

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Luciana Filippin Cossetin

**NANOEMULSÕES DE *Lavandula dentata* E DE *Myristica fragrans*:  
DESENVOLVIMENTO, ESTUDO DE ESTABILIDADE E EFEITO  
INSETICIDA**

Santa Maria, RS  
2018



**Luciana Filippin Cossetin**

**NANOEMULSÕES DE *Lavandula dentata* E DE *Myristica fragrans*:  
DESENVOLVIMENTO, ESTUDO DE ESTABILIDADE E EFEITO INSETICIDA**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**.

Orientadora: Dra. Silvia Gonzalez Monteiro

Santa Maria, RS  
2018

Cossetin, Luciana Filippin  
Nanoemulsões de Lavandula dentata e de Myristica  
fragrans: desenvolvimento, estudo de estabilidade e  
efeito inseticida / Luciana Filippin Cossetin.- 2018.  
144 p.; 30 cm

Orientadora: Silvia Gonzalez Monteiro  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, RS, 2018

1. Controle de insetos 2. Produtos Naturais 3.  
Nanoestruturas 4. Acetilcolinesterase 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 Luciana Filippin Cossetin. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: [Lucianacossetin@gmail.com](mailto:Lucianacossetin@gmail.com)

**Luciana Filippin Cossetin**

**NANOEMULSÕES DE *Lavandula dentata* E DE *Myristica fragrans*:  
DESENVOLVIMENTO, ESTUDO DE ESTABILIDADE E EFEITO INSETICIDA**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**.

**Aprovada em 14 de dezembro de 2018:**

---

**Silvia Gonzalez Monteiro, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Luis Antonio Sangioni, Dr. (UFSM)**

---

**Cristiane Franco Codevilla, Dra. (UFSM)**

---

**Camila Belmonte Oliveira, Dra. (UFPEL)**

---

**Érico Silva de Loreto, Dr. (SOBRESP)**

Santa Maria, RS  
2018



## **DEDICATÓRIA**

À minha Família, maior exemplo de perseverança e que apesar das dificuldades e das minhas ausências souberam transmitir apoio e amor constante; e Ricardo, pelo incentivo, conforto e alegrias proporcionadas para que eu chegasse até aqui.





## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado caminhos e oportunidades na minha vida para chegar até aqui e com muita fé concluir mais uma etapa.

Aos meus pais, pelo apoio e pela compreensão, por muitas vezes não poder estar ao lado deles em momentos de reunião em família, em momentos difíceis na qual mesmo sabendo da importância da minha presença ou mesmo passar fins de semana consecutivos eu não pude estar presente. Tudo isso, com certeza, por estar envolvida na construção desta tese, mais uma conquista nossa! Minha eterna gratidão e honra a vocês, meus pais, meus heróis, meus exemplos de força e perseverança.

A minha irmã, Jo, mais que querida, que conseguiu conviver comigo nesses últimos anos os quais foram vividos com os mais variados sentimentos. Você foi quem aguentou as minhas chatices e brigas, mas foi também quem esteve sempre presente sendo a pessoa que todo dia quando chegava em casa eu podia conversar, desabafar e compartilhar todas as experiências vividas. Minha eterna amiga, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao meu noivo, Ricardo, agradeço de coração cheio de sentimentos puros e verdadeiros, pela sua companhia a qual sempre me fez e faz sentir-me mais feliz. Sensação, essa, que foi essencial na construção deste trabalho, sobretudo na reta final. Também, pelo apoio, dedicação e compreensão; por todos esses anos convividos com quem pude dividir minhas tristezas e compartilhar minhas alegrias e conquistas. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me dando forças quando eu mesma duvidava que as tinha. Muito obrigada!

Agradeço aos colegas e amigos do Lapavet, pela amizade, paciência e pelo suporte, tão determinantes para a realização deste trabalho, em especial: Jana, Lety, Thirssa, Bianca, Luana, Igor, Lucas, Dion, Gi, Tiago, Gui e Ricardo. Meus mais sinceros agradecimentos.

À Eduarda, a qual foi fundamental na construção deste trabalho, pois a partir do nosso trabalho conjunto e convívio diário conseguimos chegar até o final desenvolvendo-o com muita responsabilidade e dedicação contornando as dificuldades e obstáculos sem deixar que o cansaço nos atingisse.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelo ensino, aprendizagem e espaço físico para a realização deste trabalho.

À professora Sílvia Gonzalez Monteiro pela oportunidade e por ter confiado no meu trabalho e no meu potencial, pela transmissão de seus conhecimentos, além de ter servido como base sólida para a construção deste trabalho.

**A todos aqueles que de alguma forma me apoiaram e me incentivaram nessa jornada. Meu muito obrigado!**



## RESUMO

### NANOEMULSÕES DE *Lavandula dentata* E DE *Myristica fragrans*: DESENVOLVIMENTO, ESTUDO DE ESTABILIDADE E EFEITO INSETICIDA

AUTOR: Luciana Filippin Cossetin  
ORIENTADORA: Sílvia Gonzalez Monteiro

Os óleos essenciais têm sido amplamente estudados em relação à atividade inseticida considerados como uma alternativa para os inseticidas convencionais, pois o uso generalizado de compostos sintéticos tem influenciado no número crescente de espécies resistentes além de causarem danos à saúde e ao meio ambiente. Neste sentido, os óleos essenciais de *Myristica fragrans* (noz-moscada) e de *Lavandula dentata* (lavanda) podem constituir uma alternativa para o controle de moscas das famílias Muscidae e Calliphoridae. Com isso, este trabalho teve por objetivo investigar a atividade inseticida dos óleos associados à nanoemulsões e livres frente às espécies *Musca domestica* e *Chrysomya albiceps*. Para isso, foi realizada a extração dos óleos essenciais de sementes de *M. fragrans* e das partes aéreas de *L. dentata* por hidrodestilação e os óleos obtidos foram avaliados quanto a sua composição química. Foram identificados como componentes principais os monoterpenóides beta-pineno (26%), alfa-pineno (10,5%) e sabineno (9,1%) em *M. fragrans*; e 1,8-cineol, cânfora e linalool oxide para *L. dentata*. As nanoemulsões contendo os óleos, foram preparadas pelo método de emulsificação sob alta agitação e avaliadas quanto ao diâmetro médio de gotículas (64-87 nm), índice de polidispersão (inferior a 0,26), potencial zeta negativo (11 – 14 mV), pH (fracamente ácido), teor dos compostos (próximo aos valores dos óleos essenciais livres) as quais foram adequadas e melhor estáveis sob condições de temperatura de refrigeração (4°C). Para a determinação da atividade inseticida foram avaliados os efeitos dos óleos livres e nanoemulsionados em relação à ação larvicida e adulticida. Os óleos essenciais na forma livre em estudo à 5% (p/v) foram efetivos contra larvas de *M. domestica*. Referente ao efeito adulticida, o óleo essencial de *L. dentata* apresentou toxicidade em ambas espécies; a concentração letal (CL<sub>50</sub>) pelo método de aplicação superficial foi, respectivamente, de 3,13 ± 0,64 e 1,39 ± 0,19% (p/v) para *M. domestica* e *C. albiceps*; CL<sub>50</sub> pelo teste de exposição foi de 4,15 ± 0,64 e 5,14 ± 0,81% para *M. domestica* e *C. albiceps*, respectivamente. Em relação ao óleo essencial de *M. fragrans* a aplicação tópica foi mais tóxica para *C. albiceps*, com valores de CL<sub>50</sub> de 2,02 ± 0,56%, quando comparados a mosca comum (CL<sub>50</sub> = 8,57 ± 2,41%). Esse óleo foi efetivo contra *M. domestica* (CL<sub>50</sub> = 2,74 ± 0,24%) e *C. albiceps* (CL<sub>50</sub> = 3,65 ± 0,48%) quando foram expostas ao papel impregnado contendo o óleo. As nanoemulsões produziram efeito inseticida por aplicação tópica e efeito fumigante, sendo as nanoemulsões do óleo essencial de *M. fragrans* (NE-OM) bastante eficazes por efeito fumigante para ambas as espécies de inseto e as nanoemulsões do óleo essencial de lavanda (NE-OL) a 5% eficazes em *C. albiceps* pelo mesmo método. A toxicidade tópica foi verificada também para os sistemas nanoestruturados sendo que a NE-OM 5% provocou mortalidade em *C. albiceps* enquanto que NE-OL 5% foi mais tóxico para *M. domestica*. Foi possível verificar que o efeito inibitório observado na enzima acetilcolinesterase demonstrou ter uma relação com a atividade inseticida. Dessa forma, as formulações desenvolvidas neste projeto poderão contribuir para o desenvolvimento de um inseticida contendo um produto natural para o controle de moscas.

**Palavras-chave:** Controle de insetos. Produtos Naturais. Nanoestruturas. Acetilcolinesterase.



## ABSTRACT

### NANOEMULSIONS OF *Lavandula dentata* AND *Myristica fragrans*: DEVELOPMENT, STABILITY STUDY AND INSECTICIDE EFFECT

AUTHOR: Luciana Filippin Cossetin

ADVISOR: Silvia Gonzalez Monteiro

Essential oils have been widely studied in relation to insecticidal activity as an alternative to conventional insecticides, since the widespread of synthetic compounds has caused damage to health and environment, as well influenced the growing number of resistant species. In this sense, the essential oils of *Myristica fragrans* (nutmeg) and *Lavandula dentata* may be an alternative for the control of the Muscidae and Calliphoridae families. The objective of this work was to investigate the insecticidal activity of nanoemulsion and free oils in relation to the species *Musca domestica* and *Chrysomya albiceps*. Extraction of essential oils from *M. fragrans* seeds and aerial parts of *L. dentata* were conducted by hydrodistillation and the oils obtained were evaluated for their chemical composition. The main components identified were beta-pinene (26%), alpha-pinene (10.5%) and sabinene (9.1%) monoterpenoids in *M. fragrans*; and 1,8-cineole, camphor and linalool oxide for *L. dentata*. The nanoemulsions containing the oils were prepared by emulsification method under high agitation and evaluated for mean droplet diameter (64-87 nm), polydispersity index (less than 0.26), negative zeta potential (11-14 mV), pH (weak acid), content of the compounds (close to free essential oil values) which were adequate and better stable under cooling (4 °C) temperature conditions. To determine the insecticidal activity were evaluated the effects of free oils and nanoemulsions regarding larvicide and adulticide action. Essential oils under study in the free form at 5% (b/w) were effective against larvae of *M. domestica*. Regarding the adulticidal effect, the essential oil of *L. dentata* presented toxicity in both species; the lethal concentration (LC<sub>50</sub>) by the superficial application method was, respectively,  $3.13 \pm 0.64$  and  $1.39 \pm 0.19\%$  (b/w) for *M. domestica* and *C. albiceps*; LC<sub>50</sub> by the exposure test was  $4.15 \pm 0.64$  and  $5.14 \pm 0.81\%$  for *M. domestica* and *C. albiceps*, respectively. The topical application of *M. fragrans* essential oil was more toxic to *C. albiceps*, with LC<sub>50</sub> values of  $2.02 \pm 0.56$ , than for common fly (LC<sub>50</sub> =  $8.57 \pm 2.41\%$ ). As for the impregnated paper exposure test, the oil were very effective for *M. domestica* (LC<sub>50</sub> =  $2.74 \pm 0.24\%$ ) and *C. albiceps* (LC<sub>50</sub> =  $3.65 \pm 0.48\%$ ). Both nanoemulsions produced an insecticidal effect by topical application and fumigant effect, being the nanoemulsions of *M. fragrans* essential oil effective by fumigant effect for both insect species and lavender essential oil nanoemulsions at 5% effective in *C. albiceps* by the same method. Topical toxicity was also observed for nanostructured systems, with NE-OM 5% causing mortality in *C. albiceps* whereas NE-OL 5% was more toxic to *M. domestica*. It was possible to verify that the inhibitory effect observed in the enzyme acetylcholinesterase has been shown to have a relation with the insecticidal activity. Thus, the formulations developed in this project may contribute to the development of an insecticide containing a natural product for the control of flies.

**Keywords:** Insect control. Natural products. Nanostructures. Acetylcholinesterase.



## LISTA DE FIGURAS

### APRESENTAÇÃO

- Figura 1 – Ilustração do ciclo das fases de *Musca domestica*: ovos (A), larva (B), pupas (C) e adulto (D).....26
- Figura 2 – Ilustração do ciclo das fases de *Chrysomya albiceps*: ovos (A), larva (B), pupa (C) e adulto (D). .....27

### ARTIGO

- Fig. 1.** Adulticidal activity of *L. dentata* essential oil in adult flies, *Musca domestica* (a) and *Chrysomya albiceps* (b), in experimental topical application model with different concentrations of oil (1, 2.5, 5.0, and 10%) (NC: Negative control; PC: Positive control; LO: *Lavandula dentata* essential oil). .....46
- Fig. 2.** Adulticidal activity of *L. dentata* in adult *Musca domestica* (a) and *Chrysomya albiceps* (b) flies, in experimental model of exposure to filter paper impregnated with different concentrations of oil (10; 25, 50, and 100  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) (NC: Negative control; PC: Positive control; LO: *Lavandula dentata* essential oil) .....46
- Fig. 3.** Effects of *Lavandula dentata* oil essential on human leukocytes; a: DNA damage index; b: frequency of micronuclei; c: cell viability percentage. NC: Negative Control; PC: Positive Control. Data expressed as mean  $\pm$  SD. Results were confirmed by experiments in triplicate. In the columns different letters represent statistically different results ( $P < 0.05$ ). .....47

### MANUSCRITO 1

- Figure 1.** Adult emergence percentage (%) *M. domestica* (A) and *C. albiceps* (B) after larvae immersions at different *M. fragrans* essential oil concentrations. NC: Negative Control (Tween 80 1%), PC: Positive Control (Diazinon 1%), MO: *M. fragrans* essential oil in different concentrations. ....73
- Figure 2.** Mortality of adults: *M. fragrans* oil against *M. domestica* (A, C) and *C. albiceps* (B, D), in experimental models of exposure to oil impregnated filter paper (A, B) and topical applications (C, D).....74

### MANUSCRITO 2

- Figura 1.** Tamanho médio de gotícula das nanoemulsões dos óleos essenciais de *L. dentata* (NE-OL) e de *M. fragrans* (NE-OM) durante o armazenamento em temperatura ambiente (24°C), refrigeração (4°C) e câmara climática (40°C). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. #resultados comparados com as amostras em tempo zero. \* resultados comparados entre as condições de armazenamento no mesmo tempo de avaliação. ....84
- Figura 2.** Polidispersão das nanoemulsões dos óleos essenciais de *L. dentata* (NE-OL) e de *M. fragrans* (NE-OM) durante o armazenamento em temperatura ambiente (24°C), refrigeração (4°C) e câmara climática (40°C). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

#resultados comparados com as amostras em tempo zero. \* resultados comparados entre as condições de armazenamento no mesmo tempo de avaliação. .... 85

**Figura 3.** Potencial zeta das nanoemulsões dos óleos essenciais de *L. dentata* (NE-OL) e de *M. fragrans* (NE-OM) durante o armazenamento em temperatura ambiente (24°C), refrigeração (4°C) e câmara climática (40°C). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. #resultados comparados com as amostras em tempo zero. \* resultados comparados entre as condições de armazenamento no mesmo tempo de avaliação. .... 86

**Figura 4.** pH das nanoemulsões dos óleos essenciais de *L. dentata* (NE-OL) e de *M. fragrans* (NE-OM) durante o armazenamento em temperatura ambiente (24°C), refrigeração (4°C) e câmara climática (40°C). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. #resultados comparados com as amostras em tempo zero. \* resultados comparados entre as condições de armazenamento no mesmo tempo de avaliação. .... 87

### MANUSCRITO 3

**Figura 1.** Mortalidade (%) de adultos após o bioensaio aduicida do óleo de *L. dentata* livre e nanoemulsionado em *M. domestica* (A, C) e em *C. albiceps* (B, D), a partir dos modelos experimentais por exposição ao papel filtro impregnado (A, B) e por aplicação superficial (C, D). CN: Controle negativo (Tween 80 1%), NEB: Nanoemulsões brancas, CP: Controle positivo (Diazinon 1%), OL: Óleo essencial de *L. dentata* em diferentes concentrações, NE: Nanoemulsões. .... 111

**Figura 2.** Mortalidade (%) de adultos após o bioensaio aduicida do óleo essencial livre de *M. fragrans* e nanoemulsionado em *M. domestica* (A, C) e em *C. albiceps* (B, D), a partir dos modelos experimentais por exposição ao papel filtro impregnado (A, B) e por aplicação superficial (C, D). CN: Controle negativo (Tween 80 1%), NEB: Nanoemulsões brancas, CP: Controle positivo (Diazinon 1%), OM: Óleo essencial de *M. fragrans* em diferentes concentrações, NE: Nanoemulsões. .... 112

**Figura 3.** Efeito dos óleos essenciais de *Lavanda dentata* livre (OL) e nanoemulsionado (NE-OM) [A, B] e de *M. fragrans* livre (OM) e nanoemulsionado (NE-OM) [C, D] sobre atividade da enzima acetilcolinesterase das larvas de *M. domesica* [A, C] e de *C. albiceps* [B, D]. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Tukey. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*\*  $P < 0.0001$  indicaram diferença significativa para o grupo controle. #  $P < 0.05$  and ####  $P < 0.0001$  indicaram diferença significativa para o Diazinon (Controle positivo). Barras representam média  $\pm$  DP. .... 114

**Figura 4.** Efeito do óleo essencial de *M. fragrans* livre (OM) e nanoemulsionado (NE-OM) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em *M. domesica* [A, C] e *C. albiceps* [B, D] adultos após os bioensaios de Aplicação superficial [A, B] e exposição ao papel impregnado [C, D]. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de uma via, seguidas do teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. \*\*\*\*  $P < 0.0001$  indicou diferença significativa para o grupo controle (CN). ###  $P < 0.01$  e ####  $P < 0.0001$  indicaram diferença significativa para o Diazinon (Controle positivo). Barras representam média  $\pm$  DP. .... 116

**Figura 5.** Efeito do óleo essencial de *L. dentata* livre (OL) e nanoemulsionado (NE-OL) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em *M. domesica* [A, C] e *C.*



*albiceps* [B, D] adultos após os bioensaios de Aplicação superficial [A, B] e exposição ao papel impregnado [C, D]. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de uma via, seguidas do teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. \*\*\*\*  $P < 0.0001$  indicou diferença significativa para o grupo controle (CN). ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  e ####  $P < 0.0001$  indicaram diferença significativa para o Diazinon (Controle positivo). Barras representam média  $\pm$  DP..... 118



## LISTA DE TABELAS

### APRESENTAÇÃO

Tabela 1 – Terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos que apresentam atividade inseticida.....	31
---	----

### ARTIGO

<b>Table 1.</b> Chemical composition of <i>Lavandula dentata</i> essential oil.....	43
<b>Table 2.</b> Effect of <i>L. dentata</i> essential oil (LO), Tween control (NC), and Diazinon (PC) on larvae, pupae and adult emergence after immersion of third stage <i>Musca domestica</i> larvae (n = 20, in triplicate for each group; mean ± SD).....	44
<b>Table 3.</b> Effect of <i>L. dentata</i> essential oil (LO), Tween control (NC), and Diazinon (PC) on larvae, pupae, and adult emergence after immersion of third instar <i>Chrysomya albiceps</i> larvae (n = 20, in triplicate for each group; mean ± SD) .....	44
<b>Table 4.</b> Adulticidal activity of <i>Lavandula dentata</i> essential oil (LO), Tween control (NC), and Diazinon (PC) in adult flies; <i>Musca domestica</i> and <i>Chrysomya albiceps</i> , experimental topical application model at different concentrations of oil (1.0, 2.5, 5.0, and 10%) (n = 10, in triplicate for each group; mean ± SD).....	45
<b>Table 5.</b> Adulticidal activity of <i>Lavandula dentata</i> essential oil (LO), Tween control (NC), and Diazinon (PC) in adult flies, <i>Musca domestica</i> and <i>Chrysomya albiceps</i> , experimental model of exposure to paper impregnated in different concentrations of oil (10, 25, 50, and 100 µg.cm <sup>-2</sup> ) (n = 20, in triplicate for each group; mean ± SD).....	45
<b>Table 6.</b> Lethal concentration (LC <sub>50</sub> ) of <i>Lavandula dentata</i> essential oil against adult <i>Musca domestica</i> and <i>Chrysomya albiceps</i> , after a period of 15 min using methods involving superficial application and exposure to impregnated paper.....	45

### MANUSCRITO 1

<b>Table 1.</b> Chemical composition of <i>Myristica fragrans</i> essential oil. % relative percentage considering retention time (RT) and Kovats retention index calculation (RI calc)....	67
<b>Table 2.</b> Effect of <i>M. fragrans</i> essential oil on larvae, pupae and adult emergence after immersion of third stage <i>M. domestica</i> larvae (n=20, in triplicate for each group; mean ± standard deviation). .....	68
<b>Table 3.</b> Effect of <i>M. fragrans</i> essential oil on larvae, pupae and adult emergence after immersion of third instar <i>C. albiceps</i> larvae (n=20, in triplicate for each group; mean ± standard deviation). .....	69
<b>Table 4.</b> Adulticidal activity of <i>M. fragrans</i> essential oil (average number of deaths ± standard deviation) in <i>M. domestica</i> adult flies by topical application model at different oil concentrations (1, 2.5, and 5 %) (n=10, in triplicate for each group), and exposure to oil impregnated paper in different concentrations (10, 25, and 50 µg/cm <sup>2</sup> ) (n=20, in triplicate for each group).....	70
<b>Table 5.</b> Adulticidal activity of <i>M. fragrans</i> essential oil (average number of deaths ± standard deviation) in <i>C. albiceps</i> adult flies by topical application at different oil concentrations (1, 2.5, and 5 %) (n=10, in triplicate for each group), and exposure to oil impregnated paper in different concentrations (10, 25, and 50 µg/cm <sup>2</sup> ) (n=20, in triplicate for each group). .....	71

<b>Table 6.</b> Lethal concentration of <i>M. fragrans</i> essential oil against adult <i>M. domestica</i> and <i>C. albiceps</i> , after a period 30 minutes using methods involving topical applications and exposure to impregnated paper. ....	72
--	----

## MANUSCRITO 2

<b>Tabela 1.</b> Características físico-químicas das formulações contendo nanoemulsões associadas aos óleos essenciais de <i>L. dentata</i> (NE-OL) e de <i>M. fragrans</i> (NE-OM) após a preparação (n=3, média ± desvio padrão) .....	80
<b>Tabela 2.</b> Composição química do óleo essencial de <i>L. dentata in natura</i> (livre) e do obtido a partir das nanoestruturas (NE).....	81
<b>Tabela 3.</b> Composição química do óleo essencial de <i>M. fragrans in natura</i> (livre) e do obtido a partir das nanoestruturas (NE) .....	82
<b>Tabela 4.</b> Estabilidade do óleo essencial de <i>L. dentata</i> livre e do obtido a partir das nanoemulsões contendo o óleo no período de 0-90 dias.....	88
<b>Tabela 5.</b> Estabilidade do óleo essencial de <i>M. fragrans</i> livre e obtido das nanoemulsões contendo o óleo no período de 0-90 dias. ....	89

## MANUSCRITO 3

<b>Tabela 1.</b> Efeito do óleo essencial de <i>M. fragrans</i> livre (OM) e nanoemulsionado (NE-OM), do tratamento controle negativo (CN; NEB) e positivo (CP) após a imersão de larvas de terceiro estágio de <i>C. albiceps</i> e <i>M. domestica</i> , (n=10, em triplicata para cada grupo; média ± DP). ....	101
<b>Tabela 2.</b> Efeito do óleo essencial de <i>L. dentata</i> livre (OL) e nanoemulsionado (NE-OL), dos tratamentos controle negativo (CN; NEB) e positivo (CP) após imersão em larvas em terceiro estágio de <i>C. albiceps</i> e <i>M. domestica</i> (n = 10, em triplicata para cada grupo; média ± DP).....	102
<b>Tabela 3.</b> Efeito das nanoemulsões do óleo essencial de <i>L. dentata</i> (NE-OL), do óleo livre (OL) e tratamentos controle negativo (CN) e positivo (PC) em adultos <i>M. domestica</i> e <i>C. albiceps</i> a partir do modelo experimental de aplicação tópica (n = 10, em triplicata para cada grupo; média±DP). ....	104
<b>Tabela 4.</b> Efeito das nanoemulsões do óleo essencial de <i>M. fragrans</i> (NE-OM), do óleo livre (OM) e tratamentos controle negativo (CN, NEB) e positivo (PC) em adultos <i>M. domestica</i> e <i>C. albiceps</i> a partir do modelo experimental de aplicação tópica (n = 10, em triplicata para cada grupo; média±DP). ....	105
<b>Tabela 5.</b> Efeito das nanoemulsões do óleo essencial de <i>L. dentata</i> (NE-OL), óleo livre (OL) e tratamentos controle negativo (CN) e positivo (PC) em adultos <i>M. domestica</i> e <i>C. albiceps</i> a partir do modelo experimental de exposição ao papel impregnado (n=20, em triplicata para cada grupo; média±DP).....	107
<b>Tabela 6.</b> Efeito das nanoemulsões do óleo essencial de <i>M. fragrans</i> (NE-OM), do óleo livre (OM) e tratamentos controle negativo (CN, NEB) e positivo (CP) em adultos <i>M. domestica</i> e <i>C. albiceps</i> a partir do modelo experimental de exposição ao papel impregnado (n=20, em triplicata para cada grupo; média±DP). ....	109

## SUMÁRIO

	<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	25
1.1.1	Dípteros de natureza sinantrópica com importância para a saúde pública .....	25
1.1.2	Inseticidas sintéticos .....	27
1.1.3	Atividade inseticida a partir de produtos naturais.....	30
1.1.3.1	Óleo essencial de <i>Lavandula dentata</i> .....	34
1.1.3.2	Óleo essencial de <i>Myristica fragrans</i> .....	34
1.1.4	O uso de óleos essenciais e algumas considerações .....	35
1.1.5	Sistemas nanoestruturados contendo óleos essenciais.....	35
1.2	OBJETIVOS .....	38
1.2.1	Objetivo geral.....	38
1.2.2	Objetivos específicos .....	38
<b>2</b>	<b>ARTIGO – <i>In vitro</i> SAFETY AND EFFICACY OF LAVENDER ESSENTIAL OIL (LAMIALES: LAMIACEAE) AS AN INSECTICIDE AGAINST HOUSEFLIES (DIPTERA: MUSCIDAE) AND BLOWFLIES (DIPTERA: CALLIPHORIDAE).....</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>MANUSCRITO 1 – INSECTICIDAL EFFECT OF NUTMEG ESSENTIAL OIL (MAGNOLIALES: MYRISTICACEAE) AGAINST HOUSEFLIES (DIPTERA: MUSCIDAE) AND BLOWFLIES (DIPTERA: CALLIPHORIDAE).....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>MANUSCRITO 2 – DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DE ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES DE <i>Myristica fragrans</i> E DE <i>Lavandula dentata</i>.....</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>MANUSCRITO 3 – NANOEMULSÕES DE OLEOS ESSENCIAIS DE <i>Lavandula dentata</i> E DE <i>Myristica fragrans</i>: ATIVIDADE INSETICIDA EM <i>Musca domestica</i> E <i>Chrysomya albiceps</i> .....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>129</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>131</b>



## **APRESENTAÇÃO**

Esta tese apresenta os resultados e a metodologia sob forma de artigo e manuscritos.

O item discussão representa a interpretação e análise dos resultados alcançados dos manuscritos e artigo que compõem esse trabalho.

Na parte final, são apresentadas as conclusões gerais do trabalho, considerando os manuscritos e artigo.

Nas referências menciona-se somente as citações utilizadas nos itens introdução, fundamentação teórica e discussão geral.





## 1 INTRODUÇÃO

Algumas classes de invertebrados possuem importância relevante para os seres humanos e animais, pois, muitas vezes, apresentam-se como vetores patogênicos de várias doenças (POHLIT et al., 2011). Dentre essas classes, destacam-se os insetos da ordem Diptera, subordem Muscomorpha, constituída, dentre outras, pelas famílias Muscidae e Calliphoridae (ADENUSI; ADEWOGA, 2013). O controle desses dípteros tem sido realizado a partir do uso de inseticidas sintéticos. No entanto, há um crescente interesse em alternativas para o controle dessas pragas a partir de produtos naturais e biodegradáveis a fim de minimizar os riscos ambientais e à saúde humana além da tentativa de contornar a resistência que alguns insetos têm apresentado (POHLIT et al., 2011; REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

*Musca domestica* e *Chrysomya albiceps* são consideradas pelo *Food and Drug Administration (FDA)* como importantes contribuidores para a disseminação de várias doenças infecciosas transmitidas por alimentos, como, por exemplo, a cólera, shigelose e salmonelose. A transmissão de patógenos a partir desses insetos pode acontecer, inicialmente, pela conservação desses agentes no canal alimentar e/ou devido à contaminação nas partes externas no corpo do inseto durante a alimentação, defecação ou regurgitação (SASAKI; KOBAYASHI; AGUI, 2000). Devido a esse comportamento, os dípteros possuem um grande potencial na contaminação de alimentos, principalmente, propagando doenças entre os animais e o homem.

Tendo em vista o relevante potencial das moscas de natureza sinantrópica das famílias Muscidae e Calliphoridae em transmitirem vários agentes patogênicos, se faz necessário um controle eficaz desses insetos, principalmente, em localidades com falta de educação em saúde e saneamento adequado. Para o controle desses dípteros são realizadas aplicações de pesticidas químicos como, por exemplo, organofosforados e piretróides (MALIK; SINGH; SATYA, 2007). No entanto, tem sido relatado o desenvolvimento de resistência pela *M. domestica* aos agentes sintéticos organofosforados como o diazinon (MCNAIR, 2015).

Além da resistência desenvolvida pelos insetos, outra preocupação em relação aos inseticidas químicos é o seu uso excessivo que pode implicar na saúde e também no aumento da poluição ambiental. Diante das implicações provocadas pelos pesticidas sintéticos, estudos têm sido realizados com plantas visando substituir esses agentes (ISMAN; MIRESMAILLI; MACHIAL, 2011; UMPIÉRREZ et al., 2011).

Muitos óleos essenciais têm sido amplamente estudados como agentes promissores para o controle de vários insetos por apresentarem atividade inseticida com propriedades larvicidas, pupicidas e adulticidas, outros atuam como repelentes, fumigantes ou dissuadores e outros

como reguladores no crescimento dos insetos. Essas propriedades têm sido relacionadas devido à presença de compostos químicos bioativos que representam os complexos mono e sesquiterpenos sendo os monoterpenos o grupo predominante com ação inseticida (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

Nesse sentido, há a necessidade crescente de pesquisas com substâncias alternativas como os óleos essenciais para a determinação do efeito inseticida desses compostos no controle de insetos e o estudo da sua composição química. *Lavandula dentata* tem sido utilizada principalmente na medicina popular devido ao seu efeito antidiabético (PATEL et al., 2012), anti-hipertensivo (JOUAD et al., 2001), antiprotozoário (AL-MUSAYEIB et al., 2012) e antimicrobiano (IMELOUANE et al., 2009). Para outras espécies pertencentes ao mesmo gênero (*Lavandula*), foram reportadas atividades inseticida (*Lavandula angustifolia*) à *M. domestica* (BOSLY, 2013), acaricida (CAVANAGH; WILKINSON, 2002) e efeito antialimentar para alguns insetos (GONZALEZ-COLOMA et al., 2006).

Outro óleo essencial com potencial para o controle de insetos é o óleo obtido a partir de *Myristica fragrans* que tem sido estudado para o controle de vários artrópodes, como a sua aplicação em *Koenigii Dysdercus*, uma praga do algodoeiro (SURYAKALA; RAM; JYOTHI, 2007). A toxicidade por contato do óleo em larvas de *Lymantria dispar* foi reportada ocasionando uma atividade antialimentar (KOSTIC et al., 2013). O efeito larvicida também foi analisado contra as larvas de *Aedes aegypti* L. e de *Anopheles stephensi* (Liston) (SENTHILKUMAR; VARMA; GURUSUBRAMAMANIAN, 2009; DIAS; MORAES, 2014). Outros estudos relataram que o óleo essencial de *M. fragrans* tem atividade inseticida e de repelência em *Lasioderma serricorne* (DU et al., 2014).

Esses produtos naturais de acordo com as condições ambientais, podem apresentar instabilidade, muitas vezes, devido a sua volatilidade e como podem ter odor intenso, podem causar desconforto quando aplicados na forma pura. Portanto, proteger os óleos essenciais e controlar a sua liberação a partir de uma formulação nanoestruturada é interessante para manter sua estabilidade e tornar seu uso mais eficiente (MARTINS et al., 2014).

A nanotecnologia tem sido utilizada como uma forma eficaz para promover o controle de liberação e proteção dos óleos essenciais (DONSI; FERRARI, 2016). Entre os diferentes tipos de sistemas nanoestruturados, inclui-se as nanoemulsões que são dispersões coloidais de gotículas de óleo em água com diâmetros médios entre 20 e 200 nm (SOLANS et al., 2005). Devido a capacidade desses sistemas serem constituídos por compostos lipofílicos, a incorporação de óleos essenciais pode melhorar várias características desses compostos como, por exemplo, a solubilidade em água contribuindo para a sua aplicação em vários produtos

(DONSI; FERRARI, 2016). Além disso, podem minimizar o impacto dos óleos essenciais sobre as suas propriedades organolépticas ou o risco de toxicidade, diminuindo a concentração necessária para a sua atividade (MOGHIMI et al., 2016).

A partir disso, considerando que o controle de insetos utilizando óleos essenciais é promissor devido às suas propriedades inseticidas além da possibilidade desses compostos serem associados aos sistemas nanoestruturados visando maior atividade e proteção frente a várias condições ambientais desses compostos naturais, esse trabalho teve por objetivo desenvolver formulações contendo nanoemulsões associadas aos óleos essenciais isolados a partir das partes aéreas de *L. dentata* e sementes de *M. fragrans* e avaliar os óleos essenciais puros e associados à nanoemulsões em diferentes fases de desenvolvimento de *M. domestica* e *C. albiceps*.

## 1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.1.1 Dípteros de natureza sinantrópica com importância para a saúde pública

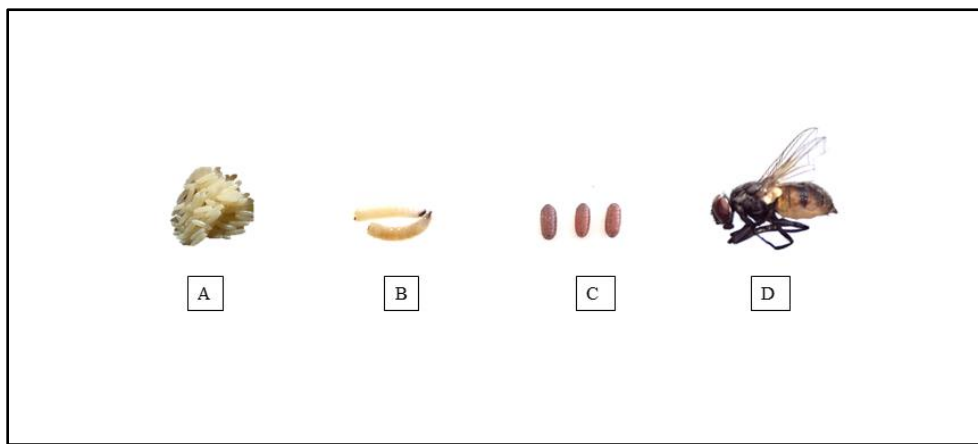
Diferentes espécies de moscas podem ser portadoras naturais de aproximadamente 100 microrganismos patogênicos, os quais estão associados com mais de 65 doenças dos seres humanos e animais. Essa capacidade em transmitir patógenos está intimamente relacionada com adaptação desses insetos em viverem associados em habitações humanas o que caracteriza a sua natureza sinantrópica (CHAIWONG et al., 2014). A transmissão de patógenos acontece, muitas vezes, quando os adultos se alimentam de esterco animal, lixo, excrementos humanos e outros materiais em decomposição e se deslocam entre estes habitats e alimentos, superfícies de preparação de alimentos e pousam em humanos (NGOEN-KLAN et al., 2011).

Dentre as espécies de natureza sinantrópica, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) conhecida, popularmente, como mosca doméstica, mosca comum ou ainda mosca caseira é considerada uma das principais pragas domésticas, pois está associada com a vetorização de vários patógenos de importância médica e veterinária (KUMAR et al., 2014). Entre os principais patógenos transmitidos por esse inseto estão: *Salmonella typhi* (Febre tifoide), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose), *Vibrio cholerae* (cólera), patógenos do gênero *Shigella* (disenteria bacilar) e agentes relacionados com a diarreia infantil (COHEN et al., 1991; FOTEDAR, 2001) dentre outras.

A mosca adulta de *M. domestica* é a fase principal responsável na disseminação das doenças transmitidas por essa espécie. Durante essa fase, as moscas se alimentam, geralmente,

de substratos orgânicos em decomposição onde elas realizam, na maioria das vezes, a oviposição. De acordo com as condições ambientais, a fêmea pode depositar cerca de 700 ovos em toda sua vida. Além disso, o desenvolvimento de ovos até adultos pode ocorrer durante um período de 10 dias em lugares mais quentes ou 40 dias em ambientes mais frios. Durante esse período ocorre ainda a fase larval constituída por 3 estágios e a de pupação de onde emergem os adultos (Figura 1) (PASTOR et al., 2011).

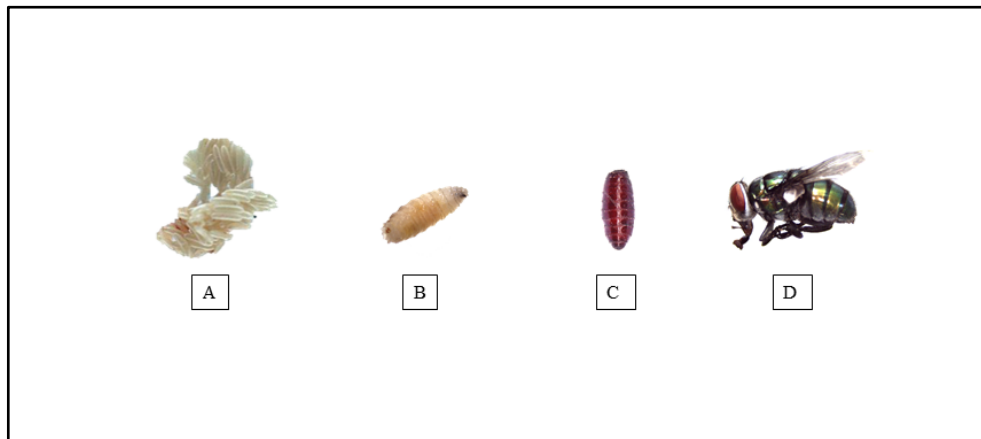
Figura 1 – Ilustração do ciclo das fases de *Musca domestica*: ovos (A), larva (B), pupas (C) e adulto (D).



Fonte: autoria própria

Outra espécie de mosca preocupante para a saúde humana e animal é a *C. albiceps* (Figura 2), pois é considerada vetor de patógenos, como enterovírus, enterobactérias, cistos e oocistos de protozoários, ovos de helmintos e conídios de fungos (ADENUSI; ADEWOGA, 2013). A varejeira, como é conhecida popularmente, pode sobreviver em diferentes habitats, uma vez que elas são ecologicamente diversificadas (CHAIWONG et al., 2014). Em virtude disso, as larvas desse díptero são capazes de se desenvolver em vários substratos com decomposição de matéria orgânica, fezes e lixos (NGOEN-KLAN et al., 2011). Esses dípteros também têm sido estudados em cadáveres para estimar o tempo de pós-morte em investigações forenses (RABÊLO et al., 2011; SUKONTASON et al., 2007).

Figura 2 – Ilustração do ciclo das fases de *Chrysomya albiceps*: ovos (A), larva (B), pupa (C) e adulto (D).



Fonte: autoria própria

Além de ser um importante vetor de patógenos, *C. albiceps* é também uma espécie de mosca causadora de miíase secundária humana e animal devido às suas características de reprodução, geralmente, do tipo facultativa. A forma adulta dessa espécie deposita seus ovos em alimentos, feridas necróticas, pele ou mucosa de tecidos em decomposição onde as larvas se desenvolvem. Essas infestações são frequentemente elevadas em pacientes que vivem em precárias condições socioeconômicas e com pouca higiene pessoal (FERNANDES; PIMENTA; FERNANDES, 2009).

Tendo em vista o relevante potencial das moscas de natureza sinantrópica das famílias como Muscidae e Calliphoridae em transmitir vários agentes patogênicos, se faz necessário um controle eficaz, principalmente, em condições subdesenvolvidas, falta de educação em saúde e saneamento inadequado. Para o controle desses dípteros são utilizadas algumas medidas como a implantação adequada de saneamento, e, principalmente, a realização de aplicações de pesticidas químicos como, por exemplo, organofosforados e piretróides (MALIK; SINGH; SATYA, 2007).

### 1.1.2 Inseticidas sintéticos

A necessidade de melhorar a produtividade de muitas culturas devido ao crescimento e as mudanças que ocorreram nos hábitos alimentares da população tem intensificado o interesse em controlar muitos insetos que são considerados pragas (WYCKHUYS et al., 2013). Além disso, muitos desses insetos são importantes vetores de doenças infecciosas e representam um sério risco a nível mundial para a saúde pública. A maioria das medidas de controle desses

vetores é realizada a partir da utilização de inseticidas químicos (ANADÓN; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA; MARTÍNEZ, 2009).

Inseticidas sintéticos estão restritos ao uso de agentes químicos e entre esses agentes, os piretróides são os mais utilizados e constituem 30% dos inseticidas utilizados mundialmente (SPARKS, 2013). Originalmente, foram desenvolvidos a partir das piretrinas naturais e atualmente, a permetrina, cipermetrina e a deltametrina são os principais compostos dessa classe (WOLANSKY; HARRILL, 2008). Com relação ao seu mecanismo de ação, os piretróides agem no sistema nervoso central, especificamente modificando os canais de sódio dos axônios o que resulta na inibição da transmissão elétrica do impulso nervoso. Com isso, ocorre uma maior produção de choques elétricos a partir das células nervosas induzidas provocando a paralisia total do inseto (SODERLUND, 2010).

Além dos piretróides, os inseticidas organofosforados são amplamente utilizados para o controle de insetos (MOSHIRI; DARCHINI-MARAGHEH; BALALI-MOOD, 2012). O mecanismo de ação desses compostos é múltiplo e pode acontecer a partir da inibição da enzima acetilcolinesterase, sobre o metabolismo de lipídios, hidrocarbonetos, proteínas, além de induzirem o estresse oxidativo (KARAMI-MOHAJERI; NIKFAR; ABDOLLAHI, 2014). Esses agentes químicos correspondem a aproximadamente 13 % dos inseticidas utilizados, sendo o malathion, parathion e o diazinon os mais comercializados (SPARKS, 2013).

Outras classes de inseticidas sintéticos são a dos carbamatos, que representam 6 % dos inseticidas que são comercializados (KING; AARON 2015). O efeito desses agentes consiste na inibição da enzima acetilcolinesterase o que permite acumular a acetilcolina nas sinapses e ocorrer superestimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos (ROSMAN et al., 2009).

A segurança dos agentes sintéticos para o controle de insetos tem sido intensamente analisada mundialmente em relação aos animais e ao homem, uma vez que, esses agentes não são seletivos e podem agir em diversos organismos que apresentam o mesmo sítio alvo como, por exemplo, a enzima acetilcolinesterase (KARAMI-MOHAJERI; NIKFAR; ABDOLLAHI, 2014). A partir disso, inúmeros efeitos são possíveis a partir do uso de inseticidas sintéticos entre eles, diferenças comportamentais, alterações neurofisiológicas e processos físico-químicos, biológicos e fisiológicos (RAO et al., 2005).

A associação da exposição aos inseticidas com incidência de doenças crônicas foi evidenciada (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013), assim como a indução de danos genéticos (BOLOGNESI, 2003), modificações epigenéticas (RAKITSKY; KOBLYAKOV; TURUSOV, 2000), desregulação endócrina (COCCO, 2002), disfunção mitocondrial (KARAMI-MOHAJERI; NIKFAR; ABDOLLAHI, 2014) e estresse oxidativo. Olgun e Misra (2006)

observaram a indução do estresse oxidativo em timócitos de ratos após exposição aos inseticidas deltametrina e malathion por gerarem tanto superóxido como peróxido de hidrogênio. Essas substâncias são consideradas espécies reativas de oxigênio e contribuem para a citotoxicidade a partir da potencialidade de promover a peroxidação lipídica celular, mitocondrial e nas membranas nucleares, bem como a degradação de proteínas citosólicas além de danos ao DNA (RAHAL et al., 2014).

A maioria dos inseticidas, incluindo organofosfatos e carbamatos, quando são fumigados, são neurotóxicos. Essa toxicidade foi evidenciada a partir de estudos epidemiológicos que correlacionaram a aplicação desses agentes químicos com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas tais como a doença de Parkinson e doença de Alzheimer. A causa dessa neurotoxicidade tem sido determinada, principalmente, a partir de processos de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial que desempenham, em geral, o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas (THANY; REYNIER; LENAERS, 2013).

Outro fator que deve ser considerado relacionado a toxicidade dos agentes controladores de insetos são as suas características físico-químicas como a lipofilicidade. Rodrigues e colaboradores (2003), explicaram a alta sensibilidade da absorção da deltametrina (AD) devido à sua característica lipofílica mesmo em menor concentração por peixes em comparação com os mamíferos. Essa afinidade contribuiu potencialmente para a AD ser penetrada através da epiderme e posteriormente distribuída podendo chegar à circulação sanguínea (DE ASSIS et al., 2009).

As características físico-químicas também influenciam no tempo de meia-vida dos inseticidas sintéticos quando são expostos ao meio ambiente. Isso, porque a meia vida do produto pode variar de dias a anos dependendo da química, textura e presença de microrganismos no solo (PRUSTY et al., 2015). Esse período, muitas vezes, é determinante para provocar a contaminação de ambientes aquáticos, terrestres e toxicidade nos animais que neles vivem (WIJNGAARDEN; BROCK; BRINK, 2005).

Devido a isso, é preocupante a disseminação indiscriminada e ampla de pesticidas. Nesse sentido, têm sido estudadas alternativas para o controle de insetos como moscas a partir de produtos naturais e biodegradáveis a fim de minimizar os riscos ambientais, além de contornar a resistência que as moscas têm desenvolvido aos inseticidas químicos (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

### 1.1.3 Atividade inseticida a partir de produtos naturais

A utilização de produtos naturais como matéria-prima para a produção de substâncias com atividade biológica, especialmente os fármacos, tem sido extensamente relatada ao longo dos anos (PIETROVSKI, 2004). Esses produtos representam fontes de diversidades moleculares na descoberta de drogas. Ainda, permanece urgente a necessidade de identificação de novos quimiotipos para o desenvolvimento de produtos para serem utilizados em muitas áreas terapêuticas e no controle de pragas (ZHANG et al., 2007).

Nesse sentido, os produtos naturais têm contribuído fortemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas a partir de seus metabólitos secundários. Estes são conhecidos por atuarem de forma direta ou indireta no organismo podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros) (CALIXTO; OTUK; SANTOS, 2003).

Os óleos essenciais são produtos naturais e têm sido amplamente estudados devido às suas diversas e relevantes atividades biológicas. A sua composição química, muitas vezes, com mais de 100 compostos terpênicos, é responsável pelo seu amplo espectro de atividade biocida em que se destacam a antibacteriana, acaricida, antifúngica, anti-viral e inseticida sendo. Desta forma, são considerados como potentes candidatos naturais para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de pragas (LUCIA et al., 2009). A ausência de fitotoxicidade e sistematicidade bem como a biodegradabilidade dos produtos naturais caracterizam-os como potentes agentes no manejo de pragas (XUAN et al., 2006).

Muitos óleos essenciais que apresentam atividade inseticida possuem propriedades larvicidas (ZUHARAH et al., 2015), pupicidas e adulticidas (KUMAR et al., 2012); outros atuam como repelentes (ISLAM et al., 2009), fumigantes (CHOI et al., 2006), dissuadores (ISMAN et al., 2006) ou atuam como reguladores no crescimento dos insetos (NATHAN; HISHAM; JAYAKUMAR, 2008). Essas propriedades têm sido relacionadas devido à presença de compostos químicos bioativos.

Quanto à composição química responsável para a atividade inseticida de várias plantas foram identificados mais de 120 compostos químicos (Tabela 1) sendo distribuídos em 11 grupos. Nestes, incluem-se os terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos com atividade inseticida significativa representando 37, 30 e 20% respectivamente dos compostos verificados para tal atividade.



Tabela 1 – Terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos que apresentam atividade inseticida

<b>Terpenóides</b>	<b>Alcalóides</b>	<b>Compostos fenólicos</b>
p-Amirine	5-hidroxitriptamina	Anetol
p-Asarone	Aconine	Anisaldehyde
$\alpha$ -Pineno	Aconitina	Asarinin
$\alpha$ -Terpineno	Ajaconine	Bergapten
Ácido $\alpha$ -Terpineol	Anabasina	Canelline
$\alpha$ -Tuiona	Anonaine	Deguelin
Absinthin	Benzaconine	Elemicin
10-Hidroxi-asimicine	Aphylline	Deoxipodophillotoxin
Apiole	Cafeína	Isopimpineline
24-metileno-3,22-dihidroxico- lesterol	Aristolochine	Desoxipodofilotoxina
24 Metilenecicloarta-3-ol	Atropina	Dillapiol
Ascaridol	Camptotecina	Mammein
Asimicine	Castanospermina	Metil-chavicol
Azadiractina	Celabenzine	Metil-cinamato
Bisabolangelone	Cevadine	Plumbagina
Carvone	Efedrina	Podofilotoxina
Zingiberene	Delcosine	Sesamin
Cinerins	Donaxerine	Rotenone
Óxido de cariofileno	Delsoline	Psoraleno
Cinamaldeído	Galantamina	Rutina
Estragol	Graminha	Xantotoxina
Eugenol	Hipaconitine	
Gedunine	Jervine	
Geranilo-linalol	Mesaconitine	
Glaucarubinone	Miosmine	
Helenalin	Napelline	
Himachalol	Neoline	
Iridomirmecina	Neopelline	
l –Carvone	Nicotina	
Limoneno	Fisostigmina	
Óxido de Limoneno	Piperina	
Menthone	Solamargina	
Myristicina	Solasonina	
Neriifolin	Esparteína	
Ocimeno	Tomatina	
Picrotoxina	Wilfordine	
Óxido-Piperitenone	Wilforine	
Pulegone		
Quassin		
Terpineol		
Timol		
Zingiberene		

Fonte: BOULOGNE, 2012 (dados obtidos a partir de uma pesquisa bibliográfica de 1965 referências).

Devido à complexidade de compostos químicos dos produtos naturais, os óleos essenciais desenvolvem múltiplos mecanismos de ação de modo que os insetos são afetados por compostos diferentes contribuindo para o potencial da redução da probabilidade de desenvolvimento de resistência a esses compostos (COPPING; DUKE, 2007). Com isso, a gama de alvos celulares para estas substâncias é ampla e abrangem vias metabólicas, macromoléculas (por exemplo, proteínas ou ácidos nucleicos), organelas (por exemplo, membranas biológicas ou núcleos) que afetam o funcionamento dos organismos inteiros quando elas se ligam a receptores prejudicando a função do sistema nervoso (GERWICK; SPARKS, 2014).

Sabendo-se que a classe dos terpenos é a principal responsável pelo desenvolvimento da atividade inseticida de muitas plantas (Tabela 1), muitos estudos têm sido realizados para elucidar o mecanismo de ação dessas substâncias. Esses compostos são facilmente encontrados em óleos essenciais e se dividem quimicamente em complexos mono (C 10) e sesquiterpenos (C 15) sendo os monoterpenóides o grupo predominante com ação inseticida (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

De acordo com a literatura, os monoterpenóides podem atuar em vários alvos nos insetos, especialmente no sistema nervoso, incluindo o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) acoplado aos canais de cloreto, receptores de octopamina, tiramina, acetilcolina esterase, receptores nicotínicos de acetilcolina (RnACh), canais de sódio, e possivelmente outros alvos. O timol, linalol, mentol, cânfora, carvona, borneol e outros monoterpenóides são descritos como para ser moduladores alostéricos positivos dos receptores GABA em mamíferos (RAYMOND-DELPECH et al., 2005). Em um estudo com o timol em *Drosophila melanogaster* foi descrita a ação moduladora positiva sobre o receptor GABA homomérico RDLac (MILLAR; DENHOLM, 2007).

Outro mecanismo de ação realizado por muitos monoterpenóides está relacionado aos receptores acoplados à proteína G em insetos, incluindo receptores de octopamina e receptores de tiramina que são considerados importantes candidatos alvos para o efeito inseticida. Os terpenóides  $\alpha$ -terpineol, carvacrol, pulegona, eugenol demonstraram atividade de ligação com receptores octopamina da *Periplaneta americana* (barata americana). Esses compostos foram avaliados como antagonistas ou agonistas dos receptores de octopamina (TOMIZAWA; YAMAMOTO, 1992). Compostos como p-cimeno, timol, carvona, terpineol e carvacrol foram identificados como ligantes aos receptores de tiramina de insetos pelo aumento (timol) ou diminuição (p-cimeno, carvona, terpineol e carvacrol) dos níveis do nucleotídeo AMPc (3'5' - adenosina – monofosfato – cíclico) e alteraram os níveis de cálcio intracelular em células S2

que expressam os receptores de tiramina em *D. melanogaster* (TOMIZAWA; LEE; CASIDA, 2000).

Em adição a estes dois receptores como possíveis alvos, alguns estudos sugerem que os monoterpenóides atuam também sobre outros receptores ou enzimas no sistema nervoso. Alguns terpenos, entre eles, a pulegona foi caracterizada como inibidor da acetilcolinesterase (ACE) em eritrócitos bovinos (TOMIZAWA; CASIDA, 2005). Borneol e cânfora também foram demonstrados serem inibidores não competitivos dos RnAC (receptores nicotínico da acetilcolina) de mamíferos (em células adrenais bovina) por aumentarem os níveis de cálcio e de sódio intracelular induzidos por um agonista de RnAC, iodeto de 1,1-dimetil-4-fenilpiperazínio (CASIDA; TOMIZAWA, 2008; MACPHERSON et al., 2006).

A partir disso, é possível identificar a potencialidade inseticida que muitos óleos essenciais podem possuir a partir da sua composição sendo os monoterpênicos, os principais compostos com atividade inseticida. Dessa forma, os óleos essenciais têm sido explorados como potentes inseticidas para o controle de dípteros como moscas (AHBIRAMI et al., 2014; POHLIT et al., 2011).

Alguns óleos essenciais são utilizados para o tratamento e controle de moscas, tais como o óleo de citronela (CÁRCAMO et al., 2007) e o óleo de neem (DELEITO; BORJA, 2008; PISSINATI et al., 2009). Em um ensaio fumigante, adultos de *M. domestica* foram tratados com o óleo essencial de *Citrus sinensis* ( $LC_{50} = 3,9 \text{ mg/dm}^3$ ) que tem o (4R) (+) – limoneno como componente principal (95,1%) e verificou-se uma mortalidade total dos insetos em menos de 15 minutos. Esse estudo sugere que os compostos foram absorvidos pelas moscas, pois foram identificados metabólitos dos mesmos nesses insetos (ROSSI; PALACIOS, 2013).

Em outro estudo, Kumar e colaboradores (2012) avaliaram a atividade inseticida de dois óleos essenciais de menta (*Mentha piperita* e *Mentha citrata*) em larvas e pupas de *M. domestica* a partir de dois bioensaios diferentes: toxicidade por contato e por fumigação. De acordo com os resultados, foi obtido um maior efeito larvicida e pupicida com o uso da *M. piperita* no ensaio de toxicidade por contato, bem como no ensaio de fumigação. Segundo os autores devido aos óleos essenciais possuírem diferentes constituintes químicos, produzem uma capacidade de absorção diferente o que desencadeia uma eficácia variada. Em larvas de lepidópteros, os terpenos podem bloquear os efeitos estimulatórios da glicose e do inositol em células quimiorreceptoras localizadas nas partes bucais (RATTAN, 2010), enquanto os monoterpenóides têm sido relatados com neurotoxicidade em mosca doméstica (COATS KARR; DREWES, 1991).

A partir das diversas propriedades apresentadas pelos produtos naturais, há um crescente interesse de avaliação de óleos essenciais como inseticidas (AHBIRAMI et al., 2014; BÉJAR et al., 2006; POHLIT et al., 2011).

#### 1.1.3.1 Óleo essencial de *Lavandula dentata*

*Lavandula dentata* tem sido utilizada principalmente na medicina popular devido aos seus efeitos antidiabético (PATEL et al., 2012), anti-hipertensivo (JOUAD et al., 2001), antiprotozoário (AL-MUSAYEIB et al., 2012) e antimicrobiano (IMELOUANE et al., 2009) que essa planta apresenta. O óleo essencial dessa espécie é amplamente estudado para a determinação da sua composição química e também para a descoberta dos seus compostos bioativos. Para outras espécies pertencentes ao mesmo gênero (Lamiaceae), foi reportado atividades de inseticidas (*Lavandula angustifolia*) em *M. domestica* (BOSLY, 2013), acaricida (CAVANAGH; WILKINSON, 2002) e efeito antialimentar para alguns insetos (GONZALEZ-COLOMA et al., 2006).

#### 1.1.3.2 Óleo essencial de *Myristica fragrans*

*M. fragrans* é uma planta aromática pertencente à família Myristicaceae e é popularmente conhecida pela medicina tradicional devido à suas atividades biológicas relacionadas com os sistemas digestório e nervoso (EL-ALFY et al., 2009). A principal estrutura explorada, cientificamente, dessa planta são as sementes (nóz-moscada) sendo composta pelos óleos voláteis, óleos fixos, mucilagens e amido (BARCELOUX, 2009).

Entre os 21 compostos investigados no óleo essencial foram identificados os monoterpenos sabineno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, sendo constituído, também, de compostos oxigenados como a miristicina, o eugenol de metila, terpinen-4-ol, safrol e  $\alpha$ -terpineol (DUPUY et al., 2013). Devido à presença desses vários compostos, muitos estudos *in vivo* e *in vitro* foram desenvolvidos, sendo reportadas ações farmacológicas como a analgésica, antibacteriana, antioxidante (GUPTA et al., 2013), anti-inflamatória (OLAJIDE et al., 1999), anti-tumoral (THUONG et al., 2014), hipoglicemiante (OSEN; IDOWU, 2014) e anticonvulsivante (WAHAB et al., 2009).

Além dessas atividades, o óleo essencial tem sido estudado para o controle de várias pragas. A sua aplicação tópica desenvolveu ação inseticida frente à *Koenigii Dysdercus*, uma praga do algodoeiro (SURYAKALA; RAM; JYOTHI, 2007). A toxicidade por contato do óleo

em larvas de *Lymantria dispar* foi reportada assim para uma atividade antialimentar (KOSTIC et al., 2013). O efeito larvicida também foi analisado e larvas de *Aedes aegypti* L. (DIAS; MORAES, 2014) assim como em *Anopheles stephensi* (Liston) (SENTHILKUMAR; VAMAR GURUSUBRAMANIAN, 2009). Outros estudos relataram que o óleo essencial de *M. fragrans* tem atividade inseticida e de repelência no controle de *Lasioderma serricornis* (DU et al., 2014).

#### **1.1.4 O uso de óleos essenciais e algumas considerações**

Apesar do interesse crescente dos óleos essenciais no controle de dípteros, vários fatores devem ser considerados e que podem interferir na sua aplicação e atividade biológica. A baixa solubilidade em água desses compostos limita, muitas vezes, a viabilidade na produção industrial, uma vez que são compostos hidrofóbicos o que contribui também para o elevado coeficiente de partição óleo/água (PRAKASH et al., 2015). Essa limitação reduz a incorporação dos óleos em produtos hidrofílicos que possuem fácil aceitabilidade pela população como, por exemplo, cosméticos. O odor intenso característico dos óleos voláteis, também influencia nas propriedades organolépticas dos produtos que os contêm e pode contribuir negativamente para a aceitação do produto final (DIMA; DIMA, 2015).

Além disso, devido a sua natureza volátil, a susceptibilidade para perdas durante a aplicação ou armazenamento desses produtos é maior. Essa degradação é facilitada de acordo com a composição química, pois compostos hidrogenados como mono e sesquiterpenos são mais oxidáveis. A presença de luz e de temperaturas mais altas reduz também a estabilidade dos óleos devido à oxidação (ISMAN, 2000).

Essas limitações podem ser superadas a partir da incorporação dos óleos essenciais em estruturas formadas a partir de tensoativos em escala manométrica. Essas estruturas são capazes de contornar problemas de instabilidade além de melhorar, muitas vezes, a atividade biológica dos óleos essenciais nanoestruturados controlando a sua liberação e aumentando a sua funcionalidade devido ao seu tamanho reduzido (menor que 1  $\mu\text{m}$ ) (ACEVEDO-FANI et al., 2017).

#### **1.1.5 Sistemas nanoestruturados contendo óleos essenciais**

Sistemas nanoestruturados consistem em uma tecnologia que tem sido muito explorada em diversas áreas da ciência, entre elas, a farmacêutica, a agrícola e a alimentar (LAI et al., 2007). Esses sistemas por caracterizarem-se como estruturas submicrométricas permitem

aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade de várias substâncias ativas (ZHAO et al., 2015). Além disso, a partir da possibilidade de incorporação de substâncias lipofílicas, a nanotecnologia pode aumentar a dispensabilidade desses compostos em água bem como a sua estabilidade às diversas condições ambientais (DONSI; FERRARI, 2016).

Os principais carreadores nanoestruturados estudados são os lipossomas, as nanopartículas lipídicas, as nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas) e as nanoemulsões. Os lipossomas representam a primeira geração de carreadores coloidais, sendo constituídos principalmente por fosfolipídios organizados em bicamadas concêntricas em torno de um núcleo aquoso central. A grande vantagem dessas estruturas é o fato de possuírem um caráter anfifílico, permitindo o encapsulamento de substâncias hidrofílicas no núcleo aquoso ou substâncias hidrofóbicas nas membranas de fosfolipídios. Algumas desvantagens são observadas na utilização desses sistemas, como a baixa eficiência de encapsulamento, alto custo de produção e baixa estabilidade físico-química (EDWARDS; BAEUMNER, 2006; JOSHI, MÜLLER, 2008). As nanopartículas lipídicas podem ser divididas em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Essas partículas são constituídas principalmente por lipídios, sendo que as NLS são constituídas por lipídeos sólidos sob temperatura ambiente e corporal e os CLN possuem um núcleo constituído por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos, resultando em uma estrutura mais desorganizada e capaz de promover um maior encapsulamento dos fármacos, quando comparado com as NLS. Como vantagens, essas estruturas apresentam a baixa toxicidade, facilidade de transposição de escala, ausência de solventes orgânicos na preparação e boa compatibilidade (MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000; PARDEIKE; HOMMOS; MÜLLER, 2009). Estas estruturas apresentam desvantagens, como o baixo encapsulamento de fármacos, presença simultânea de outras estruturas coloidais (micelas, lipossomas, nanocristais do fármaco) e instabilidade física durante o armazenamento (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

As nanopartículas poliméricas são partículas sólidas coloidais divididas em nanoesferas e nanocápsulas. As nanocápsulas poliméricas são vesículas carreadoras de fármacos, compostas por um núcleo geralmente oleoso envolto por uma parede polimérica, podendo o fármaco estar adsorvido a esta parede e/ou dissolvido no núcleo. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica (sem a presença do óleo) e o fármaco pode estar retido ou adsorvido na matriz (SHAFFAZICK et al., 2003; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010). Estas nanopartículas apresentam vantagens relacionadas à estabilidade *in vivo* e também durante o armazenamento, quando comparadas aos lipossomas. Foram desenvolvidas nanocápsulas de núcleo lipídico com um núcleo hidrofóbico (triglicerídeos de cadeia média) contendo uma substância lipídica sólida

(monoestearato de sorbitano), o que remete a um núcleo mais viscoso que as nanocápsulas convencionais, podendo aumentar a estabilidade físico-química (JAGER et al., 2009).

As nanoemulsões são emulsões submicrométricas, em geral com diâmetros entre 20 e 200 nm, formadas por gotículas de óleo estabilizadas por tensoativos, dispersas na fase aquosa (BOUCHEMAL et al., 2004). São principalmente empregadas para o encapsulamento de substâncias lipofílicas, como por exemplo, o propionato de clobetasol (FONTANA et al., 2009) e o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (FLORES et al., 2011), podendo também encapsular moléculas hidrofílicas, como os oligonucleotídeos (MARTINI et al., 2007).

Os métodos utilizados para a formação das nanoemulsões classificam-se em técnicas com alta ou baixa energia para a emulsificação (SOLANS et al., 2005). A utilização da homogeneização e a sonicação com alta pressão são técnicas utilizadas com alta energia capazes de provocar forças intensas favorecendo a quebra e conseqüentemente a redução do tamanho para a formação das pequenas gotículas (TADROS; IZQUIERDO; SOLANS, 2004). A emulsificação espontânea é um método desenvolvido com baixa energia para a formação das nanogotas que depende do controle das propriedades físico-químicas do sistema (CHANG; McCLEMENTS; 2015).

O uso de tensoativos para a formação das nanogotículas contribui para a estabilidade termodinâmica desses sistemas, a partir da redução da tensão interfacial, que viabiliza a formação e a manutenção das pequenas gotas (RAO; McCLEMENTS, 2012). Essa estabilidade de sistemas coloidais nanométricos foi avaliada por Flores e colaboradores (2011) e verificaram que nas nanoemulsões contendo o óleo essencial de *Melaleuca aternifolia*, as análises de tamanho e índice de polidispersão não apresentaram alterações durante o período de estocagem (6 meses).

Devido ao fato das nanoemulsões serem sistemas possíveis para a encapsulação de substâncias lipofílicas, muitos estudos foram desenvolvidos para a formação desses sistemas contendo óleos essenciais promovendo, muitas vezes, uma melhor atividade biológica e o aumento da estabilidade (GUTIÉRREZ et al., 2008). O tamanho nanométrico das gotículas contendo os óleos essenciais podem interagir eficientemente com membranas de microrganismos. Salvia-Trujillo e colaboradores (2015) observaram a melhor atividade antimicrobiana de nanoemulsões contendo óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* ou *Eugenia caryophyllata* frente à *Escherichia coli* quando comparadas a emulsões convencionais.

O tamanho de gotícula reduzido de nanoemulsões também favorece a maior atividade inseticida de óleos essenciais em estudos larvicidas (OLIVEIRA et al., 2017). Esse efeito foi verificado por Sugumar e colaboradores (2014) quando compararam formulações de tamanho

nanométrico e convencionais de óleo de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) em larvas de *Culex quinquefasciatus* e verificaram que as nanoemulsões foram mais eficazes, provocando danos na membrana peritrófica e nas células epiteliais do intestino médio e também a redução das esterases (acetilcolinesterase).

As formulações nanoemulsionadas são capazes de controlar a liberação de substâncias ativas quando incorporados a esses sistemas. Esse controle de liberação é desejável a fim de contornar problemas de toxicidade para organismos não alvos e também evitando altas concentrações de substâncias ativas como, por exemplo, pesticidas. Esse controle da entrega do óleo de neem, um biopesticida, foi obtido a partir do desenvolvimento de nanoemulsões revestidas com polímeros biodegradáveis (JEROBIN et al., 2012).

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Verificar a atividade inseticida dos óleos essenciais de *M. fragrans* e de *L. dentata* livres e associados à nanoemulsões em *M. domestica* e *C. albiceps*.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Extrair os óleos essenciais a partir das sementes de *M. fragrans* e partes aéreas de *L. dentata* por hidrodestilação utilizando-se o aparelho de Clevenger;
- Identificar e quantificar os principais compostos presentes nos óleos essenciais por cromatografia gasosa;
- Desenvolver nanoemulsões associadas aos óleos essenciais de *L. dentata* e *M. fragrans* empregando-se o método de emulsificação sob alta agitação;
- Avaliar as características físico-químicas das nanoemulsões contendo os óleos essenciais, no que se refere ao tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e composição dos óleos essenciais;
- Estudar a estabilidade das formulações em diferentes condições de acondicionamento por um período de 90 dias quanto a: tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e determinação dos compostos presentes nos óleos essenciais;



- Avaliar os efeitos dos óleos associados às nanoestruturas e livres em relação a atividade larvicida por imersão;
- Avaliar os efeitos dos óleos associados às nanoestruturas e livres em relação a atividade adulticida por exposição ao papel impregnado e aplicação tópica;
- Determinar o mecanismo de ação dos óleos essenciais livres e nanoemulsionados a partir da avaliação do efeito inibitório na atividade da acetilcolinesterase em larvas e adultos de *M. domestica* e *C. albiceps*.



## 2 ARTIGO – *In vitro* SAFETY AND EFFICACY OF LAVENDER ESSENTIAL OIL (LAMIALES: LAMIACEAE) AS AN INSECTICIDE AGAINST HOUSEFLIES (DIPTERA: MUSCIDAE) AND BLOWFLIES (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

Artigo publicado em *Journal of Economic Entomology*

*Journal of Economic Entomology*, 111(4), 2018, 1974–1982

doi: 10.1093/jee/toy145

Advance Access Publication Date: 26 May 2018

Research Article

Veterinary Entomology

OXFORD

### *In vitro* Safety and Efficacy of Lavender Essential Oil (Lamiales: Lamiaceae) as an Insecticide Against Houseflies (Diptera: Muscidae) and Blowflies (Diptera: Calliphoridae)

Luciana F. Cossetin,<sup>1,5</sup> Eduarda Maria T. Santi,<sup>1</sup> Jocelene F. Cossetin,<sup>2</sup> Janaina B. Dillmann,<sup>1</sup> Matheus D. Baldissera,<sup>1</sup> Quelen I. Garlet,<sup>2</sup> Tiago P. de Souza,<sup>1</sup> Luiza Loebens,<sup>3</sup> Berta M. Heinzmann,<sup>2</sup> Michel M. Machado,<sup>4</sup> and Silvia G. Monteiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Microbiology and Parasitology Department, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, <sup>2</sup>Pharmacology Graduate Program, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, <sup>3</sup>Ecology and Evolution Department, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, <sup>4</sup>Pharmacy Department, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Brazil, and <sup>5</sup>Corresponding author, e-mail: lucianacossetin@gmail.com

Subject Editor: Jeb Owen

Received 8 February 2018; Editorial decision 3 May 2018

#### Abstract

Essential oils are considered an alternative for replacement of conventional insecticides that have provoked an increasing number of resistant species and damages to health. The objective of this work was to investigate the insecticidal activity of *Lavandula dentata* L. (Lamiales: Lamiaceae) oil against the species *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) and *Chrysomya albiceps* Wiedemann (Diptera: Calliphoridae). Extraction of the essential oil from the aerial parts of the plant was carried out using hydro-distillation. Its principal compounds (1,8-cineol, camphor, and linalool oxide) were identified. Insecticidal activity was determined by evaluating an adulticidal effect using topical application methods and exposure to impregnated paper; larvicidal effect was determined using immersion method. The essential oil presented toxicity in *M. domestica* and *C. albiceps* adults; the lethal concentration values (LC<sub>50</sub>) in the superficial application method were respectively 3.13 ± 0.64 and 1.39 ± 0.19% live weight (l/v). Toxicity was also found in the oil impregnated paper exposure test; the LC<sub>50</sub> results for *M. domestica* and *C. albiceps* were respectively 4.15 ± 0.64 and 5.14 ± 0.81%. Larvicidal effect was observed on third stage *M. domestica* larvae when exposed to an oil concentration of 2.5% (m/v). In addition, the oil was evaluated for cytotoxicity, mutagenicity, and genotoxicity in human cells, and the *in vitro* safety of this oil in human cells was verified. Thus, *L. dentata* oil presented insecticidal activity in *M. domestica* and *C. albiceps* and can be used as an alternative for control of these dipterans.

**Key words:** Adulticide, Lavandula, fly, natural product

Certain classes of invertebrates are relevant or important to humans and animals. They often are pathogenic vectors for various diseases (Pohlit et al. 2011). Among such classes, insects from the Muscidae and Calliphoridae families are significant (Adenusi and Adewoga 2013).

The Food and Drug Administration (FDA) considers *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) and *Chrysomya albiceps* Wiedemann (Diptera: Calliphoridae) to be important vectors that spread various infectious foodborne diseases, such as *Vibrio cholerae*, and bacteria of the genera *Shigella*, and *Salmonella*. The transmission of pathogens from these insects may occur through passing of such agents to the alimentary tract or contamination of external parts of the body by the insect during feeding, or through defecation, or regurgitation (Sasaki et al. 2000). Accordingly, these dipterans present great potential to contaminate food and spread disease.

Control of dipterans is generally achieved through the use of synthetic insecticides. However, there is a growing interest in using alternative natural and biodegradable products to control these pests and minimize their environmental and human health risks, in addition to overcoming the resistance which use of chemical agents have brought (Pohlit et al. 2011, Regnault-Roger et al. 2012).

Many essential oils present larvicidal (Ahhirami et al. 2014), pupicidal, and adulticidal properties against insects (Kumar et al. 2012); others act as insect repellents (Islam et al. 2009), fumigants (Choi et al. 2006), deterrents (Isman et al. 2006), and growth regulators (Nathan et al. 2008). Certain essential oils have already been used to treat and control flies, for example; citronella and neem oil (Deleito and Borja 2008, Pissinati et al. 2009). These properties have been associated with the presence of bioactive chemical compounds

that present mono (C 10) and sesquiterpene (C 15) complexes. Monoterpenes are the predominant group having insecticidal action (Regnault-Roger et al. 2012).

Due to its anti-diabetic (Patel et al. 2012), antihypertensive (Jouad et al. 2001), antiprotozoal (Al-Musayeb et al. 2012) and antimicrobial effects (Imelouane et al. 2009), *Lavandula dentata* L. (Lamiales: Lamiaceae) is used in folk medicines. Essential oil from this species is widely studied; from determining its chemical composition to discovering its bioactive compounds. For other species such as *Lavandula angustifolia* (from the same *Lavandula* genus), there are reports of insecticidal activity against *M. domestica* (Bosly 2013), acaricide activity (Cavanagh and Wilkinson 2002), and for its anti-feeding effects in certain insects (Gonzalez-Coloma et al. 2006).

Considering that flies transmit many pathogens and that various essential oils are capable of controlling insects, the objective of this study was to evaluate the susceptibility of *M. domestica* and *Chrysomya albiceps* (in their larval and adult stages) to essential oil extracted from aerial parts of *L. dentata*; and also to investigate the in vitro safety of this oil in human cells.

## Material and Methods

### Extraction and Analysis of Essential Oil

The essential oil was obtained from aerial parts of *L. dentata* collected in Santa Maria, RS (Brazil). A Clevenger apparatus was used for extraction for 3 h (European Commission 2007). The oil was stored in amber flasks at a temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$  until the analyses and bioassays were performed. The analyses were performed using gas chromatography coupled to mass spectrometry. The GC-MS TIC analyses were performed using an Agilent 7890A chromatograph equipped with a 5975C series selective mass detector on a DB-5MS fused silica capillary column (5% phenylmethylsiloxane,  $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$ , film thickness:  $0.25\text{ }\mu\text{m}$ ) and electron impact ionization at  $70\text{ eV}$ . Analysis parameters being: split inlet 1:50; carrier gas: He ( $1\text{ ml/min}$ ); temperature of the injector and detector:  $250^{\circ}\text{C}$ , analysis program:  $40^{\circ}\text{C}$  (Ti) for 4 min,  $40\text{--}320^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C/min}$ . The components were identified based on the retention index (IR), and determined using a calibration curve from a homologous series of *n*-alkanes (C8–C40) injected under the same chromatographic sample conditions in spectra fragmentation models, being both compared with the literature data and the equipment spectra (NIST/EPA/NIH 2008, Adams 2009). GC-DIC analysis was performed on an Agilent 7890A gas chromatograph equipped with a flame ionization detector using a DB-5 fused silica capillary column (5% phenylmethylsiloxane,  $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$ , film thickness:  $0.25\text{ }\mu\text{m}$ ). Carrier gas: He with a flow of  $1\text{ ml/min}$ ; split inlet 1:50; temperature of the injector and detector:  $300^{\circ}\text{C}$ . Quantification of the constituents was performed by integrating the peak areas and expressed as a relative percentage of the total.

### Laboratory Colony Maintenance

The flies were kept in cubical entomological cages ( $30 \times 30 \times 30\text{ cm}$ ) at  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  under a light/dark cycle (12 h) and at 70% relative humidity. Feeding of the adult flies consisted of honey placed in a Petri dish and water ad libitum. For oviposition, a paste of commercial lamb meat on a plastic plate was used. After hatching, the larvae were fed with meat ration, and kept under the same environmental conditions as the adult flies. After this phase the larvae transformed into pupae, and finally into adult males and females.

### Larvicide Bioassay

Testing was performed according to a methodology established by Bosly (2013) with modifications. Larvicidal activity evaluations were carried out for the flies under study using larval immersion in previously tested concentrations of *L. dentata* oil respectively 0.25, 0.5, 1, 2.5% and 5, 10, 20, 30% for *M. domestica* and *C. albiceps*, with a positive control (Diazinon 2%). Larvae in stage L3 ( $n = 20$ ) were placed in a Falcon tube and treated with 5 ml of each solution for 5 min. To evaluate the effects of the surfactant used, one group was tested with 1% Tween solution alone. The tests were performed in triplicate at ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  and an RH of  $65 \pm 5\%$ ). For final efficacy calculations, the Abbott (1925) formula was used:

$$\% \text{ Efficacy} = \left[ \frac{\text{No. of adults in the control group} - \text{No. of adults in the treated group}}{\text{No. of adults in the control group}} \right] \times 100$$

### Adulticide Bioassays

#### Topical Application Method

Topical toxicity was assessed according to Sukontason et al. (2004) with some modifications. In the assay, three replicates with 10 flies per replicate were performed, and evaluated after treatment at predetermined times for 2 h at: 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min. Dilutions of the oil in acetone were applied (1.0, 2.5, 5.0, and 10%; w/v),  $3\text{ }\mu\text{l}$  each, to the thoraxes of adult flies (at 5–7 d post-hatch), which had been previously anesthetized at a temperature of  $-18^{\circ}\text{C}$  for 165 s. To analyze whether the solvent itself presented any insecticidal effect, applications of acetone were also carried out at the same volume. For comparative purposes, the organophosphate Diazinon (1%) was used as a positive control.

#### Method for Impregnated Paper Exposure Test

This bioassay was performed according to a methodology proposed by Sheppard and Hinkle (1987) with modifications. Essential oil was diluted in acetone (P.a.) to obtain the following concentrations: 10, 25, 50, and  $100\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$ . The differing concentrations were impregnated on filter paper and left to the open-air environment for 15 min for solvent evaporation. Subsequently, each paper containing impregnated oil was placed in a Petri dish containing 20 adult flies (5–7 d post hatch) which were exposed for a period of 2 h. In the negative control and positive control group, acetone and Diazinon (each at 1%), were evaluated. All of the groups were evaluated in triplicate and analyzed at predetermined times (15, 30, 45, 60, 90 and 120 min) after treatment.

### Essential Oil Cytotoxicity and Mutagenicity Evaluation

#### Preparation of Lymphocyte Cell Culture

Lymphocyte cultures were prepared using 0.5 ml of human venous blood, (collected from volunteers), in accordance with ethics committee protocol (CEP/UFMS 23081.012330/2006–94), and immediately transferred to the culture medium which contained 10 ml of RPMI 1640, supplemented with 10% fetal bovine serum, and 1% streptomycin/penicillin (Santos-Montagner et al. 2010). The cells were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  environment for 72 h.



### Cell Culture Treatments

To evaluate the genotoxic profiles, leukocyte cultures were divided into five groups. The groups were: negative control (phosphate buffer pH 7.2); positive control (Hydrogen peroxide 100 µg/ml); and the three other groups containing *L. dentata* essential oil at concentrations of 1 µg/ml, 10 µg/ml, and 100 µg/ml.

### Cytotoxic and Genotoxic Evaluation of Oil in Human Leukocyte Cultures

The genotoxic parameters were evaluated using proliferation analysis, cell viability, the comet test, and micronuclei frequency.

### Proliferation and Cell Viability

Proliferation parameters and cell viability were evaluated using loss of membrane integrity and the Tripam Blue method (Burow et al. 1998). The sample, at concentrations of 1, 10, and 100 g/mL was combined with Turk's solution (3% acetic acid plus 1% plus gentian violet in water), and placed in a Neubauer chamber after 3 min. Differentiation between living and dead cells was observed through dead cell blue staining. A total of 300 cells were counted, and the total leukocyte number (proliferation) was quantified by counting in a Neubauer chamber.

### Comet Test

The comet test assessment followed the method proposed by Singh (1995). After incubation, the samples (leukocytes) were mixed with agarose and placed on a pre-coated microscope slide with low melting point agarose. The slides were immersed in a lysis solution, and electrophoresis was performed (20 min at 300 mA, and 25 V). The slides were then neutralized and left to dry overnight at room temperature. The dried slides were then rehydrated and fixed for 10 min. Drying, staining, and the use of stop solution were then performed. The slides were analyzed under blind conditions. DNA damage was determined using a DNA damage index (DI). Damage was calculated from cells in different damage classes (completely intact: 100 cells × 0; maximally damaged - 100 cells × 4).

### Micronuclei Formation

Micronucleus analysis was performed according to the technique described by Schmid (1975). The lymphocytes were placed in a conical tube with saline solution and centrifuged at 1000 rpm for 5 min. One milliliter of this leukocyte solution was spread on one slide (two per sample), and left to dry at room temperature. The slides were then stained and analyzed under optical microscope and immersion lens (Fenech 2000).

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed assuming  $P < 0.05$  as a criterion of significance. All variables were previously tested for variance normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity (Bartlett test), and were logarithmic if necessary. Analysis of variance to verify differences in adulticidal effect between treatments was used for each of the methods: Topical application; Impregnated paper; to verify the difference in larvicidal effect between treatments; and to verify the difference between the numbers of adults emerging between treatments. The results of the toxicity evaluation trials were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by post hoc Bonferroni for multiple comparison tests. Data were expressed as mean ± SD.

## Results

### Essential Oil Extraction and Analysis

The *L. dentata* essential oil obtained by extraction from aerial parts was analyzed using gas chromatography coupled to mass spectrometry, and 21 compounds were identified (Table 1).

### Larvicidal Assay

The larval activity of *L. dentata* essential oil was evaluated using the immersion method for third instar larvae of both *M. domestica* and *C. albiceps*. For evaluation of this activity, the following oil concentrations were prepared: 0.5, 1.0, 2.5, and 5% (l/w) for *M. domestica*; and 5, 10, 20, and 30% (l/w) for *C. albiceps*. After a 5-min exposure, the larvae were monitored for mortality, pupal development,

**Table 1.** Chemical composition of *Lavandula dentata* essential oil

Peak	Rt (min)	Constituents	%	RI calc
1	5.09	Tricyclene	2.55	929
2	5.44	Alpha-pinene	0.84	943
3	5.60	Camphene	0.07	950.1
4	6.14	Beta-pinene	4.43	972
5	6.59	Myrcene	0.25	990.7
6	7.55	Gama-terpinene	0.26	1023
7	7.73	1,8 cineole	41.67	1029
8	9.49	Linalool oxide	16.46	1085
9	9.93	Linalool	1.82	1100
10	10.31	1,3,8-para-menthatriene	5.82	1111.5
11	11.18	Pinocarveol	1.11	1137
12	11.34	Camphor	17.36	1141.9
13	11.98	Lavandulol	0.30	1160.5
14	12.06	Pinocarvone	0.82	1163.1
15	12.16	Borneol	0.47	1166
16	12.52	Terpin-4-ol	0.28	1176.4
17	12.98	Alpha-terpinol	0.87	1189.9
18	13.11	Myrteneal	0.76	1194.0
19	13.17	Verbanol	0.52	1195.5
20	20.61	Cis-alpha bergamotene	0.15	1415.4
21	21.20	Alpha-trans bergamotene	0.15	1433.4

%, relative percentage; Rt, retention time; RI calc, calculated Kovats retention index.

and adult emergence. The larvicidal effect between treatments was observed in *M. domestica* ( $F = 333.4$ ;  $P < 0.0001$ ) (Table 2). This effect was higher for concentrations of 1 and 2.5% as compared to the other treatments ( $P < 0.05$ ), being that the 2.5% oil treatment presented a greater larvicidal effect as compared to the 1% concentration ( $P < 0.001$ ). Thus, the 1.0 and 2.5% treatments presented the lowest number of emerged adults ( $F = 55.59$ ,  $P < 0.0001$ ).

The larvicidal test performed with *C. albiceps* caused little variation for the different treatments in the number of emerged adults ( $F = 2.88$ ,  $P > 0.05$ ) (Table 3). However, the number of emerged adults was significantly higher for the 5% oil treatment when compared to the 30% treatment ( $F = 10.35$ ,  $P < 0.01$ ).

### Adulticidal Assay

In tests conducted on direct or superficial contact in *M. domestica*, there was a significant difference among treatments in relation to adulticidal action ( $F = 28.83$ ,  $P < 0.0001$ ). In relation to the positive control Diazinon, the negative control and treatments of 1.0 and 2.5% (l/w) presented low adulticidal action. Similar to positive control (Diazinon), the 5.0 and 10% treatments presented potent adulticidal action, ( $P > 0.05$ ). In the same assay, results obtained for *C. albiceps* presented adulticidal action ( $F = 16.44$ ,  $P < 0.0001$ ). In relation to Diazinon and the treatments of 2.5, 5.0, and 10%, the negative control and 1% (D) treatments presented low adulticidal activity ( $P < 0.005$ ). However, similar to the positive control, the 5 and 10% oil treatments presented insecticidal action ( $P > 0.05$ ) (Table 4).

In addition to the topical application test for evaluation of adulticidal effect, exposure to impregnated paper (containing oil) was also carried out. In this study, the objective is to verify fumigant effect. Activity in *M. domestica* ( $F = 18.27$ ,  $P < 0.0001$ ) was observed in the treatments. The negative control and the 10  $\mu\text{g cm}^{-2}$  treatments did not show adulticidal effect ( $P < 0.005$ ), while Diazinon and the treatments of 25, 50, and 100  $\mu\text{g cm}^{-2}$  presented adulticidal action,

with no difference between the treatments ( $P > 0.05$ ). The effects on *C. albiceps* through exposure to *L. dentata* oil impregnated filter paper were similar to those observed in *M. domestica*, though the adulticidal action ( $F = 21.79$ ,  $P < 0.0001$ ) was achieved between treatments. For the negative control and the 10  $\mu\text{g cm}^{-2}$  treatment insecticidal action was not observed ( $P < 0.005$ ). Treatments of 25, 50, and 100  $\mu\text{g cm}^{-2}$  demonstrated adulticidal action comparable to Diazinon ( $P > 0.05$ ) (Table 5).

From the evaluations carried out for *M. domestica* and *C. albiceps*, it was also possible to determine the toxicological values of lavender oil; defined from  $\text{LC}_{50}$  (%; l/w), which represents the lethal concentration necessary to obtain 50% mortality in the studied population (Table 6).

In addition to adulticidal activity, mortality rate in relation to time after exposure to a topical application, and exposure to the impregnated filter paper test, for up to 120 min were also evaluated (Figs. 1 and 2).

### Assessment of Genotoxicity, Mutagenesis, and Cytotoxicity

For evaluation of possible genotoxic effects, the in vitro comet assay was performed which identifies DNA damage/repair in proliferating and non-proliferating cells. At the concentrations used, the oil did not cause DNA damage when compared to the positive control (Fig. 3a). Another assay performed to evaluate genotoxicity and mutagenicity determined the micronuclei frequency, which may be indicative of chromosomal alterations when in contact with mutagenic or carcinogenic agents. According to the results shown in Fig. 3b, *L. dentata* essential oil when compared to the positive control did not cause breaks or chromosome losses. As to cytotoxicity, cell viability was evaluated and we observed that the oil in concentrations of 1 and 10  $\mu\text{g/ml}$  was significantly less cytotoxic than the positive control (hydrogen peroxide) (Fig. 3c).

**Table 2.** Effect of *L. dentata* essential oil (LO), Tween control (NC), and Diazinon (PC) on larvae, pupae and adult emergence after immersion of third stage *Musca domestica* larvae ( $n = 20$ , in triplicate for each group; mean  $\pm$  SD)

Treatments	Mortality of larvae	Number of pupae	Number of emerged adults
PC (A)	20 $\pm$ 0B,C,D,E	0 $\pm$ 0B,C,D,E	0 $\pm$ 0B,C,D
NC (B)	2.66 $\pm$ 0.57E,F	17.33 $\pm$ 0.57E,F	16 $\pm$ 1.73E,F
LO 0.25% (C)	0.66 $\pm$ 0.57E,F	19.67 $\pm$ 0.57E,F	13.66 $\pm$ 4.72E,F
LO 0.5% (D)	1.33 $\pm$ 0.57E,F	18.66 $\pm$ 0.57E,F	10 $\pm$ 1.73E,F
LO 1% (E)	11.33 $\pm$ 2.30A,B,C,D,F	8.66 $\pm$ 2.30A,B,C,D,F	0A,B,C,D
LO 2.5% (F)	19.66 $\pm$ 0.57B,C,D,E	0.33 $\pm$ 0.57A,B,C,D,E	0A,B,C,D

Post hoc analysis: significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments are indicated by letters. Each letter represents a treatment.

**Table 3.** Effect of *L. dentata* essential oil (LO), Tween control (NC), and Diazinon (PC) on larvae, pupae, and adult emergence after immersion of third instar *Chrysomya albiceps* larvae ( $n = 20$ , in triplicate for each group; mean  $\pm$  SD)

Treatments	Mortality of larvae	Number of pupae	Number of emerged adults
PC (A)	20 $\pm$ 0B,C,D,E,F	0 $\pm$ 0B,C,D,E,F	0 $\pm$ 0B,C,D,E,F
NC (B)	0.33 $\pm$ 0.57	18.33 $\pm$ 0.57	17.66 $\pm$ 4.04
LO 5% (C)	0.66 $\pm$ 0.57	19.33 $\pm$ 0.57	18.33 $\pm$ 0.57F
LO 10% (D)	0.00 $\pm$ 0.00	19.33 $\pm$ 0.57	18.00 $\pm$ 2.00
LO 20% (E)	1.33 $\pm$ 0.57	17.33 $\pm$ 2.08	14.66 $\pm$ 4.04
LO 30% (F)	3.00 $\pm$ 1.00	18.00 $\pm$ 1.73	10.33 $\pm$ 1.52C

Post hoc analysis: significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments are indicated by letters. Each letter represents a treatment.



**Table 4.** Adulticidal activity of *Lavandula dentata* essential oil (LO), Tween control (NC), and Diazinon (PC) in adult flies; *Musca domestica* and *Chrysomya albiceps*, experimental topical application model at different concentrations of oil (1.0, 2.5, 5.0, and 10%) ( $n = 10$ , in triplicate for each group; mean  $\pm$  SD)

Treatment	<i>Musca domestica</i> (n dead)	<i>Chrysomya albiceps</i> (n dead)
NC (A)	0.33 $\pm$ 0.58B,E,F	0.33 $\pm$ 0.58B,D,E,F
PC (B)	10.0 $\pm$ 0A,C,D	10 $\pm$ 0A,C,D
1% LO (C)	0.67 $\pm$ 0.58B,E,F	1.67 $\pm$ 1.53B,D,E,F
2.5% LO (D)	3.0 $\pm$ 1.0B,E,F	6.0 $\pm$ 2.0A,B,C,E,F
5% LO (E)	8.0 $\pm$ 2.0A,C,D	9.0 $\pm$ 0.0A,C,D
10% LO (F)	8.7 $\pm$ 1.15A,C,D	10 $\pm$ 0.0A,C,D

Post hoc analysis: significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments are indicated by letters. Each letter represents a treatment.

**Table 5.** Adulticidal activity of *Lavandula dentata* essential oil (LO), Tween control (NC), and Diazinon (PC) in adult flies, *Musca domestica* and *Chrysomya albiceps*, experimental model of exposure to paper impregnated in different concentrations of oil (10, 25, 50, and 100  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) ( $n = 20$ , in triplicate for each group; mean  $\pm$  SD)

Treatment	<i>Musca domestica</i> (n dead)	<i>Chrysomya albiceps</i> (n dead)
NC (A)	0B,D,E,F	0.33 $\pm$ 0.58B,D,E,F
PC (B)	20.0 $\pm$ 0A,C	20.0 $\pm$ 0A,C,D
10 $\mu\text{g cm}^{-2}$ LO (C)	0B,D,E,F	0.5 $\pm$ 0.7B,D,E,F
25 $\mu\text{g cm}^{-2}$ LO (D)	20.0 $\pm$ 0A,C	12.3 $\pm$ 2.52A,C,F
50 $\mu\text{g cm}^{-2}$ LO (E)	20.0 $\pm$ 0A,C	16.33 $\pm$ 2.82A,C
100 $\mu\text{g cm}^{-2}$ LO (F)	20.0 $\pm$ 0A,C	20.0 $\pm$ 0A,C,D

Post hoc analysis: significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments are indicated by letters. Each letter represents a treatment.

## Discussion

### Essential Oil Extraction and Analysis

The genus *Lavandula* belongs to the Lamiaceae family and comprises 28 species; among them *L. dentata* (Aprotosoae et al. 2017). From the phytochemical analyses of *L. dentata* essential oil carried out in the present study, it was possible to identify 21 compounds, being the majority (75%) terpenoids. Among the identified terpenoids, 1,8-cineole (also referred to as eucalyptol), camphor, and linalool oxide were quantified in higher concentrations, respectively 41.67, 17.36, and 16.46%. The results corroborate the chemical composition analyses performed by Touati et al. (2011), who obtained the same principal compounds in the same oil (from Tunisia), extracted using the same method.

### Larvicidal Test

The larvicidal activity of *L. dentata* essential oil was evaluated using the immersion method on third stage *M. domestica* and *C. albiceps* larvae. According to the results obtained for this common fly testing, we observed dose-dependent activity with significant *M. domestica* larvae mortality for oil at a concentration of 2.5% (l/w), other concentrations of the oil resulted in reduced pupation and adult development.

The larvae, having been immersed in oil and yet surviving were permitted to grow under controlled temperature and humidity in order to evaluate the adult emergence percentage. Treatment at a concentration of 1% did not result in total larvae mortality; however, it did interfere in pupae and adult development.

The results obtained in the *C. albiceps* larvicidal test indicated that the oil in the concentrations studied does not cause larval death.

**Table 6.** Lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of *Lavandula dentata* essential oil against adult *Musca domestica* and *Chrysomya albiceps*, after a period of 15 min using methods involving superficial application and exposure to impregnated paper

	<i>Musca domestica</i>	<i>Chrysomya albiceps</i>
Superficial application		
$LC_{50}$ (%; p/v)	3.13 $\pm$ 0.64A	1.39 $\pm$ 0.19A
Slope+SE	7.09 $\pm$ 5.96	2.45 $\pm$ 0.78
$\chi^2$	0.9485	0.9363
N	12	12
Impregnated paper		
$LC_{50}$ (%; p/v)	4.15 $\pm$ 0.64A	5.14 $\pm$ 0.81B
Slope+SE	8.04 $\pm$ 2.08	2.64 $\pm$ 1.16
$\chi^2$	0.9987	0.9152
N	12	12

Post hoc analysis: significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments are indicated by letters. Each letter represents a treatment.

However, when the oil was used at its highest concentration (30%) it prevented complete development of the insect. It was observed that the oil in low concentrations presents larvicidal effects in *M. domestica*, and for both species of insects interferes in the development of adults. In the larvicidal test, deficits in energy available to the larval defense system may explain the observations. In *Anopheles stephensi* L. (Diptera: Culicidae) larvae treated with *Myristica fragrans* H. (Magnoliales: Myristicaceae) extract, Senthilkumar et al. (2009) reported reductions in total proteins, carbohydrates, lipids, and certain amino acids suggesting that the oil treatment may have reduced the insects' energy reserves and consequently their development.

The total chemical composition may also have influenced the results obtained in the larvicidal effect evaluation, as was also observed in studies by Sukontason et al. (2004) where the principle constituent of the oil under study (1,8-cineole) presented respective  $LC_{50}$  values for *M. domestica* and *Chrysomya megacephala* F. (Diptera: Calliphoridae) of 101  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  and 642  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ . Yet the toxicity observed for the oil was higher than that of the isolated compound, since an  $LC_{50}$  of 9.561  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  was obtained for *M. domestica*. In other words, the oil effect was 10 times more toxic than that of the isolated compound, indicating that all of the constituents together presented greater larvicidal activity.

The larvicidal activity of *Lavandula* genus essential oils has been reported in the literature against differing insect species. For *Lavandula stoechas* L. (Lamiales: Lamiaceae) essential oil, toxic effect against *Anopheles labranchiae* and *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae) mosquito larvae has also been evidenced (Traboulsi et al. 2002, El Ouali Lalami et al. 2016). Another type of essential oil of the same genus, *L. angustifolia* M. (Lamiales: Lamiaceae), was also studied for the larvicidal activity using the immersion method against *Spodoptera littoralis* B. (Lepidoptera: Noctuidae) and *Aedes albopictus* S. (Diptera: Culicidae). According to the authors, the toxic effect observed is directly related to the volatile compounds concentration in the oil (Conti et al. 2010, Sajftrova et al. 2013).

Bosly (2013) evaluated the larvicidal activity of *L. angustifolia* essential oil as well, and has observed morphological deformities in *M. domestica* larvae, where the larvae were exposed to differing concentrations of the oil. According to the author, abnormalities may result from a lack of hormonal control that interferes with complete insect metamorphosis. Other authors (Khater and Khater 2009) suggest that the oil promotes a paralyzing effect on larval movement and prevents the larva from contracting to the pupal form, thus contributing to the deformities verified.

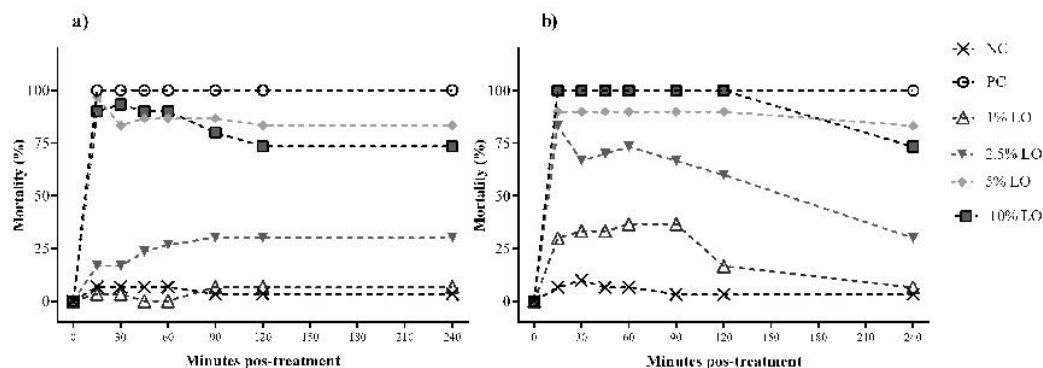


Fig. 1. Adulthood activity of *L. dentata* essential oil in adult flies, *Musca domestica* (a) and *Chrysomya albiceps* (b), in experimental topical application model with different concentrations of oil (1, 2.5, 5.0, and 10%) (NC: Negative control; PC: Positive control; LO: *Lavandula dentata* essential oil).

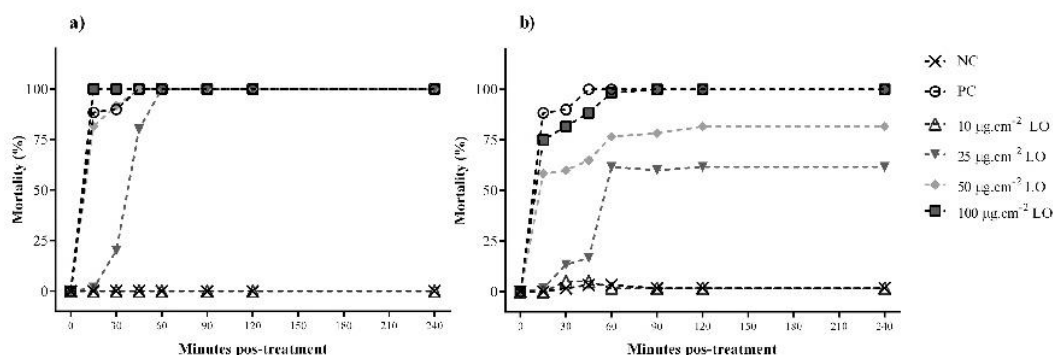


Fig. 2. Adulthood activity of *L. dentata* in adult *Musca domestica* (a) and *Chrysomya albiceps* (b) flies, in experimental model of exposure to filter paper impregnated with different concentrations of oil (10; 25, 50, and 100  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) (NC: Negative control; PC: Positive control; LO: *Lavandula dentata* essential oil).

In addition, certain studies suggest that the larvicidal effects inhibit larval enzyme detoxification systems. The principal mechanism of this effect is to reduce esterase and monooxygenase activity in the P450 cytochrome, responsible for compound metabolism upon ingestion. This was observed by Bouayad and collaborators (2013) using of methanolic plant extracts on *Plodia interpunctella* H. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae where changes in several physiological parameters (digestive and detoxification enzymes, and energy reserves) were verified.

#### Adulthood Assay

The topical application of the oil on adult flies caused significant dose-dependent mortality for both species. In relation to *M. domestica* the concentration of 1% was not lethal. However, the 5 and 10% concentrations were effective in the first evaluation ( $t = 15$  min), with a mortality rate of 100%. This concentration corresponds to 300  $\mu\text{g}$  of the oil applied on the thorax of the adult fly. For the *C. albiceps* species, 100% insect mortality was observed at concentrations of 5 and 10%. These results can be related to the composition of the oil, being 1,8-cineole (41.67%) the component most likely responsible for the observed activity. Sukontason et al. (2004) evaluated toxicity to *M. domestica* with the same method and verified that the toxic 1,8-cineole concentration was 118  $\mu\text{g/insect}$  for males and 177  $\mu\text{g/insect}$  for females. In addition, according to the authors, differences in toxicities between 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 an adulticidal effect.

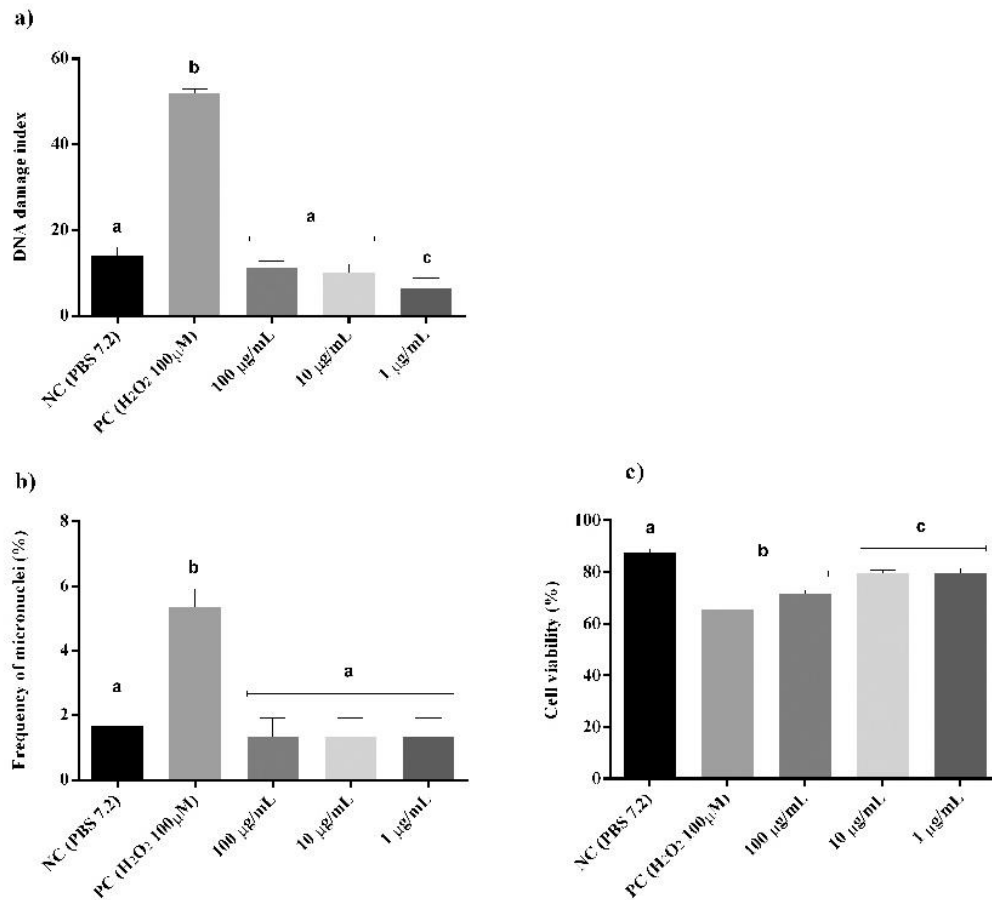
Other studies have determined the mechanism of action of (1,8) cineol against *M. domestica* through application to the prothorax and it was found that the effect is due to its binding the gamma-aminobutyric acid receptor (GABA) which prevents neurotransmitter inhibition, consequently causing the insect's death through neuromuscular hyper-excitation (Tong and Coats 2012). The insecticidal activity is also attributable to the inhibitory effect on acetylcholinesterase (Mills et al. 2004).

With the bioassay involving exposure to impregnated paper, it was verified that lavender oil has a dose-dependent fumigant and adulticidal effect on both species of dipterans. Concentrations of 5 and 10% ( $l/w$ ) caused 100% mortality in adult *M. domestica* flies, being 10% higher than the chemical pesticide Diazinon, used as a positive control. The 1% concentration was not lethal for either species. At the concentration of 2.5%, exposure time had an influence on mortality since at 60 min from application, mortality was 100%. With respect to *C. albiceps*, the concentration of 10% was adequate to produce the adulticidal activity in the first 60 min of evaluation.

From the insecticidal effects obtained through exposure of the flies to the oil, it was noted that concentration and time of exposure together provoke toxicity. In addition, essential oils are composed of a mixture of compounds that may act either alone or together in observed fumigant activity against several other types of insects (Palacios et al. 2009).

In a study of *M. domestica* fumigation, Rossi and Palacios (2015) evaluated the principle component of the oil (1,8-cineole) and verified absorption of the compound by the insect being both





**Fig. 3.** Effects of *Lavandula dentata* oil essential on human leukocytes; a: DNA damage index; b: frequency of micronuclei; c: cell viability percentage. NC: Negative Control; PC: Positive Control. Data expressed as mean  $\pm$  SD. Results were confirmed by experiments in triplicate. In the columns different letters represent statistically different results ( $P < 0.05$ ).

identified and quantified. Such absorption may be higher for some compound types because chemical structure influences vapor pressure (increases) on the insect, and lipophilicity favors penetration into the body, increasing bioavailability and contributing to a better fumigant action (Rice and Coats 1994a). Absorption occurs initially through volatilization or vaporization of the oil, markedly for certain compounds, with mono-terpenoids as the principle monocyclic saturated alcohols (Adorjan and Buchbauer 2010). The availability of the constituents in the dipteran body through its respiratory system is also likely (Yang et al. 2004).

The toxicological values of lavender oil were defined as  $LC_{50}$  (%/l/w). In the topical application test, upon first evaluation (15 min after the beginning of the experiment), lavender oil presented greater toxicity against *C. albiceps*, where it was  $1.39 \pm 0.19\%$  (l/w), in *M. domestica*, it was  $3.13 \pm 0.64\%$  (l/w). Such differing toxic effects may be the result of interspecies variables such as body size, pilosity, and defense mechanisms. They may also be the result of differing interactions between the constituents of the essential oil and the insect.

The  $LC_{50}$  value of lavender oil for *M. domestica* in the exposure to impregnated paper test was  $4.15 \pm 0.64\%$ ; similar to *C. albiceps*, which was  $5.14 \pm 0.81\%$ . However, the toxicity of the fumigant effect testing was lower for *M. domestica* and *C. albiceps* than the

topical application results. Rice and Coats (1994b) compared the topical application method with the fumigant effect method of 22 mono-terpenoids against *M. domestica* and also observed the difference between techniques. They obtained  $LC_{50}$  values of between 33 and 500  $\mu\text{g}/\text{insect}$  for the topical application method, and between 1.12 and 142  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  for the impregnated paper (fumigant) exposure method.

Contact toxicity has been reported for other types of essential oils, mainly for the common fly, and several studies have confirmed that mono-terpenoids are responsible for insecticidal activity (Regnault-Roger 2012). In addition, it has been reported that the insecticidal activity against different insect species for these compounds may occur either singly or from interactions between them (Gallardo et al. 2015).

The chemical structure of the compounds present in the essential oil contributes directly to the results, since certain organic functions such as alcohols and aldehydes are volatile. In the present study, *L. dentata* essential oil presents as a major compound 1,8-cineole; which when absorbed by the fly is a potent inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase, and results in general ataxia, lack of coordination in the neuromuscular system and eventual death.

### Assessment of Genotoxicity, Mutagenicity, and Cytotoxicity

In the current study, it was verified that *L. dentata* essential oil, in adequate concentrations, was safe in the tests carried out, since it did not cause significant cellular death or lysis in treatments containing the oil in concentrations of 1 and 10 µg/µl. However, a dose-dependent relationship was observed. This was also observed by Péres et al. (2009) in *Piper gaudichaudianum* K. (Piperales: Piperaceae) essential oil, where they found significant reduction of cell viability in concentrations higher than 5 µg/µl. This effect is commonly observed with the use of terpenoids, mainly the sesquiterpenes which are capable of altering membrane permeability due to their lipophilic characteristics.

In addition, at the concentrations studied, *L. dentata* essential oil was proven safe concerning possible genotoxic effects. This feature of not provoking genomic lesions may well be related to the constitution of the oil, since lavender oil has monoterpenes as its chief compounds. Various monoterpenes have no toxic effects on DNA. Thus, the constitution of *L. dentata* oil may itself explain the absence of mutagenicity in the human leukocyte cultures, since an increase in the number of micronuclei was not observed.

*L. dentata* oil was tested for control of *M. domestica* and *C. albiceps* and has been shown to be an adulticidal and larvicidal agent for both species, mainly for *M. domestica*, the common fly. With this, in *M. domestica*, the oil effects are not limited to one stage only. In addition, at concentrations 1 and 10 µg/µl, the oil did not cause significant changes in human cell cultures, thus presenting as safe. The essential oil of *L. dentata* represents an alternative for the control of both *M. domestica* and *C. albiceps* and the diseases associated with them. However, further studies are required in order to both develop formulations and obtain an applicable end product containing the oil.

### References Cited

- Adams, R. P. 2009. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, 4th ed. Carol Stream, EUA.
- Adenusi, A. A., and T. O. S. Adewoga. 2013. Human intestinal parasites in non-biting synanthropic flies in Ogun State, Nigeria. *Travel. Med. Infect. Dis.* 11: 181–189.
- Adorjan, B., and G. Buchbauer. 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour. Fragr. J.* 25: 407–426.
- Ahbirami, R., W. F. Zuharah, M. Thiagaletchumi, S. Subramaniam, and J. Sundarasekar. 2014. 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). *Insect. Sci.* 14: 1–6.
- Al-Musayeb, N. M., R. A. Mothana, A. Matheussen, P. Cos, and L. Maes. 2012. *In vitro* antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. *BMC Complement Altern. Med.* 12: 1–7.
- Aprotosoia, A. C., E. Gille, A. Trifan, V. S. Luca, and A. Miron. 2017. Essential oils of *Lavandula* genus: a systematic review of their chemistry. *Phytochem. Rev.* 16: 761–799.
- Bosly, A. H. 2013. Evaluation of insecticidal activities of *Mentha piperita* and *Lavandula angustifolia* essential oils against house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *J. Entomol. Nematol.* 5: 50–54.
- Bouayad, N., K. Rharrabe, N. N. Ghailani, R. Jbilou, P. Castañera, and F. Ortego. 2013. Insecticidal effects of Moroccan plant extracts on development, energy reserves and enzymatic activities of *Plodia interpunctella*. *Span. J. Agric.* 11: 189–198.
- Burrow, M. E., C. B. Weldon, Y. Tang, G. L. Navar, S. Krajewsky, J. C. Reed, T. G. Hammond, S. Clejan, and B. S. Beckman. 1998. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor A- induced apoptosis among mcf-7 breast cancer cell variants. *Cancer Res.* 58: 4940–4946.
- Cavanagh, H. M., and J. M. Wilkinson. 2002. Biological activities of lavender essential oil. *Phytother. Res.* 16: 301–308.
- Choi, W., B. Park, Y. Lee, D. Y. Jang, H. Y. Yoon, and S. Lee. 2006. Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. *Crop. Prot.* 25: 398–401.
- Conti, B., A. Canale, A. Bertoli, F. Gozzini, and L. Pistelli. 2010. Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 107: 1455–1461.
- Deleito, C. S. R., and G. E. M. Borja. 2008. Nim (*Azadirachta indica*): uma alternativa no controle de moscas na pecuária. *Pesqui. Vet. Bras.* 28: 293–298.
- El Ouali Lalami, A., F. EL-Akhal, S. Maniar, Y. Ez zoubi, and K. Taghouthi. 2016. Chemical constituents and larvicidal activity of essential oil of *Lavandula stoechas* (Lamiaceae) from Morocco against the malaria vector *Anopheles labranchiae* (Diptera: Culicidae). *Int. J. Pharmacognosy and Phytochem. Res.* 8: 505–511.
- Europe, C., and E. P. Commission. 2007. European Pharmacopea. 6th ed. Council Of Europe, Strassbourg, FR.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455: 81–95.
- Gallardo, A., M. I. Picollo, and G. Mougabure-Cueto. 2015. Lethal activity of individual and mixed monoterpenoids of geranium essential oil on *Musca domestica*. *Parasitol. Res.* 114: 1229–1232.
- González-Coloma, A., D. Martín-benito, N. Mohamed, M. C. García-vallejo, and A. C. Soria. 2006. Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. *Biochem. Syst. Ecol.* 34: 609–616.
- Imelouane, B., M. Elbachiri, M. Ankit, H. Benzaid, and K. Khedid. 2009. Physico-chemical compositions and antimicrobial activity of essential oil eastern Moroccan *Lavandula dentata*. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 113–118.
- Islam, R., K. R. Islam, S. M. Al-reza, Y. T. Jeong, C. H. Song, and M. Khalequzzaman. 2009. Chemical composition and insecticidal properties of *Cinnamomum aromaticum* (Nees) essential oil against the stored product beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). *J. Sci. Food Agric.* 89: 1241–1246.
- Isman, M. B., S. Miresmailli, and C. Machial. 2006. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochem. Rev.* 10: 197–204.
- Jouad, H., M. Haloui, H. Rhiouani, J. El Hilaly, and M. Eddouks. 2001. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J. Ethnopharmacol.* 77: 175–182.
- Khater, H. F., and D. F. Khater. 2009. The insecticidal activity of four medicinal plants against the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Int. J. Dermatol.* 48: 492–497.
- Kumar, P., S. Mishra, A. Malik, and S. Satya. 2012. Efficacy of *Mentha piperita* and *Mentha citrata* essential oils against housefly, *Musca domestica* L. *Ind. Crops Prod.* 39: 106–112.
- Mills, C., B. J. Cleary, J. F. Gilmer, and J. J. Walsh. 2004. Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. *J. Pharm. Pharmacol.* 56: 375–379.
- Nathan, S. S., A. Hisham, and G. Jayakumar. 2008. Larvicidal and growth inhibition of the malaria vector *Anopheles stephensi* by triterpenes from *Dysoxylum malabaricum* and *Dysoxylum beddomei*. *Fitoterapia.* 79: 106–111.
- (NIST/EPA/NIH) NIST/EPA/NIH mass spectral library and search/analysis program. 2008. John Wiley & Sons, Hoboken, USA.
- Palacios, S. M., A. Bertoni, Y. Rossi, R. Santander, and A. Urzúa. 2009. Efficacy of essential oils from edible plants as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. *Molecules.* 14: 1938–1947.
- Patel, D. K., R. Kumar, D. Laloo, and S. Hemalatha. 2012. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: an overview of its pharmacological aspects. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2: 239–250.
- Péres, V. F., D. J. Moura, A. R. Sperotto, F. C. Damasceno, E. B. Caramão, C. A. Zini, and J. Saffi. 2009. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic



- and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food Chem. Toxicol.* 47: 2389–2395.
- Pissinatti, A., A. Y. Mikami, and C. R. G. Marques. 2009. Use of neem and kaolin on nymphs of whitefly in cabbage. *RBA.* 4: 1487–1490.
- Pohlit, A. M., A. R. Rezende, E. L. L. Baldin, N. P. Lopes, and V. F. Andrade Neto. 2011. Plant extracts, isolated phytochemicals, and plant-derived agents which are lethal to arthropod vectors of human tropical diseases – A Review. *Planta. Med.* 77: 618–630.
- Regnault-Roger, C., C. Vincent, and J. T. Arnason. 2012. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annu. Rev. Entomol.* 57: 405–424.
- Rice, P., and J. Coats. 1994a. Insecticidal properties of monoterpenoid derivatives to the house fly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pest Manag. Sci.* 41: 195–202.
- Rice, P., and J. Coats. 1994b. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 85: 1172–1179.
- Rossi, Y. E., and S. M. Palacios. 2015. Fumigant toxicity of *Citrus sinensis* essential oil on *Musca domestica* L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor. *Acta. Trop.* 127: 33–37.
- Sajfrtova, M., H. Sovova, J. Karban, K. Rochova, R. Pavela, and M. Barnet. 2013. Effect of separation method on chemical composition and insecticidal activity of Lamiaceae isolates. *Ind. Crops Prod.* 47: 69–77.
- dos Santos Montagner, G. F., M. Sagrillo, M. M. Machado, R. C. Almeida, C. P. Mostardeiro, M. M. Duarte, and I. B. da Cruz. 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol. In Vitro.* 24: 1410–1416.
- Sasaki, T., M. Kobayashi, and N. Agui. 2000. Epidemiological potential of excretion and regurgitation by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 to food. *J. Med. Entomol.* 37: 945–949.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31: 09–15.
- Senthilkumar, N., P. Varma, and G. Gurusubramanian. 2009. Larvicidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the malarial vector, *Anopheles stephensi* (Liston). *Parasitol. Res.* 104: 237–244.
- Sheppard, D. C., and N. C. Hinkle. 1987. A field procedure using disposable materials to evaluate horn fly insecticide resistance. *J. Agr. Entomol.* 4: 87–89.
- Singh, N., M. McCoy, R. Tice, and E. A. Schneider. 1995. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175: 184–191.
- Sukontason, K. L., N. Boonchu, K. Sukontason, and W. Choochote. 2004. Effects of eucalyptol on house fly (Diptera: Muscidae) and blow fly (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 46: 97–101.
- Tong, F., and J. R. Coats. 2012. Quantitative structure-activity relationships of monoterpenoid binding activities to the housefly GABA receptor. *Pest Manag. Sci.* 68: 1122–1129.
- Touati, B., H. Chograni, I. Hassen, M. Boussaïd, L. Toumi, and N. B. Brahim. 2011. Chemical composition of the leaf and flower essential oils of Tunisian *Lavandula dentata* L. (Lamiaceae). *Chem. Biodivers.* 8: 1560–1569.
- Traboulsi, A. F., K. Taoubi, S. El-Haj, J. M. Bessiere, and S. Rammal. 2002. Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito (Diptera: Culicidae). *Pest Manag. Sci.* 58: 491–495.
- Yang, Y. C., H. Y. Choi, W. S. Choi, J. M. Clark, and Y. J. Ahn. 2004. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Agric. Food Chem.* 52: 2507–2511.



**3 MANUSCRITO 1 – INSECTICIDAL EFFECT OF NUTMEG ESSENTIAL OIL (MAGNOLIALES: MYRISTICACEAE) AGAINST HOUSEFLIES (DIPTERA: MUSCIDAE) AND BLOWFLIES (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**

Manuscrito submetido em *Journal of Medical Entomology*

**Corresponding author:** Luciana F. Cossetin and Silvia G. Monteiro, Microbiology and Parasitology Department, University Federal of Santa Maria, SE- 97105-900, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS, BR.  
Tel.: +1555996702481; +1555996482998  
E-mail: lucianacossetin@gmail.com  
sgmonteiro@uol.com.br

**Insecticidal effect of Nutmeg essential oil (Magnoliales: Myristicaceae) against Houseflies (Diptera: Muscidae) and Blowflies (Diptera: Calliphoridae)**

Luciana F. Cossetin<sup>1,7</sup>, Eduarda M. T. Santi<sup>2</sup>, Antônio F. I. M. Matos<sup>3</sup>, Quelen Garlet<sup>4</sup>, Jocelene F. Cossetin<sup>5</sup>, Tiago P. De Souza<sup>2</sup>, Luiza Loebens<sup>6</sup>, Berta M. Heinzmann<sup>4</sup> and Sílvia G. Monteiro<sup>1,7</sup>.

<sup>1</sup>Department Microbiology and Parasitology, Graduate Program of Pharmacology, University Federal of Santa Maria, Santa Maria, Brazil, <sup>2</sup> Department Microbiology and Parasitology, School of Veterinary Medical, University Federal of Santa Maria, Santa Maria, Brazil, <sup>3</sup>Department Microbiology and Parasitology, Graduate Program of Veterinary Medical, University Federal of Santa Maria, Santa Maria, Brazil, <sup>4</sup>Laboratory of plant extracts, Graduate Program of Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil, <sup>5</sup>Graduate Program of Pharmacology, University Federal of Santa Maria, Santa Maria, Brazil, <sup>6</sup>Department Ecology and Evolution, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil and <sup>7</sup>corresponding author.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

**Abstract**

The insecticide activity of *Myristica fragrans* essential seed oil, (Nutmeg) was evaluated against *Musca domestica* and *Chrysomya albiceps*; both important infectious pathogenic disease vectors. The oil was extracted by distillation, and from chemical analysis 21 components were identified, principally Beta-pinene (26%), Alpha-pinene (10.5%), Sabinene (9.1%) and Gamma-terpinen (8.5%). Insecticidal properties were identified through larvicide and adulticide tests. Using the immersion method, oil at 5% was very effective ( $90 \pm 1\%$ ) against *M. domestica* larvae. The results for adulticide activity varied with the fly species, dosage, time, and method of exposure. Topical application (on the insect thorax) was more toxic to *C. albiceps*, where the lethal concentration for 50% ( $LC_{50}$ ) was  $2.02 \pm 0.56$ , and  $8.57 \pm 2.41$  for the common flies. When the insects were exposed to oil impregnated paper, the results were similar for *M. domestica* and *C. albiceps* adults with respective  $LC_{50}$  values of  $2.74 \pm 0.24$ , and  $3.65 \pm 0.48$ . Thus, the results demonstrated that *M. fragrans* oil presents insecticide activity and can be used for control of *M. domestica* and *C. albiceps*.

**Key words:** Fly, Adulticide, Larvicide, Musca.

## Introduction

Due to population growth, and changes occurring in global eating habits, the need to improve crop productivities has intensified interest in insect/pest control (Wyckhuys et al. 2013). In addition, many insects are infectious disease vectors and pose serious risks to public health worldwide. Most control measures for these vectors are performed using chemical insecticides (Anadón et al. 2009). However, widespread use of pesticides is of concern. Alternatives to control insects with natural and biodegradable products have thus been studied; to minimize environmental risks, and to overcome resistance to chemical insecticides (Regnault-roger et al. 2012).

*Myristica fragrans* belongs to the Myristicaceae family and is popularly known as Nutmeg. Due to its biological activities related to digestive and nervous systems its use in traditional medicine is extensive (El-alfy et al. 2009). The principle scientifically explored structure of this plant is the seeds (Nutmeg) composed of volatile oils, fixed oils, mucilage and starch (Barceloux 2009).

Of the 21 compounds investigated in the essential oil were the monoterpenes sabinene,  $\alpha$ -pinene, and  $\beta$ -pinene; and oxygenated compounds such as myristatin, methyl eugenol, terpinen-4-ol, safrol, and  $\alpha$ -terpineol (Dupuy et al. 2013). Due to the presence of such a variety of compounds, *in vivo* and *in vitro* studies have reported: analgesic, antibacterial, and antioxidant (Gupta et al. 2013); anti-inflammatory (Olajide et al. 1999) (Tong et al. 2004); hypoglycemic (Oseni and Idowu 2014); and anticonvulsive (Wahab et al. 2009) activities.

In addition to these activities, the essential oil has been studied for control of various pests. Topical applications demonstrate insecticidal action against a cotton pest *Dysdercus koenigii* (Suryakala et al. 2007). Oil contact in *Lymantria dispar* larvae presents anti-feeding activity (Kostic et al. 2013), and larvicidal effects have also been analyzed in *Aedes aegypti* L.

larvae (Dias and Moraes 2014) and in *Anopheles stephensi* (Liston) (Senthilkumar et al. 2009). Other studies have reported that *M. fragrans* essential oil presents insecticidal and repellent activity against *Lasioderma serricorne* (Du et al. 2014).

Considering that many pathogens are transmitted by flies and that various essential oils are capable of controlling insects, the objective of this study was to evaluate the susceptibility of *M. domestica* and *C. albiceps* (larval and adult stage) to essential oil extracted from the seeds of *M. fragrans*.

## **Material and methods**

### **Plant material and essential oil extraction**

*M. fragrans* essential oil was obtained by hydro-distillation (Europe and Commission 2007) of seeds marketed locally at the Padarias Shopping Mall (Porto Alegre, RS, Brazil). Upon extraction, the oil was packed in an amber bottle and kept at a temperature of -20°C until analysis and use.

### **Essential oil chemical analysis**

The analysis was performed in gas chromatography coupled to mass spectrometry. GC-MS TIC was performed using an Agilent 7890A chromatograph 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 electronic impact ionization at 70 eV. Parameters of analysis: split inlet 1:50; carrier gas: He (1 mL/min); temperature of the injector and detector: 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 for the samples, and in spectra fragmentation models, being both compared with data from the



literature and equipment spectra (Wiley et al. 2008, Adams 2009). GC-DIC analysis was performed on an Agilent 7890A gas chromatograph equipped with flame ionization detector using a DB-5 fused silica capillary column (5% phenylmethylsiloxane, 30 mx 0.25 mm, film thickness: 0.25  $\mu\text{m}$ ). Carrier gas: He with a 1 mL/min flow; split inlet 1:50; temperature of the injector and detector: 300°C. Quantification of the constituents was performed by integrating peak areas, and expressed as a relative percentage of the total.

### **Fly raising**

Entomological cages (30 cm X 30 cm X 30 cm) were used to condition the dipterans under the following conditions: temperature of  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , under a light/dark cycle (00:12 H), and 70% relative humidity. The adults received food consisting of honey and water at will. For breeding new generations, commercial beef paste and bovine liver were respectively used to induce *M. domestica* and *C. albiceps* oviposition. After the larvae hatched, commercial dog feed paste was provided as feed until pupation.

### ***In vitro* evaluation of essential oil larvicide activity**

The larvicidal action of *M. fragrans* oil against *C. albiceps* and *M. domestica* was evaluated using the methodology recommended by Cossetin et al. (2018). In the assay, twenty (20) third stage larvae were immersed in different concentrations of the oil (1, 2.5, and 5%, w/v) in 1% (w/v) polysorbate 80, and 2% (w/v) diazinon solution positive control). The negative control group consisted of 1% polysorbate 80 alone, as used in the preparation of the differing oil dosages. The larvae were immersed in 5 mL of each solution (in triplicate) for a period of 5 minutes following conditions of:  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , and RH of  $65 \pm 5\%$ . For final efficacy calculations, the Abbott formula (1925) was used: % Efficacy = [(No. of adults in the control group - No. of adults in the treated group)/No. of adults in the control group]100.

### ***In vitro* evaluation of essential oil adulticide activity**

For the topical toxicity evaluation, dilutions of the oil were tested in groups consisting of ten adult flies (after 5-7 days of emergence) in triplicate (Cossetin et al. 2018). The insects were pre-anesthetized by cooling (-20°C) for 90 seconds and treated with 3 µL of the different concentrations of oil applied to the thorax. The differing oil concentrations (1, 1.5, and 5%, w/v) were prepared using 1% (w/v) polysorbate 80 surfactant. The organophosphate Diazinon (1%; p/v) and polysorbate 80 (1%; p/v) were used respectively as a positive and negative controls. After treatment, the flies were evaluated at predetermined times (15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes).

In addition to topical application testing for evaluation of adulticidal effect, a method using exposure to impregnated paper containing oil was also performed. In this method, as reported by Cossetin et al. (2018), 20 adult flies (5 - 7 days) in triplicate were exposed to oil impregnated paper at different dosages (10, 25, 50 µ/cm<sup>2</sup>). Aliquots of the solutions (1, 2.5, 5; w/v) were prepared using a 1% polysorbate 80 surfactant, and applied to 11 cm<sup>2</sup> diameter paper disks, which after 15 minutes of total oil impregnation environment were packed into petri dishes together with the flies. The dipterans were evaluated for the adulticidal effect of the oil, polysorbate 80 1%, or the synthetic insecticide diazinon (1%; w/v) for determined times (15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes).

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed assuming  $p < 0.05$  as the significance criterion. All variables were previously tested for variance normality (Shapiro-Wilk test), and homogeneity (Bartlett test); logarithmically as necessary. Analysis of variance to verify differences in adulticidal effect between treatments was used for each of the methods: Topical application;

Impregnated paper; Verification of larvicidal effect differences between treatments; Verification of differences between the numbers of adults emerging from the treatments.

## Results

### Essential oil chemical analysis

Analysis of the chemical composition of *M. fragrans* essential seed oil was determined by gas chromatography and 21 compounds were identified (Table 1).

**Table 1.** Chemical composition of *Myristica fragrans* essential oil % relative percentage considering retention time (RT) and Kovats retention index calculation (RI calc).

### *In vitro* evaluation of essential oil larvicide activity

Larvae mortality, pupal stage development, and emergence of adults were evaluated. The results are reported in Tables 2 and 3. The larvicidal activity observed for *M. domestica* ( $F = 598.2$ ;  $p < 0.0001$ ) with the essential oil at 5% was equivalent to the reference drug diazinon ( $P > 0.05$ ). The treatments presented a reduced number of pupae ( $F = 230.7$ ,  $p < 0.00001$ ), and emerging adults (Figure 1a) ( $F = 58.56$ ,  $p < 0.0001$ ) in relation to the other treatments ( $p < 0.005$  for all). Besides, larval forms exhibiting agitation, hyperactivity, and paralysis, effects observed in the present study.

**Table 2.** Effect of *M. fragrans* essential oil on larvae, pupae and adult emergence after immersion of third stage *M. domestica* larvae (n=20, in triplicate for each group; mean  $\pm$  standard deviation).

The *C. albiceps* larvae were not susceptible when immersed at concentrations of 1, 2.5, or 5% of *M. fragrans* oil (Table 3); thus, only diazinon ( $p < 0.05$ ) presented larvicidal effect ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Effect of *M. fragrans* essential oil on larvae, pupae and adult emergence after immersion of *C. albiceps* third instar larvae (n=20, in triplicate for each group; mean  $\pm$  standard deviation).

In accordance with the results, the 5% oil concentration was toxic to common fly larvae when immersed. In the *M. domestica* assay, the mortality rate was found to be dosage dependent - increasing with oil concentration (Figure 1).

**Figure 1.** Adult emergence percentage (%) *M. domestica* (A) and *C. albiceps* (B) after larvae immersions at different *M. fragrans* essential oil concentrations.

### ***In vitro* evaluation of essential oil adulticide activity**

In accordance with the results, the insecticidal activity of *M. fragrans* varied depending on the concentration of oil used, and on the exposure method. *M. domestica* was susceptible to the oil (toxicity) in the fumigant assay, and an adulticide effect was observed between treatments ( $F = 1009$ ;  $p < 0.0001$ ) (Table 4). In this technique, the impregnated papers containing oil at  $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  and  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  were 100% lethal to *M. domestica* (equivalent to Diazinon) ( $p > 0.05$ ). The results for the common fly topical toxicity evaluation trial showed that oil treatments at 1, 2.5 or 5% presented low efficacy (adulticidal) as compared to Diazinon ( $p < 0.005$ , for all).

**Table 4.** *M. fragrans* essential oil adulticide activity (average number of deaths  $\pm$  standard deviation) in *M. domestica* (adult flies); topical application model at different oil concentrations

(1, 2.5, and 5 %) (n=10, in triplicate for each group), and exposure to oil impregnated paper in different concentrations (10, 25, and 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (n=20, in triplicate for each group).

In *C. albiceps*, the fumigant action of the oil was equivalent to *M. domestica*; presenting adulticidal effect ( $F = 1009$ ;  $p < 0.0001$ ) (Table 5). In this bioassay, the *M. fragrans* oil concentrations of 25, and 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  impregnating the paper demonstrated insecticidal action equivalent to that of Diazinon ( $p > 0.05$ ). When the oil was applied topically, *C. albiceps* was susceptible (adulticidal effect) to the oil ( $F = 1009$ ;  $p < 0.0001$ ). The natural product at 2.5, and 5% applied superficially was comparable to the positive control ( $p > 0.05$ ).

**Table 5.** Adulticidal activity of *M. fragrans* essential oil (average number of deaths  $\pm$  standard deviation) in *C. albiceps* adult flies by topical application at different oil concentrations (1, 2.5, and 5 %) (n=10, in triplicate for each group), and exposure to oil impregnated paper in different concentrations (10, 25, and 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (n=20, in triplicate for each group).

Time-dependent toxic effect was also verified for insect exposure to the essential oil. The effect was verified in the impregnated paper exposure bioassay, and oil at 25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of paper was used for both species, at that concentration, 100% mortality occurred within 90 minutes of exposure (Figure 2A, B).

**Figure 2.** Mortality of adults: *M. fragrans* oil against *M. domestica* (A, C) and *C. albiceps* (B, D), in experimental models of exposure to oil impregnated filter paper (A, B) and topical applications (C, D).

In order to determine the toxicological values of the essential oil against *M. domestica* and *C. albiceps*, the concentrations necessary to cause insect mortality of 50% were determined and expressed in table 6.

**Table 6.** Lethal concentration of *M. fragrans* essential oil against adult *M. domestica* and *C. albiceps*, after a period 30 minutes using methods involving topical applications and exposure to impregnated paper.

## **Discussion**

### **Essential oil extraction and characterization**

From the chemical composition study of *M. fragrans* essential oil it was possible to identify 93.73% of the constituents. The composition of the oil was principally monoterpenoids (corresponding to about 90%), being chiefly (-) -  $\beta$ -Pinene (24-31%), 1-Terpinen-4-ol (14-15%), L- Pinene (13%) and Sabinene (10%). These compounds were identified in the essential oil obtained from the seeds, and have also been studied by Wahab et al. (2009), Piaru et al. (2012) and Muchtaridi et al. (2010).

### **In vitro evaluation of essential oil larvicide activity**

The toxicity observed against *M. domestica* larvae can be attributed to chemical composition; monoterpenes, major compounds of *M. fragrans*, are potent insecticides (Badolhahi et al. 2011), and according to Houghton et al. (2006), these substances cause larval mortality by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase.

Other authors have observed that the larvicidal effect may also be due to modulation of physiological functions in larvae (Lee et al. 2003). According to Jeyabalan and Murugan (1999), larval neuro-secretory and epidermal cells are inhibited by certain plant extract treatments, where production of the enzymes responsible cuticle development becomes

irregular. This can negatively influence the complete development of the insect. This effect was observed in the *M. domestica* group treated with 2.5% oil; interfering in the evolutionary cycle and limiting adult emergence to only 50%.

The mortality rate increased with increasing oil concentration. The dose and effect are corroborated by Chaubey (2008) for *M. fragrans* larvicidal effect against *Callosobruchus chinensis*.

Nutmeg may interfere with the activity of certain larval enzymes including esterase and monooxygenase; activities which when reduced, alter insect digestive and detoxification systems; interfering in larval defense (Bouayad et al. 2013). Senthilkumar et al. (2009) reported reductions in total proteins, carbohydrates, lipids and certain amino acids in *Anopheles stephensi* larvae treated with *M. fragrans* extract, suggesting that the treatments reduced the insect's energy reserve. Energy reserve can vary according to the size and species of the insect. At the concentrations studied, differences observed in the larvicidal test for *M. fragrans* oil may be explained using *M. domestica* and *C. albiceps* species energy intake, and their larval defense system differences.

### ***In vitro* evaluation of essential oil adulticide activity**

Several studies have suggested that the efficacy of an insecticide depends on the application surface (Enan 2001). In the present work, the application area differed between species, which may explain the differing toxicity results for the oil. *C. albiceps* is larger with greater pilosity; this contributes to absorption/permeation of the oil (Brown and Pal 1971). When absorbed, the oil may interfere with various, especially nerve and muscle functions, which are important targets for insecticidal agents.

The absorption/permeation characteristics of essential oils depend on their chemical constitutions. The presence of saturations and certain functional groups on the structure can

favor volatilization (Adorjan and Buchbauer 2010). Monoterpenoids, the major compounds of *M. fragrans* are volatile, and on the insect surface lipophilic compounds immediately promote oil diffusion following vapor adsorption of the same (Rince and Coats, 1994). This explains the fumigation test toxicity of the oil.

The toxicity of the oil is mainly attributed to its monoterpenoids, and the main target of these compounds in relation to insects is the inhibition of acetylcholinesterase (Lopes et al. 2015). Several of these compounds have already been tested on insects to assess toxic activity and affinity to cholinesterase. According to Lee et al. (1997),  $\alpha$  - pinene,  $\beta$  - pinene, and limonene (compounds present in greater concentration in the essential oil of *M. fragrans*), when applied dorsally are toxic for *M. domestica* adults. Certain authors have reported that these compounds inhibit acetylcholinesterase in insects (LEE et al., 2001, KANG et al., 2013, SEO et al., 2014).

In addition, the chemical structure of monoterpenoids classified as bicyclic is reported in the literature, indicating a significant relation to acetylcholinesterase inhibitory activity. Miyazawa and Yamafuji (2005) have identified a group of bicyclic hydrocarbon monoterpenoids as potent inhibitors of the enzyme. In this group, the authors highlighted alpha and beta pinene compounds which corresponded to 36.51% of the composition of Nutmeg oil. According to the researchers, the absence of oxygen groups, besides the presence of terminal methyl allylates, strongly favors the esterase inhibiting interaction.

The insecticidal action of the oil under study has been verified by certain authors against other species, and depending on concentration and time of exposure, adulticide effect was also identified. Chaubey (2008) observed the fumigant activity of *M. fragrans* essential oil against *Callosobruchus chinensis* adults, and the toxic effect of the oil has been identified through impregnated paper exposure for *Sarcoptes scabiei*; (whether Permethrin sensitive or resistant) (Pasay et al. 2010).



In other studies, the adulticidal effect of Nutmeg oil has been observed against *Aedes aegypti* females using topical applications (Voris et al. 2018). The authors attributed the effect of the oil to inhibition of the enzymes acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase.

When observed between species, differing toxicological effects may result not only from the activity of the constituent mixture present in the oil; but also by the type of enzymatic interactions involved and the concentration necessary to obtain the insecticidal action (Lopes et al. 2014). Interspecies variables such as body size, pilosity, and defense mechanism differences must also be considered.

Moreover, according to certain authors, essential oils may act through differing mechanisms, and in certain species higher concentrations of a product are often required to achieve effectiveness. It is important to emphasize that the need for higher concentrations may be predicted given the physicochemical characteristics of the oil constituents (Lopes et al. 2015).

The results indicate that Nutmeg oil presents larvicidal action against *M. domestica*, and when applied as a fumigant, the oil presented insecticide activity in *C. albiceps* and *M. domestica* adults. *M. fragrans* oil therefore may well be an alternative for control of *M. domestica* and *C. albiceps*. However, further studies are required in order to obtain formulations that increase the oil's efficiency and stability.

## References

- Adams, RP 2009.** Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, 4th ed. Carol Stream, EUA.
- Adorjan, B and G, Buchbauer 2010.** Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour. Fragr. J.* 25: 407–426.
- Anadón, A, Martínez-larrañaga, MR and Martínez, MA 2009.** Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *Vet J.* 182: 7-20.

- Barceloux, D 2009.** Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants, and Venomous Animals: 373-379.
- Bouayad, N, Rharrabe, K, Ghailani, NN, Jbilou, R, Castañera, P and Ortego, F 2013.** Insecticidal effects of Moroccan plant extracts on development, energy reserves and enzymatic activities of *Plodia interpunctella*. Span. J. Agric. 11: 189-198.
- Brown, A & Pal, R 1971.** Insecticidal resistance in arthropods. 2. ed. Genebra, World Health Organization.
- Chaubey, MK 2008.** Fumigant Toxicity of Essential Oils from Some Common Spices against Pulse Beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). J. Oleo Sci. 57: 171-179.
- Cossetin, LF, Santi, EMT, Cossetin JF, Dillmann, JB, Baldissera, MD, Garlet QI, De Souza, TP, Loebens, L, Heinzmann, BM, Machado MM and Monteiro, SG 2018.** *In vitro* Safety and Efficacy of Lavender Essential Oil (Lamiales: Lamiaceae) as an Insecticide Against Houseflies (Diptera: Muscidae) and Blowflies (Diptera: Calliphoridae). J Econ Entomol. 111: 1974–1982.
- Dias, CN and Moraes, DFC 2014.** Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. Parasitol Res. 113: 565–592.
- Du, S, Yang, K, Wang, C, You, C, Geng, Z, Guo, S, Deng, Z and Liu, Z 2014.** Chemical Constituents and Activities of the Essential Oil from *Myristica fragrans* against Cigarette Beetle *Lasioderma serricorne*. Chem Biodivers 11: 1949-1456.
- Dupuy, N, Molinet, J, Mehl, F, Nanlohy, F, Dréau, YL and Kister, J 2013.** Chemometric analysis of mid infrared and gas chromatography data of Indonesian nutmeg essential oils. Ind Crops Prod. 43: 596– 601.
- El-alfy, AT, Wilsona, L, Elsohlyb, M, Ehab, A and Abourashedd, A 2009.** Towards a better understanding of the psychopharmacology of nutmeg: Activities in the mouse tetrad assay. J Ethnopharmacol. 126: 280–286.
- Enan, E 2001.** Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. Comp Biochem Physiol C 130: 325 – 337.
- Europe, C and Commission, EP 2007.** European Pharmacopea, 6nd ed, Strassbourg, EU.
- Ebadolhahi, A 2011.** Iranian Plant Essential Oils as Sources of Natural Insecticide Agents. J Biol Chem. 5: 266 – 290.
- Gupta, AD, Bansal, VK, Babu, V and Maithil, N 2013.** Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt). Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 11: 25–31.
- Houghton, PJ, Rena Y and Howesb M 2006.** Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. Nat. Prod. Rep. 23: 181–199.

- Jeyabalan, D and K Murugan, 1999.** Effect of certain plant extracts against the mosquito *Anopheles stephensi*, Liston. Curr. Sci. 76: 631-633.
- Lee, S, Tsao R, Peterson, C and Coats JR 1997.** Insecticidal Activity of Monoterpenoids to Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae), and House Fly (Diptera: Muscidae). J Econ Entomol., 90: 883 – 892.
- Lee, S, Lee, B, Choi, W, Park, B, Kim, J and Campbell, BC 2001.** Pest Manag Sci 57: 548 – 552.
- Lee, S, Peterson, CJ, Coats and JR 2003.** Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. J Stored Prod Res. 39: 77–85.
- López, MD and Pascual-Villalobos, MJ 2014.** Are monoterpenoids and phenylpropanoids efficient inhibitors of acetylcholinesterase from stored product insect strains? Flavour Fragr. J. 30: 108–112.
- López MD, Campoy, FJ, Pascual-Villalobos, MJ, Muñoz-Delgado, E and Vidal CJ 2015.** Chem.-Biol. Interact. 229: 36–43.
- Miyazawa, M and Yamafuji, C 2005.** Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Bicyclic Monoterpenoids. J. Agric. Food Chem. 53: 1765-1768.
- Muchtaridi, Subarnas, A, Apriyantono, A and Mustarichie, R 2010.** Identification of Compounds in the Essential Oil of Nutmeg Seeds (*Myristica fragrans* Houtt.) That Inhibit Locomotor Activity in Mice. Int. J. Mol. Sci. 11: 4771-4781.
- (NIST/EPA/NIH) NIST/EPA/NIH mass spectral library and search/analysis program. 2008.** John Wiley & Sons, Hoboken, USA.
- Kang, JS, Kim, E, Hyeock and SL, Park, I 2013.** Pestic Biochem Physiol. 105: 50–56.
- Kostic, I, Petrovic, O, Milanovic, S, Popovic, Z, Stankovic, S, Todorovic, G and Kosti, M 2013.** Biological activity of essential oils of *Athamanta haynaldii* and *Myristica fragrans* to gypsy moth larvae. Ind Crops Prod. 41: 17– 20.
- Olajide, OA, Ajayi, FF, Ekhelar, AI, Awe, SO, Makinde, JM and Alada, AR 1999.** Biological effects of *Myristica fragrans* (nutmeg) extract. Phytother Res 13: 344-55.
- Oseni, OA and Idowu, ASK 2014.** Inhibitory activity of aqueous extracts of horseradiash *Moringa oleifera* (Lam) and Nutmeg *Myristica fragrans* (Hoult) on Oxidative stress in alloxan induced diabetic male wistar albino rats. Americal Journal of Biochemistry and Molecular Biology 04: 64-75.
- Pasay, C, Mounsey, K, Stevenson, G, Davis, R, Arlian, L, Morgan, M, Vyszenski-Moher, D, Andrews and K, McCarthy, J 2010.** Acaricidal Activity of Eugenol Based Compounds against Scabies Mites. PLoS One. (8): e12079.

**Piaru, SP, Mahmud, R, Majid, AMSA, Ismailb, S and Manc, CN 2012.** Chemical composition, antioxidant and cytotoxicity activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. *J Sci Food Agric* 92: 593–597.

**Regnault-Roger, C, Vincent, C and Arnason, JT 2012.** Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annu Rev Entomol.* 57: 405 – 424.

**Rice, P and J, Coats 1994.** Insecticidal properties of monoterpenoid derivatives to the house fly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pest Manag. Sci.* 41: 195–202.

**Senthilkumar, N, Varma, P and Gurusubramanian, G 2009.** Larvicidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the Malarial Vector, *Anopheles stephensi* (Liston). *Parasitol Res.* 104: 237–244.

**Seo, S, Kim, J, Kang, J, Koh, S, Ahn, Y, Kang, K and Park, I 2014.** Pestic Biochem Physiol. 113 :55–61.

**Suryakala, I, Ram, GM and Jyothi, KN 2007.** Insect growth regulatory activity of some botanical pesticides - Their role in pest management. *Pestology* 31: 40-43.

**Thuong, PT, Hung, TM, Khoi, NM, Nhung, HTM, Chinh, NT, Quy, NT, Jang, TS and Na, M 2014.** Cytotoxic and anti-tumor activities of lignans from the seeds of Vietnamese nutmeg *Myristica fragrans*. *Arch Pharm Res* 37: 399–403.

**Voris, DGR, Dias, LS, Lima, JÁ, Lima, KSC, Lima, JBP and Lima, ALS 2018.** Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of *Illicium verum* Hook. f., *Pimenta dioica* (L.) Merr., and *Myristica fragrans* Houtt. against Zika virus vectors. *Environ Sci Pollut Res* 25: 22541–22551.

**Wahab, A, Haq, RU, Ahmed, A, Khan, RA and Raza, M 2009.** Anticonvulsant Activities of Nutmeg Oil of *Myristica fragrans*. *Phytother Res* 23: 153 –158.

**Wyckhuys, KAG, Lu, Y, Morales, H, Vazquez, LL, Legaspi, JC, Eliopoulos, PA and Hernandez, LM 2013.** Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing world. *Biocontrol* 65: 152–167.

**Table 1.** Chemical composition of *Myristica fragrans* essential oil. % relative percentage considering retention time (RT) and Kovats retention index calculation (RI calc).

Peak	Rt (min)	Constituents	%	RI calc
1	10.81	Alpha-Thujene	1.71	924
2	11.08	Alpha-pinene	10.51	931
3	12.74	Beta-pinene	26.00	971
4	12.90	Sabinene	9.16	975
5	13.48	Myrcene	1.46	989
6	14.11	Alpha-Phellandrene	0.92	1004
7	14.19	$\delta$ -3-carene	1.61	1006
8	14.55	$\alpha$ -Terpinen	4.93	1015
9	14.87	o-Cymene	2.97	1023
10	15.05	Limonene	4.67	1027
11	15.10	$\beta$ -Phellandrene	3.83	1029
12	16.23	$\gamma$ -Terpinen	8.51	1057
13	17.30	Terpinolen	1.59	1083
14	17.90	cis- $\beta$ -Terpineol	0.24	1098
15	18.81	4-Isopropyl-1-methyl-2-cyclohexen-1-ol	0.25	1122
16	20.95	4-Terpineol	0.67	1179
17	21.49	$\alpha$ -Terpinol	0.76	1193
18	24.85	Safrole	0.72	1287
19	28.53	Methyleugenol	0.38	1397
20	32.28	Myristicin	0.76	1517
21	33.08	Elemicin	0.58	1544

**Table 2.** Effect of *M. fragrans* essential oil on larvae, pupae and adult emergence after immersion of third stage *M. domestica* larvae (n=20, in triplicate for each group; mean  $\pm$  standard deviation).

Treatments	Mortality of larvae	Number of pupae	Number of emerged adults
<b>NC (A)</b>	0 $\pm$ 0 <sup>BDE</sup>	19,34 $\pm$ 0,58 <sup>BDE</sup>	16 $\pm$ 1 <sup>BDE</sup>
<b>PC (B)</b>	20 $\pm$ 0 <sup>ACD</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>ACD</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>AC</sup>
<b>MO 1 % (C)</b>	0,66 $\pm$ 0,57 <sup>BDE</sup>	19,34 $\pm$ 0,58 <sup>BDE</sup>	15,34 $\pm$ 1,15 <sup>BDE</sup>
<b>MO 2.5% (D)</b>	6,66 $\pm$ 1,53 <sup>ABCE</sup>	13,34 $\pm$ 1,53 <sup>ABCE</sup>	6 $\pm$ 2,65 <sup>ABCE</sup>
<b>MO 5% (E)</b>	18 $\pm$ 2 <sup>ACD</sup>	2,0 $\pm$ 1 <sup>ACD</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>ACD</sup>

\*Post hoc analysis: significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments are indicated by letters. Each letter represents a treatment.

NC, Negative controle

PC, Positive controle

MO, *M. fragrans* essential oil in diferentt concentrations

**Table 3.** Effect of *M. fragrans* essential oil on larvae, pupae and adult emergence after immersion of third instar *C. albiceps* larvae (n=20, in triplicate for each group; mean  $\pm$  standard deviation).

<b>Treatments</b>	<b>Mortality of larvae</b>	<b>Number of pupae</b>	<b>Number of emerged adults</b>
<b>NC (A)</b>	1,34 $\pm$ 0,94 <sup>B</sup>	18,66 $\pm$ 1,15 <sup>B</sup>	16 $\pm$ 0,82 <sup>B</sup>
<b>PC (B)</b>	16 $\pm$ 1,63 <sup>ACD</sup>	0 $\pm$ 2 <sup>ACDE</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>ACDE</sup>
<b>MO 1 % (C)</b>	1,34 $\pm$ 0,94 <sup>B</sup>	18,66 $\pm$ 1,15 <sup>B</sup>	14 $\pm$ 1,63 <sup>B</sup>
<b>MO 2.5% (D)</b>	0 $\pm$ 0 <sup>B</sup>	20 $\pm$ 0 <sup>B</sup>	14 $\pm$ 1,41 <sup>B</sup>
<b>MO 5% (E)</b>	0 $\pm$ 0 <sup>B</sup>	19,34 $\pm$ 0,58 <sup>B</sup>	14,66 $\pm$ 2,05 <sup>B</sup>

\*Post hoc analysis: significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments are indicated by letters. Each letter represents a treatment.

NC, Negative controle

PC, Positive controle

MO, *M. fragrans* essential oil in diferentt concentrations

**Table 4.** Adulticidal activity of *M. fragrans* essential oil (average number of deaths  $\pm$  standard deviation) in *M. domestica* adult flies by topical application model at different oil concentrations (1, 2.5, and 5 %) (n=10, in triplicate for each group), and exposure to oil impregnated paper in different concentrations (10, 25, and 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (n=20, in triplicate for each group).

Treatment	(n dead)	
	Superficial application	Impregnated paper
NC (A)	$0.66 \pm 0.57^{\text{B}}$	$0.66 \pm 0.57^{\text{BDE}}$
PC (B)	$10 \pm 0^{\text{ACDE}}$	$20 \pm 0^{\text{AC}}$
1% MO (C)	$2 \pm 2^{\text{B}}$	$0 \pm 0^{\text{BDE}}$
2.5% MO (D)	$3.66 \pm 3.05^{\text{B}}$	$20 \pm 0^{\text{AC}}$
5% MO (E)	$3 \pm 2.64^{\text{B}}$	$20 \pm 0^{\text{AC}}$

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

Each letter represents a treatment.

NC, Negative Control (Tween 80 1%)

PC, Positive Control (Diazinon 1%)

MO, *M. fragrans* essential oil in different concentrations



**Table 5.** Adulticidal activity of *M. fragrans* essential oil (average number of deaths  $\pm$  standard deviation) in *C. albiceps* adult flies by topical application at different oil concentrations (1, 2.5, and 5 %) (n=10, in triplicate for each group), and exposure to oil impregnated paper in different concentrations (10, 25, and 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (n=20, in triplicate for each group).

Treatment	(n dead)	
	Superficial application	Impregnated paper
NC (A)	$0.66 \pm 0.57^{\text{BDE}}$	$0.66 \pm 0.57^{\text{BDE}}$
PC (B)	$10 \pm 0^{\text{AC}}$	$20 \pm 0^{\text{AC}}$
1% MO (C)	$1 \pm 1.73^{\text{BDE}}$	$0,33 \pm 0,57^{\text{BDE}}$
2.5% MO (D)	$8 \pm 2^{\text{AC}}$	$20 \pm 0^{\text{AC}}$
5% MO (E)	$9.33 \pm 0.57^{\text{AC}}$	$19.66 \pm 0.57^{\text{AC}}$

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

Each letter represents a treatment.

NC, Negative Control (Tween 80 1%)

PC, Positive Control (Diazinon 1%)

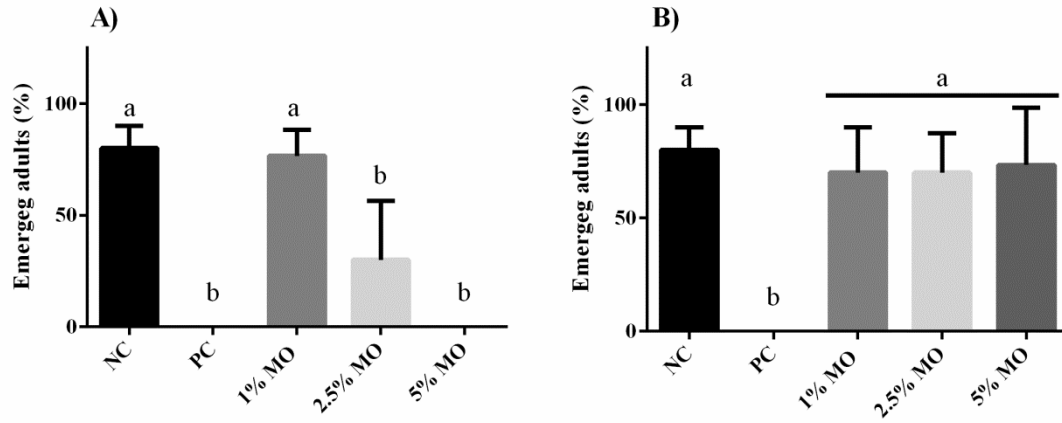
MO, *M. fragrans* essential oil in different concentrations

**Table 6.** Lethal concentration of *M. fragrans* essential oil against adult *M. domestica* and *C. albiceps*, after a period 30 minutes using methods involving topical applications and exposure to impregnated paper.

	<i>Musca domestica</i>	<i>Chysomya albiceps</i>
<b>Superficial application</b>		
LC50 (%; p/v)	8.57 ± 2.41	2.02 ± 0.56
Slope+SE	1.32 ± 1.02	2.93 ± 1.8
x <sup>2</sup>	0.9411	0.9263
N	9	9
<b>Impregnated paper</b>		
LC <sub>50</sub> (%; p/v)	2.74 ± 0.24	3.65 ± 0.48
Slope+SE	6.66 ± 1.08	10.74 ± 1.77
x <sup>2</sup>	0.9800	0.9955
N	9	9

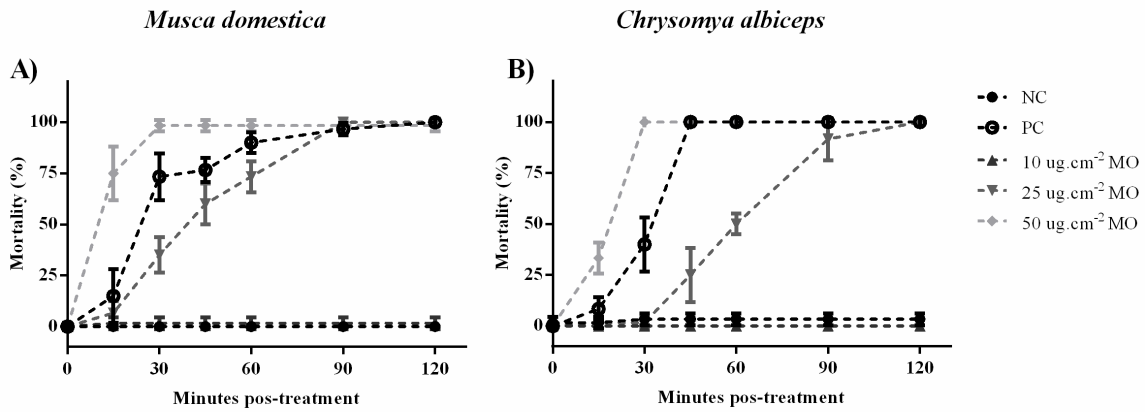
LC<sub>50</sub>, Lethal concentration

**Figure 1.** Adult emergence percentage (%) *M. domestica* (A) and *C. albiceps* (B) after larvae immersions at different *M. fragrans* essential oil concentrations. NC: Negative Control (Tween 80 1%), PC: Positive Control (Diazinon 1%), MO: *M. fragrans* essential oil in different concentrations.

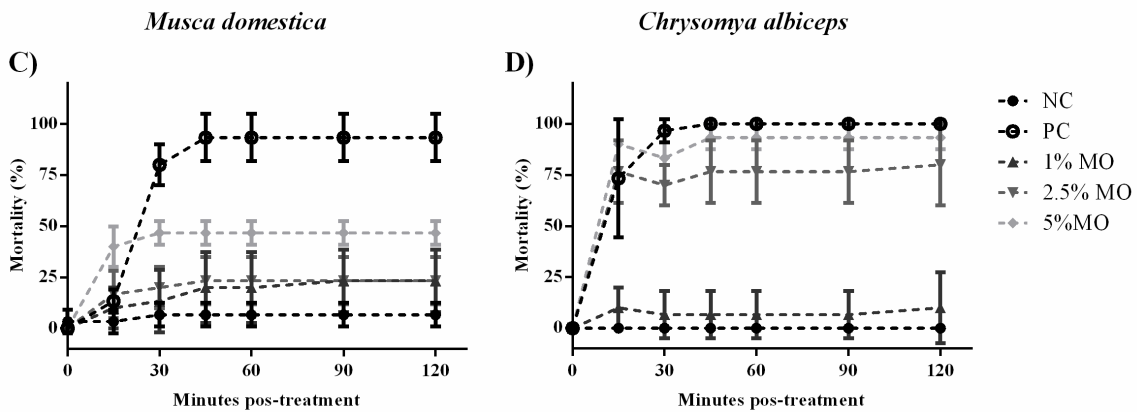


**Figure 2.** Mortality of adults: *M. fragrans* oil against *M. domestica* (A, C) and *C. albiceps* (B, D), in experimental models of exposure to oil impregnated filter paper (A, B) and topical applications (C, D)

### Exposure to paper impregnated



### Surface application



#### **4 MANUSCRITO 2 – DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DE ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES DE *Myristica fragrans* E DE *Lavandula dentata***

Manuscrito a ser submetido

##### **Desenvolvimento e estudo de estabilidade de nanoemulsões de *Myristica fragrans* e de *Lavandula dentata***

Luciana F. Cossetin<sup>1,4</sup>, Quelen I. Garlet<sup>2</sup>, Maiara Callegaro Velho<sup>3</sup>, Samanta Gündel<sup>3</sup>, Aline F. Ourique<sup>3</sup>, Berta M. Heinzmann<sup>2</sup>, Sílvia G. Monteiro<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, <sup>2</sup>Laboratório de extratos de plantas, Programa de Pós-Graduação de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, <sup>3</sup>Universidade Franciscana, Santa Maria, Brasil, e <sup>4</sup>autor correspondente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

## Resumo

Os óleos essenciais são caracterizados como uma mistura complexa de compostos com importantes propriedades farmacológicas. No entanto, estes compostos são sensíveis a alta temperatura, à luz e à presença de oxigênio. Nesse sentido, a nanotecnologia tem sido utilizada para melhorar a estabilidade de óleos essenciais visando garantir a qualidade e a eficácia desses produtos. A fim de avaliar a estabilidade dos óleos essenciais de *Lavandula dentata* e de *Myristica fragrans* associados a nanoestruturas, nanoemulsões contendo óleo essencial à 5% e tensoativos hidrofílico e lipofílico foram desenvolvidas por emulsificação sob alta agitação. Esses sistemas foram caracterizados quanto ao tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão, pH, potencial zeta e composição química dos óleos essenciais após a preparação e também por 90 dias nas seguintes condições de armazenamento: temperatura de refrigeração, ambiente e câmara climática. Após a preparação, as amostras apresentaram as seguintes características físico-químicas: tamanho médio de gotícula nanométrico (64-87 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,26, potencial zeta negativo (11 – 14 mV) e pH fracamente ácido (4,9 -5,6). A manufatura das formulações não alterou quali e quantitativamente a maioria dos compostos dos óleos essenciais. O estudo de estabilidade revelou que as características físico-químicas das formulações de tamanho médio de gotícula, IPD e pH se mantiveram quando as amostras permaneceram em temperatura de refrigeração. Quanto a composição química do óleo nas condições estudadas, os sistemas desenvolvidos foram capazes de preservar o percentual dos compostos majoritários do óleo essencial de *M. fragrans* em condições de armazenamento à 4 e 24 °C durante todo o estudo.

Paravras-chaves: Nanoestruturas. Dispersões coloidais. Óleos voláteis. Nutmeg. Lavandula.

## INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são substâncias líquidas voláteis obtidos a partir de diferentes espécies de plantas (ASBAHANI et al. 2015). Esses produtos possuem propriedades sensoriais fortes e geralmente agradáveis sendo utilizados nas indústrias de perfumaria e cosméticos. Na área médica, os óleos essenciais são amplamente estudados pois apresentam constituintes biologicamente ativos (BILIA et al. 2014).

Esses bioprodutos foram inicialmente utilizados pela medicina tradicional e os óleos obtidos de plantas aromáticas com elevados teores de terpenoides são os mais explorados para uso em fragrâncias e como conservantes de alimentos (SANTOS et al. 2011; BILIA et al. 2014). Os compostos terpenoides são também os principais componentes dos óleos essenciais de Lavanda (*Lavandula dentata*) e de noz-moscada (*Myristica fragrans*), utilizados, principalmente, na indústria de alimentos e de fragrâncias. Adicionalmente, esses óleos possuem compostos com capacidade antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatória, antitumoral, hipoglicemiante, anticonvulsivante e inseticida (ABOURASHED e EL-ALFY, 2016; APROTOSOAIIE et al. 2017; COSSETIN et al. 2018).

Apesar do interesse da indústria farmacêutica nos óleos essenciais, vários fatores devem ser considerados, pois podem interferir na sua aplicação e atividade biológica. A baixa solubilidade em água desses compostos limita, muitas vezes, a viabilidade na produção, uma vez que são compostos hidrofóbicos o que contribui também para o elevado coeficiente de partição óleo/água (PRAKASH et al. 2015). Essa limitação reduz a incorporação dos óleos em produtos hidrofílicos que possuem fácil aceitabilidade pela população como, por exemplo, cosméticos. O odor intenso característico dos óleos voláteis que influencia nas propriedades organolépticas dos produtos que os contêm pode contribuir negativamente para a aceitação do produto final (DIMA e DIMA, 2015).

Além disso, devido a sua natureza volátil, a susceptibilidade para perdas durante a aplicação ou armazenamento desses produtos é maior. Essa degradação é facilitada de acordo com a composição química, pois compostos mais hidrogenados como mono e sesquiterpenos são mais oxidáveis. A presença de luz e de temperaturas mais altas reduz também a estabilidade dos óleos devido à oxidação (ISMAN, 2000).

Essas limitações podem ser superadas a partir da incorporação dos óleos essenciais em estruturas formadas por tensoativos em escala nanométrica. Essas estruturas são capazes de contornar problemas de instabilidade além de melhorar, muitas vezes, a atividade biológica dos óleos essenciais nanoestruturados controlando a sua liberação e aumentando a sua

funcionalidade devido ao seu tamanho reduzido (menor que 1  $\mu\text{m}$ ) (ACEVEDO-FANI et al., 2017).

Assim, considerando que os óleos essenciais são constituídos por compostos químicos susceptíveis à altas temperaturas, à luz e à presença de oxigênio e que sistemas nanoestruturados são capazes de melhorar a estabilidade e a qualidade de diversos óleos essenciais, o objetivo desse trabalho foi desenvolver nanoemulsões com o óleo essencial de *L. dentata* ou de *M. fragrans* para constituir a fase oleosa das formulações. Foram avaliadas as características físico-químicas das formulações bem como a composição química dos óleos essenciais em diferentes condições de armazenamento durante 90 dias.

## **MATERIAL E METODOS**

### **Material**

Os óleos essenciais de *M. fragrans* e de *Lavandula dentata* foram obtidos por hidrodestilação a partir das sementes e partes aéreas, respectivamente (Farmacopeia Européia, 2007). Monooleato de Sorbitano (Span 80®) foi adquirido da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Polissorbato 80 (Tween 80®) foi obtido da LabSynth® (São Paulo, Brasil).

### **Preparação das nanoemulsões**

As nanoemulsões foram preparadas (triplicata) utilizando o método de emulsificação sob alta agitação com resfriamento (DE GODOI et al. 2017). A formulação contendo *L. dentata* foi constituída, primeiramente, pelo óleo (5%) e monooleato de sorbitano (2.5%). Essa solução (fase oleosa) foi adicionada em uma fase aquosa composta de polissorbato 80 (2.5%) e água ultrapura sob agitação de 10.000 rpm utilizando o equipamento Ultra Turrax®. Após, a agitação foi aumentada para 17.000 rpm por um período de 30 minutos. As nanoemulsões constituídas de *M. fragrans* foram desenvolvidas utilizando a mesma metodologia modificando-se as quantidades de tensoativos: 2% de monooleato de sorbitano e 2% de polissorbato 80.

### **Caracterização das nanoemulsões**

As formulações produzidas foram caracterizadas quanto ao tamanho médio de gotículas formadas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e composição do óleo.

Análises do tamanho médio de gotículas e índice de polidispersão foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons das amostras previamente diluídas com água ultrapura e filtradas através de membrana 0.45  $\mu\text{m}$  (Sartorius RC 0.45 microns). A técnica foi



realizada usando o equipamento Zetasizer (Nano-ZS Zetasizer® model ZEN 3600, Malvern, United Kingdom). Este foi usado, também, para determinar o potencial zeta por mobilidade eletroforética após a diluição das formulações em solução de NaCl 10 mM e, seguidamente, a filtração das mesmas em membrana de 0.45 µm.

O pH foi mensurado diretamente nas formulações utilizando-se um potenciômetro calibrado (DM-22, Digimed®, Brasil).

O estudo de estabilidade das formulações foi iniciado após a preparação sendo separadas e avaliadas nas seguintes condições de armazenamento: temperatura ambiente (24 °C), resfriada (4 °C) e de câmara climática (40°C e 65% de umidade). Os parâmetros de avaliação foram tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH em 7, 15, 30, 60 e 90 dias após a preparação. Foi realizada a avaliação de proteção da volatilização do óleo essencial associado às nanoestruturas a partir da obtenção do óleo por hidrodestilação após a preparação, 30 e 90 dias de armazenamento nas condições de acondicionamento de estudo citadas acima. Para isso, 20 mL de cada formulação (n=3) foi diluída com água ultrapura e submetida a extração por 30 minutos usando o aparelho de Clevenger e posteriormente foram realizadas análises químicas por cromatografia gasosa.

### **Análise de Cromatografia Gasosa**

Cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massas (CG-EM): As análises foram realizadas em um sistema hifenado Agilent 7890A, equipado com um detector seletivo de massas série 5975C em coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (5% fenilmetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme: 0,25 µm) e ionização por impacto eletrônico a 70 eV. Parâmetros de análise: split inlet 1:50; gás carreador: He (1mL/min); temperatura do injetor e do detector: 250°C, programa de análise: 40 °C (Ti) por 4 min, 40-320 °C, 4 °C/min. Os componentes foram identificados com base no índice de retenção (IR), determinados através da utilização de uma curva de calibração de uma série homóloga de n-alcanos (C8-C40) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura e com a espectroteca do equipamento (ADAMS, 2009; NIST, 2008).

Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (CG-DIC): A análise quantitativa foi realizada em cromatógrafo gasoso Agilent 7890A equipado com detector por ionização de chama, utilizando coluna capilar de sílica fundida DB-5 (5% fenilmetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme: 0,25 µm). Gás carreador: He com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>; split inlet 1:50; temperatura do injetor e do detector: 300 °C. A quantificação dos constituintes

foi realizada através da integração das áreas dos picos e expressa em porcentagem relativa do total.

### Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o software Graphpad Prism 5.0 seguido de ANOVA de uma via e duas vias com teste post hoc de Tukey. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização das nanoemulsões

As formulações apresentaram macroscopicamente um aspecto homogêneo, como um líquido fluido com características de opalescente – leitoso e azulado. Suas características físico-químicas estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características físico-químicas das formulações contendo nanoemulsões associadas aos óleos essenciais de *L. dentata* (NE-OL) e de *M. fragrans* (NE-OM) após a preparação (n=3, média  $\pm$  desvio padrão)

Formulação	Tamanho de gotícula (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)	pH
NE-OL	64,99 $\pm$ 1,62	0,26 $\pm$ 0,02	-11,1 $\pm$ 2,95	4,95 $\pm$ 0,02
NE-OM	87,06 $\pm$ 0,20	0,17 $\pm$ 0,00	-14,8 $\pm$ 1,99	5,62 $\pm$ 0,02

As formulações apresentaram tamanho médio de gotículas nanométrico (64 – 87 nm) sendo que o tipo de óleo utilizado para constituir a fase oleosa influenciou nessa medida. Isso pode ser explicado pela diferença de densidade entre os óleos pois esse parâmetro físico influencia na viscosidade da fase oleosa e conseqüentemente na formação da gotícula (SCHAFFAZICK et al. 2003). A distribuição de tamanho de gotículas das formulações foi avaliada a partir da determinação do índice de polidispersão (IPD) onde foram verificados valores abaixo de 0,30 (0,17 – 0,26) o que caracteriza a uniformidade dos sistemas desenvolvidos (ISHAKA et al. 2014).

Outra característica avaliada desses sistemas foi a densidade de carga superficial a partir da determinação do potencial zeta que identifica a formação de forças repulsivas contra fenômenos de instabilidade, por exemplo. Os resultados obtidos para o potencial zeta foram

negativos e superiores a 11, em valor absoluto, sendo que a carga negativa obtida pode ser resultante das moléculas de polissorbato 80 e/ou partir de ligações de hidrogênio de seus grupos oxetilenos com íons hidroxilas (LIU et al. 2006). Além disso, foi possível observar que o tipo de fase oleosa interferiu no valor absoluto da densidade de carga superficial. Conforme Marinova e colaboradores (1996) o potencial zeta é fortemente influenciado pelo pH da fase aquosa sugerindo que a adsorção de íons hidroxilas na interface óleo/água contribui para carga negativa superficial o que pode explicar o discreto valor absoluto maior de potencial zeta para a formulação NE-OM que apresentou pH mais elevado que NE-OL.

As composições químicas dos óleos antes e após a preparação das nanoemulsões estão representados nas tabelas 2 e 3. Os componentes identificados do óleo essencial de *L. dentata in natura* e do obtido a partir das nanoemulsões totalizaram 97.54 e 97.82%, respectivamente, e os principais foram: 1,8 cineol (50 - 52 %), fenchona (17 - 16 %) e cânfora (15 - 13 %). Esse percentual de monoterpênicos majoritários foram os principais também em outras amostras do óleo essencial provenientes das regiões de Marrocos e Espanha (BOUSMAHA et al. 2006; IMELOUANE et al. 2010; MOSTEFA et al. 2014). A quantificação, da maioria dos constituintes, não foi alterada pela preparação das nanoestruturas.

**Tabela 2.** Composição química do óleo essencial de *L. dentata in natura* (livre) e do obtido a partir das nanoestruturas (NE)

Pico	Constituinte	Tempo de Retenção (min)	Índice de Kovats calculado	Teor (%)	
				Livre Media ± SD	NE Media ± SD
1	α-Pineno	10,83	926	2,76 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,46 ± 0,78 <sup>a</sup>
2	Campheno	11,49	942	0,62 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,44 <sup>a</sup>
3	β-Pineno	12,48	966	0,38 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,16 <sup>a</sup>
4	Sabineno	12,65	970	3,99 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,45 ± 0,66 <sup>a</sup>
5	Mirceno	13,21	984	0,44 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,17 <sup>a</sup>
6	Limoneno	14,79	1022	3,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,90 ± 0,16 <sup>a</sup>
7	1,8-Cineol	14,90	1025	50,73 ± 0,01 <sup>a</sup>	52,30 ± 0,97 <sup>b</sup>
8	Fenchona	17,14	1081	17,11 ± 0,01 <sup>a</sup>	16,43 ± 0,82 <sup>a</sup>
9	Fenchol	18,34	1111	2,72 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,41 ± 0,04 <sup>a</sup>
10	Cânfora	19,39	1139	15,18 ± 0,01 <sup>a</sup>	13,47 ± 1,24 <sup>b</sup>
11	L-borneol	20,34	1164	0,51 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,01 <sup>a</sup>

%, porcentagem relativa. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos entre amostra. Cada letra representa o tipo de amostra.

A partir do estudo da composição química do óleo essencial de *Myristica fragrans* foi possível identificar 93,73% dos constituintes presentes no óleo *in natura* e 97,82% do óleo proveniente das nanoestruturas. A principal constituição do óleo foi de monoterpenoides correspondendo a cerca de 90% sendo os principais constituintes (-)-beta-pineno (24 – 31%), 1-terpinen-4-ol (14 – 15%), L-alfa-pineno (13%) e sabineno (10%). Esses compostos foram identificados majoritariamente no óleo essencial obtido das sementes e estudado por WAHAB et al. (2009), PIARU et al. (2011), PIRAS et al. (2012).

**Tabela 3.** Composição química do óleo essencial de *M. fragrans in natura* (livre) e do obtido a partir das nanoestruturas (NE)

Pico	Constituinte	Tempo de retenção (min)	Índice de Kovats calculado	Teor (%)	
				Livre Media ± SD	NE Media ± SD
1	$\alpha$ -Phellandrene	10,56	919	3,00 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,06 <sup>b</sup>
2	L- $\alpha$ -Pineno	10,84	926	13,73 ± 0,06 <sup>a</sup>	13,68 ± 0,28 <sup>a</sup>
3	(-)- $\beta$ -Pineno	12,48	966	24,56 ± 0,07 <sup>a</sup>	31,70 ± 0,46 <sup>b</sup>
4	Sabineno	12,64	970	10,13 ± 0,06 <sup>a</sup>	10,53 ± 0,09 <sup>a</sup>
5	Mirceno	13,22	984	1,77 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,07 ± 0,01 <sup>a</sup>
6	3-Careno	14,30	1010	1,38 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,58 ± 0,06 <sup>b</sup>
7	o-Cimeno	14,61	1018	3,42 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,01 ± 0,01 <sup>b</sup>
8	$\alpha$ -Limoneno	14,79	1022	7,55 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,82 ± 0,06 <sup>b</sup>
9	$\gamma$ -Terpineno	15,97	1052	7,69 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,82 ± 0,07 <sup>b</sup>
10	$\alpha$ - Terpinolen	17,04	1078	1,81 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,07 <sup>a</sup>
11	1-Terpinen-4-ol	20,68	1173	15,58 ± 0,07 <sup>a</sup>	14,47 ± 0,25 <sup>b</sup>
12	Terpineol	21,21	1187	0,50 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,0 <sup>a</sup>
13	Safrol	24,57	1281	1,16 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,95 ± 0,20 <sup>b</sup>
14	Miristicin	32,00	1509	1,45 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,19 <sup>b</sup>

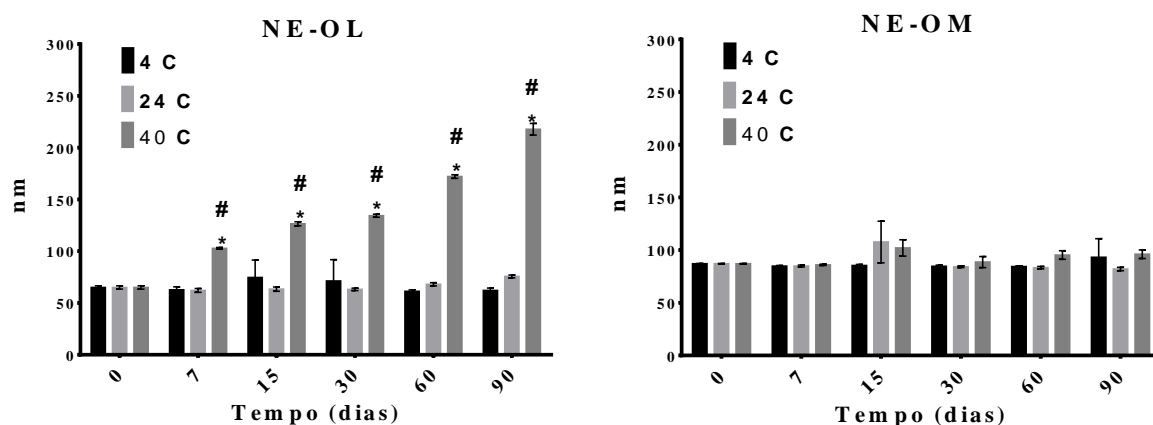
%, porcentagem relativa. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos entre amostra. Cada letra representa o tipo de amostra.

O processo de preparação das nanoestruturas e/ou o isolamento do óleo a partir das mesmas influenciou na quantificação dos compostos do óleo de noz-moscada. Esse resultado pode ser explicado a partir do tipo de composição do óleo pois *M. fragrans* que apresentou alto teor de monoterpenoides e sabe-se que esses compostos são mais susceptíveis à volatilização/degradação e à transformação em outros compostos (PÉRES – LÓPES et al. 2006).

## Estudo de estabilidade

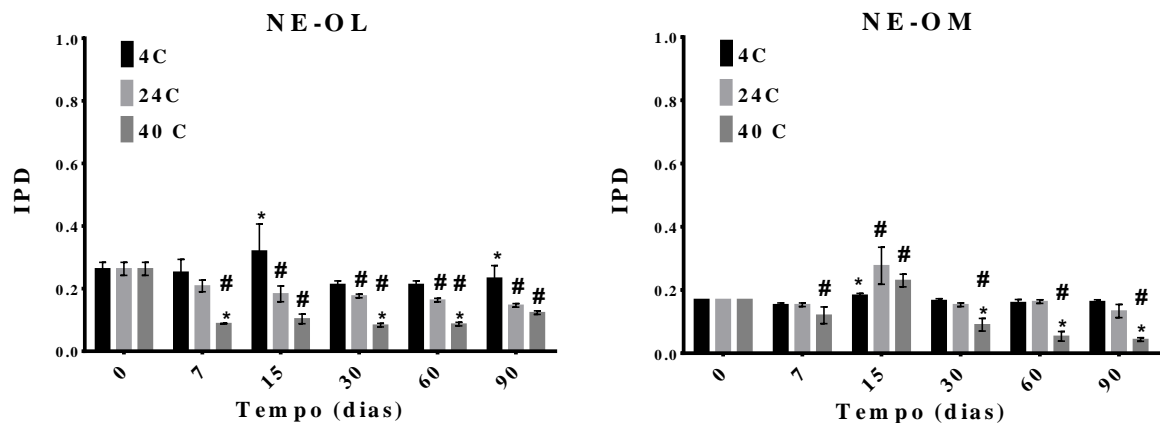
Sistemas coloidais como emulsões são termodinamicamente instáveis e devem, por isso, serem estudados em diferentes temperaturas por um período longo de armazenamento (TADROS et al. 2004). Assim, após a preparação das formulações NE-OL e NE-OM, alíquotas foram mantidas a 4, 24 e 40 °C por 90 dias e caracterizadas físico-quimicamente aos parâmetros de tamanho, índice de polidispersão, pH e composição do óleo.

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das gotículas são parâmetros importantes a serem avaliados pois podem indicar características de fenômenos de instabilidade das emulsões (SINGH et al. 2017). O tamanho médio da formulação NE-OL durante o estudo não sofreu alteração em temperaturas baixas (4 e 24 °C) ( $p > 0.05$ ) (Figura 1). Entretanto, em temperatura mais alta (40°C) o tamanho médio aumentou consideravelmente em todos os tempos avaliados quando comparado com a medida após a preparação ( $p < 0.05$ ). A medida média do diâmetro de gotícula quando avaliado nas mesmas condições para a formulação NE-MO apresentou-se estável durante o tempo de armazenamento ( $p > 0.05$ ). É importante considerar que sistemas constituídos por água, óleo e surfactante possuem uma barreira cinética que impedem que as fases alcancem o equilíbrio cinético e conseqüentemente o aumento do tamanho das gotículas. Esse fenômeno foi possível ser evidenciado somente nas formulações NE-OL a 40 °C e a temperatura pode ter influenciado na barreira cinética a partir das colisões resultantes à alta temperatura e subseqüentemente favorecendo o aumento do equilíbrio cinético e do tamanho das gotículas (HASHTJIN e ABBASI 2015).



**Figura 1.** Tamanho médio de gotícula das nanoemulsões dos óleos essenciais de *L. dentata* (NE-OL) e de *M. fragrans* (NE-OM) durante o armazenamento em temperatura ambiente (24°C), refrigeração (4°C) e câmara climática (40°C). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. # resultados comparados com as amostras em tempo zero. \* resultados comparados entre as condições de armazenamento no mesmo tempo de avaliação.

Outro parâmetro considerado para o estudo de estabilidade das formulações foi o índice de polidispersão (Figura 2). Esse índice permaneceu estável em condição de armazenamento a temperatura de 4°C para as formulações NE-OL e NE-OM durante o período de estudo ( $p > 0.05$ ). Além disso, NE-OL foi estável até 15 dias após a preparação na temperatura de 24°C ( $p > 0.05$ ) sendo que para essa mesma condição a formulação NE-OM apresentou variação para polidispersão apenas no tempo 15 dias ( $p < 0.05$ ). Na condição de 40°C de temperatura o índice variou e reduziu-se consideravelmente a partir da primeira semana para NE-OM e em todos tempos para NE-OL ( $p < 0.05$ ). A alteração na homogeneidade verificada pode ser resultante de fenômenos de instabilidade em sistemas que não se encontram em equilíbrio como as nanoemulsões (QADIR et al. 2016). A maturação de Ostwald é o principal mecanismo de instabilidade desses sistemas e acontece quando as menores gotículas se difundem molecularmente nas maiores, principalmente em temperaturas mais altas (TAYLOR, 1998). Após o estado de equilíbrio desses sistemas ser atingido, a distribuição de tamanho torna-se invariável obtendo uma polidispersibilidade reduzida com o tempo como foi possível ser evidenciado em temperaturas mais elevadas para ambas formulações nas últimas avaliações (TAYLOR, 2003).

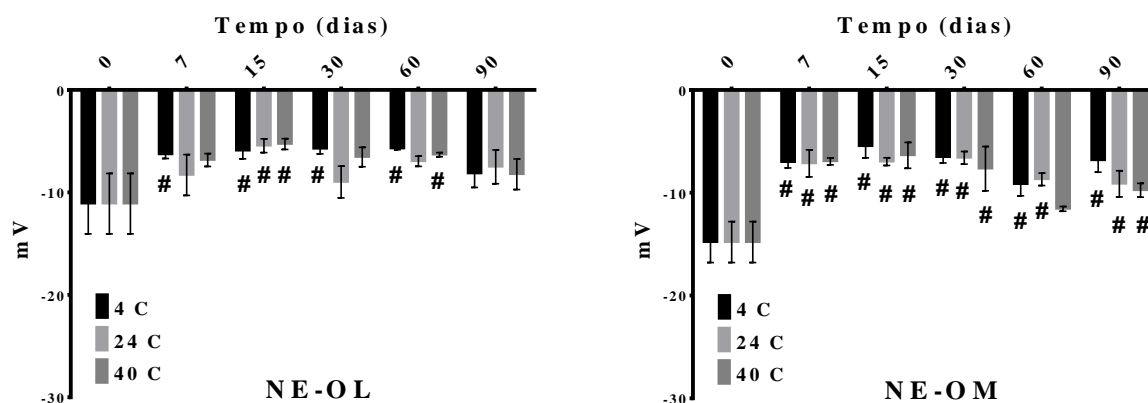


**Figura 2.** Polidispersão das nanoemulsões dos óleos essenciais de *L. dentata* (NE-OL) e de *M. fragrans* (NE-OM) durante o armazenamento em temperatura ambiente (24°C), refrigeração (4°C) e câmara climática (40°C). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. #resultados comparados com as amostras em tempo zero. \* resultados comparados entre as condições de armazenamento no mesmo tempo de avaliação.

O estudo das propriedades eletroforéticas das nanoemulsões avalia o desenvolvimento de fenômenos de instabilidade, como, por exemplo, a floculação e coalescência (SINGH et al. 2017). Para verificação desse possível fenômeno foi determinado o potencial zeta até 90 dias nas três diferentes condições de temperatura do estudo (4°C, 24°C e 40°C). A redução da carga, como verificado no presente estudo, pode diminuir a estabilidade das emulsões devido a redução das forças repulsivas entre as nanogotículas contra a floculação e a coalescência. Observa-se na figura 3 que houve uma redução significativa ( $p < 0.05$ ) do potencial zeta (valor absoluto) para as avaliações realizadas após a preparação para a formulação NE-OM nas três condições de armazenamento exceto no tempo de 60 dias à 40 °C ( $p > 0.05$ ). Quanto a formulação NE-OL o potencial zeta variou de acordo com o tempo e condição de armazenamento observando-se os seguintes aspectos: temperatura de refrigeração contribui para a redução da densidade da carga superficial das nanogotículas durante as avaliações ( $p < 0.05$ ) (exceto  $t=90$  dias); a temperatura ambiente favoreceu para a estabilidade desse parâmetro ( $p > 0.05$ ) (exceto  $t=15$  dias) e em temperatura mais alta (40 °C) o potencial permaneceu sem variações significativas após 7, 30 e 90 dias da preparação ( $p > 0.05$ ).

Segundo Schaffazick e colaboradores (2003) o potencial zeta é influenciado pelas mudanças na interface com o meio contínuo resultantes da dissociação de grupos de moléculas

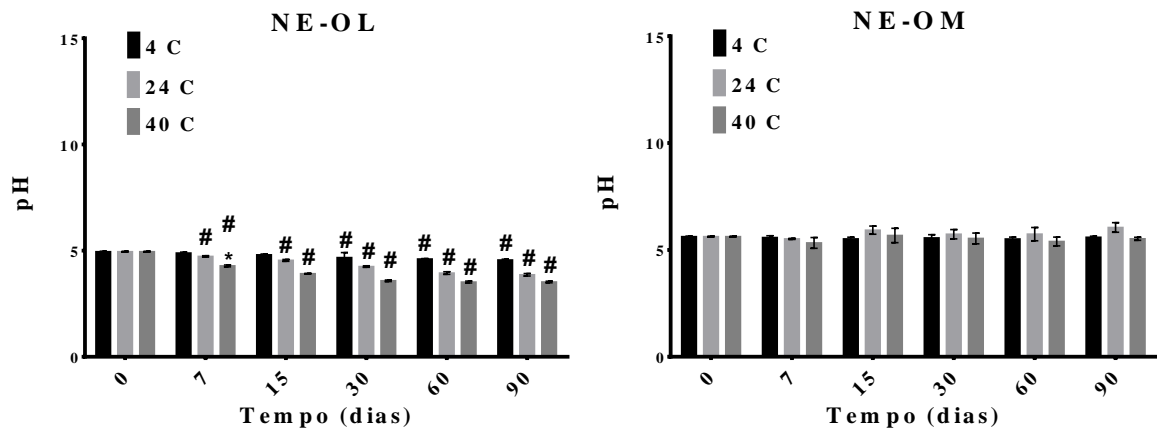
na superfície das nanoestruturas. Essas alterações são influenciadas pela concentração e tipo de surfactante e também pela temperatura como verificado nas formulações desenvolvidas, pois, as mesmas sofreram tensões térmicas o que pode provocar a formação de novos compostos capazes de induzir a desestabilização das emulsões (KUNDU et al. 2013).



**Figura 3.** Potencial zeta das nanoemulsões dos óleos essenciais de *L. dentata* (NE-OL) e de *M. fragrans* (NE-OM) durante o armazenamento em temperatura ambiente (24°C), refrigeração (4°C) e câmara climática (40°C). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. # resultados comparados com as amostras em tempo zero. \* resultados comparados entre as condições de armazenamento no mesmo tempo de avaliação.

O estudo de estabilidade do pH indicou redução de valores somente para a formulação NE-OL nas condições de refrigeração após 30 dias de preparação e em temperaturas mais altas durante o período de avaliação ( $p < 0.05$ ) (Figura 4). Esse decréscimo pode estar relacionado novamente com a mudança da interface das nanoemulsões resultando em maior contato do óleo com a fase aquosa e favorecendo a degradação de alguns de seus compostos e a sua volatilização como foi observado em temperaturas mais altas. Diferentemente, a formulação NE-MO permaneceu estável durante todo o estudo ( $p > 0.05$ ).





**Figura 4.** pH das nanoemulsões dos óleos essenciais de *L. dentata* (NE-OL) e de *M. fragrans* (NE-OM) durante o armazenamento em temperatura ambiente (24°C), refrigeração (4°C) e câmara climática (40°C). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. #resultados comparados com as amostras em tempo zero. \* resultados comparados entre as condições de armazenamento no mesmo tempo de avaliação.

Além disso, as diferenças observadas entre as formulações dos respectivos óleos corroboram com outros estudos no sentido de que a solubilidade do óleo na fase dispersa é um fator determinante para a estabilidade das nanoemulsões (RIOS et al. 1998).

Os componentes químicos dos óleos essenciais de *L. dentata* e de *M. fragrans* avaliados durante o estudo de estabilidade estão representados nas tabelas 4 e 5, respectivamente. Os compostos majoritários de *L. dentata* (1,8 cineol, fenchona, cânfora, alfa-pineno e sabineno) foram considerados para a análise da estabilidade sob condições de tempo (0 – 90 dias) e de temperatura (4, 24 e 40 °C). Em temperatura ambiente, foi possível observar que a nanoemulsão protegeu os níveis de cânfora contra a volatilização, pois se mantiveram, o que não se repetiu quando o óleo se encontrava na forma livre onde os níveis do composto se reduziram a zero. Em temperaturas de refrigeração e mais elevada (40°C) a quantificação dos compostos não demonstrou alteração significativa durante o estudo para o óleo na forma livre. Nessas mesmas condições de armazenamento quanto a formulação nanoestruturada, o nível de alfa - pineno sofreu variação ao final do estudo (90 dias). Os compostos 1,8 cineol e sabineno provenientes do óleo associado às nanoemulsões foram alteradas significativamente nas condições de refrigeração (t=30 dias) e de câmara climática (t=90 dias), respectivamente.

**Tabela 4.** Estabilidade do óleo essencial de *L. dentata* livre e do obtido a partir das nanoemulsões contendo o óleo no período de 0-90 dias

Constituinte	Condições	Tempo					
		Dia 0		Dia 30		Dia 90	
		Óleo livre	NE	Óleo livre	NE	Óleo livre	NE
<b><math>\alpha</math>-Pineno</b>	-	<b>2,76(A)</b>	<b>3,46(B)</b>				
	TA			<b>2,74</b>	<b>3,11</b>	<b>2,27</b>	<b>2,74</b>
	TR			<b>2,73</b>	<b>2,96</b>	<b>2,11</b>	<b>2,2<sup>B</sup></b>
	CC			<b>2,64</b>	<b>2,95</b>	<b>2,14<sup>B</sup></b>	<b>2,28<sup>B</sup></b>
<b>Campheno</b>	-	0,62	0,93				
	TA			0,66	0,73	0,45	0,49
	TR			0,63	0,57	0,32	0,5
	CC			0,55	0,66	-	0,62
<b><math>\beta</math>-Pineno</b>	-	0,38	0,50				
	TA			0,38	0,47	-	0,13
	TR			0,35	0,15	-	0,1
	CC			0,32	-	-	-
<b>Sabineno</b>	-	<b>3,99(A)</b>	<b>4,45(B)</b>				
	TA			<b>4,10</b>	<b>4,19</b>	<b>3,62</b>	<b>3,81</b>
	TR			<b>3,98</b>	<b>4,12</b>	<b>3,25</b>	<b>4,0</b>
	CC			<b>3,60</b>	<b>4,03</b>	<b>3,41<sup>B</sup></b>	<b>3,22<sup>B</sup></b>
<b>Mirceno</b>	-	0,44	0,55				
	TA			0,46	0,28	-	0,14
	TR			0,43	0,37	-	0,2
	CC			0,43	-	-	0,05
<b>Limoneno</b>	-	3,10	2,90				
	TA			2,94	2,76	2,53	1,60
	TR			2,90	3,13	2,44	3,1
	CC			2,44	2,71	1,66	2,07
<b>1,8-Cineol</b>	-	<b>50,73(A)</b>	<b>52,30(B)</b>				
	TA			<b>49,72</b>	<b>56,18</b>	<b>53,77</b>	<b>58,91</b>
	TR			<b>50,81</b>	<b>56,34<sup>A,B,b</sup></b>	<b>53,91</b>	<b>55,0<sup>A</sup></b>
	CC			<b>51,05</b>	<b>58,45</b>	<b>53,14</b>	<b>56,37</b>
<b>Fenchona</b>	-	<b>17,11(A)</b>	<b>16,43(B)</b>				
	TA			<b>16,33</b>	<b>16,20</b>	<b>17,45</b>	<b>15,71</b>
	TR			<b>17,00</b>	<b>17,18</b>	<b>17,44</b>	<b>16,7</b>
	CC			<b>16,67</b>	<b>16,54</b>	<b>17,80<sup>B</sup></b>	<b>17,25</b>
<b>Fenchol</b>	-	2,72	2,41				
	TA			2,86	2,27	2,56	1,68
	TR			2,71	1,62	2,61	2,3
	CC			2,75	2,03	3,10	2,26
<b>Cânfora</b>	-	<b>15,18(A)</b>	<b>13,47(B)</b>				
	TA			<b>16,01<sup>a</sup></b>	<b>12,38<sup>b</sup></b>	<b>-<sup>A,B,a</sup></b>	<b>12,92</b>
	TR			<b>15,46<sup>a</sup></b>	<b>12,61<sup>b</sup></b>	<b>16,23</b>	<b>14,1</b>
	CC			<b>16,58<sup>a</sup></b>	<b>11,87<sup>b</sup></b>	<b>16,96<sup>a</sup></b>	<b>13,89<sup>b</sup></b>
<b>L-borneol</b>	-	0,51	0,42				
	TA			0,63	-	15,98	0,28
	TR			0,52	-	-	-
	CC			0,53	-	-	0,24

Condições de armazenamento: TA: temperatura ambiente (24 ° C); TR: temperatura de refrigeração (4 ° C); CC: câmara climática (40 ° C e 65% de umidade). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de duas vias, seguida de análise post hoc: diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre amostra e tempo zero são indicadas por letras maiúsculas; entre amostras no mesmo tempo por letras minúsculas. Cada letra representa o tipo de amostra.

A avaliação de estabilidade da composição química do óleo de *M. fragrans* foi realizada considerando as condições e tempos de armazenamento do presente estudo com os seguintes constituintes majoritários: alfa-pineno, beta-pineno, alfa-limoneno, sabineno e gama-terpineno. Verificou-se significativas variações dos compostos beta-pineno, alfa-limoneno e gama-terpineno na forma livre quando comparado com as nanoemulsões em condições de refrigeração. Nas condições de temperatura ambiente verificou-se a instabilidade dos compostos majoritários (beta-pineno, alfa -limoneno, sabineno e gama-terpineno) do óleo na forma livre o que não aconteceu com alfa pineno do óleo livre e para todos os constituintes principais provenientes do óleo nanoemulsionado. Quanto a avaliação na condição de câmara climática, alfa-pineno, beta-pineno, alfa-limoneno, sabineno e gama-terpineno provenientes do óleo livre foram instáveis até ao final do período de estudo. Nessa condição de temperatura mais elevada a formulação NE-OM protegeu todos os compostos majoritários por 30 dias e por 90 dias os compostos alfa-pineno e alfa-limoneno.

**Tabela 5.** Estabilidade do óleo essencial de *M. fragrans* livre e obtido das nanoemulsões contendo o óleo no período de 0-90 dias.

Constituinte	Condições	Time					
		Dia 0		Dia 30		Dia 90	
		Óleo livre	NE	Óleo livre	NE	Óleo livre	NE
<b><math>\alpha</math>-Phellandreno</b>	-	3,00	2,35				
	TA			2,33	2,46	2,87	2,22
	TR			2,33	2,86	3,28	2,42
	CC			2,33	2,54	1,88	1,84
<b>L-<math>\alpha</math>-Pineno</b>	-	13,73(A)	13,68(B)				
	TA			13,22	13,61	14,22	12,65
	TR			13,2	15,03	14,61	13,48
	CC			13,22 <sup>a</sup>	14,39 <sup>b</sup>	12,30 <sup>A,B,a</sup>	13,42 <sup>b</sup>
<b>(-)-<math>\beta</math>-Pineno</b>	-	24,56(A)	31,70(B)				
	TA			28,68 <sup>A,B,a</sup>	31,29 <sup>A,b</sup>	- <sup>A</sup>	30,26 <sup>A</sup>
	TR			28,68 <sup>A</sup>	32,68	29,37 <sup>A</sup>	31,32
	CC			28,68 <sup>A,B</sup>	30,36 <sup>A</sup>	24,40 <sup>B,a</sup>	28,17 <sup>A,B,b</sup>
<b>Sabineno</b>	-	10,13(A)	10,53(B)				
	TA			10,43	10,75	9,21 <sup>A</sup>	10,99
	TR			10,43	11,61	9,91	10,98 <sup>A,b</sup>
	CC			10,43 <sup>a</sup>	11,17 <sup>A,B,b</sup>	9,55 <sup>A,B,a</sup>	11,84 <sup>A,b</sup>
<b>Mirceno</b>	-	1,77	2,07				
	TA			1,82	2,03	1,76	2,23
	TR			1,82	2,20	2,22	2,27
	CC			1,82	1,89	1,01	1,74
<b>3-Careno</b>	-	1,38	3,58				
	TA			3,32	3,80	1,54	3,53
	TR			3,32	4,05	4,40	4,01
	CC			3,32	3,58	-	1,52
<b>o-Cimeno</b>	-	3,42	2,01				
	TA			2,68	2,50	6,44	2,50

	TR			2,68	2,40	3,46	2,58
	CC			2,68	2,52	3,45	1,90
<b><math>\alpha</math>-Limoneno</b>	-	<b>7,55(A)</b>	<b>4,82(B)</b>				
	TA			3,74 <sup>A,B</sup>	4,46	5,84 <sup>B,a</sup>	6,05 <sup>A,b</sup>
	TR			3,74 <sup>A</sup>	5,28 <sup>A</sup>	7,17	4,83
	CC			3,74 <sup>A</sup>	4,27 <sup>A</sup>	- <sup>A,B,a</sup>	6,00 <sup>b</sup>
<b><math>\gamma</math>-Terpineno</b>	-	<b>7,69(A)</b>	<b>5,82(B)</b>				
	TA			5,15 <sup>A,B</sup>	5,84 <sup>A</sup>	3,06 <sup>A,B,a</sup>	6,01 <sup>A,b</sup>
	TR			5,15 <sup>A,B,a</sup>	5,57 <sup>A,b</sup>	0,20 <sup>A,B,a</sup>	6,09 <sup>A,b</sup>
	CC			5,15 <sup>A,B,a</sup>	5,74 <sup>A,b</sup>	- <sup>A,B,a</sup>	4,89 <sup>A,B,b</sup>
<b><math>\alpha</math>-Terpinolen</b>	-	1,81	1,64				
	TA			1,44	1,73	1,11	1,72
	TR			1,44	1,60	0,18	1,84
	CC			1,44	1,67	2,81	1,33
<b>1-Terpinen-4-ol</b>	-	15,58	14,47				
	TA			16,08	14,35	11,17	15,51
	TR			16,08	10,24	0,88	13,23
	CC			16,08	14,75	1,61	20,83
<b>Terpineol</b>	-	0,50	0,45				
	TA			0,60	0,30	0,79	0,33
	TR			0,60	0,36	-	0,12
	CC			0,60	0,34	4,47	0,53
<b>Safrol</b>	-	1,16	1,95				
	TA			2,22	1,55	2,60	1,48
	TR			2,22	1,18	-	1,17
	CC			2,22	1,37	4,52	1,76
<b>Miristicin</b>	-	1,45	0,13				
	TA			1,58	-	2,33	-
	TR			1,10	0,19	-	-
	CC			1,58	-	4,69	-

Condições de armazenamento: TA: temperatura ambiente (24 ° C); TR: temperatura de refrigeração (4 ° C); CC: câmara climática (40 ° C e 65% de umidade). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de duas vias, seguida de análise post hoc: diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre amostra e tempo zero são indicadas por letras maiúsculas; entre amostras no mesmo tempo por letras minúsculas. Cada letra representa o tipo de amostra.

Os óleos essenciais por serem constituídos por compostos voláteis, principalmente monoterpénoides, são amplamente instáveis em algumas condições de armazenamento. De acordo com os resultados obtidos, a nanoemulsão foi capaz de proteger os compostos majoritários conservando-os quanto a composição e quantificação química, principalmente, do óleo de *M. fragrans* nas 3 condições do presente estudo. Porém, esse resultado não se repetiu para a formulação LO-NE nas condições de temperaturas baixa (4°C) e elevada (40°C). Esse efeito pode estar relacionado com mudança de interface óleo/água durante o armazenamento como foi verificado nos resultados físico-químicos da formulação e discutidos anteriormente. A alteração da estrutura da nanoemulsão permite que os compostos fiquem mais expostos a processos de instabilidade como hidrogenação, oxidação e perda de massa (volatilização) além da interação química com o surfactante (DAVIDOV-PARDO et al. 2015). Foi verificado uma instabilidade química dos compostos do óleo de *L. dentata* proveniente da nanoemulsão em

temperatura ambiente o que pode ser devido a oxidação dos compostos que ficaram potencialmente adsorvidos na superfície das nanoestruturas (HASANI et al. 2018).

Em adição, é importante considerar a natureza química dos constituintes para o processo de decomposição térmica ou volatilização dos óleos. DUCE e colaboradores (2017) observaram a partir de análise cinética de evaporação, uma sequência de tendência crescente de instabilidade térmica para os compostos cânfora, óleo essencial de lavanda e 1,8 cineol. Os autores atribuíram esses resultados a diferentes pressões de vaporização e ponto de ebulição.

Cabe salientar que o aumento de alguns compostos seguidos pela redução de outros durante o armazenamento como verificado no presente estudo é dependente de condições de estocagem além da natureza da constituição química do óleo. O aumento obtido da concentração de 1,8 cineol pode ser explicado como resultado de rearranjos moleculares e da conversão de ésteres em compostos fenólicos (1,8 cineol) contribuindo também para o declínio do pH durante o armazenamento (SKÖLD et al. 2004). Esse aumento de concentração foi verificado pelo presente estudo para o óleo *in natura* e também associado as nanoemulsões bem como a redução do pH para a formulação NE-OL. Essa redução de pH verificada corrobora com o resultado de TUREK e STINTZING (2012) para o óleo de Lavanda em diferentes condições (23 e 38 °C sob luz branca ou não) que atribuiu o efeito à oxidação.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos verificou-se a viabilidade tecnológica para a preparação das nanoemulsões contendo o óleo essencial de *L. dentata* e de *M. fragrans* para compor a fase oleosa. Além disso, o estudo de estabilidade revelou que as nanoestruturas protegeram o óleo essencial de *Myristica fragrans* em diferentes condições de temperaturas avaliadas. Este fato é importante visto que a estabilidade do óleo favorece uma maior atividade terapêutica, além da administração mais segura e conveniente (menor número de doses necessárias). O bom desempenho verificado para a formulação de NE-OM desenvolvida neste trabalho, configura-se, assim, como uma nova plataforma para a estabilidade do óleo essencial e para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos.

## REFERÊNCIAS

- Abourashed, EA, El-Alfy, AT. 2016. **Chemical diversity and pharmacological significance of the secondary metabolites of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.)**. *Phytochemistry Reviews*, 15: 1035–1056.
- Acevedo-Fani A, Soliva-Fortuny, R, Martín-Belloso, O. 2017. **Nanostructured emulsions and nanolaminates for delivery of active ingredients: Improving food safety and functionality**. *Trends in Food Science & Technology*, 60: 12-22.
- Adams, RP. 2009. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured Publishing Corporation, 4th ed. Carol Stream, EUA.
- Asbahani, AE, Miladi K, Badri W, Sala, M, Aït Addi, EH, Casabianca, H, Mousadik, AE, Hartmann D, Jilale, A, Renaud, FNR, Elaissari, A. 2015. **Essential oils: From extraction to encapsulation**. *International Journal of Pharmaceutics*, 483: 220-243.
- Aprotosoai, AC, Gille, E, Trifan, A, Luca, VS, Miron, A. 2017. **Essential oils of *Lavandula* genus: a systematic review of their chemistry**. *Phytochemistry Reviews*, 16: 761–799.
- Bousmaha, L, Boti, JB, Bekkara, FA, Castola, V, Casanova, J. 2006. **Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria**. *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 368–372.
- Bilia, AR, Guccione, C, Isacchi, B, Righeschi, C, Firenzuoli, F, Bergonzi, MC. 2014. **Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014: 1-14.
- Cossetin, LF, Santi, EMT, Cossetin JF, Dillmann, JB, Baldissera, MD, Garlet QI, De Souza, TP, Loebens, L, Heinzmann, BM, Machado MM, Monteiro, SG. 2018. ***In vitro* Safety and Efficacy of Lavender Essential Oil (Lamiales: Lamiaceae) as an Insecticide Against Houseflies (Diptera: Muscidae) and Blowflies (Diptera: Calliphoridae)**. *Journal of Economic Entomology*, 111: 1974–1982.
- Davidov-Pardo, G, Joye, IJ, McClements, DJ. 2015. **Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 1: Preparation and characterization**. *Food Hydrocolloids*, 45: 309-316.
- De Godoi, SN, Quatrin, PM, Sagrillo, MR, Nascimento, K, Wagner, R, Klein, B, Santos, RCV, Ourique, AF. 2017. **Evaluation of Stability and *In Vitro* Security of Nanoemulsions Containing *Eucalyptus globulus* Oil**. *BioMed Research International*, 2017: 1-10.
- Dima, C, Dima, S. 2015. **Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity**. *Current Opinion in Food Science*, 5: 29-35.
- Duce, C, Cipriotti, SV, Spepi, A, Bernazzani, L, Tinè, MR. 2017. **Vaporization kinetic study of lavender and sage essential oils**. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 130: 595–604.

Imelouane, B, Elbachiri, A, Wathelet, J, Dubois, J, Amhamdi, H. 2010. **Chemical Composition, Cytotoxic and Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Lavandula dentata***. World Journal of Chemistry, 2:103-110.

Ishaka, A, Imam, MU, Mahamud, R, Zuki, ABZ, Maznah, I. 2014. **Characterization of rice bran wax policosanol and its nanoemulsion formulation**. International Journal of Nanomedicine, 9: 2261–2269.

Hashtjin, AM, Abbasi, S. 2015. **Optimization of ultrasonic emulsification conditions for the production of orange peel essential oil nanoemulsions**. Journal of Food Science and Technology, 52: 2679–2689.

Hasani, S, Ojagh, SM, Ghorbani, M. 2018. **Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: Study on its physical and structural characteristics**. International Journal of Biological Macromolecules, 115:143–151.

Isman, MB. 2000. **Plant essential oils for pest and disease management**. Crop Protection, 19 603-608.

Kundu, P, Agrawal, A, Mateen, H, Mishra, IM. 2013. **Stability of oil-in-water macro-emulsion with anionic surfactant: Effect of electrolytes and temperature**. Chemical Engineering Science, 102: 176–185.

Liu, W, Sun, D, Li, C, Liu, Q, Xu, J. 2006. **Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method**. Journal of Colloid and Interface Science, 303: 557–563.

Marinova, KG, Alargova, RG, Denkov, ND, Velev, OD, Petsev, DN, Ivanov, IB., Borwankar, RP. 1996. **Charging of Oil-Water Interfaces Due to Spontaneous Adsorption of Hydroxyl Ions**. Langmuir, 12: 2045-2051.

Mostefa, MB, Kabouche, A, Abaza, I, Aburjai, T, Touzani, R, Kabouche, Z. 2014. **Chemotypes investigation of *Lavandula* essential oils growing at different North African soils**. Journal of Materials and Environmental Science, 6: 1896-1901.

**NIST/EPA/NIH mass spectral library and search/analysis program**. 2008. John Wiley & Sons, Hoboken, USA.

Piaru, SP, Mahmud, R, Majid, AMSA, Ismailb, S, Manc, CN. 2012. **Chemical composition, antioxidant and cytotoxicity activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia***. Journal of the Science of Food and Agriculture, 92: 593–597.

Piras, A, Rosa, A, Marongiu, B, Atzeri, A, Dessì, MA, Falconieri, D, Porcedda, S. 2012. **Extraction and separation of volatile and fixed oils from seeds of *Myristica fragrans* by supercritical CO<sub>2</sub>: chemical composition and cytotoxic activity on Caco-2 cancer cells**. Journal of Food Science, 4: 448-453.

Prakash, B, Kedia, A, Mishra, PK, Dubey, NK. 2015. **Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities e Potentials and challenges**. Food control, 47: 381-391.

Qadir, A, Faiyazuddinb, MD, Hussain, MDT, Alshammari, TM, Shakeel, F. 2016. **Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion.** Journal of Molecular Liquids, 214: 7–18.

Rios, G, Pazos, C, J, Coca. 1998. **Destabilization of cutting oil emulsions using inorganic salts as coagulants.** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 138: 383–389.

Santos, MRV, Moreira, FV, Fraga, BP, De Sousa, DP, Bonjardim, LR, Quintans-Junior, LJ. 2011.

**Cardiovascular effects of monoterpenes: a review.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, 21: 764-771.

Schaffazick, SR, Freitas, LL, Pohlmann, AR, Guterres, SS. 2013. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** Química Nova, v: 726-737.

Singh, Y, Meher, JG, Raval, K, Khan, FA, Chaurasia, M, Jain, NK, Chourasia, MK. 2017. **Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery.** Journal of Controlled Release, 252: 28–49.

Sköld, M, Börje, A, Harambasic, E, Karlberg, A-T. 2004. **Contact allergens formed on air exposure of linalool. Identification and quantification of primary and secondary oxidation products and the effect on skin sensitization.** Chemical Research in Toxicology, 17:1697–705.

Tadros, T, Izquierdo, P, Esquena, J, Solans, C. 2004. **Formation and stability of nano-emulsions.** Advances in Colloid and Interface Science, 108 –109: 303–318.

Taylor, P. 1998. **Ostwald ripening in emulsions.** Advances in Colloid and Interface Science, 75: 107-163.

Taylor, P. 2003. **Ostwald ripening in emulsions: estimation of solution thermodynamics of the disperse phase.** Advances in Colloid and Interface Science, 106: 261–285.

Turek, C, Stintzing, FC. 2012. **Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils.** Food Research International, 46: 341–353.

Wahab, A, Haq, RU, Ahmed, A, Khan, RA, Raza, M. 2009. **Anticonvulsant Activities of Nutmeg Oil of Myristica fragrans.** Phytotherapy Research, 23: 153 –158.



**5 MANUSCRITO 3 – NANOEMULSÕES DE OLEOS ESSENCIAIS DE *Lavandula dentata* E DE *Myristica fragrans*: ATIVIDADE INSETICIDA EM *Musca domestica* E *Chrysomya albiceps***

Manuscrito a ser submetido

**NANOEMULSÕES DE OLEOS ESSENCIAIS DE *Lavandula dentata* E DE *Myristica fragrans*: ATIVIDADE INSETICIDA EM *Musca domestica* e *Chrysomya albiceps***

Luciana F. Cossetin<sup>1,4</sup>, Pauline Da Costa<sup>2</sup>, Maiara Callegaro Velho<sup>3</sup>, Samanta Gündel<sup>3</sup>, Luana Saraiva<sup>1</sup>, Eduarda M. T. Santi<sup>1</sup>, Antônio F. I. M. Matos<sup>1</sup>, Aline F. Ourique<sup>3</sup>, Vera Maria Morsch<sup>2</sup>, Sílvia G. Monteiro<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup>Departamento Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, <sup>2</sup>Departamento Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, <sup>3</sup>Universidade Franciscana, Santa Maria, Brasil, Universidade Federal de Santa Maria e autor correspondente<sup>4</sup>.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade inseticida das plantas *Lavandula dentata* e *Myristica fragrans* em formulações nanotecnológicas e livres frente a *M. domestica* e *C. albiceps* - importantes vetores de doenças infecciosas. Adicionalmente, com a finalidade de determinar o mecanismo de ação inseticida, foi avaliado o efeito de inibição dos bioprodutos bem como as nanoestruturas sobre a enzima acetilcolinesterase dos insetos tratados. Para tal, nanoemulsões do óleo essencial de *M. fragrans* (NE-OM) e de *L. dentata* (NE-OL) contendo os óleos a 5% foram preparadas por emulsificação sob alta agitação. Posteriormente, as formulações foram avaliadas quanto as suas propriedades larvicida, pelo método de imersão, e adulticida, a partir dos métodos de aplicação tópica e exposição ao papel impregnado. Nanoemulsões de *M. fragrans* a 5% foram mais efetivas em larvas de *M. domestica* (40% de mortalidade). Os resultados para o ensaio adulticida indicaram que as nanoemulsões promoveram um efeito inseticida. No método de exposição ao papel impregnado, NE-OM 5% foi eficaz para ambas espécies de inseto (100% de mortalidade) sendo que NE-OL 5% foi eficaz em *C. albiceps*. Para o ensaio de aplicação tópica o efeito foi dependente do tipo de óleo nanoemulsionado e espécie de inseto: NE-OM 5% foi tóxico topicamente para *C. albiceps* enquanto que NE-OL 5% eliminou 50% das *M. domestica*. A partir dos estudos inibitórios na enzima acetilcolinesterase *in vitro* foi possível observar uma atividade inseticida relacionada com a inibição para a enzima, principalmente para os ensaios realizados em larvas e adultos tratados topicamente demonstrando possivelmente ser esse um dos mecanismos de ação tóxica dos óleos. Tendo em vista tais resultados, nanoemulsões de *M. fragras* e de *L. dentata* constituem uma alternativa para o controle de *M. domestica* e *C. albiceps*.

Palavras-chaves: Noz-moscada. Lavanda. Nanotecnologia. Controle de insetos.

## 1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças infecciosas são transmitidas a partir da vetorização de seus patógenos por insetos. Devido a isso, esses animais são considerados como importantes pragas para a saúde pública humana (KHAMESIPOUR et al. 2018). Dentre esses, *Musca domestica* e *Chrysomya albiceps* têm sido relatados como transportadores mecânicos de bactérias, protozoários, helmintos e vírus; muitos desses patógenos, são responsáveis, por produzirem doenças intestinais (MALDONADO e CENTENO 2003; SUKONTASON et al. 2007).

O controle de *C. albiceps* e *M. domestica* é realizado a partir do uso de substâncias químicas como piretróides e organofosforados visando o estágio adulto do inseto (ABBAS et al. 2013) e devido a aplicação intensa e irregular dessas substâncias muitos insetos, entre eles a mosca comum, desenvolveram resistência, sendo difícil a eliminação (KOSTAROPOULOS et al. 2001; GNANKINÉ e BASSOLÉ 2017). Vários estudos têm demonstrado o uso dos inseticidas químicos relacionados com riscos ambientais e toxicidade ao homem e nesse sentido, há um crescente interesse por substâncias naturais como alternativa aos inseticidas convencionais (MALIK et al. 2007; ROY et al. 2016).

Os óleos essenciais (OEs) bem como seus constituintes, principalmente os terpenos, são considerados como potentes agentes no controle de vários insetos em virtude da sua seletividade e efeitos mínimos ambientais (WALIA et al. 2017). Esses produtos apresentam atividade tóxica por contato e por fumigação aos insetos adultos, além de efeito anti-alimentar, inibidor do crescimento, ovicida e larvicida (ZOUBIRI e BAALIOUAMER 2014).

Os óleos essenciais de *L. dentata* e *M. fragrans* foram estudados anteriormente para a atividade inseticida em *M. domestica* e *C. albiceps* pelo nosso grupo de pesquisa. Os bioprodutos apresentaram efeito adulticida para ambos insetos por dois métodos de avaliação: toxicidade por contato e exposição ao papel impregnado contendo os óleos em diferentes concentrações. Adicionalmente, verificou-se a ação larvicida dos óleos em *M. domestica* (COSSETIN et al. 2018). No entanto, a volatilidade, o odor forte e a insolubilidade na água desses compostos continuam sendo como fatores limitantes para o uso dos óleos essenciais (SUGUMAR et al. 2016).

Considerando as características relacionadas à utilização de óleos essenciais e o uso da nanotecnologia como uma alternativa para contornar os problemas de volatilidade e reduzida solubilidade desses produtos, recentemente nosso grupo de pesquisa desenvolveu nanoemulsões de *L. dentata* e de *M. fragrans*. As formulações possibilitaram aumentar a estabilidade dos

óleos essenciais durante o armazenamento em temperatura ambiente e de refrigeração por 90 dias, principalmente para *M. fragrans*.

Assim, com base nas vantagens fornecidas a partir de sistemas nanoestruturados e da viabilidade verificada para a produção das nanoemulsões de *L. dentata* e *M. fragrans*, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade inseticida (estágio adulto e larval) das formulações contendo os óleos livres e nanoemulsionados em *M. domestica* e em *C. albiceps*. Além disso, foi avaliado o efeito inibitório *in vitro* desses óleos essenciais livres e nanoestruturados sobre a atividade da acetilcolinesterase (ACE) dos insetos a fim de explorar o mecanismo de ação dos óleos e a forma de exposição com a atividade inseticida.

## 2 MATERIAL E METODOS

### 2.1 MATERIAL

Os óleos essenciais de *M. fragrans* e de *L. dentata* foram obtidos por hidrodestilação e caracterizados de acordo com COSSETIN et al. (2018) e como descrito no capítulo 3. Monooleato de Sorbitano (Span 80®) foi adquirido da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Polissorbato 80 (Tween 80®) foi obtido da LabSynth® (São Paulo, Brasil). Mistura de triglicerídeos capríco/caprílico foi adquirido da Alpha Química Ltda. (Porto Alegre, Brasil).

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Preparação das nanoemulsões

Nanoemulsões contendo óleo essencial (50 mg/mL) de *L. dentata* (NE-OL) e de *M. fragrans* (NE-OM) foram preparadas por emulsificação sob alta agitação com resfriamento (DE GODOI et al., 2017).

#### 2.2.2 Bioensaios

##### Manutenção das colônias

*M. domestica* e *C. albiceps* foram usadas para avaliar a atividade inseticida das formulações NE-OL e NE-OM. Os insetos foram criados em gaiolas entomológicas à  $23 \pm 1$  °C e 70% de umidade relativa com um fotoperíodo de 12:00 h. A alimentação consistiu de mel e água para os adultos e de ração pastosa comercial de carne como substrato para as larvas. As gerações posteriores foram formadas a partir da indução da oviposição com carne pastosa comercial e fígado bovino para *M. domestica* e *C. albiceps*, respectivamente.

### **Bioensaio larvicida**

A atividade das formulações NE-OL e NE-OM contra as larvas *M. domestica* e *C. albiceps* foi realizada utilizando a metodologia preconizada por COSSETIN et al. (2018). Tubos de ensaio foram utilizados para a imersão de 20 larvas (triplicata) em diferentes concentrações (1, 2.5 e 5%) do óleo livre ou emulsionado durante 5 minutos. Polissorbato 80 a 1% utilizado na preparação das diferentes dosagens de óleo e nanoemulsões brancas foram usados como controle negativo. Diazinon (2%) foi usado como controle positivo.

### **Bioensaios adulticida**

A ação adulticida de NE-OL e NE-OM foi avaliada a partir dos métodos de aplicação superficial e por exposição ao papel impregnado contendo os bioprodutos como descritos por COSSETIN e colaboradores (2018). Para efeitos comparativos o óleo livre também foi avaliado.

#### *Método por aplicação tópica*

Para avaliação do efeito tóxico por contato, 3  $\mu$ L dos tratamentos foram aplicadas sobre o toráx de 10 moscas (5 – 7 dias após a imersão do adulto) previamente anestesiadas (90 segundos em temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Os tratamentos consistiram das diferentes concentrações do óleo livre e nanoemulsionado (1, 2.5 e 5%), organofosforado Diazinon (2%; p/v) como controle positivo e polissorbato 80 (1%; p/v), nanoemulsões brancas usados como controle negativo. Em tempos predeterminados (15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos) foi avaliada a mortalidade das moscas.

#### *Método por exposição ao papel impregnado*

O efeito tóxico por fumigação dos insetos foi avaliado em placas de petri contendo papel impregnado com os tratamentos a partir da exposição de 20 moscas (5 – 7 dias após a imersão do adulto), em triplicata. As dosagens do óleo livre e emulsionado impregnadas no papel foram de 10, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Alíquotas das soluções contendo o óleo livre (1, 2.5, 5 %; p/v) foram preparadas com o tensoativo polissorbato 80 (1%; p/v). Todos os tratamentos foram aplicados em discos de papéis deixando-os expostos ao ambiente por 15 minutos previamente ao ensaio. Após, os dípteros foram avaliados quanto ao efeito adulticida em tempos predeterminados (15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos). Como controle positivo, foi usado o organofosforado diazinon (2%; p/v) e como controle negativo o polissorbato 80 (1%; p/v) e nanoemulsões brancas.

### **Efeito na inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase**

As moscas (n=10, em triplicata) usadas após os bioensaios adulticidas e larvicida foram armazenadas a -20 °C até a dosagem da atividade enzimática. Inicialmente, as os insetos foram homogeneizados em tampão fosfato salino que foi centrifugado à 1000 FCR por 20 minutos para a obtenção do sobrenadante utilizado para a avaliação da acetilcolinesterase. A concentração de proteína do homogeneizado das moscas controle e tratadas foi analisada pelo método Bradford (1976). A atividade da acetilcolinesterase do homogeneizado das moscas foi mensurada de acordo com o método de Ikezawa e Taguchi (1981) com algumas modificações. 25µl do homogeneizado foram misturados com 225µl de tampão fosfato salino, 25µl de 10mM 5,5'-dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) e 25µl de 12.5mM acetilcolina iodada que atuou como substrato. A densidade óptica foi medida em 412 nm e expressa em mmol de AcSCh/h/mg de proteína.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Ensaio larvicida**

O efeito larvicida das formulações NE-OL e NE-OM foi estudado a partir da imersão das larvas *M. domestica* e *C. albiceps*. No ensaio, comparou-se as diferentes concentrações do óleo na forma livre e das nanoemulsões com os controles. Os resultados do bioensaio estão expressos nas tabelas 1 e 2. O efeito larvicida entre os tratamentos foi observado em *M. domestica* (F=25.36; p<0.0001) e em *C. albiceps* (F=16.56; p<0.0001) quando realizou-se o ensaio com o óleo essencial de *M. fragrans* (tabela 1).

Observou-se que a nanoemulsão contendo o óleo essencial de *M. fragrans* 5% causou a mortalidade de aproximadamente 50% das larvas de *M. domestica*. De acordo com Montenegro e colaboradores (2006), produtos naturais são parcialmente promissores quando causam a morte de mais de 50% das larvas após o tratamento, o que sugere que NE-OM 5% classifica-se como um produto parcialmente promissor para aplicação larvicida. O óleo essencial livre à 5% apresentou considerável atividade larvicida para *M. domestica*. Não houve mortalidade significativa para os grupos controles Tween 80 1% (CN) e nanoemulsões brancas (NEB).

**Tabela 1.** Efeito do óleo essencial de *M. fragrans* livre (OM) e nanoemulsionado (NE-OM), do tratamento controle negativo (CN; NEB) e positivo (CP) após a imersão de larvas de terceiro estágio de *C. albiceps* e *M. domestica*, (n=10, em triplicata para cada grupo; média ± DP).

Tratamentos	Número de larvas mortas		Número de pupas		Número de adultos emergidos	
	<i>C. albiceps</i>	<i>M. domestica</i>	<i>C. albiceps</i>	<i>M. domestica</i>	<i>C. albiceps</i>	<i>M. domestica</i>
<b>CN (a)</b>	0,67±0,94	0,00±0,00	9,33±0,58	10,00±0,00 <sup>f,i</sup>	8±0,81 <sup>c</sup>	8,00±1,00 <sup>e,f</sup>
<b>NEB (b)</b>	2,00±0,00	1,67±0,58	8,00±0,00	7,33±1,15 <sup>f</sup>	8±0 <sup>c</sup>	8,33±0,58 <sup>e,f</sup>
<b>CP (c)</b>	9,00±0,00 <sup>a,b</sup>	10,00±0,00 <sup>a,b</sup>	1,00±0,00 <sup>a,b</sup>	0±0 <sup>a,b</sup>	0±0 <sup>a,b</sup>	0,00±0,00 <sup>a,b</sup>
<b>OM 1 % (d)</b>	0,67±0,94 <sup>c</sup>	0,33±0,58 <sup>c,f,i</sup>	9,33±1,15 <sup>c</sup>	9,67±0,58 <sup>c,f,i</sup>	7±1,63 <sup>c</sup>	7,67±1,15 <sup>c,e,f</sup>
<b>OM 2.5% (e)</b>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	3,33±1,52 <sup>c,f</sup>	10,00±0,00 <sup>c</sup>	6,67±1,53 <sup>c,f</sup>	7±1,41 <sup>c</sup>	3,00±2,65 <sup>d</sup>
<b>OM 5% (f)</b>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	9,00±1,00 <sup>c,d,e,g,h,i</sup>	9,67±0,58 <sup>c</sup>	1±1 <sup>d,e,g,h,i</sup>	7,33±2,05 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>d,g,h,i</sup>
<b>NE-OM 1% (g)</b>	0,67±0,47 <sup>c</sup>	2,00±1,00 <sup>c,f</sup>	9,33±0,58 <sup>c</sup>	8±1 <sup>c,f</sup>	8,33±0,94 <sup>c</sup>	4,67±1,15 <sup>c,f</sup>
<b>NE-OM 2.5% (h)</b>	2,00±2,82 <sup>c</sup>	3,33±2,08 <sup>c,f</sup>	7,67±3,21 <sup>c</sup>	6,67±2,08 <sup>c,f</sup>	5,33±1,24 <sup>c</sup>	5,33±0,58 <sup>c,f</sup>
<b>NE-OM 5% (i)</b>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	4,00±2,00 <sup>c,f</sup>	10,00±0,00 <sup>c</sup>	6±2 <sup>d,f</sup>	8,67±0,47 <sup>c</sup>	5,00±2,00 <sup>c,f</sup>

\*Análises post hoc: diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamentos são indicadas por letras. Cada letra representa um tratamento. CN, Controle negativo (Tween 80 1%). NEB, Nanoemulsões brancas. CP, Controle positivo (Diazinon 1%). OM, Óleo essencial de *M. fragrans*. NE, Nanoemulsões

O tratamento contendo o óleo na forma livre em concentração de 2.5% foi capaz de interferir no ciclo biológico das larvas e conseqüentemente evitou o desenvolvimento de adultos de *M. domestica* quando comparado com o diazinon ( $p > 0.05$ ). As formulações constituídas pelas nanogotículas interferiram no ciclo da mosca comum reduzindo em 50% a emissão do adulto ( $p < 0.05$ ).

O efeito larvicida foi verificado entre os tratamentos realizados no ensaio de avaliação do óleo essencial de Lavanda em *M. domestica* ( $F=26.24$ ;  $p < 0.0001$ ) e em *C. albiceps* ( $F=126.4$ ;  $p < 0.0001$ ) (tabela 2). Os tratamentos constituídos pela formulação NE-OL e suas diluições não provocaram mortalidade em *M. domestica* e em *C. albiceps* quando comparado com o inseticida químico ( $p > 0.05$ ). A atividade larvicida do óleo livre à 5% foi evidenciada para *M. domestica* ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 2.** Efeito do óleo essencial de *L. dentata* livre (OL) e nanoemulsionado (NE-OL), dos tratamentos controle negativo (CN; NEB) e positivo (CP) após imersão em larvas em terceiro estágio de *C. albiceps* e *M. domestica* (n = 10, em triplicata para cada grupo; média ± DP).

Tratamentos	Número de larvas mortas		Número de pupas		Número de adultos emergidos	
	<i>C. albiceps</i>	<i>M. domestica</i>	<i>C. albiceps</i>	<i>M. domestica</i>	<i>C. albiceps</i>	<i>M. domestica</i>
<b>CN (a)</b>	0,33±0,58	1,00±1,00	9,67±0,58	9,00±1,00	7,33±1,25	8,33±0,58
<b>NEB (b)</b>	0,33±0,58	0,33±0,58	8,00±2,00	9,67±0,58	8,00±0,00	8,00±1,00
<b>CP (c)</b>	8,67±0,47 <sup>ab</sup>	9,33±0,58 <sup>ab</sup>	1,00±0,00 <sup>ab</sup>	0,67±0,58 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>ab</sup>
<b>OL 1 % (d)</b>	0,33±0,58 <sup>c</sup>	0,67±1,15 <sup>c,e,f</sup>	9,67±0,58 <sup>c</sup>	9,33±1,15 <sup>c,e,f</sup>	9,33±0,47 <sup>c,e,f</sup>	3,33±1,15 <sup>a,b,c,f,g,h,i</sup>
<b>OL 2.5% (e)</b>	0,33±0,47 <sup>c</sup>	5±2,65 <sup>a,b,c,d,g,h,i</sup>	9,00±1,00 <sup>c</sup>	5±2,65 <sup>a,b,c,d,f,g,h,i</sup>	5,67±1,24 <sup>c,d</sup>	0,33±0,58 <sup>a,b,g,h,i</sup>
<b>OL 5% (f)</b>	0,67±0,47 <sup>c</sup>	8,33±1,53 <sup>a,b,d,g,h,i</sup>	9,00±1,00 <sup>c</sup>	1,33±1,53 <sup>a,b,d,e,g,h,i</sup>	5,33±1,70 <sup>c,d</sup>	0,00±0,00 <sup>a,b,d,g,h,i</sup>
<b>NE-OL 1% (g)</b>	0,67±0,47 <sup>c</sup>	0,67±1,15 <sup>c,e,f</sup>	9,67±0,58 <sup>c</sup>	9,33±1,15 <sup>c,e,f</sup>	7,33±0,47 <sup>c</sup>	8,00±1,73 <sup>c,d,e,f</sup>
<b>NE-OL 2.5% (h)</b>	0,67±0,47 <sup>c</sup>	0,33±0,58 <sup>c,e,f</sup>	9,00±0,00 <sup>c</sup>	9,67±0,58 <sup>c,e,f</sup>	6,67±0,47 <sup>c</sup>	7,67±1,52 <sup>c,d,e,f</sup>
<b>NE-OL 5% (i)</b>	0,33±0,5 <sup>c</sup>	0,67±0,58 <sup>c,e,f</sup>	10,00±0,00 <sup>c</sup>	9,33±0,58 <sup>c,e,f</sup>	7,00±0,00 <sup>c</sup>	7,67±1,52 <sup>c,d,e,f</sup>

\*Análises post hoc: diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamentos são indicadas por letras. Cada letra representa um tratamento. CN, Controle negativo (Tween 80 1%). NEB, Nanoemulsões brancas. CP, Controle positivo (Diazinon 1%). OL, Óleo essencial de *L. dentata*. NE, Nanoemulsões.

Assim como o óleo de *M. fragrans*, o óleo de lavanda em concentrações menores (1 e 2.5%) não provocaram ação larvicida mas impediram o desenvolvimento até a fase adulta para ambos insetos. Esse efeito do óleo de Lavanda nos dípteros em estudo foi verificado pelo nosso grupo de pesquisa anteriormente (Cossetin et al. 2018). Nesse estudo, os autores atribuíram os resultados ao déficit energético larval e a redução do sistema de defesa dos insetos dependendo da concentração de óleo utilizada.

O efeito larvicida reduzido para as formulações contendo o óleo nanoemulsionado diante da sua forma livre, principalmente em *M. domestica*, pode ser explicado pelo tamanho das gotículas desenvolvidas, que foram submicrométrico (64-87 nm) e incapazes de atravessar os poros no corpo da larva (NEL et al. 2009). Essa relação de tamanho da gotícula de nanoemulsões contendo óleos essenciais e efeito larvicida foi verificada por MONTEFUSCOLI et al. (2014) quando verificou que o menor tamanho (9,9 nm) contribuiu para a melhor eficácia do que a formulação de maior tamanho (525 nm) em *Culex pipiens pipiens*.

Além disso, deve-se considerar que o diluente adicionado às nanoemulsões 5% para a formação dos tratamentos contendo os óleos a 1% e 2,5% pode ter influenciado em possíveis mudanças na estrutura dos sistemas contribuindo, assim, para instabilidades e, conseqüentemente, para a baixa eficácia desses tratamentos. OSANLOO e colaboradores (2017) avaliaram esse efeito da diluição de nanoemulsões com a instabilidade dos sistemas correlacionando com



a atividade larvicida em *Anopheles stephensi*. Nesse estudo, os autores identificaram que a formulação mais estável, após a diluição, apresentou um aumento significativo da atividade do que formulações com nanoemulsões que apresentaram perfil instável após a diluição.

### **Bioensaio aduicida por aplicação tópica**

A bioatividade dos sistemas nanoestruturados contendo os óleos de *M. fragrans* e *L. dentata* contra adultos *M. domestica* e *C. albiceps* foi estudada a partir de dois ensaios: aplicação tópica e exposição ao papel contendo os óleos. As tabelas 3 e 4 expressam os resultados para o bioensaio de aplicação tópica dos óleos livres e nanoemulsionados de *L. dentata* e *M. fragrans*, respectivamente. A aplicação tópica de *L. dentata* teve significância quanto a atividade aduicida entre os tratamentos em *M. domestica* ( $F= 38.01$ ;  $p<0.0001$ ) e em *C. albiceps* ( $F=67.08$ ;  $p<0.0001$ ). Conforme a tabela 3, as nanoemulsões de *L. dentata* a 5% utilizadas de forma tópica provocaram mortalidade de 50 % de *M. domestica*. Adultos de *C. albiceps* quando expostos ao nanoproduto do óleo de lavanda 5% e suas diluições (1 e 2,5%) não foram susceptíveis quando comparados ao controle positivo ( $p<0.05$ ). O tratamento realizado com o óleo livre 5% revelou ser eficaz em ambos os insetos e corroborativo com os resultados obtidos por Cossetin et al (2018).

O bioensaio por aplicação tópica de *M. fragrans* revelou atividade aduicida entre os tratamentos para *M. domestica* ( $F=13,64$ ;  $p<0.0001$ ) e *C. albiceps* ( $F=51,13$ ;  $p<0.0001$ ). Os resultados no presente trabalho expressaram que *C. albiceps* foi susceptível frente ao óleo livre e nanoemulsionado à 2.5 e 5% ( $p<0.05$ ); e as amostras de óleo à 1%, controle Tween e NEB não provocaram mortalidade nos insetos em estudo para esse tipo de ensaio ( $p>0.05$ ) (tabela 4).

**Tabela 3.** Efeito das nanoemulsões do óleo essencial de *L. dentata* (NE-OL), do óleo livre (OL) e tratamentos controle negativo (CN) e positivo (PC) em adultos *M. domestica* e *C. albiceps* a partir do modelo experimental de aplicação tópica (n = 10, em triplicata para cada grupo; média±DP).

Espécie	Mortalidade								
	NE-OL			OL			CP (D)	CN (E)	NEB(F)
	1%(A)	2.5%(B)	5%(C)	1%(a)	2.5%(b)	5%(c)			
<i>Crhysomia</i>									
<i>albiceps</i>	0,67±0,58 <sup>D,c</sup>	0,33±0,58 <sup>D,c</sup>	0,67±0,58 <sup>D,c</sup>	0,33±0,58 <sup>D,c</sup>	0,67±0,58 <sup>D,c</sup>	7±1,73 <sup>A,B,C,D,E,F,a,b</sup>	10±0 <sup>E,F</sup>	0±0	0±0
<i>Musca</i>									
<i>domestica</i>	0,33±0,58 <sup>C,D,c</sup>	0,66±1,15 <sup>C,D,c</sup>	4,33±1,52 <sup>D,E,F,a,b</sup>	0,33±0,58 <sup>C,D,E,c</sup>	0,67±1,15 <sup>C,D,c</sup>	7,00±1,73 <sup>A,B,D,E,F,a,b</sup>	10±0 <sup>E,F</sup>	0,33±0,58	0,33±0,58

\*Análises post hoc: diferenças significativas (p <0.05) entre tratamentos são indicadas por letras. Cada letra representa um tratamento.

CN, Controle negativo (Tween 80 1%)

NEB, Nanoemulsões brancas

CP, Controle positivo (Diazinon 1%)

OL, Óleo essencial de *L. dentata*

NE, Nanoemulsões

**Tabela 4.** Efeito das nanoemulsões do óleo essencial de *M. fragrans* (NE-OM), do óleo livre (OM) e tratamentos controle negativo (CN, NEB) e positivo (PC) em adultos *M. domestica* e *C. albiceps* a partir do modelo experimental de aplicação tópica (n = 10, em triplicata para cada grupo; média±DP).

Espécie	Mortalidade (n)								
	NE-OM			OM			CP (D)	CN (E)	NEB(F)
	1%(A)	2.5%(B)	5%(C)	1%(a)	2.5%(b)	5%(c)			
<i>Chrysomya</i>									
<i>albiceps</i>	0,67±0,58 <sup>B,C,D,b,c</sup>	8±1,0 <sup>A,E,F,a</sup>	9,33±1,15 <sup>A,E,F,a</sup>	1,0±1,73 <sup>B,C,D,b,c</sup>	8,0±2,0 <sup>A,E,F,a</sup>	9,33±0,58 <sup>A,E,F,a</sup>	10±0 <sup>E,F</sup>	0±0	0±0
<i>Musca</i>									
<i>domestica</i>	0,67±0,58 <sup>D</sup>	0±0 <sup>D</sup>	1,66±1,15 <sup>D</sup>	2±2 <sup>D</sup>	3±2 <sup>D</sup>	2,67 ± 2,0 <sup>D</sup>	9,33±1,15 <sup>E,F</sup>	0,67±0,58	0,33±0,58

\*Análises post hoc: diferenças significativas (p < 0.05) entre tratamentos são indicadas por letras. Cada letra representa um tratamento.

CN, Controle negativo (Tween 80 1%)

NEB, Nanoemulsões brancas

CP, Controle positivo (Diazinon 1%)

OL, Óleo essencial de *M. fragrans*

NE, Nanoemulsões

Os resultados expressaram que as formulações NE-OL 5% e NE-OM (2,5% e 5%) provocaram toxicidade tópica em *M. domestica* e *C. albiceps*, respectivamente. Alguns autores relatam que nanoemulsões possuem capacidade de penetração aumentada em membranas celulares, devido, principalmente, ao aumento da área interfacial desses sistemas por apresentarem reduzido tamanho de gotícula (KALAITZAKI et al. 2015). Dessa forma, sobre o tamanho de gota formada, é importante relacionar o diâmetro das nanoemulsões com o efeito observado das formulações NE-OM e NE-OL. A verificação do tamanho de gota apresentado no capítulo 3 revelou que as nanoemulsões de *L. dentata* apresentaram diâmetro menor (64,99 nm) quando comparado com a nanogotícula de NE-OM (87,06 nm). Com isso, o diâmetro dos sistemas NE-OM pode ter sido responsável pela baixa atividade inseticida em *M. domestica*.

Além disso, os resultados demonstraram atividade adulticida superior para adultos *C. albiceps* em relação a *M. domestica* quando expostos ao contato superficial com o óleo essencial de noz-moscada livre e nanoemulsionado. Essa diferença interespecie observada foi discutida por COSSETIN et al. (2018) sendo que a distinção para a susceptibilidade pode ser atribuída às variações na produção de enzimas de defesa do inseto capazes de metabolizar os bioprodutos e/ou inibição quantitativa de enzimas como, por exemplo, a acetilcolinesterase, responsável por determinadas funções fisiológicas (RODRIGUES et al. 2013).

### **Ensaio adulticida por exposição ao papel impregnado**

A toxicidade por fumigação dos óleos essenciais livres e associados as nanoemulsões em estudo para *C. albiceps* e *M. domestica* estão expressos nas tabelas 5 e 6. A ação inseticida entre os tratamentos no bioensaio de exposição ao papel impregnado foi verificada significativamente para *M. domestica* ( $F=458.4$ ;  $p<0.0001$ ) e *C. albiceps* ( $F=30.69$ ,  $p<0.0001$ ) para análise do efeito do óleo de *L. dentata*.

As formulações NE-OL provocaram uma baixa eficácia para as espécies estudadas no ensaio por fumigação (Tabela 5), porém ocorreu atividade adulticida quando o óleo foi utilizado na forma livre, resultados observados por Cossetin e colaboradores (2018).

**Tabela 5.** Efeito das nanoemulsões do óleo essencial de *L. dentata* (NE-OL), óleo livre (OL) e tratamentos controle negativo (CN) e positivo (PC) em adultos *M. domestica* e *C. albiceps* a partir do modelo experimental de exposição ao papel impregnado (n=20, em triplicata para cada grupo; média±DP).

Espécie	Mortalidade								
	NE-OL			OL			CP (D)	CN (E)	NEB(F)
	10 ug.cm <sup>-2</sup> (A)	25 ug.cm <sup>-2</sup> (B)	50 ug.cm <sup>-2</sup> (C)	10 ug.cm <sup>-2</sup> (a)	25 ug.cm <sup>-2</sup> (b)	50 ug.cm <sup>-2</sup> (c)			
<i>Chrysomya</i>									
<i>albiceps</i>	0,33±0,58 <sup>D,c</sup>	0,33±0,58 <sup>D,c</sup>	3,0±2,64 <sup>D,c</sup>	0,33±0,58 <sup>D,c</sup>	1,67±2,88 <sup>D,c</sup>	12,33±5,03 <sup>A,B,C,D,E,F,a,b</sup>	20,0±0 <sup>E,F</sup>	0±0	0±0
<i>Musca</i>									
<i>domestica</i>	0,33±0,58 <sup>D,c</sup>	1,33±1,15 <sup>D,c</sup>	1,67±0,57 <sup>D,c</sup>	1,67±0,58 <sup>D,c</sup>	0,33±0,58 <sup>D,c</sup>	20,0±0 <sup>A,B,C,E,F,a,b</sup>	20,0±0 <sup>E,F</sup>	0,67±0,58	0,33±0,58

\*Análises post hoc: diferenças significativas (p < 0.05) entre tratamentos são indicadas por letras. Cada letra representa um tratamento.

CN, Controle negativo (Tween 80 1%)

NEB, Nanoemulsões brancas

CP, Controle positivo (Diazinon 1%)

OL, Óleo essencial de *L. dentata*

NE, Nanoemulsões

A reduzida eficácia do óleo de Lavanda nanoemulsionado para o efeito fumigante pode ser explicada pela reduzida volatilização/vaporização do óleo ou de alguns dos seus constituintes uma vez que o óleo pode ter sido protegido ao permanecer interiorizado nas nanogotículas durante o ensaio. Esse efeito protetivo das nanogotículas foi verificado e demonstrado no capítulo 4 para os principais compostos do óleo de Lavanda, como a fenchona. Esse composto correspondeu a 17% do óleo e é conhecido como um potente inseticida por fumigação (ABDEL-GALEIL et al. 2009). No entanto, o efeito adulticida não foi observado eficazmente possivelmente devido a proteção das nanoestruturas durante o tempo de estudo. Esses sistemas reduzem a evaporação de óleo voláteis como observado por LAI et al. (2006) que associaram o óleo essencial de *Artemisia arborescens* à nanopartículas lipídicas sólidas. Esses autores também verificaram um controle de liberação dos bioprodutos.

Adicionalmente, os sistemas nanoestruturados quando apresentam um controle de liberação promovem, muitas vezes um efeito biológico gradual com a liberação do ativo (JEROBIN et al. 2012). Esse comportamento cinético, que pode ter ocorrido nas nanoemulsões no presente estudo, pode sugerir que o tempo do ensaio de exposição ao papel constituído pela formulação NE-LO não foi suficiente para a liberação dos constituintes responsáveis pelo efeito inseticida. YANG e colaboradores (2009) atribuíram o controle de liberação ao menor efeito tóxico do óleo de alho quando associado às nanoemulsões, em adultos de *Tribolium castaneum*, no mês zero (início do tratamento) aumentando gradativamente ao fim do estudo (5 meses).

Diferentemente das nanoemulsões do óleo essencial de *L. dentata*, as formulações contendo nanoemulsões de *M. fragrans* 5% foram eficazes para o efeito fumigante contra as espécies *M. domestica* e *C. albiceps* (tabela 6). O efeito adulticida entre os tratamentos foi verificado para esse ensaio com *M. domestica* ( $F=507.2$ ;  $p<0.0001$ ) e *C. albiceps* ( $F=388.2$ ;  $p<0.0001$ ). Adicionalmente, o óleo na forma livre nas concentrações de  $25 \text{ ug.cm}^{-2}$  e  $50 \text{ ug.cm}^{-2}$  apresentou também efeito inseticida para ambas espécies ( $p<0.05$ ). Esses resultados ficaram em conformidade com os resultados expressos por Cossetin et al. (2018).

**Tabela 6.** Efeito das nanoemulsões do óleo essencial de *M. fragrans* (NE-OM), do óleo livre (OM) e tratamentos controle negativo (CN, NEB) e positivo (CP) em adultos *M. domestica* e *C. albiceps* a partir do modelo experimental de exposição ao papel impregnado (n=20, em triplicata para cada grupo; média±DP).

Espécie	Mortalidade								
	NE-OM			OM			CP (D)	CN (E)	NEB(F)
	10 ug.cm <sup>-2</sup> (A)	25 ug.cm <sup>-2</sup> (B)	50 ug.cm <sup>-2</sup> (C)	10 ug.cm <sup>-2</sup> (a)	25 ug.cm <sup>-2</sup> (b)	50 ug.cm <sup>-2</sup> (c)			
<i>Chrysomya</i>									
<i>albiceps</i>	0,67±0,58 <sup>B,C,D,b,c</sup>	4±2 <sup>A,C,D,E,F,a,b,c</sup>	20±0 <sup>A,B,E,F,a</sup>	0,33±0,58 <sup>B,D,b</sup>	20±0 <sup>A,B,E,F,a</sup>	19,66±0,67 <sup>A,B,C,E</sup>	20,0±0 <sup>E,F</sup>	0±0	0±0
				c		.F,a			
<i>Musca</i>									
<i>domestica</i>	0,33±0,58 <sup>B,C,D,b,c</sup>	13,33±1,53 <sup>A,C,D,E,F,a,b,c</sup>	20±20 <sup>A,B,E,F,a</sup>	0±0 <sup>B,C,D,b,c</sup>	20±0 <sup>A,B,E,F,a</sup>	20,0±0 <sup>A,B,E,F,a</sup>	20,0±0 <sup>E,F</sup>	0,67±0,58	0,33±0,5

8

\*Análises post hoc: diferenças significativas (p <0.05) entre tratamentos são indicadas por letras. Cada letra representa um tratamento.

CN, Controle negativo (Tween 80 1%)

NEB, Nanoemulsões brancas

CP, Controle positivo (Diazinon 1%)

OL, Óleo essencial de *M. fragrans*

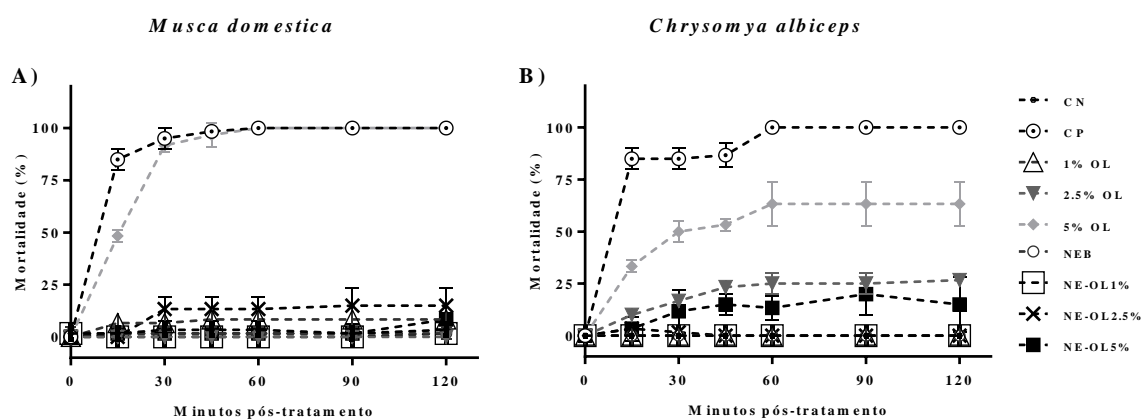
NE, Nanoemulsões

Os resultados obtidos do óleo essencial de *M. fragrans* indicaram que as nanoemulsões a 5 % provocaram significativa mortalidade em adultos quando expostos à fumigação sendo comparáveis ao inseticida químico. Esse efeito pode ser resultante da constituição majoritária do óleo por terpenóides de hidrocarbonetos, que são compostos altamente vaporizáveis. Deve-se considerar que a evaporação dos óleos essenciais depende da sua natureza química, pois os seus compostos apresentam diferentes pressões de vaporização e pontos de ebulição (DUCE et al. 2017). A captação respiratória pelo animal a partir dos seus espiráculos é o principal mecanismo para a ação fumigante de substâncias voláteis além da adsorção do vapor dos compostos na cutícula dos insetos (GONZÁLEZ et al. 2014; SFARA et al. 2009). Ao atingirem o sistema traqueal ou atravessarem a epiderme, os constituintes são absorvidos e são distribuídos a outros tecidos atingindo seus locais de ação (TARELLI et al. 2009).

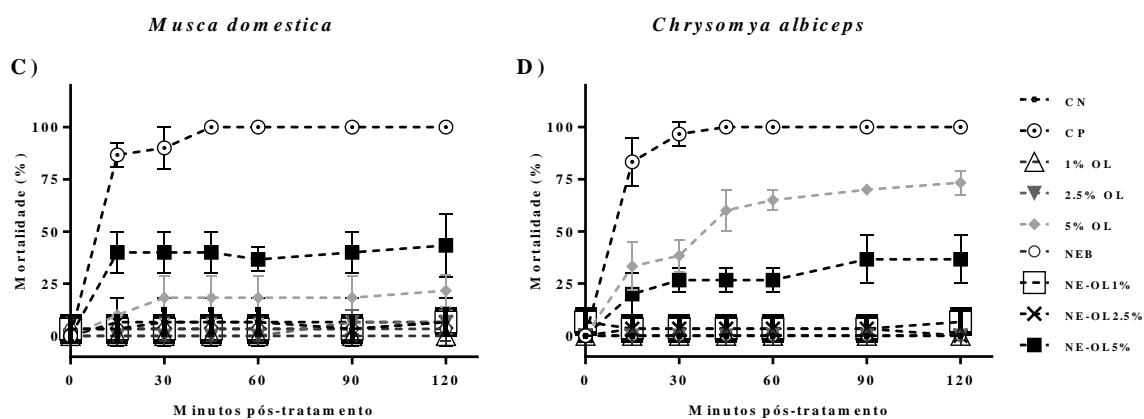
Foi possível observar, também, que a toxicidade do óleo foi dependente do tempo de exposição, principalmente para tratamentos de 2,5% de óleo e tipo de inseto (Figuras 1 e 2). O mecanismo de desintoxicação para cada inseto envolvido pode ter influenciado na diferença da bioatividade verificada. Essas diferenças interespecies já foram observadas por Cossetin et al. (2018).



## Exposição ao papel impregnado

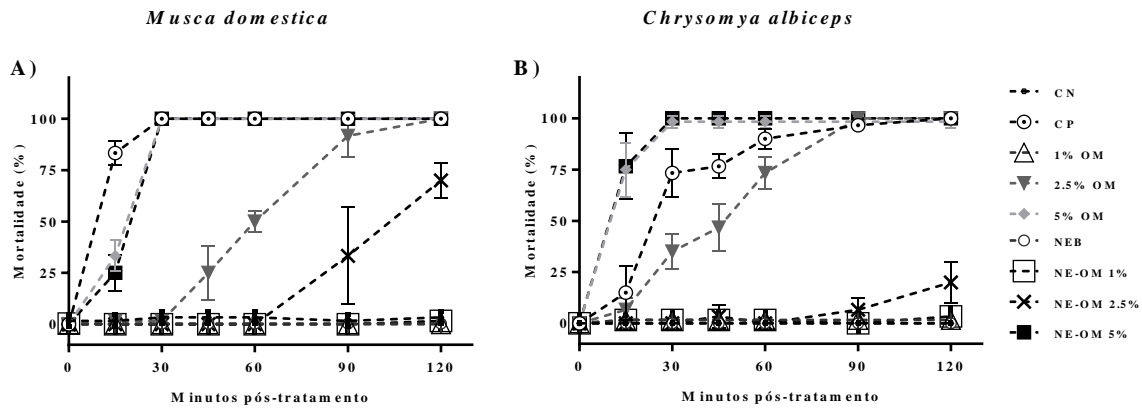


## Aplicação superficial

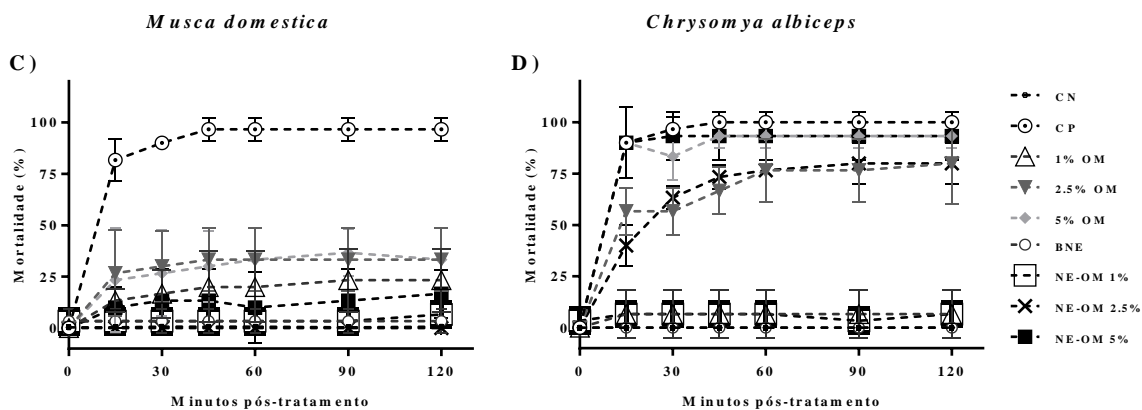


**Figura 1.** Mortalidade (%) de adultos após o bioensaio adulticida do óleo de *L. dentata* livre e nanoemulsionado em *M. domestica* (A, C) e em *C. albiceps* (B, D), a partir dos modelos experimentais por exposição ao papel filtro impregnado (A, B) e por aplicação superficial (C, D). CN: Controle negativo (Tween 80 1%), NEB: Nanoemulsões brancas, CP: Controle positivo (Diazinon 1%), OL: Óleo essencial de *L. dentata* em diferentes concentrações, NE: Nanoemulsões.

## Exposição ao papel impregnado



## Aplicação superficial



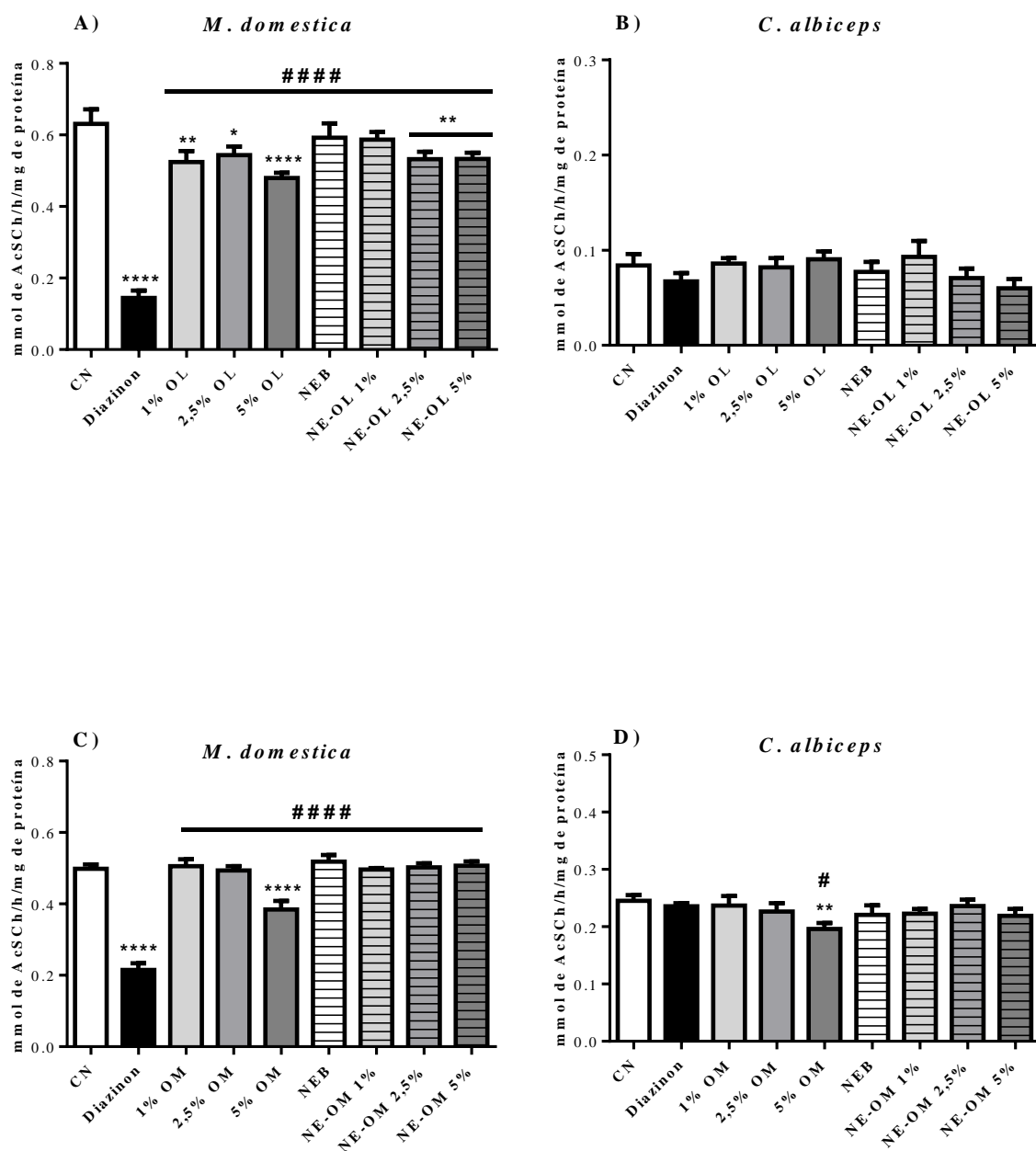
**Figura 2.** Mortalidade (%) de adultos após o bioensaio adúltica do óleo essencial livre de *M. fragrans* e nanoemulsionado em *M. domestica* (A, C) e em *C. albiceps* (B, D), a partir dos modelos experimentais por exposição ao papel filtro impregnado (A, B) e por aplicação superficial (C, D). CN: Controle negativo (Tween 80 1%), NEB: Nanoemulsões brancas, CP: Controle positivo (Diazinon 1%), OM: Óleo essencial de *M. fragrans* em diferentes concentrações, NE: Nanoemulsões.

### **Efeito da inibição na atividade da acetilcolinesterase**

O efeito dos óleos essenciais livres e nanoemulsionados na atividade da acetilcolinesterase de larvas e de adultos *M. domestica* e *C. albiceps* foi avaliado nas concentrações de 1, 2,5 e 5% *in vitro*.

A avaliação da inibição da atividade da acetilcolinesterase no ensaio larvicida em *M. domestica*, revelou que o óleo de Lavanda livre nas concentrações estudadas nanoestruturados (exceto NE-OL 1%) reduziu a atividade da enzima quando comparado ao controle ( $p < 0.05$ ) (figura 3). Uma menor atividade da acetilcolinesterase foi observada para o tratamento OL 5% sendo que este apresentou atividade larvicida em relação às outras quantidades de óleo utilizadas ( $p < 0.05$ ). Esse resultado também foi demonstrado quando se utilizou o tratamento com o óleo de *M. fragrans* a 5%. No entanto, esses tratamentos foram inferiores ao diazinon, um potente inibidor da acetilcolinesterase ( $p < 0.05$ ).

Em larvas de *C. albiceps* não foi verificada alteração significativa na atividade da enzima quando as larvas foram tratadas com as formulações contendo os óleos essenciais no presente estudo (figura 3B). De acordo com os resultados do bioensaio larvicida não se observou atividade inseticida nos tratamentos com os óleos realizados em *C. albiceps*.

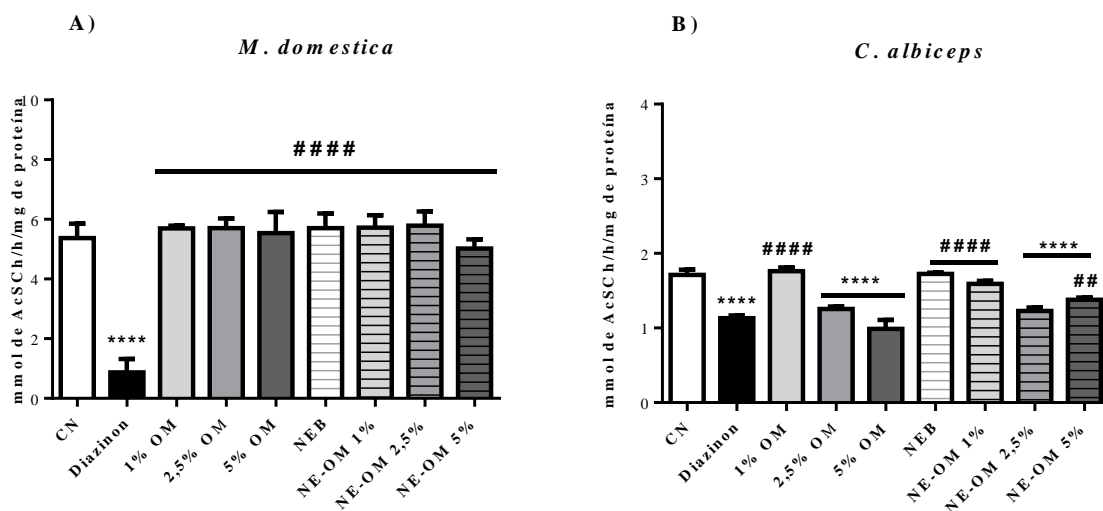


**Figura 3.** Efeito dos óleos essenciais de *Lavanda dentata* livre (OL) e nanoemulsionado (NE-OM) [A, B] e de *M. fragrans* livre (OM) e nanoemulsionado (NE-OM) [C, D] sobre atividade da enzima acetilcolinesterase das larvas de *M. domestica* [A, C] e de *C. albiceps* [B, D]. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Tukey. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*\*  $P < 0.0001$  indicaram diferença significativa para o grupo controle. #  $P < 0.05$  and #####  $P < 0.0001$  indicaram diferença significativa para o Diazinon (Controle positivo). Barras representam média  $\pm$  DP.

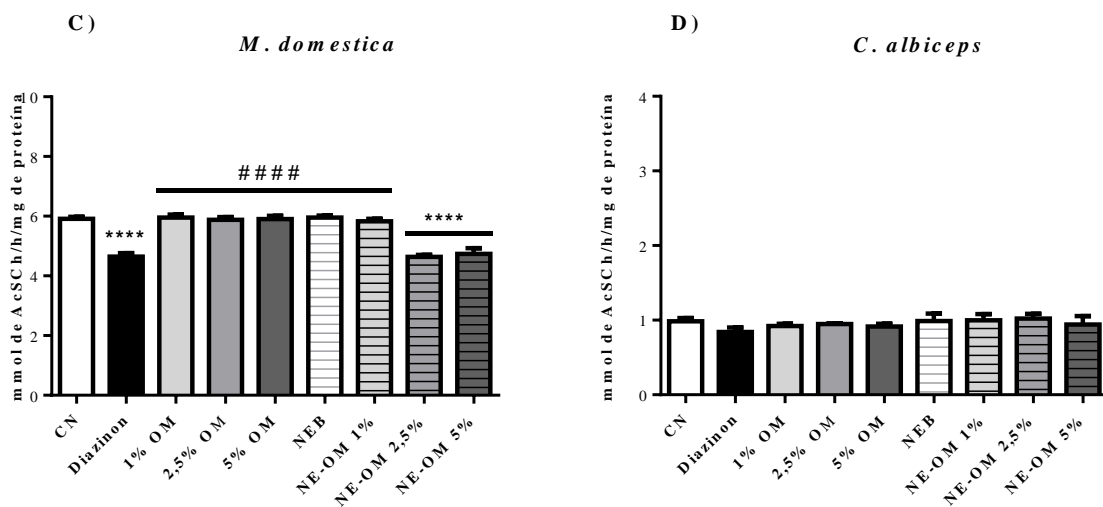
Os efeitos inibitórios da enzima em larvas indicaram que houve uma relação com a atividade larvívora quando utilizou-se concentrações de 5% para ambos óleos em *M. domestica*. Os resultados observados corroboram com estudos que avaliaram a relação atividade inibitória da ACE e a atividade larvívora de alguns monoterpêneos sugerindo que a composição química dos óleos favoreceu a ação observada. Isso foi verificado por ABDELGALII e colaboradores (2009) ao estudar o efeito de 1,8 cineol e fenchona (compostos majoritários de *L. dentata*) em larvas e na atividade da ACE de *Sitophilus oryzae*. É importante ressaltar que a espécie de inseto influenciou nos resultados e que pode ser explicado a partir das diferenças fisiológicas e dos sistemas de desintoxicação. Devido a isso, a quantidade de tratamento necessária para o efeito inseticida pode ser variável dependendo da espécie de mosca.

Referente aos bioassaios adulticidas, o óleo essencial de Lavanda 5% foi o mais efetivo inibidor na atividade da acetilcolinesterase quando aplicado topicamente em adultos *C. albiceps* (Figura 5B) seguido pelo óleo de *M. fragrans* 2,5 (livre) e 5% (livre e nanoemulsionado-NE) (Figura 4B) aplicados na mesma espécie. É importante ressaltar que se observou um efeito inibidor superior ( $p < 0.05$ ) e comparável ( $p < 0.05$ ) à atividade nos adultos tratados quando comparado ao inseticida químico para os tratamentos OL (5%) e OM (5 e 2,5% - livre e NE), respectivamente. O óleo de Lavanda reduziu a atividade da enzima quando aplicado superficialmente em *M. domestica* (exceto para a formulação OL 1%), mas com menor efeito quando comparado ao Diazinon ( $p < 0.05$ ) (Figura 5A).

## Aplicação superficial



## Exposição ao papel impregnado

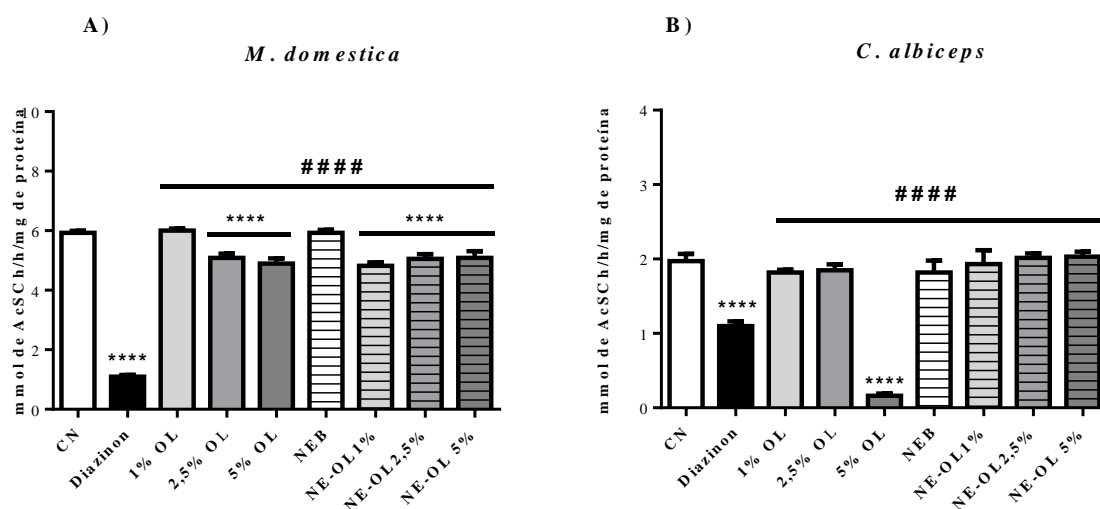


**Figura 4.** Efeito do óleo essencial de *M. fragrans* livre (OM) e nanoemulsionado (NE-OM) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em *M. domestica* [A, C] e *C. albiceps* [B, D] adultos após os bioensaios de Aplicação superficial [A, B] e exposição ao papel impregnado [C, D]. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de uma via, seguidas do teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. \*\*\*\*  $P < 0,0001$  indicou diferença significativa para o grupo controle (CN). ##  $P < 0,01$  e #####  $P < 0,0001$  indicaram diferença significativa para o Diazinon (Controle positivo). Barras representam média  $\pm$  DP.

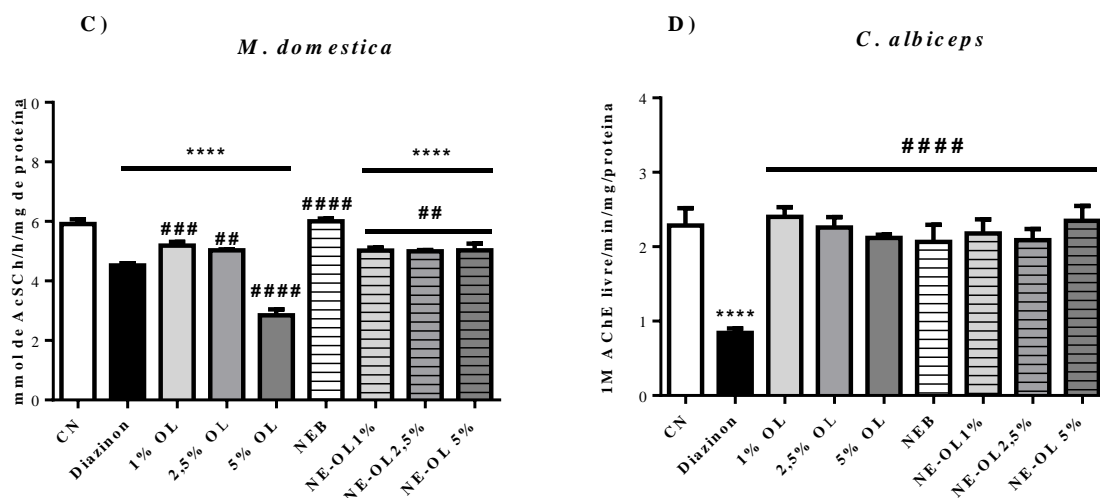
De posse aos resultados de toxicidade dos óleos por contato em adultos de *M. domestica* e *C. albiceps* e dos efeitos inibitórios na atividade da ACE, o estudo demonstra que os óleos possuem forte atividade inseticida e atividade inibitória potente da ACE quando utilizado de forma tópica.

A investigação da inibição da acetilcolinesterase para os adultos expostos ao papel impregnado revelou que *M. domestica* foi mais sensível ao óleo de *L. dentata* 5% livre e nanoe-mulsionado (Figura 5C) seguido pelas formulações NE-OM 2,5% e NE-OM 5% (Figura 4C). Em *C. albiceps* a enzima em estudo não foi susceptível quando o inseto foi exposto aos óleos a partir do papel impregnado (Figura 4D).

## Aplicação superficial



## Exposição ao papel impregnado



**Figura 5.** Efeito do óleo essencial de *L. dentata* livre (OL) e nanoemulsionado (NE-OL) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em *M. domestica* [A, C] e *C. albiceps* [B, D] adultos após os bioensaios de Aplicação superficial [A, B] e exposição ao papel impregnado [C, D]. As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de uma via, seguidas do teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. \*\*\*\*  $P < 0,0001$  indicou diferença significativa para o grupo controle (CN). ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  e ####  $P < 0,0001$  indicaram diferença significativa para o Diazinon (Controle positivo). Barras representam média  $\pm$  DP.



A partir dos resultados de avaliação da atividade da acetilcolinesterase para o ensaio por exposição ao papel impregnado, principalmente em *C. albiceps*, observou-se forte atividade inseticida dos óleos, mas com pouca inibição da ACE para mesma espécie. Da mesma forma, LEE et al. (2001) não encontraram uma correlação direta entre a toxicidade de insetos e a inibição da ACE para mentona e  $\beta$ - pineno (constituintes dos óleos em estudo). Esses achados sugerem que a ACE pode ser um alvo para os óleos, porém, outros sítios de ação devem ser explorados para elucidar a ação contra insetos.

## CONCLUSÃO

Os nanoproductos avaliados neste trabalho, demonstraram ser efetivos no controle populacional de *C. albiceps* e *M. domestica* pois apresentaram efeitos adulticidas. Esses resultados de eficácia podem estar relacionados com a inibição da atividade da acetilcolinesterase verificada no presente trabalho. Assim, com base nos resultados obtidos, as nanoemulsões mantiveram o desempenho biológico dos óleos essenciais para o efeito adulticida e considerando que esses sistemas melhoraram a estabilidade química dos óleos de *M. fragrans* e de *L. dentata*, as formulações nanotecnológicas tornam-se possíveis alternativas aos inseticidas químicos.

## REFERÊNCIAS

- Abbas, MN, Sajeel, M, Kausa, S. 2013. **House fly (*Musca domestica*), a challenging pest; biology, management and control strategies.** Elixir Entomology, 64: 19333-19338.
- Abdelgaleil, SAM, Mohamed, MIE, Badawy, MEI, El-arami, SAA. 2009. **Fumigant and Contact Toxicities of Monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their Inhibitory Effects on Acetylcholinesterase Activity.** Journal of Chemical Ecology, 35: 518–525.
- Cossetin, LF, Santi, EMT, Cossetin JF, Dillmann, JB, Baldissera, MD, Garlet QI, De Souza, TP, Loebens, L, Heinzmann, BM, Machado MM, Monteiro, SG. 2018. **In vitro Safety and Efficacy of Lavender Essential Oil (Lamiales: Lamiaceae) as an Insecticide Against Houseflies (Diptera: Muscidae) and Blowflies (Diptera: Calliphoridae).** Journal of Economic Entomology, 111: 1974–1982.
- De Godoi, SN, Quatrin, PM, Sagrillo, MR, Nascimento, K, Wagner, R, Klein, B, Santos, RCV, Ourique, AF. 2017. **Evaluation of Stability and In Vitro Security of Nanoemulsions Containing *Eucalyptus globulus* Oil.** BioMed Research International, 2017: 1-10.

- Duce, C, Cipriotti, SV, Spepi, A, Bernazzani, L, Tinè, MR. 2017. **Vaporization kinetic study of lavender and sage essential oils.** Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 130: 595–604.
- Gnankiné, O, Bassolé, IHN. 2017. **Essential Oils as an Alternative to Pyrethroids' Resistance against *Anopheles* Species Complex Giles (Diptera: Culicidae).** Molecules, 22: 1321-1344.
- González, J, Gutiérrez, MM, Ferrero, AA, Band, BF. 2014. **Essential oils nanoformulations for stored-product pest control – Characterization and biological properties.** Chemosphere, 100: 130–138.
- Jerobin, J, Sureshkumar, RS, Anjali, CH, Mukherjee, A, Chandrasekaran, Natarajan. 2012. **Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A.** Carbohydrate Polymers, 90: 1750– 1756.
- Kalaitzaki, A, Papanikolaou, NE, Karamaouna, F, Dourtoglou, V, Xenakis, A, Papadimitriou, V. 2015. **Biocompatible Colloidal Dispersions as Potential Formulations of Natural Pyrethrins: A Structural and Efficacy Study.** Langmuir, 31: 5722–5730.
- Khamesipour, F, Lankarani, KB, Honarvar, B, Kwenti, TE. 2018. **A systematic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L.).** BMC Public Health, 18:1-15.
- Kostaropoulos, I, Papadopoulos, A, Metaxakis, A, Boukouvala, E, Papadopoulou-Mourkidou, E. 2001. **Glutathione S–transferase in the defence against pyrethroids in insects.** Insect Biochemistry and Molecular Biology, 31: 313–319.
- Lai, F, Wissing, SA, Müller, RH, Fadda, AM. 2006. ***Artemisia arborescens* L Essential Oil-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Potential Agricultural Application: Preparation and Characterization.** AAPS PharmSciTech, 7: E1-10.
- Lee, S, Lee, B, Choi, W, Park, B, Kim, J, Campbell, BC. 2001. **Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L).** Pest Management Science, 57: 548-553.
- Maldonado, MA, Centeno, N. 2003. **Quantifying the Potential Pathogens Transmission of the Blowflies (Diptera: Calliphoridae).** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98: 213-216.
- Malik, A, Singh, N, Satya, S. 2007. **House fly (*Musca domestica*): a review of control strategies for a challenging pest.** Journal of Environmental Science and Health Part B, 42: 453-69.
- Montefuscoli, AR, González, JOW, Palma, SD, Ferrero, AA, Band, BF. 2014. **Design and development of aqueous nanoformulations for mosquito control.** Parasitology Research, 113: 793–800.
- Nel, A, Mädler, L, Velegol, D, Xia, T, Hoek, EMV, Somasundaran, P, Klaessig, F, Castranova, V, Thompson, M. 2009. **Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface.** Nature Materials, 8: 543–557.

- Osanloo, M, Amani, A, Sereshti, H, Abai, MR, Esmaeili, F, Sedaghat, MM. 2017. **Preparation and optimization nanoemulsion of Tarragon (*Artemisia dracunculus*) essential oil as effective herbal larvicide against *Anopheles stephensi***. Industrial Crops & Products, 109: 214–219.
- Rodrigues, ARS, Spindola, AF, Torres, JB, Siqueira, HAA, Colares, F. 2013. **Response of different populations of seven lady beetle species to lambda-cyhalothrin with record of resistance**. Ecotoxicology and Environmental Safety, 96: 53–60.
- Roy, S, Handique, G, Muraleedharan, N, Dashora, K, Roy, SM, Mukhopadhyay, A, Babu, A. 2016. **Use of plant extracts for tea pest management in India**. Applied Microbiology and Biotechnology, 100: 4831–4844.
- Sfara, V, Zerba EN, Azogaray, R. 2009. **Fumigant Insecticidal Activity and Repellent Effect of Five Essential Oils and Seven Monoterpenes on First-Instar Nymphs of *Rhodnius prolixus***. Journal of Medical Entomology, 46: 511-515.
- Sugumar, S, Singh, S, Mukherjee, A, Chandrasekaran, N. 2016. **Nanoemulsion of orange oil with non ionic surfactant produced emulsion using ultrasonication technique: evaluating against food spoilage yeast**. Applied Nanoscience, 6: 113–120.
- Sukontason, KL, Bunchoo, M, Khantawa, B, Piangjai, S, Rongsriyam, Y, Sukontason, K. 2007. **Comparison between *Musca domestica* and *Chrysomya megacephala* as carriers of bacteria in northern Thailand**. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 38: 38-44.
- Tarelli G, Zerba, EN, Alzogaray, RA. 2009. **Toxicity to Vapor Exposure and Topical Application of Essential Oils and Monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae)**. Journal of Economic Entomology, 102: 1383-1388.
- Zoubiri, S, Baaliouamer, A. 2014. **Potentiality of plants as source of insecticide principles**. Journal of Saudi Chemical Society, 18: 925–938.
- Walia, S, Saha, S, Tripathi, V, Sharma, KK. 2017. **Phytochemical biopesticides: some recent developments**. Phytochemistry Reviews, 16: 989–1007.
- Yang, F, Li X, Zhu, F, Lei, C. 2009. **Structural Characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 10156–10162.



## 6 DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento de novos agentes inseticidas, visando, principalmente, o controle de insetos sinantrópicos, tem sido uma área da pesquisa de importância considerável e crescente nos últimos anos para o âmbito da saúde pública. Dentre esses agentes, destacam-se os biopesticidas conferindo vantagens relacionadas por serem, geralmente, reconhecidos como seguros para o meio ambiente e a saúde humana, menos persistentes em água e solo por serem biodegradáveis além de apresentarem uma ampla ação pesticida por possuírem múltiplos mecanismos de ação (WALIA et al., 2017).

Entre muitos produtos naturais, os óleos essenciais (OEs) e seus constituintes têm recebido considerável atenção na busca por novos pesticidas (ROY et al., 2016). Os óleos essenciais são constituídos por misturas frequentemente complexas e sua atividade inseticida depende muito da composição química e das interações entre os compostos individuais. A maior bioatividade, geralmente, dos OEs se dá quando a constituição de monoterpenos é majoritária. Essa composição contribui para as ações já verificadas dos OEs como: fumigante (CHOI et al., 2006), inseticida de contato (TANG et al., 2007), repelente (ISLAM et al., 2009) e (GONZALEZ-COLOMA et al., 2006) e podem afetar alguns parâmetros biológicos como taxa de crescimento (NATHAN et al., 2008), tempo de vida e reprodução (ISIKBER et al., 2006).

Devido as essas importantes propriedades inseticidas, os OEs têm sido amplamente estudados para o controle de insetos que possuem importante vetorização de patógenos (MOREY; KHANDAGLE, 2012). *Musca domestica* e *Chrysomya albiceps* espécies endofílicas e sinantrópicas, são consideráveis transportadores de patógenos causadores de doenças graves à saúde humana e animal (MALDONADO; CENTENO, 2003; BASSON et al., 2018). Esses dípteros estão associados com mais de 100 patógenos incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas (protozoários e metazoários). Seus comportamentos favorecem a transmissão da cólera, shigelose e salmonelose (GUPTA et al., 2012; KHAMESIPOUR et al., 2018). Além disso, *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) é conhecida por produzir miíases em humanos e em animais (THYSSEN et al., 2014).

O controle de *M. domestica* e *C. albiceps* é realizado a partir de inseticidas sintéticos sendo que os quatro principais grupos são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Embora esses agentes desempenharam boa eficácia por muitos anos, uma combinação de fatores tem contribuindo para o interesse à redução do seu uso. Entre esses fatores, incluem-se um amplo desenvolvimento de resistência aos compostos existentes pelos insetos (SCOTT et al., 2000); o uso de maneira frequente e que continua crescendo o que

representa, muitas vezes, de acordo com a organização mundial da saúde, graves problemas de saúde e ambientais (PAVELA, 2016).

Considerando a necessidade de estudo de agentes alternativos aos químicos e a existência de muitos derivados de plantas naturalmente biocidas e com considerável potencial inseticida, o presente trabalho descreveu no capítulo 1 e 2 a obtenção e a caracterização química do óleo essencial de *L. dentata* e de *M. fragrans* obtidos das suas partes aéreas e de suas sementes, respectivamente, bem como o efeito inseticida desses óleos em *M. domestica* e em *C. albiceps*.

No capítulo 1, a caracterização química do óleo essencial de *L. dentata* (OEL) revelou a composição principal pelos monoterpenoides 1,8 cineol (41,67%), canfôra (17,36%) e linalol oxide (16,46%). Tendo em vista que trabalhos comprovaram a atividade inseticida para esses e outros compostos monoterpenos em diferentes artrópodes, o efeito inseticida do OEL foi avaliado em suas diferentes concentrações (1, 2,5, 5 e 10%) em larvas e adultos de *M. domestica* e *C. albiceps*.

O ensaio larvicida consistiu na imersão das larvas em diferentes concentrações do OEL (0,25, 0,5, 1, 2,5% para *M. domestica* e 5, 10, 20, 30% para *C. albiceps*) e observou-se que as concentrações do óleo à 2,5% foram eficazes frente a *M. domestica* o que não foi evidenciado em *C. albiceps* quando utilizou-se até mesmo concentrações maiores (30%). Quanto aos ensaios adulticidas, o óleo apresentou toxicidade avaliada por dois métodos. Valores de concentração letal ( $CL_{50}$ ) obtidos a partir do método de aplicação superficial foram de  $3,13 \pm 0,64$  e  $1,39 \pm 0,19\%$  (p/v) para *M. domestica* e *C. albiceps*, respectivamente, indicando uma necessidade de maior quantidade de óleo aplicado para *M. domestica*. Outro método utilizado para analisar efeito adulticida foi a exposição ao papel impregnado com diferentes concentrações do óleo no papel (10, 25, 50, e 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) a fim de avaliar um possível efeito fumigante. Nesse ensaio, foi possível observar também a toxicidade do óleo com valores de  $LC_{50}$  para *M. domestica* e *C. albiceps* de  $4.15 \pm 0.64$  e  $5.14 \pm 0.81\%$ , respectivamente. Estes resultados foram satisfatórios e superiores aos valores reportados na literatura com o composto majoritário de *L. dentata* (1,8 cineol) em larvas de *M. domestica* (SUKONTASON et al., 2004). Isso foi também verificado para os constituintes (Fenchona, 1,8-cineole e cânfora) de *Lavandula luisieri* L. em que nenhum constituinte químico individual apresentou bioatividade (anti-alimentar), sugerindo um efeito sinérgico (GONZALEZ-COLOMA et al., 2006) dos componentes do óleo. Em adição, o presente trabalho verificou uma bioatividade dos óleos diferente entre as espécies de moscas estudadas, uma característica de óleos essenciais não incomum quando se avalia a atividade inseticida em diferentes espécies (ISMAN, 2000).

No capítulo 2 continuou-se os estudos de controle de *M. domestica* e de *C. albiceps* a partir do uso do óleo essencial de *M. fragrans* (OEM). O óleo obtido constituiu-se quimicamente principalmente por monoterpenoides, sendo o beta-pineno (26 %), alfa-pineno (10,51%) e sabineno (9,16%) os compostos majoritários. Entre esses compostos, o monoterpeno  $\alpha$ -pineno foi estudado frente a *M. domestica* e demonstrou atividade inseticida com toxicidade nas larvas que inibiram o desenvolvimento das pupas (SHARMA; SAXENA, 1974); efeito adulticida quando o óleo foi aplicado topicamente e efeito fumigante para os insetos adultos (LEE et al., 1997; PALACIOS et al., 2009).

Dando continuidade aos estudos de avaliação inseticida, foi possível verificar que o óleo essencial de *M. fragrans* (5%) apresentou atividade larvicida em *M. domestica* utilizando-se o método de imersão. A concentração de 2.5% de OEM inibiu o desenvolvimento pupal assim como evidenciado para o tratamento com *L. dentata* (1%) no capítulo 2 para a mesma espécie. Não foi observada ação larvicida em *C. albiceps*. O efeito larvicida do OEM foi reportado em outros insetos como *Anopheles stephensi* (SENTHILKUMAR et al., 2009) e foi verificado que o bioproduto alterou os níveis de proteína, lipídios e carboidratos para larvas tratadas.

O óleo de *M. fragrans* foi avaliado para o efeito adulticida e apresentou valores  $CL_{50}$  de  $2.02 \pm 0.56$  % (p/v) para *C. albiceps* e  $8.57 \pm 2.41$  % (p/v) para *M. domestica* quando as moscas foram tratadas topicamente representando ser mais tóxico na mosca varejeira. A diferença de bioatividade observada entre as espécies pode estar relacionada às diferenças de desintoxicação do óleo pelos insetos. Voris et al. (2018) observaram que o OEM não foi metabolizado pelas fêmeas de *Aedes aegypti* e sugeriram a isso o seu maior efeito inseticida quando tratadas superficialmente. Além disso, esses autores atribuíram a ação adulticida também à composição principal pelos monoterpenos sabineno (52,1%) e  $\alpha$ -pineno (12,8%), majoritários também do óleo em estudo.

Em adição, os insetos do presente estudo, foram expostos ao papel impregnado a fim de avaliar a toxicidade por fumigação de *M. fragrans* e demonstrou valores  $CL_{50}$  de  $2.74 \pm 0.24$  % (p/v) e  $3.65 \pm 0.48$  % (p/v) para *M. domestica* e *C. albiceps*, respectivamente. O efeito fumigante do OEM foi dependente da concentração e tempo de exposição, fatores observados também por Chaubey (2008) em *Callosobruchus chinensis*.

Ao final dos dois primeiros capítulos foi possível evidenciar o efeito inseticida para os bioprodutos e o comportamento diferente dependendo da espécie de mosca em estudo para os ensaios larvicida e adulticida (aplicação tópica) quando expostas nas concentrações previamente determinadas dos óleos. Isso sugere que as diferenças morfológicas das espécies podem influenciar na interação enzimática dos constituintes do óleo bem como a concentração

necessária dos constituintes para se obter o efeito inseticida (LOPES et al., 2014). Tamanho de corpo, pilosidade e mecanismos de defesa também devem ser considerados (SUKONTASON et al., 2004). Adicionalmente o tipo de monoterpenos majoritários dos óleos influenciou no nível de toxicidade principalmente no efeito fumigante, o qual foi mais eficaz para *M. fragrans*. Esse óleo é composto principalmente por monoterpenos hidrocarbonetos que são substâncias altamente voláteis além de possuírem afinidade pela acetilcolinesterase, uma enzima envolvida em mecanismos neurotoxicológicos nos insetos.

De posse a esses resultados, foi verificado a potencialidade dos óleos essenciais estudados para o controle de *M. domestica* e *C. albiceps*. No entanto, sabe-se que os óleos essenciais possuem uma aplicação limitada devido à sua rápida volatilidade. Porém, com o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados é possível melhorar a proteção dos OEs além de conferir vantagens relacionadas com o aumento da eficácia, manutenção das características físico-químicas contribuindo para a sua melhor aceitabilidade e podem apresentar uma liberação controlada.

Considerando as vantagens da nanotecnologia, no capítulo 4, foi abordada a preparação de nanoemulsões dos óleos essenciais de *M. fragrans* e *L. dentata* à 5% utilizando o método de emulsificação sob alta agitação com resfriamento.

A fim de avaliar físico-quimicamente as nanoemulsões após a preparação e 7, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento a temperaturas ambiente (24 °C), de refrigeração (4 °C) e de câmara climática (40 °), as amostras foram caracterizadas quanto ao tamanho médio das gotículas, índice de polidispersão, pH e potencial zeta. Após a preparação, ambas formulações apresentaram tamanho médio nanométrico (64-87 nm); índice de polidispersão inferior a 0,3; pH fracamente ácido (4,9 -5,6) e potencial zeta negativo configurando propriedades nanométricas adequadas como relatada por CODEVILLA e colaboradores (2015) para o encapsulamento de produtos naturais. Em adição foi possível verificar que a manufatura das nanoemulsões não interferiram na quantificação da maioria dos compostos dos óleos essenciais.

Referente ao estudo de estabilidade de 90 dias, as características físico-químicas das nanoemulsões dos óleos essenciais em estudo (tamanho médio de gotícula e IPD) se mantiveram para as amostras que permaneceram em temperatura de refrigeração. O pH das nanoemulsões de *L. dentata* variou após 30 dias da preparação das amostras em temperatura baixa (4 °C). A composição majoritária do óleo essencial de *M. fragrans* (alfa-pineno, beta-pineno, alfa-limoneno, sabineno e gama-terpineno) foram estáveis durante o estudo em condições de armazenamento à 4 e 24 °C de temperatura. Diferentemente, a composição principal do óleo essencial de *L. dentata* (1,8 cineol, fenchona, cânfora, alpha-pineno e



sabineno) variou de acordo com tempo e condição de armazenamento. Nesse sentido, é importante considerar a natureza química dos constituintes para o processo de decomposição térmica ou volatilização dos óleos. Adicionalmente a estabilidade das nanoestruturas frente às condições de estocagem. Os resultados do estudo de estabilidade corroboram com os obtidos por de Godoi e colaboradores (2017) para nanoemulsões do óleo de *Eucalyptus globulus* preparadas pelo mesmo método do presente trabalho. No estudo, as formulações foram estáveis quanto as características físico-químicas em temperatura de refrigeração (4 °C) por 90 dias.

Finalizando o capítulo 3, os resultados obtidos a partir da caracterização das formulações nanotecnológicas demonstraram que o método proposto foi adequado para a formação dos sistemas dispersos. Após um período de tempo (0-90 dias) sob diferentes condições de armazenamento, as nanoemulsões foram capazes de proteger, principalmente, os compostos majoritários do óleo essencial de *M. fragrans*. Cabe salientar que esse fato é interessante, uma vez que tais sistemas podem promover um aumento da estabilidade e conseqüentemente a permanência dos óleos essenciais no local de aplicação. O efeito protetivo contra a volatilização e decomposição de óleos essenciais a partir de nanoemulsões já foi observada para maior estabilidade dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* (DE GODOY et al., 2017) e *Melaleuca alternifolia* (FLORES et al., 2011).

Com base destas informações, o capítulo 5 considerou a utilização das nanoemulsões de *L. dentata* e *M. fragrans* para o controle de adultos e larvas de *M. domestica* e de *C. albiceps* bem como a avaliação da possibilidade na inibição da acetilcolinesterase dos insetos pelos óleos livre e nanoemulsionado. Os resultados sugerem que a NE-OM 5% é um produto larvicida parcialmente promissor (50% de mortalidade) em *M. domestica*. Esse resultado reduzido observado ao comparar com o óleo essencial livre de *M. fragrans* pode ser explicado pelo tamanho das gotículas formadas podendo dificultar a passagem pelos poros do corpo da larva (NEL et al., 2009).

Além disso, a bioatividade adulticida avaliada para as nanoemulsões expressaram que as formulações NE-OL 5% e NE-OM (2,5% e 5%) provocaram toxicidade tóxica em *M. domestica* e *C. albiceps*, respectivamente. Com relação a ação fumigante as formulações contendo nanoemulsões de noz-moscada 5% foram eficazes contra as espécies de *M. domestica* e *C. albiceps*. Dessa forma, foi possível verificar o efeito inseticida a partir das nanoemulsões e a variabilidade na atividade observada entre as nanoemulsões resultante, principalmente da composição dos óleos envolvidos para a formulação nanotecnológica e seus efeitos a partir da mesma.

A fim de elucidar o mecanismo de ação das formulações testadas foi determinada a atividade da enzima acetilcolinesterase dos insetos após os tratamentos e observou-se uma certa atividade inseticida relacionada com a inibição da enzima, principalmente para os ensaios realizados em larvas e em adultos tratados topicamente demonstrando ser um mecanismo de ação tóxica dos óleos. No entanto, é importante salientar que não houve uma correlação direta entre a toxicidade em adultos submetidos ao efeito de fumigação com a inibição da AChE revelando que existem outros possíveis mecanismos de ação para os óleos.

O conjunto de todos os resultados obtidos neste trabalho demonstra a viabilidade da produção das nanoemulsões contendo os óleos essenciais de *L. dentata* e *M. fragrans* bem como a atividade inseticida desses bioprodutos frente a *M. domestica* e *C. albiceps*. Por fim, tendo conhecimento da importância da vetorização de patógenos a partir de *M. domestica* e *C. albiceps* e a necessidade de medidas alternativas para o controle desses dípteros bem como a obtenção de nanoemulsões, as quais possibilitaram uma proteção aos óleos essenciais, o presente trabalho contribui para o desenvolvimento tecnológico de uma formulação inovadora para o controle de *M. domestica* e *C. albiceps*. Como perspectiva para sua continuidade, destaca-se o desenvolvimento de um produto final comercial.

## 7 CONCLUSÕES

- Os óleos essenciais de *L. dentata* e de *M. fragrans* a partir das partes aéreas e das sementes, respectivamente foram extraídos com sucesso utilizando o aparato Clevenger e apresentaram os terpenoides como os principais compostos.
- Foi possível verificar atividade inseticida do óleo de *L. dentata* em *M. domestica* nos bioensaios larvicida e adulticida (toxicidade tópica e fumigante). O óleo apresentou efeito tóxico em adultos de *C. albiceps* (toxicidade tópica e fumigante).
- O óleo obtido a partir das sementes de *M. fragrans* provocou efeito inseticida em larvas e adultos de *M. domestica* por imersão e exposição ao papel impregnado, respectivamente. O óleo apresentou efeito tóxico em adultos de *C. albiceps* (toxicidade tópica e fumigante).
- Foram desenvolvidas dispersões coloidais (nanoemulsões) contendo os óleos essenciais que apresentaram características físico-químicas compatíveis com os sistemas nanométricos. A manufatura das formulações não influenciou a composição química dos óleos e os sistemas se mantiveram estáveis quando armazenados em temperatura de refrigeração.
- As nanoemulsões desenvolvidas apresentaram efeito inseticida frente a adultos de *M. domestica* e *C. albiceps*.
- A atividade inseticida aumentou quando a atividade da enzima acetilcolinesterase diminuiu, principalmente nos ensaios realizados em larvas e em adultos tratados topicamente, possivelmente sendo este, um dos principais mecanismos da ação inseticida.
- Os óleos e as formulações desenvolvidas nesse trabalho mostraram-se promissores para o controle de *M. domestica* e *C. albiceps*.



## REFERÊNCIAS

ACEVEDO-FANI, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Nanostructured emulsions and nanolaminates for delivery of active ingredients: Improving food safety and functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 60, p. 12-22, 2017.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2009.

ADENUSI, A. A.; ADEWOGA, T. O. S. Human intestinal parasites in non-biting synanthropic flies in Ogun State, Nigeria. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 11, p. 181-189, 2013.

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.

AL-MUSAYEIB, N. M.; MOTHANA, R. A.; MATHEEUSSEN, A.; COS, P.; MAES, L. *In vitro* antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 49, n. 12, p. 1-7, 2012.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 7-20, 2009.

ASAKURA, K. Phosphatase activity in the larvae of the euryhaline mosquito, *Aedes togoi* Theobold, with special reference to sea water adaptation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 31, p. 325-337, 1978.

BARCELOUX, D. Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). **Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants, and Venomous Animals**, v. 55, n. 6, p. 373-379, 2009.

BÉJAR, V.; CHUMPITAZ, J.; PAREJA, E.; VALENCIA, E.; HUAMÁN, A.; SEVILLA, C.; TAPIA, M.; SAEZ, G. *Musca domestica* como vector mecánico de bacterias enteropatógenas en mercados y basurales de Lima y Callao. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 23, p. 39-43, 2006.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 543, p. 251-272, 2003.

BOSLY, A. H. Evaluation of insecticidal activities of *Mentha piperita* and *Lavandula angustifolia* essential oils against house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Journal of Entomology and Nematology**, v. 5, n. 4, p. 50-54, 2013.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PIERRER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.

BOULOGNE, I.; PETIT, P.; OZIER-LAFONTAINE, H; DESFONTAINES, L.; LORANGER-MERCIRIS, G. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 325-347, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B., OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). **Planta Medica**, v. 69, n. 11, p. 1-12, 2003.

CÁRCAMO, M. C.; SILVA, A. Z.; RIBEIRO, P. B.; MENEZES, A. M. D. Ação do citral e citronelal sobre larvas de *Lucilia sericata* (Meigen, 1926) (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPEL. **Anais Eletrônicos...** Pelotas, RS, 2007.

CASIDA, J. E.; TOMIZAWA, M. Insecticide interactions with gamma-aminobutyric acid and nicotinic receptors: Predictive aspects of structural models. **Journal of Pesticide Science**, v. 33, n. 1, p. 4-8, 2008.

CAVANAGH, H. M. A.; WILKINSON, J. M. Biological activities of lavender essential oil. **Phytotherapy research**, v. 16, n. 4, p. 301-308, 2002.

CHAIWONG, T.; SRIVORAMAS, T.; SUEABSAMRAN, P.; SUKONTASON, K.; SANFORD, M. R.; SUKONTASON, K. L. The blow fly, *Chrysomya megacephala*, and the house fly, *Musca domestica*, as mechanical vectors of pathogenic bacteria in Northeast Thailand. **Tropical Biomedicine**, v. 31, n. 2, p. 336-346, 2014.

CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food Chemistry**, v. 172, p. 298-304, 2015.

CHAUBEY, M. K. Fumigant toxicity of essential oils from some common spices against pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Oleo Science**, v. 57, n. 3, p. 171-179, 2008.

CHOI, W.; PARK, B.; LEE, Y.; JANG, D. Y.; YOOND, H. Y.; LEE, S. Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. **Crop Protection**, v. 25, n. 4, p. 398-401, 2006.

COATS, R.; KARR, L.L.; DREWES, C. D. Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. In: HEDIN, P. (Ed.). **Natural Occurring Pest Bioregulators**. Washington, DC: American Chemical Society Symposium Series, 1991. 449v. p. 305–316.

COCCO, P. On the rumors about the silent spring. Review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 379-402, 2002.

CODEVILLA, C. F.; BAZANA, M. T.; DA SILVA C. B.; BARIN, J. S.; MENEZES, C. R. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. **Ciência e Natura**, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, v. 37, p. 142-151, 2015.

COHEN, D.; GREEN, M.; BLOCK, C.; SLEPON, R.; AMBAR, R.; WASSERMAN, S.; LEVINE, M. M. Reduction of transmission of shigellosis by control of houseflies (*Musca domestica*). **The lancet**, v. 337, p. 993-997, 1991.

COPPING, L. G.; DUKE, S. O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science**, v. 63, n. 6, p. 524-554, 2007.

DE ASSIS, H. C. D.; NICARETA, L.; SALVO, L. M.; KLEMZ, C.; TRUPPEL, J. H.; CALEGARI, R. Biochemical biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Ancistrus multispinis*. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 52, n. 6, p. 1401-1407, 2009.

DE GODOI, S. N.; QUATRIN, P. M.; SAGRILLO, M. R.; NASCIMENTO, K.; WAGNER, R.; KLEIN, B.; SANTOS, R. C. V.; OURIQUE, A. F. Evaluation of stability and in vitro security of nanoemulsions containing eucalyptus globulus oil. **Biomed Research International**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

DELEITO, C. S. R.; BORJA, G. E. M. Nim (*Azadirachta indica*): uma alternativa no controle de moscas na pecuária. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 293-298, 2008.

DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN. **Flora ilustrada Catarinense: Rubiáceas**. 2005. 1v.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 565-592, 2014.

DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29-35, 2015.

DONSI, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106-120, 2016.

DU, S.; YANG, K.; WANG, C.; YOU, C.; GENG, Z.; GUO, S.; DENG, Z.; LIU, Z. Chemical constituents and activities of the essential oil from *Myristica fragrans* against cigarette beetle *Lasioderma serricorne*. **Chemistry & biodiversity**, v. 11, n. 9, p. 1949-1456, 2014.

- DUPUY, N.; MOLINET, J.; MEHL, F.; NANLOHY, F.; DRÉAU, Y. L.; KISTER, J. Chemometric analysis of mid infrared and gas chromatography data of Indonesian nutmeg essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 596-601, 2013.
- EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Analysis of liposomes. **Talanta**, v. 68, n. 5, p. 1432-1441, 2006.
- EL-ALFY, A. T.; WILSONA, L.; ELSOHLYB, M.; EHAB, A.; ABOURASHEDD, A. Towards a better understanding of the psychopharmacology of nutmeg: Activities in the mouse tetrad assay. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 2, p. 280-286, 2009.
- ELLMAN G. L.; COUTERNEY, D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- FERNANDES, L. F.; PIMENTA, F. C.; FERNANDES, F. F. First report of human myiasis in Goiás state, Brazil: frequency of different types of myiasis, their various etiological agents, and associated factors. **Journal Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 32-38, 2009.
- FETENE, T.; WORKU, N. Public health importance of non-biting cyclorrhaphan flies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 2, p. 187-191, 2009.
- FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: Protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.
- FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructure system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 254-263, 2009.
- FOTEDAR, R. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) in the transmission of *Vibrio cholerae* in India. **Acta Tropica**, v. 78, n. 1, p. 31-34, 2001.
- GERWICK, B. C. Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. **Pest Management Science**, v. 70, n. 8, p. 1169-1185, 2014.
- GETACHEW, S.; GEBRE-MICHAEL, T.; ERKO, B.; BALKEW, M.; MEDHIN, G. Non-biting cyclorrhaphan flies (Diptera) as carriers of intestinal human parasites in slum areas of Addis Ababa, Ethiopia. **Acta Tropica**, v. 103, n. 3, p. 186-94, 2007.
- GODOI, S. N. **Estudo da citotoxicidade *in vitro* de nanoemulsões contendo óleo de *Eucalyptus globulus***. 2016. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biomedicina) – Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2016.
- GONZÁLEZ-COLOMA, A.; MARTÍN-BENITO, D.; MOHAMED, N.; GARCÍA-VALLEJO, M. C.; SORIA, A. C. Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 8, p. 609-616, 2006.



GUPTA, A. K.; NAYDUCH, D.; VERMA, P.; SHAH, B.; GHATE, H. V.; PATOLE, M. S.; SHOUCHE, Y. S. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 3, p. 581-593, 2012.

GUPTA, A. D.; BANSAL, V. K.; BABU, V.; MAITHIL, N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt). **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 25-31, 2013.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, C.; MAESTRO, A.; SOLÈ, I.; PEY, C. M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 245-251, 2008.

ISIKBER, A. A.; ALMA, M. H.; KANAT, M.; KARCI, A. Fumigant toxicity of essential oils from *Laurus nobilis* and *Rosmarinus officinalis* against all life stages of *Tribolium confusum*. **Phytoparasitica**, v. 34, n. 2, p. 167-177, 2006.

IMELOUANE, B.; ELBACHIRI, M.; ANKIT, M.; BENZEID, H.; KHEDID, K. Physico-Chemical compositions and antimicrobial activity of essential oil eastern Moroccan *Lavandula dentata*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 11, n. 2, p. 113-118, 2009.

ISLAM, R.; ISLAM, K. R.; AL-REZA, S. M.; JEONG, Y. T.; SONG, C. H.; KHALEQUZZAMAN, M. 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**, v. 89, n. 7, p. 1241-1246, 2009.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, p. 603-608, 2000.

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.

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, n. 2, p. 197-204, 2011.

JAGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTI, F. S.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130-140, 2009.

JEROBIN, J.; SURESHKUMAR, R. S.; ANJALI, C.H.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1750-1756, 2012.

JOSHI, M.; MÜLLER, R. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 161-172, 2008.

JOUAD, H.; HALOUI, M.; RHIOUANI, H.; EL HILALY, J.; EDDOUKS, M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 175-182, 2001.

KARAMI-MOHAJERI, S.; NIKFAR, S.; ABDOLLAHI, M. A systematic review on the nerve–muscle electrophysiology in human organophosphorus pesticide exposure. **Human and Experimental Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 92-102, 2014.

KAUFMAN, P. E.; SCOTT, J. G; RUTZ, D. A. Monitoring insecticide resistance in house flies (Diptera: Muscidae) from New York dairies. **Pest Management Science**, v. 57, n. 6, p. 514-521, 2001.

KHAMESIPOUR, F.; LANKARANI, K. B.; HONARVAR, B.; KWENTI, T. E. A systematic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L.). **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, p. 1049-1064, 2018.

KING, A. M.; AARON, C. K. Organophosphate and Carbamate Poisoning. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 133-151, 2015.

KOSTIC, I.; PETROVIC, O.; MILANOVIC, S.; POPOVIC, Z.; STANKOVIC, S.; TODOROVIC, G.; KOSTI, M. Biological activity of essential oils of *Athamanta haynaldii* and *Myristica fragrans* to gypsy moth larvae. **Industrial Crops and Products, Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 17-20, 2013.

KRISTENSEN, M.; SPENCER, A. G.; JESPERSEN, J. B. The status and development of insecticide resistance in Danish populations of the housefly *Musca domestica* L. **Pest Management Science**, v. 57, n. 1, p. 82-89, 2001.

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

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Efficacy of *Mentha piperita* and *Mentha citrata* essential oils against housefly, *Musca domestica* L. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 106-112, 2012.

KUMAR, P.; MISHRA, S; MALIK, A.; SATYA, S. Biocontrol potential of essential oil monoterpenes against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 1-6, 2014.

LAI, F.; WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H.; FADDA, A. M. Artemisia arborescens L Essential Oil–Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Potential Agricultural Application: Preparation and Characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2006.

LEE, S.; TSAO, R.; PETERSON, C.; COATS, Jr. Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and house fly (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n. 4, p. 883-892, 1997.

LOHMEYER, K. H.; POUND, J. M. Laboratory evaluation of novaluron as a development site treatment for controlling larval horn flies, house flies, and stable flies (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 647-651, 2012.

LÓPEZ, A.; CASTRO, S.; ANDINAA, M.J.; X. MUNGUÍA, U., B.; LLABOTB, J.M.; ELDERC, H.; DELLACASSA, E.; PALMAB, DOMÍNGUEZA, S. L. Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 209-216, 2014.

LUCIA, A.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; AUDINO, P. G.; MASUH, H. Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of Eucalyptus essential oils. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6083–6087, 2009.

MACPHERSON, L. J.; HWANG, S. W.; MIYAMOTO, T.; DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A.; STORY, G. M. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 32, n. 4, p. 335-343, 2006.

MALDONADO, M. A.; CENTENO, N. Quantifying the potential pathogens transmission of the blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 2, p. 213-216, 2003.

MALIK, A.; SINGH, N.; SATYA, S. Housefly (*Musca domestica*): a review of control strategies for a challenging pest. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 42, n. 4, p. 453-469, 2007.

MARTINI, É.; LEO, F.; CARVALHO, E. L. S.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, H. F. Adsorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 930-934, 2007.

MARTINS, I. M.; BARREIRO, M. F.; COELHO, M.; RODRIGUES, A. E. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 245, p. 191-200, 2014.

MCNAIR, C. M. Ectoparasites of medical and veterinary importance: drug resistance and the need for alternative control methods. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 351-363, 2015.

MILLAR, N. S.; DENHOLM, I. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. **Invertebrate Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 53-66, 2007.

MISHRA, B; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and application toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 9-24, 2010.

MOGHIMI, R.; ALIAHMADI, A.; MCCLEMENTS, D. J.; RAFATI, H. Investigations of the effectiveness of nanoemulsions from sage oil as antibacterial agents on some food borne pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 69-76, 2016.

MOREY, R. A.; KHANDAGLE, A. J. Bioefficacy of essential oils of medicinal plants against housefly, *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1799-1805, 2012.

MOSHIRI, M.; DARCHINI-MARAGHEH, E.; BALALI-MOOD, M. Advances in toxicology and medical treatment of chemical warfare nerve agents. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 81, p. 1-24, 2012.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 157-177, 2013.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-167, 2000.

NATHAN, S. S.; HISHAM, A.; JAYAKUMAR, G. Larvicidal and growth inhibition of the malaria vector *Anopheles stephensi* by triterpenes from *Dysoxylum malabaricum* and *Dysoxylum beddomei*. **Fitoterapia**, v. 79, n. 2, p. 106-111, 2008.

NEL, A.; MÄDLER, L.; VELEGOL, D.; XIA, T.; HOEK, E.M.V.; SOMASUNDARAN, P.; KLAESSIG, F.; CASTRANOVA, V.; THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature Materials**, v. 8, n. 7, p. 543-557, 2009.

NGOEN-KLAN, R.; MOOPHAYAK, K.; Klong-klaew, T.; IRVINE, K. N.; SUKONTASON, K. L.; PRANGKIO, C.; SOMBOON, P.; SUKONTASON, K. Do climatic and physical factors affect populations of the blow fly *Chrysomya megacephala* and house fly *Musca domestica*? **Parasitology Research**, v. 109, n. 5, p. 1279-1292, 2011.

NIST/EPA/NIH mass spectral library and search/analysis programs. Hoboken: J. Wiley and Sons, 2008.

OLGUN, S.; MISRA, H. P. Pesticides induced oxidative stress in thymocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 290, n. 1, p. 137-144, 2006.

OLAJIDE, O. A.; AJAYI, F. F.; EKHELAR, A. I.; AWE, S. O.; MAKINDE, J. M.; ALADA, A. R. Biological effects of *Myristica fragans* (nutmeg) extract. *Phytotherapeutic Research*, v 13, n. 4, p. 344-355, 1999.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; DUARTE, J. L.; CRUZ, R. A. S.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. A.; PENICHE, T.; DA CONCEIÇÃO, E. C. 4; DE OLIVEIRA, L. A. R.; FAUSTINO, S. M. M.; FLORENTINO, A. C.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P. *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 2, p. 1-11, 2017.

OSENI, O. A.; IDOWU, A. S. K. Inhibitory activity of aqueous extracts of horseradiash *Moringa oleifera* (Lam) and Nutmeg *Myristica fragrans* (Hoult) on Oxidative stress in alloxan induced diabetic male wistar albino rats. **Americal Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 4, n. 2, p. 64-75, 2014.

OYARZÚN, M. P.; LI, A. Y.; FIGUEROA, C. C. High levels of insecticide resistance in introduced horn fly (Diptera: Muscidae) populations and implications for management. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 1, p. 258-265, 2011.

PALACIOS, S.M.; BERTONI, A.; ROSSI, Y.; SANTANDER, R.; URZÚA, A. Efficacy of essential oils from edible plants as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. **Molecules**, v. 14, n. 5, p. 1938-1947, 2009.

PARDEIKE, J.; HOMMOS, A.; MÜLLER, R. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Phammaceutics**, v. 366, p. 170-184, 2009.

PASTOR, B.; CICKOVÁ, H.; KOZÁNEK, M.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TAKÁC, P.; ROJO, S. Effect of the size of the pupae, adult diet, oviposition substrate and adult population density on egg production in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **European Journal Entomology**, v. 108, n. 4, p. 587-596, 2011.

PATEL, D. K.; KUMAR, R.; LALOO, D.; HEMALATHA, S. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 3, p. 239-250, 2012.

PAVELA, R. History, Presence and Perspective of Using Plant Extracts as Commercial Botanical Insecticides and Farm Products for Protection against Insects – a Review. **Plant Protection Science**, v. 52, n. 4, p. 229-241, 2016.

PIETROVSKI, E. F. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos das flores de Combretum Leprosum Mart.** 2004. 71f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PISSINATI, A.; MIKAMI, A. Y.; MARQUES, C. R. G. Use of neem and kaolin on nymphs of whitefly in cabbage. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, p. 1487-1490, 2009.

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, n. 6, p. 618-630, 2011.

PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N.K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities e Potentials and challenges. **Food Control**, v. 47, p. 381-391, 2015.

PRUSTY, A. K.; MEENA, D. K.; MOHAPATRA, S.; PANIKKAR, P.; DAS, P.; GUPTA, S. K.; BEHERA, B. K. Synthetic pyrethroids (Type II) and freshwater fish culture: Perils and mitigations. **International Aquatic Research**, v. 7, n. 3, p. 163-191, 2015.

QUINN, R. J.; CARROLL, A. R.; PHAM, N. B.; BARON, P.; PALFRAMAN, M. E.; SURAWEERA, L.; PIERENS, G. K.; MURESAN, S. Developing a drug-like natural product library. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 3, p. 464-468, 2008.

RABÊLO, K. C. N.; THYSSEN, P. J.; SALGADO, R. L.; ARAÚJO, M. S. C.; VASCONCELOS, S. D. Bionomics of two forensically important blowfly species *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) reared on four types of diet. **Forensic Science International**, v. 210, p. 257-262, 2011.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-19, 2014.

RAKITSKY, V. N.; KOBLYAKOV, V. A.; TURUSOV, V. S. Nongenotoxic (Epigenetic) Carcinogens: pesticides as an example a critical review. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 229-240, 2000.

RAO, C. S.; VENKATESWARLU, V.; SURENDER, T.; EDDLESTON, M.; BUCKLEY, N. A. Pesticide poisoning in south India: opportunities for prevention and improved medical management. **Tropical Medicine and International Health**, v. 10, n. 6, p. 581-588, 2005.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 268-276, 2012.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, n. 9, p. 913-920, 2010.

RAYMOND-DELPECH, V.; MATSUDA, K.; SATTELLE, B. M.; RAUH, J. J.; SATTELLE, D.B. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. **Invertebrate Neuroscience**, v. 5, p. 119-133, 2005.

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.

ROCHA, J. B. T.; EMANUELLI, T.; PEREIRA, M. E. Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 53, p. 431-431, 1993.

RODRIGUES, B. K. **Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae)**. 2007. 138 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

ROSMAN Y.; MAKAROVSKY, I.; BENTUR, Y.; DUSHNISTKY, T.; KRIVOY, A. Carbamate poisoning: treatment recommendations in the setting of a mass casualties event. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 27, n. 9, p. 1117-1124, 2009.

ROSSI, Y. E.; PALACIOS, S. M. Fumigant toxicity of Citrus sinensis essential oil on *Musca domestica* L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor. **Acta Tropica**, v. 127, n. 1, p. 33-37, 2013.

ROSSI, Y. E.; PALACIOS, S. M. Insecticidal toxicity of *Eucalyptus cinerea* essential oil and 1,8-cineole against *Musca domestica* and possible uses according to the metabolic response of flies. **Industrial Crops and Products**, v. 63, 133-137, 2015.

ROY, S.; HANDIQUE, G.; MURALEEDHARAN, N.; DASHORA, K.; ROY, S. M.; MUKHOPADHYAY, A.; BABU, A. Use of plant extracts for tea pest management in India. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 11, p. 4831-4844, 2016.

SAILLENFAIT, A.; NDIAYE, D.; SABATÉ, J. Pyrethroids: Exposure and health effects – An update. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 218, n. 3, p. 281-292, 2015.

SASAKI T.; KOBAYASHI, M.; AGUI, N. Epidemiological potential of excretion and regurgitation by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 to food. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 945-949, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHARMA, R.N.; SAXENA, K.N. Orientation and developmental inhibition in the housefly by certain terpenoids. **Journal Medical Entomology**, v. 11, n. 5, p. 617-621, 1974.

SCOTT, J.G.; LEICHTER, C.A.; RINKEVIHC, F.D.; HARRIS, S.A.; SU, C.; ABEREGG, L.C.; MOONG, R.; GEDEN, C.J.; GERRY, A.C.; TAYLOR, D.B.; BYFORD, R.L.; WATSON, W.; JOHNSON, G.; BOXLER, D.; ZUREK, L. Insecticide resistance in house flies from the United States: Resistance levels and frequency of pyrethroid resistance alleles. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 3, p. 377-384, 2013.

SENTHILKUMAR, N.; VARMA, P.; GURUSUBRAMANIAN, G. Larvicidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the Malarial Vector, *Anopheles stephensi* (Liston). **Parasitology Research**, v. 104, n. 2, p. 237-244, 2009.

SHEPPARD, D. C.; HINKLE, N. C. A field procedure using disposable materials to evaluate horn fly insecticide resistance. **Journal of Agricultural Entomology**, v. 4, p. 87-89, 1987.

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.

SODERLUND, D. M. State-dependent modification of voltage-gated sodium channels by pyrethroids. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 2, p. 78-86, 2010.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, p. 102-110, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768p.

SPARKS, T. C. Insecticide discovery: An evaluation and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 1, p. 8-17, 2013.

SRINIVASAN, R. ; JAMBULINGAM, P.; GUNASEKARAN, K. ; BOOPATHIDOSS, P.S. Tolerance of house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) to dichlorvos (76% EC) an insecticide used for fly control in the tsunami-hit coastal villages of southern India. **Acta Tropica**, v. 105, n. 2, p. 187-190, 2008.

SUGUMAR, S.; CLARKE, S.K.; NIRMALA, M.J.; TYAGI, B.K.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 104, n. 3, p. 393-402, 2014.

SUKONTASON, K.L; BOONCHU, N; SUKONTASON, K.; CHOOCHOTE, W. Effects of eucalyptol on house fly (Diptera: Muscidae) and blow fly (Diptera: Calliphoridae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 2, p. 97-101, 2004.

SUKONTASON, K. et al. Forensic entomology cases in Thailand: a review of cases from 2000 to 2006. **Parasitology Research**, v. 101, n. 5, p. 1417-1423, 2007.

SURYAKALA, I.; RAM, G.M.; JYOTHI, K.N. Insect growth regulatory activity of some botanical pesticides – Their role in pest management. **Pestology**, v. 31, p. 40-43, 2007.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TANG, G. W.; YANG, C. J.; XIE, L. D. Extraction of *Trigonella foenum-graecum* L. by supercritical fluid CO<sub>2</sub> and its contact toxicity to *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae). **Journal of Pest Science**, v. 80, n. 3, p. 151-157, 2007.

THANY, S. H.; REYNIER, P.; LENAERS, G. Neurotoxicité des pesticides Quel impact sur les maladies neurodégénératives? **Médecine/sciences**, v. 29, n. 3, 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, n. 3, p. 399-403, 2014.

THYSSEN, P. J.; DE SOUZA, C. M.; SHIMAMOTO, P. M.; SALEWSKI, T. D. E. B; MORETTI, T. C. Rates of development of immatures of three species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) reared in different types of animal tissues: implications for estimating the postmortem interval. **Parasitology Research**, v. 113, n. 9, p. 3373-3380, 2014.



TOMIZAWA, M.; YAMAMOTO, I. Binding of Nicotinoids and the Related Compounds to the Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor. **Journal of Pesticide Science**, v. 17, n. 4, p. 231-236, 1992.

TOMIZAWA, M.; LEE, D. L.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid Insecticides: Molecular Features Conferring Selectivity for Insect versus Mammalian Nicotinic Receptors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 6016-6024, 2000.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 247-268, 2005.

UMPIÉRREZ, M. L.; SANTOS, E.; GONZÁLEZ, A.; ROSSINI, C. Plant essential oils as potential control agents of varroaosis. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 227-244, 2011.

VERMA, S. K.; RASTOGI, S.; JAVED, K.; AKHTAR, M.; ARORAC, I.; SAMIM, M. Nanothymoquinone, a novel hepatotargeted delivery system for treating CCl<sub>4</sub> mediated hepatotoxicity in rats. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 23, p. 2956-2966, 2013.

VORIS, D. G. D.; DIAS, L. D.; LIMA, J. A.; LIMA, K. D. C.; LIMA, J. B. P.; LIMA, A. L. D. S. Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of *Illicium verum* Hook. f., *Pimenta dioica* (L.) Merr., and *Myristica fragrans* Houtt. against Zika virus vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 23, p. 22541-22551, 2018.

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, n. 3, p. 465-469, 2007.

ZHAO, T.; MANIGLIO, D.; CHEN, J.; CHEN, B.; MOTTA, A.; MIGLIARESI, C. Design and optimization of selfnanoemulsifying formulations for lipophilic drugs. **Nanotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1-7, 2015.

ZUHARAH, W. F.; FADZLY, N.; YUSOF, N. A.; DIENG, H. Risky Behaviors: Effects of *Toxorhynchites splendens* (Diptera: Culicidae) Predator on the Behavior of Three Mosquito Species. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2015.

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, n. 2, p. 89-97, 2006.

WAHAB, A.; HAQ, R. U.; AHMED, A.; KHAN, R. A.; RAZA, M. Anticonvulsant activities of nutmeg oil of *Myristica fragrans*. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 2, p. 153-158, 2009.

WALIA, S.; SAHA, S.; TRIPATHI, V.; SHARMA, K. K. Phytochemical biopesticides: some recent developments. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 5, p. 989-1007, 2017.

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, n. 3, p. 355-380, 2005.

WOLANSKY, M. J.; HARRILL, J. A. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 30, n. 2, p. 55-78, 2008.

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, n. 1, p. 152-167, 2013.