafio, sendo que no Brasil poucos laboratórios possuem colônias para testes, nenhum deles situado no estado do Rio Grande do Sul. Um dos locais que mantém uma colônia de *S. calcitrans* em condições laboratoriais propícias para realização de bioensaios é a Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande, MS, que conta com formas imaturas e adultas deste díptero (BARROS et al., 2014).

2.4 CONTROLE DE *S. calcitrans*

Para o controle de *S. calcitrans* vários métodos foram testados, incluindo inseticidas sintéticos, controle biológico e armadilhas. A medida de controle deve começar pelo adequado manejo sanitário de dejetos, sendo essencial a remoção de fezes e restos de alimentos dos locais onde os animais encontram-se estabulados ou confinados, com o objetivo de diminuir a multiplicação da mosca (NAKANO et al., 1973). Como explicam Barros et al. (2010), o controle químico sozinho não terá resultados satisfatórios se não for empregado junto ao manejo adequado de dejetos.

Embora não permaneça muito tempo sobre o corpo do animal, a utilização de inseticidas tópicos, principalmente em equinos, proporciona conforto e diminui o estresse, principalmente em locais onde há grandes concentrações desse díptero. A utilização de brincos contendo inseticida organofosforado em bovinos não é uma alternativa adequada para a redução de *S. calcitrans*, uma vez que a área de cobertura do brinco não atinge os principais pontos em que a mosca-do-estábulo se alimenta, como abdômen e membros (HOGSETTE et al., 1987).

O uso contínuo e repetitivo de inseticidas convencionais geralmente resulta no desenvolvimento de resistência e problemas para a saúde humana e meio ambiente (BALDACCHINO et al., 2013). Na Europa e na América do Norte são descritos populações de mosca-do-estábulo resistentes a organofosforados e piretróides (SALEM et al., 2012). Campbell (1994) testou quinze inseticidas químicos em forma de spray residual no animal e spray para o ambiente. Desses, apenas três apresentaram redução das infestações em 50% por duas semanas ou mais, no entanto, em sua utilização como spray no animal, após sete dias, o número de moscas era igual ou maior do que o encontrado no rebanho de tratamento controle.

O acúmulo de palha de cana após a colheita e a utilização do vinhoto como fertilizante formam o ambiente ideal para a reprodução em larga escala da mosca-do-estábulo. Sendo assim, a queima profilática da palha nas usinas sucroalcooleiras é uma alternativa de controle emergencial utilizada para diminuir a proliferação da mosca antes de possíveis surtos. No Brasil, a queima é regulamentada e autorizada, se for devidamente justificada, pelo órgão do Sistema Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 1998). Embora permitida, Caçado et al. (2013a) relataram que a queima da palha nessas usinas vem sendo reduzida gradativamente por conta da atual necessidade de autorização dos órgãos ambientais competentes.

Além disso, existem alternativas de controle biológico da mosca-do-estábulo, tais como a utilização de aves na predação das larvas em usinas sucroalcooleira (ODA & ARANTES, 2010), uso de himenópteros parasitoides (RATCLIFFE et. al, 2002) ou *Bacillus thuringiensis* (LYSYK et al., 2010). Porém a utilização de controle biológico é questionável, havendo necessidade de estudos locais para que não ocorra um desequilíbrio natural, com a eliminação de inimigos naturais, como as formigas, predadoras das fases imaturas de *S. calcitrans* (LYSYK et al., 2010).

2.5 CONTROLE ALTERNATIVO: ÓLEOS ESSENCIAIS

Em busca de novas opções para o controle de *S. calcitrans* sem uso de inseticidas químicos, estudos vem sendo realizados com repelentes e inseticidas naturais, particularmente com compostos de óleos essenciais. Os óleos de citronela e eucalipto são utilizados como base para repelentes spray no animal contra a mosca-do-estábulo e demonstram uma adequada redução das mesmas no hospedeiro (BALDACCHINO et. al, 2013).

A pesquisa de metabólitos secundários de plantas é uma área de interesse atual, uma vez que estes compostos são conhecidos por controlar insetos fitófagos e infecções por microrganismos em vegetais (ISMAN, 2006; WINK, 1988). Óleos essenciais de plantas contêm em sua composição química inúmeros metabólitos secundários ativos, tais como: terpenos e compostos aromáticos (BAKKALI et al., 2008). A ação desses metabólitos independentes ou em sinergia com outros compostos, é capaz de produzir efeito inseticida ou repelente, tornando-os alvos de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos (YANG et al., 2003).

A classe dos terpenos é a principal responsável pelo desenvolvimento da atividade inseticida de muitas plantas (REGNAULT-ROGER et al., 2012) e a ausência de fitotoxicidade bem como a biodegradabilidade dos produtos naturais caracterizam-os como potentes agentes

no manejo de pragas (XUAN et al., 2006). Dessa forma, os óleos essenciais têm sido explorados como potentes inseticidas para o controle de dípteros como as moscas (POHLIT et al., 2011; AHBIRAMI et al., 2014).

O primeiro estudo referente ao uso de óleos essenciais como repelente voltados a *S. calcitrans* foi conduzido por Zhu et al. (2010), utilizando o óleo de erva-dos-gatos (*Nepeta cataria*) em forma de cera, distribuída no solo próxima a áreas de alimentação de bovinos em confinamento e resultou em 99% de repelência durante três horas. Em 2012, Zhu et al. utilizaram a mesma planta para avaliar a atividade repelente do óleo sobre os bovinos e sua influência sobre a oviposição no ambiente, os resultados foram de 95% e 98% de eficácia respectivamente, sendo que utilizado sobre o animal o óleo permitiu proteção por 6 horas.

Hieu et al. (2010) realizaram testes com 21 óleos essenciais em associação com o óleo da noz de *Calophyllum inophyllum* em comparação com o DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide) através de bioensaio realizado com a exposição da mão de humanos voluntários em gaiolas de moscas. O óleo que garantiu melhor repelência isolado foi o de patchouli (*Pogostemon cablin*), porém, o mesmo apenas atingiu tempo de proteção comparado ao DEET quando usado em associação com o óleo de noz. Outros óleos que apresentaram uma forte repelência foram os de folha de cravo e raiz de gengibre e os que apresentaram menor repelência foram o óleo de gerânio, orégano e tomilho (HIEU et al., 2010)

Em outro estudo, Brito et al. (2012) avaliaram a atividade inseticida de diversos óleos essenciais em adultos de *Stomoxys calcitrans* pelo método do papel impregnado. De acordo com os resultados, foi obtido um efeito inseticida promissor para o controle da mosca-do-estábulo, calculando inclusive as concentrações letais (CL₉₅) dos óleos. Os melhores resultados foram de *Cymbopogon schoenanthus* (CL₉₅= 5,51%), *Eucalyptus staigeriana* (CL₉₅= 4,03%), *Cymbopogon martinii* (CL₉₅= 5,72%), *Lippia sidoides* (CL₉₅= 5,49%) e *Mentha piperita* (CL₉₅= 6,72%).

O óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) também foi testado por Baldacchino et al. (2013) como repelente a *S. calcitrans* através de rastreamento por vídeo, acompanhando a movimentação das moscas em uma gaiola disposta com dois substratos de sangue disponíveis, um impregnado com óleo e outro sem. Observou-se que as moscas não se alimentaram no substrato tratado e permaneceram mais tempo fora da zona de tratamento.

2.5.1 Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

O óleo essencial de melaleuca é extraído de uma planta medicinal bastante utilizada popularmente, conhecida como Tea tree ou chá de árvore e é um óleo essencial destilado a partir da planta nativa australiana *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel. Exemplar da medicina tradicional aborígine da Austrália, a planta era usada comumente para contusões, picadas de insetos e infecções de pele (BUDHIRAJA et al., 1999). Dentre as possíveis propriedades descritas dessa planta pode-se citar: atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e analgésica, anti-neoplásica, inseticida e antiparasitária (CARSON; RILEY, 1993; HART et al., 2000; HAMMER et al., 2003; CALDEFIE-CHE'ZET et al., 2006; BALDISSERA et al., 2014).

Este óleo possui cerca de 100 compostos ativos diferentes, sendo seus principais constituintes: terpinen-4-ol, 1,8-cineole, α -terpineno, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno, α -terpineol, p-cimeno e álcoois sesquiterpênicos. Tanto a farmacopéia, quanto a ISO4730 exigem que o óleo utilizado comercialmente deva ser obtido por destilação a vapor e apresente um teor mínimo de 30% de terpinen-4-ol e um teor máximo de 15% de 1,8-cineole (HAMMER et al., 2006). No entanto, existem variações quimiotípicas da planta, como a denominada “Var A”, que possui teor de 41-63% de 1,8-cineole e 16-20% de terpinen-4-ol, tendo assim um teor alto de dois monoterpenos conhecidos por possuírem atividade inseticida, e a “Var B” com 54-64% 1,8-cineole e <6 de terpinen-4-ol (HOMER et al., 2000).

A existência de diferentes quimiotipos tem implicações para a indústria do óleo de melaleuca. O único quimiotipo comercialmente significativo de *M. alternifolia* é o quimiotipo classificado como "Tipo", que possui a menor concentração de 1,8-cineole, sendo amplamente comercializado na Austrália, Europa, e América do Norte (HAMMER et al., 2006). No entanto, isso pode mudar no futuro e uma gama mais ampla de quimiotipos pode eventualmente ser utilizada pela indústria (HOMER et al., 2000).

3. MANUSCRITOS

3.1 ARTIGO 1

Artigo submetido a revista "*Journal of Insect Physiology*"

USE OF ALFALFA HAY AS A LARVAL SUBSTRATE FOR REARING OF STABLE FLY IN LABORATORY

Janaína Brand Dillmann, Luciana Cossetin, Letícia dos Santos Petry, Tiago Pereira de Souza

Silvia Gonzalez Monteiro

Use of alfalfa hay as a larval substrate for rearing of stable fly in laboratory

Janaína Brand Dillmann^{1*} Luciana Cossetin² Leticia dos Santos Petry¹ Tiago Pereira de Souza² Silvia Gonzalez Monteiro²

¹ Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

² Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, RS, Brasil.

ABSTRACT

This study aimed at the effects of alfalfa hay as a substrate for the development and survival of larval stages up to adult stage of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: *Muscidae*), in order to mimic their natural environment to maintain colonies in laboratory and further conduct bioassays. For this, 65 eggs were collected from a colony established in laboratory and placed on a larval substrate containing alfalfa hay (100g) and distilled water (200ml), replicated six times. The mean number of days for egg hatching was 1.4 (\pm 0.5), the larval period from L1 to L3 was 11.33 days (\pm 1.75) and the pupal period was 5.83 days (\pm 0.51). The complete cycle from egg to adult was 18.66 days (\pm 2.06). The mean larval viability was 91.03% (\pm 3.14), pupation 88.71% (\pm 3.17) and the percentage of emergence (pupae to adults) was 91.13% (\pm 3.0). The results obtained in the present work indicated that the use of larval substrate with alfalfa hay allowed the development of immature stages of *S. calcitrans* in laboratory, demonstrating good percentages of larval development, pupation and emergence of adults.

Keywords: larvae, substrate, alfalfa, *Stomoxys calcitrans*, development

***Corresponding author:** Janaína Brand Dillmann. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Av. Roraima, 1000 - Camobi, Santa Maria - RS, Brasil, 97105-900. Telephone: (55) 55 98100-7473. E-mail: medvetjana@gmail.com, sgmonteiro@uol.com.br.

1. INTRODUCTION

Stomoxys calcitrans (Linnaeus, 1758) (Diptera: *Muscidae*) has been responsible for the dissemination of pathogenic microorganisms to humans and domestic animals as a mandatory blood sucking diptera, as well acting as an intermediate host of endoparasites (Valgode et al., 1992). It affects mainly horses and cattle, and it is a cosmopolitan species, endemic in several regions of Brazil, with a recurrent occurrence of outbreaks (Kassab et al., 2012). These dipterans cause irritation due to their flight habit and have a painful sting, inducing defensive and escape movements, resulting in loss of energy, stress, reduction of feeding time and total consumption, consequently decreasing horse performance and production gains in cattle (Baldacchino et al., 2013).

The creation of stable fly in laboratory remains a challenge, as in Brazil few laboratories have viable colonies to perform bioassays. It has already been established that *S. calcitrans* adults have a better adaptation and development at temperatures between 25 °C (± 1), relative humidity of 70% (± 10) and photoperiod of 12:12 hours (Bailey et al., 1975; Guilles et al., 2005), being their diet based on citrated bovine or equine blood. Immature stages develop best at temperatures of 26.7 °C (± 1) and relative humidity of 80% (Parr, 1962).

The food diet of larvae should mimic the natural environment in which they are found, containing adequate moisture and fermentation, so in the preparation of the substrate authors such as Barros et al. (2014) make use of baking soda and water for proper control of these variables. However, most larvae diets for *S. calcitrans* consist of wheat flour, meat flour, bicarbonate and sugar cane, as presented by Macedo (2001). Although it is known that *S. calcitrans* has a preference for laying eggs and developing in decomposing organic and vegetable matter (Soulsby, 1987). Studies that only use vegetable matter without supplementation with flours are rare.

Thus, as we have observed frequent outbreaks of stable flies, increasingly interfering with equine performance and Brazilian cattle ranching, the need for bioassays is increasing to establish alternative methods of parasite control, making it necessary to maintain viable colonies in laboratory. The objective of this work was to evaluate the development of colonies created with alfalfa hay supply as the only larval substrate, in view of the lack of studies that use vegetal matter and in order to mimic the conditions found in their natural environment.

2. MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out in the Laboratory of Veterinary Parasitology of the Department of Microbiology and Parasitology from Universidade Federal de Santa Maria. The initial colony of *S. calcitrans* was obtained by the capture of adult specimens collected through falcon tubes in horses located at Associação Equestre Universitária de Santa Maria, both located at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), state of Rio Grande do Sul, in the month of October 2016.

After identification, the flies were transferred to transparent plastic cages (30 x 30 x 50 cm) and kept in an air conditioned room $27 (\pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$, 12:12 photophase and $70 (\pm 10\%) \text{ RH}$. Adults were fed once a day with citrated equine blood (0.38% sodium citrate) supplied in gauze-wrapped cotton placed in a glass available in a top corner of the cage and water at will. Besides, after obtaining the second generation of adults in laboratory, additional feed was provided consisting of brown sugar mixed with water, arranged in the same way as the blood.

For the posture, a petri dish containing moist alfalfa hay was placed in the center of the cage. The eggs placed on the walls of the cage were carefully removed through a moistened brush and transferred to petri dishes containing the larval substrate. The plate was then placed in a clear plastic container (350ml) above a layer of sieved and sterilized sand. The pots were sealed with organza fabric and tied for proper ventilation and observation of the larvae. After completing their development the larvae of third instar (L3) directed themselves to the sand for pupation, from where they were later collected by immersion in water and properly relocated in a petri dish.

The alfalfa hay used in the bioassay was placed in identified brown paper bags and autoclaved for proper sterilization. Afterwards, the bags were stored in an oven at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for drying the leaves. The substrate was prepared in the proportion of 100 g of hay to 200 ml of distilled water and stored in a partially closed plastic container, kept in the fly breeding room at a temperature of $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ and $70\% \pm 10 \text{ RH}$ for adequate fermentation.

For the test, eggs of third generation adult flies kept in laboratory were collected. Six replicates were made, each of which had 65 eggs. Each petri dish containing the eggs was placed on the dry, sterilized sand in a pot covered with organza tissue that allowed both larval visualization and ventilation. The larval substrate was daily moistened through syringe jets containing distilled water and 50 g of hay substrate was added on top of the existing one.

Larvae were analyzed daily and as they got to L3 (Figure 1) they were removed from the substrate and proceeded to counting and weighing in an analytical balance. After this procedure, the larvae were returned to the substrate in order for pupation to occur, ending the cycle. The pupae were removed from the sand by immersion in water, dried on paper towel, counted, weighed and placed in petri dishes in the center of the cage. After hatching, adult flies were counted and analyzed visually and under stereomicroscope to identify morphological changes.

The efficiency of alfalfa hay substrate diet was observed through the hatching time of the eggs in days (d), the larval development in days (d), the interval between pupation and adult emergence in days (d), viability (%), larval transformation to pupae (%) and pupal viability / emergence of adults (%).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Alfalfa hay is widely used as a food supplement for both livestock production and equine animals. This leguminous hay is available in troughs or distributed on the field, but the remains are not usually removed from the ambience and, in contact with humidity, form a conducive environment for flies, such as *S. calcitrans*, to carry out their life cycle. It is known that this diptera has a preference to lay eggs and develop in decomposing organic and vegetal matter (Soulsby, 1987) and that the ingestion of cellulolytic bacteria is highly beneficial for its larval instars (Gilles et al., 2008), however there were no studies on alfalfa hay for use in larval diets.

Humidity and temperature are important factors in the creation of larvae, especially for *S. calcitrans*, which does not tolerate extreme temperatures. Valgode and Azevedo (1992) study points that, for post-embryonic development, the ideal temperature is 25 °C, becoming unviable at temperatures above 35°C. For this reason, it was decided to keep the larvae at temperatures of 27 °C ± 1 and 70% ± 10 RH and the use of organza tissue for adequate ventilation of the medium, without raising the internal temperature of the vessel.

The use of sterilized and sifted sand, below the petri dish containing the substrate, provided a favorable environment for the pupation of third instar larvae. According to Mello (1989), larvae seek in their developmental substrate a place with adequate humidity conditions to initiate puparium formation, thus the sand was changed whenever it presented high humidity due to the movement of larvae before pupation period. It was rare to find pupae in the substrate, since it contains a higher degree of humidity than that present in the sand, not conducive to

pupation.

The mean egg hatching time was 1-2 days (Table 1), similar to results found by Mello and Garcia (1998) under the same environmental conditions. Valgode and Azevedo (1992) tested the egg phase at temperatures of 20 °C and 25 °C (55-75% RH) and obtained an incubation period of 69.90 and 42.28 hours, respectively. Cançado et al. (2014) indicate 72 hours for favorable hatch performance for *S. calcitrans*. The mean between the larval period was 11.3 days (± 1.7) (Table 1), a higher mean than found in other experiments, such as Salem et al. (2012), who found averages of 9.6 (± 0.9) days. However, the mean in this experiment from pupal to adult emergence was 5.8 days (± 0.5) (Table 1), considerably lower than that found by Salem et al. (2012) of 8.2 days (± 0.9).

The mean number of days between egg and adult was 18.66 (± 2.06), a result similar to that obtained by Valgode and Azevedo (1992), where the variation of days between the larval and adult period was 16.35 (± 2.88) at 25 °C and Salem et al. (2012) who found 19.2 (± 1.7) on the same environmental conditions of the present study. Thus, even if the larval period was higher in comparison to the others, the pupal period was reduced, making the complete cycle very similar to what has already been observed with other larval diets.

The percentage of hatching was not verified, since this has direct relation with the adult fly, by the process of copulation and oviposition, thus only the third instar larvae were counted to verify the development in the larval substrate. In relation to this, larval viability can be verified by percentage of *S. calcitrans* eggs submitted to the substrate of alfalfa hay that reached third instar larvae, obtaining the result of 91.03% (± 3.14) (Table 2). According to Sutherland (1978), nutrition acts as a limiting factor in the development of immature forms of *S. calcitrans*, transferring the inhibitory effect from one stage to the next.

Valgode and Azevedo (1992) used a larval diet based on sugar cane and wheat bran and obtained viability of the larval stage of 70%, in contrast to studies such as Moura (2015), which replaced part of the meat flour used in the standard larval diet by bovine faeces and reached the result of 92.8% (± 6.1). Gilles et al. (2008) demonstrated in their studies that *S. calcitrans* larvae have a great ability to digest cellulose and to take advantage of it, as well as bacteria resulting from this digestion, providing enough nutrients for an adequate larval development, which corroborates with the result obtained in the present work.

By means of adequate nutrition, good results can also be observed in the mean weight of larvae and pupae, 16.3mg and 13.9mg respectively, and in the transformation of larvae into pupae, with a mean of 88.71% (± 3.17) (Table 2). Even though percentage is high and the

weights are similar to results of Leite et al. (2013), the period between larva and pupa was the one that obtained the most losses, being the most sensitive phase of the fly. However, when using the diet formulated by Macedo (2001) composed of sugar cane (330 g), soybean meal (125 g), meat flour (40 g), sodium bicarbonate (5 g) and distilled water (250 ml), Moura (2015) obtained a percentage of only 55.9% (± 21.3), which contrasts with the results obtained in the present work. Another important factor was the availability of dry sand near the substrate for the larvae to migrate when it reached the pupation period, since the moisture requirements for this period differ from that required for the larvae.

Viability of pupae, emergence of adults, averaged 91.13% (± 3.0) (Table 2), results similar to those found by Sutherland (1978), who also states that the low quality of the larval diet produces a decrease in the size of pupa and consequently low emergence of adults. Studies using flour-based larvae diets, under environmental conditions similar to the present study, obtained an average of 88% (Gingrich, 1960). In general, the pupae stage hardly suffers significant losses reaching 95% emergency levels, as described by Kunz et al. (1997). However, it is important to emphasize that in temperatures above 35 °C this percentage is reduced to 13%.

The creation of *S. calcitrans* in laboratory is important for supplying healthy flies for use in bioassays, providing better, controlled conditions. Thus, larval substrates that mimic the conditions found in the natural environment provide the development of large numbers of viable diptera for laboratory tests. Results of the present work indicate that the use of larval substrate made with alfalfa hay is conducive to development of immature stages of *S. calcitrans* in laboratory, demonstrating good percentages of larval development, pupation and adult emergence.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Escola de Equitação Universitária de Santa Maria (EQUSM), Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria and for the financial support of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

Bailey, D. L. et al., 1975. Laboratory biology and techniques for mass Producing the Stable Fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (DIPTERA: MUSCIDAE). *J Med Entomol*, v.12, n.2, p. 189-193.

- Baldacchino, F. et al., 2013 Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera: Muscidae): a review. *Parasite*, 20, p. 26-37, doi: 10.1051/parasite/2013026.
- Barros, A. T. M.; Koller, W. W.; Catto, J. B.; Soares, C. O., 2010. Surtos por *Stomoxys calcitrans* em gado de corte no Mato Grosso do Sul. *Pesq Vet Bras*, v. 30, p. 945-952.
- Barros, T. M. et al., 2014. Metodologia para bioensaios com imaturos de *Stomoxys calcitrans*. Embrapa Gado de Corte – Metodologia.
- Cançado P.H.D.; Souza, T.F.; Oliveira, H.; Barros, A.T.M; Piranda, E.M., 2014. Efeito do período de maturação do substrato no desenvolvimento de imaturos de *Stomoxys calcitrans*. *Congresso brasileiro de parasitologia veterinária*, ed. 18.
- Gingrich, R. E., 1960. Development of a synthetic médium for aseptic rearing of larvae of *Stomoxys calcitrans* (L.). *J Econ Entom*, v. 53, p. 408-411.
- Guilles, J., 2005. *Dynamique et gene tique des populations d'insectes vecteurs. Les stomoxes, Stomoxys calcitrans et Stomoxys niger niger, dans les elevages bovins reunionnais*. [PhD thesis] Universite de La Reunion, France.
- Guilles, J. et al., 2008. Relationships Between Chemical Properties of Larval Media and Development of Two *Stomoxys* Species (Diptera: Muscidae) from Reunion Island. *Env Entomol*. V. 37, I 1, p. 45-50, doi: 10.1603/0046-225X(2008)37[45:RBCPOL]2.0.CO;2
- Kassab, S. O. et al., 1977. Novos surtos populacionais de mosca-dos-estábulo no Mato Grosso do Sul: medidas de controle e prevenção. *Agrarian*, v. 5(15), p. 84-88, 2012.
- Kunz, S. E et al. The development of rhw immature forms of *Stomoxys calcitrans*. *Entomol Soc*, v. 70, p. 169-172.
- Leite, I. H. F., Carvalho, E. B., Bittencourt, A. J., 2013. Influência do vinhoto no desenvolvimento de *Stomoxys calcitrans*. *Ciência Rural*, 43.
- Macedo, D.M., 2001. *Desenvolvimento pós-embrionário de Musca domestica (Díptera: Muscidae) e Stomoxys calcitrans (Diptera: Muscidae) criadas em fezes de bovinos tratados com diferentes avermectinas* [Tese]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Mello, R.P.; Garcia, M.L.M., 1988. Comportamento reprodutivo de fêmeas de *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) criadas isoladamente em laboratório. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.83, n.3, p.385-390.
- Mello, R.P., 1989. *Estudo de alguns aspectos de desenvolvimento biológico e do comportamento, em laboratório, de Stomoxys calcitrans (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae)*. [Tese]. Itaguaí:Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Moura, F. V. C., 2015. Desenvolvimento de substratos para criação de mosca-dos-estábulo *Stomoxys calcitrans* (diptera: muscidae) em laboratório [Tese]. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
- Parr, H. C. M., 1962. Studies on *Stomoxys calcitrans* (L.) in Uganda, East Africa II Notes on

life-history and behavior. *Bull Entomol Res.* V.53, n.2, p.437-443.

Soulsby, E.J.L., 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. México, *Interamericana*, 7ª Ed. p.823.

Salem, A.; Bouhsira, E.; Lienard, E.; Bousquet, M. A.; Jacquet, P.; Franc, M., 2012. Susceptibility of two European strains of *Stomoxys calcitrans* (L.) to cypermethrin, deltamethrin, fenval-erate, k-cyhalothrin, permethrin and phoxim. *J App Res Vet Med*, 10, 249–257.

Sutherland, B., 1978. The suitability of various types of dung and vegetable matter as larval breeding media for *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). *J Vet Res*, v. 45, p. 241-243.

Valgode, A. M.; Azevedo de, E. M. W. V., 1992. Determinação das exigências térmicas de *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera, Muscidae), em condições de laboratório. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 87, supl. 1, p. 11-20, doi: 10.1590/S0074-02761992000500005

Table 1 – Range and standard deviation (S.D.) of *Stomoxys calcitrans* development days in laboratory conditions ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, $70\% \pm 10\text{ RH}$, 12:12 photophase) with supply of larval alfalfa hay substrate.

DURATION (DAYS)		
LIFE STAGES	Range	Mean (\pm S.D.)
EGG	1 – 2	1.4 (0.5)
LARVAL INSTARS	8 – 13	11.33 (1.75)
PUPA	5 – 6	5.83 (0.51)
EGG TO ADULT	14 – 21	18.66 (2.06)

Table 2 – Range and standard deviation (S.D.) of percentage between the developmental periods of *Stomoxys calcitrans* under laboratory conditions (27 °C ± 1, 70% ± 10 RH, 12: 12 photophase) with supply of alfalfa hay larval substrate.

PERCENTAGE (%)		
LIFE STAGES	Range	Mean (± S.D.)
FROM EGG TO LARVA	84.62 - 92.31	91.03 (3.14)
FROM LARVA TO PUPA	83.33 - 91.67	88.71 (3.17)
FROM PUPA TO ADULT	86.79 - 94.55	91.13 (3.0)

Figure 1 – Larvae of third instar of *Stomoxys calcitrans* in alfalfa hay substrate.



3.2 ARTIGO 2

Artigo a ser submetido a revista “*Medical and Veterinary Entomology*”

**ADULTICIDAL ACTIVITY OF *Melaleuca alternifolia* ESSENTIAL OIL WITH HIGH
1,8-CINEOLE ON STABLE FLY**

Janaína Brand Dillmann, Luciana Cossetin, Marjorie de Giacometi, Dionatan Oliveira,
Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos, Pamela Daniele Avrella,
Silvia Gonzalez Monteiro

ADULTICIDAL ACTIVITY OF *Melaleuca alternifolia* ESSENTIAL OIL WITH HIGH 1,8-CINEOLE ON STABLE FLY

Janaína Brand Dillmann^{1*} Luciana Cossetin² Marjorie de Giacometi² Dionatan Oliveira¹

Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos¹ Pamela Daniele Avrella²

Silvia Gonzalez Monteiro²

¹ Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

² Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, RS, Brasil.

ABSTRACT

The stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: *Muscidae*), is a hematophagous Diptera responsible for causing losses in performance and production in horses and cattle, as well as causing health impacts through the spread of pathogenic microorganisms. Essential oils are an alternative to replace conventional insecticides, which have caused resistant species and damage to health and environment. The objective of this work was to investigate the insecticidal activity of the oil obtained from *Melaleuca alternifolia*, with a high content of 1,8-cineole, against adults of *S. calcitrans*. By the impregnated paper exposure method, it was possible to observe that the treatments of 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p > 0.05$) showed fumigant action. The mortality rate in relation to the time of exposure to oil after treatments was better in comparison to Diazinon between treatments of 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($96.6 \pm 3.3\%$ and $100 \pm \%$, respectively) in the first 15 minutes. By the superficial application method, the only treatment that showed adulticidal action was 5% ($p > 0.05$). The toxicity, LC_{50} (%; w/v), was 1.06 ± 0.02 and 3.82 ± 0.65 for the impregnated filter paper and superficial application methods, respectively. Thus, the essential oil of *M. alternifolia* has been shown to have an adulticidal potential against *S. calcitrans*.

Palavras-chave: *Stomoxys calcitrans*, *Melaleuca alternifolia*, inseticidal, monoterpene

*Corresponding author: Janaína Brand Dillmann. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Av. Roraima, 1000 - Camobi, Santa Maria - RS, Brasil, 97105-900. Telefone: (55) 55 98100-7473. E-mail: medvetjana@gmail.com, sgmonteiro@uol.com.br.

INTRODUCTION

The stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: *Muscidae*), is a hematophagous diptera of veterinary and economic importance mainly for horses and cattle. These insects are able to transmit a wide variety of pathogens, including helminths, bacteria, protozoa and viruses, such as equine infectious anemia virus (Valgode, 1992; Green et al., 1996). It affects both stabled and grazing animals, causing loss of energy, reducing feeding time, total consumption and stress by their flight habit and painful sting, inducing defensive and escape movements, consequently decreasing the performance of horses and production gains in cattle due irritation (Baldacchino et al., 2013).

Currently, the control of this diptera is carried out through the use of synthetic insecticides, however, there is an increasing interest in alternatives for control by natural and biodegradable products in order to minimize environmental risks and risks to animal and human health, aiming to circumvent resistance by chemical agents (Regnault-roger et al., 2012).

The essential oils of plants are among the control alternatives. Extensively tested to evaluate their repellent and toxic properties against various species of insects and arthropods, they show to have larvicidal properties (Zhu et al., 2006), pupicide and adulticide (Kumar et al., 2012), as well as repellent attributes (Islam et al., 2009). These properties have been related to the presence of bioactive chemical compounds, with monoterpenes being the predominant group with insecticidal action (Regnault-roger et al., 2012).

Thus, the objective of this work was to evaluate the insecticidal action of an essential oil obtained by hydrodistillation from the leaves of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) collected in Santa Maria, RS, Brazil, with a high concentration of monoterpenes, mainly 1,8-cineole, in adults of *S. calcitrans*.

MATERIAL AND METHODS

Obtainment of the flies and maintenance of colonies in the laboratory

Adult flies were collected through falcon tubes in equines from the Escola de Equitação Universitária de Santa Maria (EQUSM), located at Universidade Federal de Santa Maria. The flies were kept in entomological cages (30cm X 30cm X 30cm) at 25 ± 1 °C under a light/dark cycle (12:12 H) and $70\% \pm 5\%$ relative air humidity until the tests were carried out. Feeding consisted of citrated equine blood (0.38% sodium citrate). The blood was supplied in gauze wrapped cotton placed inside a glass jar available in an upper corner of the cage and water at will likewise.

Extraction and analysis of essential oil

The essential oil was obtained from the leaves of trees of *Melaleuca alternifolia*, popularly known as tea tree, aged three years, planted in the municipality of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The leaves were identified, herborized and a specimen has been deposited in the SMDB Herbarium (registration number: 17.259). Clevenger apparatus was used to extract it for 3 hours (European Pharmacopoeia, 2007) and the oil obtained was stored in amber flasks at a temperature of 10 °C until analyzes and bioassays were performed.

The analyzes were performed on an Agilent 7890A hyphenated system, equipped with a 5975C series selective mass detector on DB-5MS fused silica capillary column (5% phenylmethylsiloxane, 30 m x 0.25 mm, film thickness: 0.25 µm) and ionization by electron impact at 70 eV. Parameters of analysis: split inlet 1:50; Carrier gas: He (1 mL /min); injector and detector temperature: 250 °C, analysis program: 40 °C (Ti) for 4 min, 40-320 °C, 4 °C/min. The components were identified based on the retention index (IR) determined using a calibration curve of a homologous series of n-alkanes (C8-C40) injected under the same chromatographic conditions of the samples and in the spectra fragmentation models of masses, both of which are compared with literature data and equipment spectra (Adams, 2009; NIST, 2008). The quantitative analysis was performed by integrating the peak areas and expressed as a relative percentage of the total.

Adulticidal bioassays

Method of Exposure to Impregnated Paper

The bioassay was performed according to methodology proposed by Sheppard & Hinkle (1987) with modifications. The essential oil was diluted in Tween (1%) to obtain the following concentrations: 5, 10, 25 and 50 µg/cm². These different concentrations were impregnated on the filter paper, which was exposed to the environment for 15 minutes for solvent evaporation. Subsequently, the paper containing the impregnated oil was placed in petri dishes and above it a mesh was fitted, so that there was no direct contact of the flies. Adult flies (n = 10), previously anesthetized at a temperature of -18 °C for 140 seconds, were relocated in the petri dishes and exposed for a total of two hours. The negative control and positive control group was formed by Tween (1%) and Diazinon (1%), respectively, and were evaluated. All groups were evaluated in triplicate and analyzed at predetermined times (15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes) after treatment.

Adulticidal activity and mortality rates were evaluated in relation to time. From the evaluations carried out, it was possible to determine the toxicological values of melaleuca oil that were defined from the LC₅₀ (%; w/v), which represents the lethal concentration necessary to obtain a 50% mortality in the study population.

Surface Application Method

Topical toxicity was assessed according to Sukontason et al. (2004) with some modifications. The capture and separation of the flies was done through 15 ml falcon tubes, and 10 insects were packed per tube. The tube opening was closed with a cotton swab to allow the gas exchange between the interior of the tube and the environment. The flies, already in the tubes, were pre-anesthetized at a temperature of -18 °C for 140 seconds and after that it was applied 3 ul of the oil dilutions (0.5, 1, 2.5, 5 %, w/v) in Tween (1%) at their thorax. In the same volume, Tween (1%) was applied to analyze whether the solvent had an insecticidal effect or not. For comparative purposes, the organophosphate Diazinon (1%) was used as a positive control. In the assay, 3 replications containing 10 flies per replication were performed and evaluated for number of deaths for predetermined times for a total of 2 h (15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes) after treatment. In addition to the adulticidal activity, the mortality rate was also evaluated in relation to the time of exposure to the oil after the treatments, as well as LC₅₀.

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed by analysis of variance with significance level ($p < 0.05$). All variables were previously analyzed for normality and homogeneity with the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. The differences between the groups were evaluated with the SNK test with 5% significance. Data were expressed as mean \pm standard deviation of the mean.

RESULTS

Essential oil extraction and analysis

Eleven components were identified in the essential oil of *M. alternifolia*, representing 98.05% of the total composition. The main compounds present were 1,8-Cineole (50.26%), 1-Terpinen-4-ol (20.53%) and γ -Terpinen (9.14%), as indicated in Table 1.

Method for exposure to impregnated paper

In this experiment, the objective was to verify the fumigant effect and it was possible to observe this activity in *S. calcitrans* between treatments. The negative control using Tween (1%) can be validated since there was no insecticidal action on the flies. Both negative control and treatments of 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ did not show adulticidal effect ($p < 0.05$, for both), while Diazinon and treatments of 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ demonstrated the action, with no difference between these treatments ($p > 0.05$, for all) (Table 2).

Regarding the mortality rate in relation to the time of exposure to the oil after the treatments, it can be observed that the treatments of 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ obtained a higher and faster mortality rate when related to the positive control Diazinon. Both treatments of 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ reached $96.6 \pm 3.3\%$ and 100% in the first 15 minutes, respectively, while Diazinon obtained only $73.3 \pm 17.6\%$. After 30 minutes, both treatments and positive control obtained 100% mortality (Table 2).

The toxicological values of melaleuca oil were defined from the LC_{50} (%; w/v) which represents the lethal concentration required to obtain 50% mortality from the study population. In this case the LC_{50} (%; w/v) was 1.06 ± 0.02 (Table 4).

Method of superficial application

Negative control and treatments 0.5, 1 and 2.5% (w/v) showed a low adulticidal action in relation to Diazinon and the treatment of 5% ($p < 0.005$, for all). The 5% treatment showed adulticidal action, similar to the positive control, Diazinon ($p > 0.05$, for both) (Table 3).

It can be observed that the 5% treatment obtained a comparative mortality rate with the Diazinon positive control (1%) only at 120 minutes, that is, at the end of the 2 total test hours. This percentage means that the adult fly received 125 μg of oil on its thorax, of the total of 3 μL applied. The LC_{50} lethal concentration (%; w/v) was 3.82 ± 0.65 , showing a good toxicological percentage (Table 4).

DISCUSSION

The quantification of the components found in the essential oil obtained from specimens of *M. alternifolia* planted in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, indicated that the oil is not fit for commercialization (ISO4730), since the requirement is that there is a minimum 30% terpinen-4-ol and a maximum content of 15% 1,8-cineole (Hammer et al., 2006). However, the existence of plants with different chemotypes is common, and Homer et al. (2000) report great

natural variation found in *M. alternifolia* plants in Australia. Among the variations found, the oil used in the present study corresponds to the group called "Var A", where terpinen-4-ol values are between 16-20% and the major compound is 1,8-cineol, with 41 -63% (Homer et al., 2000).

Although there is evidence of ontogenetic variation in oil composition (Southwell and Stiff, 1992) and seasonal and diurnal variation in the quantitative characteristics of the oil (Murtagh and Etherington, 1990), most variations are considered under genetic rather than environmental control. In addition, as a secondary metabolic product, the oil is susceptible to variations due to metabolic deficiency or competitive function, as Edwards et al. (1990), where the need for insect resistance may result in the directional selection of specific terpenes that are more toxic to them, such as 1,8-cineol in *Eucalyptus rnelliadora*.

Thus, although it is not indicated for commercialization, *M. alternifolia* oil containing levels above the recommended 1,8-cineole and between 16-20% terpene-4-ol can be considered for use since it combines two monoterpenes with insecticidal potential. For example, both terpinen-4-ol and 1,8-cineole inhibit acetylcholinesterase in insects (Mills et al., 2004; Lopez & Pascual-Villalobos, 2010). Moreover, another mechanism of action of 1,8-cineole is due to its binding at the gamma-aminobutyric acid receptor (GABA), which prevents inhibition of the neurotransmitter thereby causing the insect's death through neuromuscular hyperexcitation (Tong & Coat, 2012).

The test performed with impregnated paper showed dose-dependent adulticide and fumigant effect at concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ when compared to the positive control with Diazinon (1%). Both concentrations caused a mortality of 100% of adult *S. calcitrans* flies, with a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ higher than the chemical pesticide, since it obtained a higher percentage of mortality in less time ($T = 15$ min). In this case, it is possible that the result of the fumigant activity obtained is an isolated effect of one of the compounds present in the essential oil of *M. alternifolia* or due to a joint action between 1,8-cineole and terpene-4-ol (Palacios et al., 2009).

Bandeira et al. (2010) performed a similar test with impregnated paper, using 9 essential oils against stable fly, diluted in 11 concentrations, and obtained results with promising insecticidal effects with *Eucalyptus staigeriana* oils, *Cytopogon maytini*, *Lippia sidoides* and *Mentha piperita*. However, the concentration that reached these insecticidal results was not specified, which makes it difficult to compare them with the present work.

In relation to the test of superficial application of oil in adult flies, concentrations of 0.5, 1 and 2.5% were not lethal. However, 5% showed adulticidal action in relation to the positive control with Diazinon (1%). This concentration corresponds to 125 µg of the oil applied on the thorax of the adult fly. The compound 1,8-cineole has already been evaluated in *Musca domestica* by the same method of Sukontason et al. (2004). The toxic concentration was 118 µg/insect for males and 177 µg/insect for females. According to these authors, the difference in toxicity of the compound between the genera may be justified by the size of the insect, since the female is larger and consequently a larger amount of oil is required for the adulticidal effect to occur. In contact toxicity bioassays using *Nepeta cataria* essential oil, Zhu et al. (2011) observed mortality rates of 65-68% at the dose of 12.5 µg/fly and higher mortalities with 25 µg/fly at 2, 4 and 6 h after treatment, demonstrating that the oil, as in the present study, is dose-dependent.

The toxicological values of the topical application test and the impregnated paper, after the first 15 minutes of evaluation, were LC₅₀ (%; w/v) 3.82 ± 0.65 and 1.06 ± 0.02, respectively. This difference between the techniques used was also observed by Rice and Coats (1994) who compared the method of surface application with the fumigant effect of 22 monoterpenoids against *M. domestica* and obtained values of LC₅₀ between 33 and 500 µg/insect for the application and LC₅₀ values between 1.12 and 142 µg/cm² in the impregnated paper exposure method. These data should be taken into account, because the higher the concentration, higher is the amount of material needed to achieve the desired effect.

The lower value of LC₅₀ in the test with impregnated filter paper may be related to the 1,8-cineole content present in the *M. alternifolia* in question, since Rossi and Palacios (2013) evaluated the compound in a M-fumigation test and verified the occurrence of greater absorption of the same from its identification and quantification in the insect. This is due the fact that the absorption is higher for some types of compounds, because its chemical structure influences the increase of the vapor pressure on the insect and the lipophilicity favors the penetration increasing its bioavailability and contributing to a better fumigant action (Rice and Coats, 1994).

In a more recent study, Brito et al. (2012), evaluates the insecticidal activity of the 9 essential oils in adults of *S. calcitrans* by the same impregnated paper method, in concentrations between 0.5 and 10%. According to the results, there was a promising insecticidal effect with *Cymbopogon schoenanthus* (LC₉₅=5.51%), *Eucalyptus staigeriana* (LC₉₅=4.03%), *Cymbopogon martinii* (LC₉₅=5.72%), *Lippia sidoides* (LC₉₅= 5.49%) and *Mentha piperite*

(LC₉₅=6.72%). However, the reading was only 2 hours after the flies were exposed to the treatment. For the comparative purposes, the present study evaluated the lethal concentration in the first 15 minutes and obtained an insecticidal effect with *M. alternifolia* oil of LC₅₀ 1.06 ± 0.02 (%; w/v).

Studies such as from Hieu et al. (2013) show that compounds such as citronellal, neral, linalool, piperitone, 1,8-cineole, linalool and terpinen-4-ol, have 83-86% repellent action in stable fly. Among the components, terpinen-4-ol shows similar repellent activity to citronellal, and greater repellency than those of geraniol and terpineol. This result supports the idea that the structure of the monoterpenoids play a significant role in the repellency of *S. calcitrans*, as well as their relationship to fumigant toxicity.

Thus, with restrictions on the use of some insecticides, such as organochlorines, organophosphates and pyrethroid, for their effects on human and animal health (Kolaczinski & Curtis, 2004) and at the environment (Ramwell et al., 2009), and the growing interest in organic farming practices, such as alternatives approaches to the management of ectoparasites, the *M. alternifolia* essential oil with a content of 50.26% 1,8-cineole and of 20.53% terpinen-4-ol was found to have insecticidal activity against adults of the stable fly. By acting in synergy or isolated, the compounds have the potential to carry out new studies, aiming at their use in animals, in traps, and in the environment, providing a better integrated control of *S. calcitrans*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Escola de Equitação Universitária de Santa Maria (EQUISM), Herbário SMDB, Laboratório de Extratos Vegetais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria and for the financial support of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- Adams, R.P. (2009). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *Allured Publishing Corporation*, 4 ed. Illinois.
- Baldacchino, F.; et al (2013). Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera: Muscidae): a review. *Parasite*, **20**, p. 26-37. doi: 10.1051/parasite/2013026.
- Bandeira, P.F.; et al. (2010). Avaliação da eficiência de extratos vegetais ativos em ínstares imaturos e adultos de musca domestica e stomoxys calcitrans. *Revista Pesquisa & Criação, Publicação Científica da Fundação Universidade Federal de Rondônia*, **09**.

- Brito, L.G.; et al (2012). Efeito inseticida de extratos vegetais sobre adultos de *Stomoxys calcitrans*. *Anais do Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, **17**.
- Edwards, P. B. et al. (1990). Mosaic resistance in plants. *Nature*, **347**, p. 434.
- European Pharmacopoeia. (2007). 6th ed. Strassbourg, European Directorate for the Quality of Medicines.
- Green, B. E.; Foil, L. D.; Hagidus, S. D.; Issel, C. J (1996). Stability of equine infectious anemia virus in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), and *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) stored at -70°C. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. **12**, p. 334-336.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. (2006) & Nielsen J.B. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem. Toxicol.* **44**, P. 616-625.
- Hieu, T. T. et al. (2013). Behavioral and EAG responses of the stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) to plant essential oils and their mixtures with attractants. *Society of Chemical Industry*. doi: 10.1002/ps.3547
- Homer, L. E. et al (2000). Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **28**, p. 367-382.
- Islam, R., Islam, K.R., Al-reza, S.M., Jeong, Y.T., Song, C.H., Khalequzzaman, M. (2009). Chemical composition and insecticidal properties of *Cinnamomum aromaticum* (Nees) essential oil against the stored product beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**, 1241–1246.
- Kolaczinski, J.H. & Curtis, C.F. (2004) Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate. *Food and Chemical Toxicology*, **42**, 697–706.
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., Satya, S. (2012) Efficacy of *Mentha piperita* and *Mentha citrata* essential oils against housefly, *Musca domestica* L. *Industrial Crops and Products*, **39**, 106 – 112.
- López, M.D., Pascual-Villalobos, M.J., (2010). Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Ind. Crop. Prod.* **31**, 284-288.
- Mills, C., Cleary, B.J., Gilmer, J.F., Walsh, J.J. (2004) Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. *Journal of pharmacy and pharmacology*, **56**, 375 – 379.
- Murtagh, G.J., Etherington, R.J. (1990) Variation in oil concentration and economic return from tea-tree (*Melaleuca alternifolia* Cheel) oil. *Austr. J. Exp. Agric.* **30**, 675-679.
- NIST/EPA/NIH (2008) mass spectral library and search/analysis programs. Hoboken: J. Wiley and Sons.

- Palacios, S.M., Bertoni, A., Rossi, Y., Santander, R., Urzúa, A. (2009) Efficacy of Essential Oils from Edible Plants as Insecticides Against the House Fly, *Musca Domestica* L. *Molecules*, **14**, p. 1938-1947.
- Ramwell, C.T., Sinclair, C.J., Van Beinum, G.W. & Bryning, G. (2009) *Management of the Environmental Inputs and Risks of Cypermethrinbased Sheep Dips*. Central Science Laboratory Report,
- Regnault-roger, C., Vincent, C., Arnason, J. T. (2012) Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. *Annual Review of Entomology*, **57**, 405 – 424.
- Rice, P., Coats, J. (1994) Insecticidal Properties of Monoterpenoid Derivatives to the House Fly (Diptera: Muscidae) and Red Flour Beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pest Management Science*, **41**, 195-202.
- Rossi, Y.E., Palacios, S.M. (2013) Fumigant toxicity of Citrus sinensis essential oil on *Musca domestica* L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor. *Acta Tropica*, **127**, 33– 37.
- Sheppard, D.C., Hinkle, N.C. (1987) A field procedure using disposable materials to evaluate horn fly insecticide resistance. *Journal of Agricultural Entomology*, **4**, 87-89.
- Southwell, I.A., Stiff, I.A., Brophy, J.J. (1992). Terpinolene varieties of *Melaleuca*. *J. Essential Oil Res.* **4**, 363-367.
- Sukontason K.L, Boonchu N, Sukontason K, Choochote W. (2004) Effects of eucalyptol on house fly (Diptera: Muscidae) and blow fly (Diptera: Calliphoridae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **46**, 97–101.
- Tong, F., Coats, J.R. (2012) Quantitative structure–activity relationships of monoterpenoid binding activities to the housefly GABA receptor. *Pest Management*, **68**, 1122–1129.
- Valgode, A. M.; azevedo de, E. M. W. V. (1992) Determinação das exigências térmicas de *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera, Muscidae), em condições de laboratório. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **87**, 11-20.
- Zhu, J. et al (2006). Adult Repellency and Larvicidal Activity of Five Plant Essential Oils Against Mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **22** (3), 515-522.
- Zhu, J. et al. (2011). Contact and Fumigant Toxicity of a Botanical-Based Feeding Deterrent of the Stable Fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 10394–10400.

Table 1. Chemical composition of *Melaleuca alternifolia*. Where RT =retention time; CKI = Calculated Kovats Index; LKI= Literature Kovats Index (NIST, 2008 (Mass spectral library); Adams, 2009); NI= non-identified compound.

Peak	RT(min)	Constituent	CKI	LKI	Ref.	%
1	10.82	α -Pinene	926	935	Nist	2.53
2	12.63	Sabinen	969	971	Nist	0.77
3	13.22	Myrcene	984	986	Nist	1.10
4	14.29	2-Carene	1010	1010	Nist	4.03
5	14.79	Limonene	1022	1027	Nist	4.97
6	14.89	1,8-Cineole	1025	1028	Nist	50.26
7	15.96	γ -Terpinen	1052	1053	Nist	9.14
8	17.05	NI	1078	–	–	1.20
9	20.68	1-Terpinen-4-ol	1173	1173	Nist	20.53
10	21.22	Terpineol	1187	1190	Nist	4.73
11	31.29	NI	1486	–	–	0.75
Total identified						98.05

Table 2. Adulticidal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (average number of deaths \pm standard deviation) in *Stomoxys calcitrans* by impregnated paper test at different concentrations of oil (5, 10, 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (n=10, in triplicate for each group).

Concentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Mortality (%)						
	Time (min)	15	30	45	60	90	120
Negative control		0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Diazinon (1%)		73.3 \pm 17.6 b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b
OL 5		3.3 \pm 3.3 a	10 \pm 5.7 c	20 \pm 10 c	23 \pm 6.6 c	26.6 \pm 3.3 c	50 \pm 5.7 c
OL 10		43.3 \pm 6.6 c	63.3 \pm 3.3 d	63.3 \pm 3.3d	70 \pm 5.7 d	73.3 \pm 8.8 d	80 \pm 10 d
OL 25		96.6 \pm 3.3 b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b
OL 50		100 \pm b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b

*Post hoc analysis: significant differences ($p < 0.05$) between treatments are indicated by letters.

OL, *Melaleuca alternifolia* essential oil

Table 3. Adulticidal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (average number of deaths \pm standard deviation) in *Stomoxys calcitrans* by surface application at different concentrations of oil (0.5, 1, 2.5 and 5%) (n=10, in triplicate for each group).

Concentration (%)	Mortality (%)						
	Time (min)	15	30	45	60	90	120
Negative control		0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	3.3 \pm 3.3 a
Diazinon (1%)		83.3 \pm 8.8 b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b
OL 0.5%		0 a	0 a	0 a	3.3 \pm 3.3 a	6.6 \pm 3.3 a	10 \pm 5.7 a
OL 1%		3.3 \pm 3.3 a	6.6 \pm 6.6 a	6.6 \pm 6.6 a	13.3 \pm 6.6 a	13.3 \pm 6.6 a	13 \pm 6.6 a
OL 2.5%		16.6 \pm 12 a	20 \pm 11.5 a	26.6 \pm 6.6 c	36.6 \pm 8.8 c	36.6 \pm 8.8 c	40 \pm 11.5 c
OL 5%		73.3 \pm 6.6 b	73.3 \pm 6.6 c	76.6 \pm 3.3 d	80 \pm 5.7 d	83.3 \pm 3.3 d	93 \pm 6.6 b

*Post hoc analysis: significant differences ($p < 0.05$) between treatments are indicated letters.

OL, *Melaleuca alternifolia* essential oil

Table 4. Lethal concentration of *Melaleuca alternifolia* essential oil against *Stomoxys calcitrans* adults after a 15 minutes period by superficial application method and from exposure to impregnated paper.

Melaleuca	Superficial application	Impregnated paper
LC ₅₀ (%;w/v)	3.82 ± 0.65	1.06 ± 0.02
Slope+SE	3.74 ± 0.79	4.22 ± 1.03
X ²	0.8953	0.9796
N	12	12

* LC⁵⁰, Lethal concentration

4. DISCUSSÃO

Sabe-se que a *S. calcitrans* passa pouco tempo sobre o hospedeiro e mais no ambiente, sendo que os locais utilizados para reprodução são aqueles onde há vegetação em decomposição (GILLES et al., 2005). Locais com acúmulo de restos de alimentação dos animais, tais como feno de alfafa, são responsáveis por gerar cerca de 80% dos instares imaturos da mosca-do-estábulo (SKODA et al., 1991). Em vista disso, a escolha de usar o feno de alfafa como substrato larval na criação desta mosca em laboratório, está relacionado principalmente a mimetização do ambiente onde as larvas e pupas são encontradas, tornando pesquisas futuras de controle mais fidedignas ao ambiente natural da *S. calcitrans*.

Muitos estudos abordam a criação da mosca-do-estábulo em laboratório, no entanto, possuem foco maior nas condições de temperatura e umidade (BAILEY et al., 1975; VALGODE & AZEVEDO, 1992; GUILLES et al., 2005; ANGULO & LEUCONA, 2014). Poucos abordam a alimentação dos instares larvais, sendo que a maioria dos autores utiliza mistura de farinhas, apesar da matéria vegetal ser o principal substrato natural para as larvas. Uma particularidade do presente estudo, comparado aos demais, é que apenas o uso de feno de alfafa foi suficiente como substrato larval, demonstrando bons percentuais de desenvolvimento larval, pupação e emergência de adultos, sendo possível a sua utilização na criação da mosca-do-estábulo em laboratório.

A necessidade de formar uma colônia em laboratório está relacionada, principalmente, ao fato de que o controle da *S. calcitrans* não foque apenas no adulto, mas sim, também, em seus instares imaturos. A aplicação de inseticidas contra a mosca-do-estábulo resulta apenas em controle marginal e para que ocorra um manejo eficiente é necessário que os métodos de controle sejam integrados (ZHU et al., 2010), ou seja, a manutenção da colônia servirá principalmente para a realização de testes em seus instares imaturos, voltados a aplicação no ambiente de criação da mosca. No entanto, a escolha de instares adultos para a realização do segundo ensaio ocorreu devido a maior disponibilidade dos mesmos. Embora a criação das moscas em laboratório tenha sido estabelecida, o tempo para que se complete um ciclo é longo e por esse motivo não foram utilizados no segundo estudo as moscas provenientes da colônia desenvolvida no laboratório, apenas moscas capturadas e mantidas em colônia até a realização dos testes.

A opção do teste com óleo essencial ocorreu devido ao fato de que já existem restrições ao uso de alguns inseticidas sintéticos, como organoclorados, organofosforados e piretroides, por seus efeitos adversos sobre a saúde humana, animal (KOLACZINSKI & CURTIS, 2004) e

ao meio ambiente (RAMWELL et al., 2009). Além disso, o uso de óleos essenciais no controle de ectoparasitas de importância veterinária é uma área que possui potencial considerável para o futuro e pesquisas com seu uso ainda estão em fase inicial.

O óleo de melaleuca já possui propriedades descritas, dentre elas: atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e analgésica, anti-neoplásica, inseticida e antiparasitária (CARSON;RILEY, 1993; HART et al., 2000; HAMMER et al., 2003; CALDEFIE-CHE'ZET et al., 2006; BALDISSERA et al.,2014). O óleo comercializado conforme a ISO4730 tem teor mínimo de 30% de terpinen-4-ol e um teor máximo de 15% de 1,8-cineole (CARSON, 2006). No entanto, pela disponibilidade de exemplares de *M. alternifolia* plantados em Santa Maria, RS, e custo elevado do óleo comercial, optou-se pela sua extração local. Os exemplares da planta foram devidamente identificados e registrados no herbário SMDB da Universidade Federal de Santa Maria, pelo número 17.259. A variação presente na caracterização do óleo de melaleuca local, não condiz com a comercial, no entanto é classificada como “Var A”, onde os valores de terpien-4-ol ficaram entre 16-20% e o composto majoritário foi o 1,8-cineole, com 41-63% (HOMER et al., 2000).

Assim, embora não tenha indicação para o comércio, o óleo de *M. alternifolia* que contenha níveis acima do recomendado de 1,8-cineole e entre 16-20% de terpien-4-ol, pode ser considerado para utilização, já que une dois monoterpenos com potencial inseticida, sendo que ambos terpinen-4-ol e 1,8-cineole, inibem a acetilcolinesterase nos insetos (MILLS et al., 2004; LOPEZ & PASCUAL-VILLALOBOS, 2010), além do último agir sobre os receptores ácido gama-aminobutíricos (GABA), causando a morte dos insetos por hiperexcitação neuromuscular (TONG & COAT, 2012). A eficácia inseticida muitas vezes é atribuída apenas ao componente majoritário do óleo, porém há evidências de que os vários componentes possam funcionar em sinergia (YANG et al., 2003). O presente estudo corrobora com esta possibilidade, uma vez que o óleo de *M. alternifolia* obtido apresentou ação inseticida adulticida frente a mosca-do-estábulo.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se a partir do primeiro estudo que a utilização do feno de alfafa como substrato larval foi capaz de desenvolver o ciclo completo de *S. calcitrans* em laboratório, obtendo-se bons percentuais de desenvolvimento larval, pupação e emergência de adultos. Além disso, a padronização desta nova alimentação para as larvas permitiu a redução dos custos da manutenção da colônia, bem como a redução do tempo utilizado na preparação do substrato quando comparado com o método comum.

Quanto ao segundo estudo realizado, o óleo essencial de *M. alternifolia*, com alto teor de 1,8-cineole (50.26%) e de terpien-4-ol (20.53%), apresentou-se como uma alternativa na utilização de inseticidas sintéticos, uma vez que demonstrou possuir atividade inseticida adulticida frente a mosca-do-estábulo. Este resultado corrobora com o conceito de que a estrutura dos monoterpenoides, compostos majoritários no óleo em estudo, desempenha um papel significativo na ação inseticida contra *S. calcitrans*.

REFERÊNCIAS

- AHBIRAMI, R.; ZUHARAH, W. F.; THIAGALETCHUMI, M.; SUBRAMANIAM, S.; SUNDARASEKAR, J. Larvicidal Efficacy of Different Plant Parts of *Railway creeper*, *Ipomoea cairica* Extract Against Dengue Vector Mosquitoes, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Science**, v. 14, p. 1-6, 2014.
- ANDERSON, J. R. Mating behavior of *Stomoxys calcitrans*: Effects of a blood meal on the mating drive of males and its necessity as a prerequisite for proper insemination of females. **Entomological Society of America**, v. 71, n. 2. p. 379-386, 1978.
- ASHRAFI, S. H. The cultivation and nutritional requirements of *Stomoxys calcitrans*. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 32, p. 519-520, 1964.
- BAILEY, D. L.; WHITFIELD T. L.; LABRECQUE G. C. Laboratory biology and techniques for mass Producing the Stable Fly *Stomoxys calcitrans* (L.)(DIPTERA: MUSCIDAE. **Journal of Medical Entomology**, v.12, n.2, p. 189-193, 1975.
- BALDACCHINO, F.; MUENWORN, V.; DESQUESNES, M.; CHAROENVIRIYAPHAP, T.; DUVALLET, G. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera: Muscidae): a review. **Parasite**, 20, p. 26-37, 2013. doi: 10.1051/parasite/2013026.
- BALDISSERA, M. D., et al. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. **Exp. Parasitol.** v.141, p.21-27, 2014.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils -A review. **Food and Chemical Toxicology**. 46, p. 446 –475, 2008.
- BARROS, A. T. M.; KOLLER, W. W.; CATTO, J. B.; SOARES, C. O. Surtos por *Stomoxys calcitrans* em gado de corte no Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 945-952, 2010.
- BARROS, T. M.; SOUZA, T. F.; CANÇADO, P. H. D. Metodologia para bioensaios com imaturos de *Stomoxys calcitrans*. **Congresso Brasileiro de parasitologia veterinária**, 2014.
- BITTENCOURT, A. J. Avaliação de surtos e medidas de controle ambiental de *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, supl.1, p. 73-82, 2012.
- BRASIL. Decreto N ° 2.661, de 8 de Julho de 1998. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d2661.htm . Acesso em 30 Jun 2015.
- BRITO, L.G et al. Efeito inseticida de extratos vegetais sobre adultos de *Stomoxys calcitrans*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA 17, 2012, São Luis. **Anais: Parasitologia veterinária, bem estar e produção animal**. São Luis: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p. 163, 2012.

BRUES, C.T. The geographical distribution of the Stable fly, *Stomoxys calcitrans*. **J. Economic Entomology**, 6: 419-477, 1913.

BUDHIRAJA S. S., et al. Biological activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil component, terpinen - 4 - ol, in human myelocytic ce ll line HL - 60. **J Manipulative Physiol Ther.**, v.22 p. 447 - 453; 1999.

BURALLI G. M. & GUIMARÃES J. H. Controle de *Musca domestica* Linnaeus (Diptera, Muscidae) em área de manejo de vinhaça (Macatuba, São Paulo, Brasil). **Revista Brasileira de Zoologia**, 3(1): 1-6, 1985.

CANÇADO, P. H. D.; BARROS, A. T. M.; CATTO, J. B.; KOLLER, W. W.; SOARES, C. O. Uso da queima profilática no controle emergencial e prevenção de surtos pela mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) em propriedades produtoras de cana-de-açúcar. Campo Grande: **Embrapa Gado de Corte**, p. 1-4, 2013a.

CANÇADO, P. H. D.; FERREIRA, T.; PIRANDA, E. M.; SOARES, C. O. Sugarcane stems as larval habitat for the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) in sugarcane plantations. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.6, p. 741-744, 2013b.

CAMPBELL J. B.; BERRY, I. L.; BOXLER, D. J.; DAVIS, R. L.; CLANTON, D. C.; DEUTSCHER, G. H. Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gain and feed efficiency on feedlot cattle. **Journal Economic Entomology**, v.80, n.1, p. 117-119, 1987.

CAMPBELL, J. B.; HERMANUSSEN, J. F. Efficacy of insecticides and methods of insecticidal application for control of stable flies in Nebraska. **Journal of Economic Entomology**, 64, p. 1188-1190, 2001.

CALDEFIE-CHE'ZET, F. et al. Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. **Phytother. Res.** v.20, p.364-370, 2006.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V.. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J. Appl. Bacteriol.** 78:264-269, 1993.

CASSOL, D. M. S.; SANDOVAL, G. A. F.; HENRIQUE, C. H.; GIL, P. C. N.; ORTOLAN, M. D. D. V. Controle integrado da *Stomoxys calcitrans*, a mosca dos estábulo. **A Hora Veterinária**, N, 174, 2010.

CORRÊA, E. C.; RIBAS, A. C. A.; CAMPOS, J.; BARROS, A. T. M. Abundância de *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) em diferentes subprodutos canavieiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.11, p. 1303-1308, 2013.

DESQUESNES, M.; DIA, M. L. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. **Veterinary Parasitology**, 119, p. 9-19, 2004.

DOYLE, M. S.; SWOPE, B. N.; HOGSETTE, J. A; BURKHALTER, K. L.; SABAGE, H. M.; NASCI, R. S. Vector competence of the stable fly (Diptera: Muscidae) for West Nile virus. **Journal of Medical Entomology**, 48, 656-668, 2011.

ÉLKAN, P. W.; PARNELL, R.; SMITH, J. L. D. A die-off of large ungulates following a *Stomoxys* biting fly out-break in lowland forest, northern Republic of Congo. **African Journal of Ecology**. v.47, n.4, p. 528-536, 2009.

FOIL, L. D.; HOGSETTE J. A. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. **Revue scientifique et technique de l'Office international des epizooties**, 13, p. 1125-1158, 1994.

FRAENKEL G, BHASKARAN G. Pupariation and pupation in Cyclorrhaphous Flies (Diptera): Terminology and interpretation. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 66, n.2, 418-422, 1973.

FREITAS, T. R. P. **Estudo sobre o potencial da mosca de estábulo *Stomoxys calcitrans* L. como portadora e veiculadora do vírus da leucemia bovina (Retroviridae)**. 78p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1985.

GONÇALVES, N. M. F. M.; VEIGA, L. A. S. Variação nos hábitos alimentares da mosca de estábulos *Stomoxys calcitrans* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba , v. 41, n. 3, p. 1-5, 1998.

GREEN, B. E.; FOIL, L. D.; HAGIDUS, S. D.; ISSEL, C. J. Stability of equine infectious anemia virus in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), and *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) stored at -70°C. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 12, p. 334-336, 1996.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S; BARROS, A.T.M; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D; LÉON, A.A.P; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, 23, p.150-156, 2014.

GUILLES, J; J.; DAVID, J. F.; DUVALLET, G. **Dynamique et gene tique des populations d'insectes vecteurs. Les stomoxes, *Stomoxys calcitrans* et *Stomoxys niger niger*, dans les elevages bovins reunionnais**. J. Med. Entomol., 42, p. 260-265, 2005.

GUIMARÃES, J. H. Moscas- Biologia, ecologia e controle. **Agroquímica Ciba-Geigy**, n.21, p.20-26, 1983.

GUIMARÃES, J. H. Problemas ocasionados ao gado por moscas hematófagas no Brasil, *Stomoxys Calcitrans* e *Haematobia irritans*. **Doenças parasitárias dos ruminantes S.P.** – S. A. A. Coordenadoria de Pesquisas Agropecuárias – Instituto de Zootecnia, 1986.

HART, P.H., et al. Terpin-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflamm. Res**.v.49, p.619–626, 2000.

HAMMER, K. A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V., Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **J. Appl. Microbiol.** v.95, p.853–860, 2003.

HAMMER K.A., CARSON C.F., RILEY T.V. & Nielsen J.B. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food Chem. Toxicol.** 44, P. 616-625, 2006.

- HIEU, T. T; KIM, S.; LEE, S-G.; AHN, Y-J. Repellency to *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) of Plant Essential Oils Alone or in Combination with *Calophyllum inophyllum* Nut Oil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47 (4), p. 575-580, 2010. Doi: 10.1603/ME09271
- HOGSETTE J. New Diets for Production of House Flies and Stable Flies (Diptera: Muscidae) in the Laboratory. **Veterinary Entomology** 85, n.6, 2291-2294, 1992.
- HOMER, L. E. et al. Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 28, p. 367-382, 2000.
- ISMAN, M. B.; MIRESMALLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 197–204, 2011.
- ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51 p. 45–66, 2006.
- KASSAB, S. O., GAONA, J. C., LOUREIRO, E. D. S., MOTA, T. A., DA FONSECA, P. R. B., & ROSSONI, C. Novos surtos populacionais de mosca-dos-estábulo no Mato Grosso do Sul: medidas de controle e prevenção. **Agrarian**, v. 5(15), p. 84-88, 2012. Disponível em: <<http://www.periodicos.ufgd.edu.br/index.php/agrarian/article/viewArticle/793>> . Acesso em: 30 mai 2016.
- KOLLER, W.W.; CATTO, J.B.; BIANCHIN, I.; SOARES, C.O.; PAIVA, F.; TAVARES, L.E.R; GRACIOLLI G.. Surtos da mosca-dos-estábulo, *Stomoxys calcitrans* em Mato Grosso do Sul: Novo Problema para as Cadeias Produtivas da Carne e Sucoalcooleira. **Embrapa Gado de Corte.**, v. 21, p. 1-31, 2009.
- KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALI K, A.; SATYA, S. Repellent, larvicidal and pupicidal properties of essential oils and their formulations against the housefly, *Musca domestica*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, p. 302–310, 2011.
- LAM, K.; BABOR, D.; DUTHIE, B.; BABOR, E. M.; MOORE, M.; GRIES, G. Proliferating bacterial symbionts on house fly eggs affect oviposition behaviour of adult flies. **Animal Behaviour**, v.74, n.1, p. 81–89, 2007.
- LÓPEZ, M.D., PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Ind. Crop. Prod.** 31, 284-288, 2010.
- LYSYK, T.J, KALISCHUK-TYMENSEN L. D, ROCHON K, SELINGER L. B. Activity of *Bacillus thuringiensis* Isolates Against Immature Horn Fly and Stable Fly (Diptera:Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, v.103, n.3, 1019-1029, 2010.
- MACEDO, D.M. Desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* (Díptera: Muscidae) e *Stomoxys calcitrans* (Díptera: Muscidae) criadas em fezes de bovinos tratados com diferentes avermectinas [Tese]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2001.

- MIHOK S.; MARAMBO, O.; MUNYOKI, E.; KAGOIYA, J. Mechanical transmission of *Trypanossoma* spp. By African Stomoxyinae (Diptera: Muscidae). **Tropical Medicine and Parasitology**, 46, p. 103-105, 1995.
- MIKUS, J. et al. *In vitro* effect of essential oils and isolated mono – and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosna brucei*. **Planta Med.** v.66, p.366–368, 2000.
- MILLS, C., CLEARY, B.J., GILMER, J.F., Walsh, J.J. Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. **Journal of pharmacy and pharmacology**, 56, 375 – 379, 2004.
- MONTEIRO, S. G.. **Parasitologia na Medicina Veterinária**, Editora Roca Ltda. São Paulo, 2011.
- MUIR, F. On the original habitat of *Stomoxys calcitrans*. **Journal of Economic Entomology**, v. 6. n. 6, p. 459-457, 1914.
- NAKANO, O.; PARO, J. R. L. A.; CAMARGO, A. H. Controle químico de adultos e larvas da mosca doméstica. **O Biológico**, v. 39, p. 5-8, 1973.
- ODA, F. H.; ARANTES, C. A. Surto populacional da mosca-dos-estábulo *Stomoxys calcitrans*, Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) no município de Planalto. In: **Encontro Internacional De Produção Científica Cesumar**, 6., 2009, São Paulo. Anais Maringá: Cesumar, p. 27 a 30, 2010.
- PARR, H. C. M. Studies on *Stomoxys calcitrans* (L.) in Uganda, East Africa II Notes on life-history and behavior. **Bulletin of Entomological Research**. V.53, n.2, p.437-443.1962.
- PAZINATO, R., et al. Influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Exp. Appl. Acarol.** 63, 77-83, 2014.
- POHLIT, A. M.; REZENDE, A. R.; BALDIN, E. L. L.; LOPES, N. P. ; ANDRADE NETO, V. F. Plant Extracts, Isolated Phytochemicals, and Plant-Derived Agents Which Are Lethal to Arthropod Vectors of Human Tropical Diseases – A Review. **Planta Medica**, v. 77, p. 618-630, 2011.
- RATCLIFFE, T. S. T.; ROBERTSON, H. M.; JONES, C. J.; GERMAN, A. B.; WEINZIERL, R.A. Assessment of Parasitism of House Fly and Stable Fly (Diptera: Muscidae) Pupae by Pteromalid (Hymenoptera: Pteromalidae) Parasitoids Using a Polymerase Chain Reaction Assay. **Journal of Medical Entomology**. 39(1) 52-60, 2002.
- REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405-424, 2012.
- SAILLENFAIT, A.; NDIAYE, D.; SABATÉ, J. Pyrethroids: Exposure and health effects – An update. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 218, p. 281–292, 2015.

SALEM, A.; BOUHSIRA, E.; LIENARD, E.; BOUSQUET, M. A.; JACQUIET, P.; FRANC, M.. Susceptibility of two European strains of *Stomoxys calcitrans* (L.) to cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, k-cyhalothrin, permethrin and phoxim. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, 10, 249–257, 2012.

SCHOWALTER, T. D.; KLOWDEN, M. J. Blood meal size of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, measured by the HiCN method. **Mosquito News**, 39, p. 110-112, 1979.

SCOLES, G.A.; BROCE, A.B.; LYSYK, T.J.; PALMER, G.H. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 42, p. 668-675, 2005.

SHONO, T. & SCOTT, J. G. Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 75, p. 1–7, 2003.

SOULSBY, E.J.L. **Parasitología y enfermedades parasitarias em los animales domésticos**. México, Interamericana, 7ª Ed. p.823, 1987.

THANY, S. H.; REYNIER, P.; LENAERS, G. Neurotoxicité des pesticides Quel impact sur les maladies neurodégénératives? **Médecine/sciences**, v. 29, p. 273-278, 2013.

THUONG, P. T.; HUNG, T. M.; KHOI, N. M.; NHUNG, H. T. M.; CHINH, N. T.; QUY, N. T.; JANG, T. S.; NA, M. Cytotoxic and anti-tumor activities of lignans from the seeds of Vietnamese nutmeg *Myristica fragrans*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, p. 399–403, 2014.

TRAVERSA, D.; OTRANTO, D.; IORIO, R.; CARLUCCIO, A.; CONTRI, A.; PAOLETTI, B.; BARTOLINI, R.; GIANGASPERO, A. Identification of the intermediate hosts of *Habronema microstoma* and *Habronema muscae* under field conditions. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 22, p. 283–287, 2008.

TONG, F., COATS, J.R. Quantitative structure–activity relationships of monoterpenoid binding activities to the housefly GABA receptor. **Pest Management**, 68, 1122–1129, 2012.

VALGODE, A. M.; AZEVEDO de, E. M. W. V.. Determinação das exigências térmicas de *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera, Muscidae), em condições de laboratório. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, supl. 1, p. 11-20, 1992. doi: 10.1590/S0074-02761992000500005.

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Entomology: Arthropod Ectoparasites of Veterinary Importance**. Chapman & Hall: London, 1997, 465 p.

WEBER, A.F.; MOON, R.D.; SORENSEN, D.K.; BATES, D.W.; MEISKE, J.C.; BROWN, C.A.; ROHLAND, N.L.; HOOKER, E.C.; STRAND, W.O. Evaluation of the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) as a vector of enzootic bovine leukosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 1543–1549, 1988.

WIJNGAARDEN, R. P. A. V.; BROCK, T. C. M.; BRINK, P. J. V D. Threshold Levels for Effects of Insecticides in Freshwater Ecosystems: A Review. **Ecotoxicology**, v. 14, p. 355–380, 2005.

WINK, M., Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theoret. App. Genetics**, v.75, p.225–233, 1988.

WYCKHUYS, K. A. G.; LU, Y.; MORALES, H.; VAZQUEZ, L. L.; LEGASPI, J. C.; ELIOPOULOS, P. A.; HERNANDEZ, L. M. Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing world. **Biological Control**, v. 65, p. 152–167, 2013.

XUAN, T.D.; ELZAAWELY, A.A.; DEBA, F.; FUKUTA, M.; TAWATA, S. Mimosine in *Leucaena* as a potent bio-herbicide. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 26, p. 89–97, 2006.

YANG Y.C., et al. Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicumbark* essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Int J Parasitol**, 35, p.1595 –1600, 2003.

YERUHAMI.; BRAVERMAN, Y. Skin lesions in dogs, horses and calves caused by the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). **Rev Elev Med Vet Pays Trop.**, v 48, p. 347-349, 1995.

ZHANG, B.; LI, JIAN-BEI; ZHANG, DONG-MING; DING, Y. & DU, GUAN-HUA. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of a Fraction Rich in Gaultherin Isolated from *Gaultheria yunnanensis* (FRANCH.) REHDER. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p. 465-469, 2007.

ZHU, J. J.; DUNLAP, C. A.; BEHLE, R. W.; BERKEBILE, D. R.; WIENHOLD, B. Repellency of a wax-based catnip-oil formulation against stable flies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12320–12326, 2010. Doi: 10.1021/jf102811k

ZHU, J.J.; BERKEBILE, DENNIS, R.; DUNLAP, C. E.; ZHANG, A.; BOXLER, D.; TANGTRAKULWANICH, K.; BEHLE, R.; BAXENDALE, F. P.; BREWER, G. J. "Nepetalactones from essential oil of *Nepeta cataria* represent a stable fly feeding and oviposition repellent". **Faculty Publications: Department of Entomology**, Paper 340, 2012. Disponível em: <http://digitalcommons.unl.edu/entomologyfacpub/340>. Acesso em: 01 de nov 2016.

ANEXOS

ANEXO A. Ficha de registro do exemplar de *Melaleuca alternifolia*

	<p style="text-align: center;">HERBÁRIO SMDB – JBSM CCNE - UFSM Santa Maria - RS - Brasil</p>	<p style="text-align: center;">Nº: 17.259</p>
<p style="text-align: center;"><i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel</p> <p>Família: Myrtaceae</p> <p>Col: Sílvia Gonzalez Monteiro Data: 18/12/2017</p> <p>Det: Sílvia Gonzalez Monteiro Data: 18/12/2017</p> <p>Local: Brasil, RS, Santa Maria, em direção à Silveira Martins. Chácara da Profa. Sílvia Gonzalez Monteiro.</p> <p>OBS: Material testemunho de Dissertação em Medicina Veterinária. Aluna: Janaína Brand Dillmann. Orientadora: Profa. Sílvia Gonzalez Monteiro.</p>		

ANEXO B. Autorização CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

 Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Stomoxys calcitrans*", protocolada sob o CEUA nº 6762190917, sob a responsabilidade de **Silvia Gonzalez Monteiro e equipe; Janaína Brand Dillmann; Letícia dos Santos Petry; Luciana Cossetin; Marjorie de Giacometi; Pamela Daniele Avrella** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFMS) na reunião de 28/09/2017.

We certify that the proposal "EVALUATION OF ESSENTIAL OILS IN CONTROL OF *Stomoxys calcitrans*", utilizing 6 Equines (males and females), protocol number CEUA 6762190917, under the responsibility of **Silvia Gonzalez Monteiro and team; Janaína Brand Dillmann; Letícia dos Santos Petry; Luciana Cossetin; Marjorie de Giacometi; Pamela Daniele Avrella** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFMS) in the meeting of 09/28/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **11/2017 a 02/2018**

Área: **Microbiologia E Parasitologia**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **5 a 20 anos**

N: **06**

Linhagem: **SRD**

Peso: **450 a 550 kg**

Resumo: A mosca-dos-estábulo, *Stomoxys calcitrans*, pertencente a família Muscidae, gênero *Stomoxys*, é um díptero hematófago responsável por provocar perdas produtivas e de desempenho em equinos e bovinos, além de causar impactos sanitários através da disseminação de microrganismos patogênicos. Atualmente, o controle do díptero conta com inseticidas sintéticos, manejo sanitário, controle biológico e armadilhas, porém, nenhum desses métodos isoladamente se mostra eficaz. Os frequentes surtos no Brasil, relacionados à expansão das usinas sucroalcooleiras, demonstram a necessidade de busca por alternativas ao controle convencional, sendo que os óleos essenciais têm sido amplamente estudados em relação às suas atividades inseticidas. Neste sentido, o presente estudo considera que os óleos de *Syzygium aromaticum* e *Melaleuca alternifolia* podem constituir uma alternativa para o controle da espécie *Stomoxys calcitrans*. Com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de uma formulação contendo um produto natural para o controle da mosca-dos-estábulo, este trabalho pretende investigar a atividade inseticida e repelência dos óleos essenciais frente as moscas adultas.

Local do experimento: Escola de Equitação Universitária de Santa Maria (EQUSM) e Laboratório de Parasitologia Veterinária

Santa Maria, 15 de dezembro de 2017

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria