

UFRRJ  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da atividade *in vitro* do óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. contra estágios imaturos e adultos de *Ctenocephalides felis felis*.**

Wladimir Mendes Carvalho de Castro

Seropédica, RJ  
Julho de 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Avaliação da atividade *in vitro* do óleo essencial de  
*Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. contra estágios imaturos e adultos de  
*Ctenocephalides felis felis***

WLADYMIR MENDES CARVALHO DE CASTRO

Sob a orientação do Professor  
**Douglas Siqueira de Almeida Chaves**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**, no Programa de Pós Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica, RJ  
Julho de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C355a Castro, Wladymir Mendes Carvalho de, 1982-  
Avaliação da atividade in vitro do óleo essencial de  
Caesalpinia pulcherrima (L.) Sw. contra estágios  
imaturos e adultos de Ctenocephalides felis felis /  
Wladymir Mendes Carvalho de Castro. - Volta Redonda,  
2022.  
79 f.: il.

Orientadora: Douglas Siqueira de Almeida Chaves.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Química, 2022.

1. Caesalpinia pulcherrima. 2. óleo essencial. I.  
Siqueira de Almeida Chaves, Douglas, 1980-, orient.  
II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Química III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**WLADYMIR MENDES CARVALHO DE CASTRO**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 02/08/2022

---

Douglas Siqueira de Almeida Chaves  
(Dr.) UFRRJ (Orientador)

---

Cristiane MartinsCardoso de Salles  
(Dr.<sup>a</sup>) UFRRJ

---

Catharina Eccard Fingolo  
(Dr.<sup>a</sup>) UERJ



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO, ADMINISTRAÇÃO E  
CONTRATOS

FOLHA DE ASSINATURAS

*Emitido em 2022*

**TERMO Nº 879/2022 - PPGQ (12.28.01.00.00.60)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 04/08/2022 10:35 )*  
CRISTIANE MARTINS CARDOSO DE SALLES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
CoordCGQ (12.28.01.00.00.58)  
Matrícula: 1681790

*(Assinado digitalmente em 04/08/2022 09:32 )*  
DOUGLAS SIQUEIRA DE ALMEIDA CHAVES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
ICBS (12.28.01.22)  
Matrícula: 1705075

*(Assinado digitalmente em 04/08/2022 06:59 )*  
CATHARINA ECCARD FINGOLO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 092.778.957-48

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:  
**879**, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **04/08/2022** e o código de verificação: **4a8905829a**

## **Agradecimentos**

Ao professor Dr. Douglas Chaves, pela orientação na área de Produtos Naturais com ênfase em óleos essenciais, pela oportunidade de aprender e pesquisar, pelo apoio dentro e fora da vida acadêmica, e pela compreensão em momentos difíceis. A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Química. Ao Prof. André Marques, pelas contribuições e orientações, pelas caronas matinais a caminho da UFRRJ. Ao Prof. Cristiano Jorge Ringer pela parceria e orientação. À professora Cristiane Martins Cardoso Salles pelo acolhimento e pelo ensino na prática de enzimologia. Ao Dr. Diefrey Ribeiro Campos do programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias UFRRJ pela disponibilidade de ensinar e contribuir com a pesquisa. Aos colegas do Laboratório de Química de Bioativos Naturais da UFRRJ, pela ajuda no companheirismo e dedicação. A todos da empresa JPS Farma LTDA em especial a supervisora Marcela, que sempre acreditou na minha jornada dando todo o apoio e suporte necessário. À farmacêutica Mayara e ao amigo David que sempre me motivaram em todos os momentos. Aos meus familiares, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando meus estudos. Ao meu companheiro Amaro, que em muitos momentos foi necessário compreender a minha ausência em momentos importantes, mas em nenhum instante deixou de me apoiar. Aos queridos amigos Rodrigo, Diego, Giovani, Jéssica, Bebel, Érika, Lucrécia, Fernando, Emyr, Rayssa e Elizabeth que sempre me incentivaram na realização desse sonho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

## RESUMO

CASTRO, Wladimir Mendes Carvalho. **Avaliação *in vitro* do óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima*(L)Sw. contra estágios imaturos e adultos de *Ctenocephalides felis felis*.** 2022. p Dissertação (Mestrado em Química, Produtos Naturais). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022

A interação entre humanos e animais tem aumentado cada vez mais, e com isso, eleva-se a preocupação em relação à saúde desses animais. Gatos e cachorros estão suscetíveis à infestação por carrapatos e pulgas, sendo o *Rhipicephalus sanguineus* e *Ctenocephalides felis felis* os mais comuns. A pulga do gato, conhecida como *C. felis felis*, é um inseto hematófago, sem asas que parasita os animais domésticos, que necessitam de alimentação diária. Deste modo, os animais sofrem constantemente com irritações cutâneas, anemias e dermatites alérgicas. Diante do desenvolvimento de resistência desses insetos frente ao tratamento com produtos químicos, os óleos essenciais mostram-se como alternativas promissoras, visto que já possuem atividade descrita contra alguns insetos. Sabendo-se desse potencial dos óleos essenciais, o presente trabalho tem como objetivo extrair o óleo essencial de *C. pulcherrima*, identificar seus componentes, avaliar sua atividade inseticida contra adultos e estágios imaturos da pulga do gato. Foram realizados testes *in vitro* de *screening*, para avaliar o comportamento das pulgas frente ao óleo essencial, em 10 concentrações diferentes no período de 24 e 48 horas utilizando-se 10 pulgas. Utilizou-se a técnica de impregnação em papel filtro. O óleo essencial de *C. pulcherrima* é rico em germacreno D (47,04 %) e apresentou atividade contra *C. felis*. Contra adultos, foi possível observar mortalidade de 15% e 40% a 800  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , no período de 24 e 48 horas, respectivamente. Contra ovos e pupas, observou-se 100% de mortalidade na concentração máxima (800  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ); já contra larvas, observou-se mortalidade máxima a 400  $\mu\text{g cm}^{-2}$  em ambos os tempos testados. Testou-se também a atividade do óleo essencial, em duas concentrações, na inibição da enzima acetilcolinesterase, mas não foi possível observar esta inibição frente às duas concentrações analisadas. O óleo essencial estudado apresentou atividade significativa tanto para adultos quanto para os estágios imaturos de *C. felis* concluindo-se que possa ser um ótimo candidato para o controle de pulgas, sendo utilizado como uma alternativa para o desenvolvimento de pulicidas naturais.

**Palavras-chave:** óleos essenciais; pulicidas; testes *in vitro*.

## ABSTRACT

CASTRO, Wladimir Mendes Carvalho. **In vitro evaluation of the essential oil of *Caesalpinia pulcherrima*(L)Sw. against immature and adult stages of *Ctenocephalides felis felis*.** 2022. Dissertation (Masterin Chemistry, Natural Products). Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

The interaction between humans and animals has increased more and more, and with that, the concern about the health of these animals increases. Cats and dogs are susceptible to tick and flea infestation, with *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* being the most common. The cat flea, known as *C. felis felis*, is a hematophagous, wingless insect that parasitizes domestic animals that need daily food. In this way, animals are constantly suffering from skin irritations, anemia and allergic dermatitis. Given the development of resistance of these insects to treatment with chemical products, essential oils show themselves as promising alternatives, as they already have described activity against some insects. Knowing this potential of essential oils, the present work aims to extract the essential oil from *Caesalpinia pulcherrima*, identify its components, evaluate its insecticidal activity against adults and immature stages of cat flea. In vitro screening tests were carried out to evaluate the behavior of fleas against the essential oil, at 10 different concentrations in the period of 24 and 48 hours, using 10 fleas. The technique of impregnation on filter paper was used. The essential oil of *C. pulcherrima* is rich in germacrene D (47.04%) and has activity against *C. felis*. Against adults, it was possible to observe mortality between 15% and 40% at 800  $\mu\text{gcm}^{-2}$ , in the period of 24 and 48 hours, respectively. Against eggs and pupae, 100% mortality was observed at the maximum concentration (800  $\mu\text{gcm}^{-2}$ ); against larvae, maximum mortality was observed at 400  $\mu\text{gcm}^{-2}$  in both times tested. The activity of the essential oil was also tested, in two concentrations, in the inhibition of the acetylcholinesterase enzyme, but it was not possible to observe this inhibition in the two analyzed concentrations. The essential oil studied showed significant activity for both adults and immature stages of *C. felis*, concluding that it may be a great candidate for flea control, being used as an alternative for the development of natural pulicidal.

**KEYWORDS:** essential oils; pulicidal; in vitro tests.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação da pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i> .....	17
<b>Figura 2:</b> Demonstração da diferença entre as fêmeas de <i>C. canis</i> (1) e de <i>C. felisfelis</i> (2). A/A') Forma de sua cabeça; B/B') Comprimento da 1ª espinha da combinação frontal de suas espinhas; C/C') Número de cerdas na área lateral indicada ( <i>Lateral Metanotal Area</i> , LMA) .....	18
<b>Figura 3:</b> Ciclo biológico da pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i> .....	19
<b>Figura 4:</b> Fórmula Geral dos inseticidas, organofosforados, carbamatos e acetilcolina .....	22
<b>Figura 5:</b> Fórmula Geral dos inseticidas piretróides e do DDT .....	22
<b>Figura 6:</b> Estruturas dos ciclodienosclordano, dieldrina e aldrina .....	22
<b>Figura 7:</b> Fórmula Geral das avermectinas .....	23
<b>Figura 8:</b> Estrutura do composto amitraz, uma formamidina .....	23
<b>Figura 9:</b> Estruturas da deguelina e da rotenona, dois rotenóides naturais .....	24
<b>Figura 10:</b> Estruturas do malation, DEET e permetrina.....	25
<b>Figura 11:</b> A forma como a ACh se complexa ao sítio ativo da AChE. ....	26
<b>Figura 12:</b> Demonstração de 3 mutações no sítio ativo da AChE em insetos resistentes. ....	26
<b>Figura 13:</b> Representação dos locais de mutações no canal de sódio de insetos resistentes a organoclorados/piretróides .....	28
<b>Figura 14:</b> Resistência à penetração.....	29
<b>Figura 15:</b> Demonstração do espécime <i>Caesalpinia pulcherrima</i> .....	35
<b>Figura 16:</b> Estrutura da galactomanana.....	37
<b>Figura 17:</b> Impregnação por papel filtro .....	41
<b>Figura 18:</b> Avaliação da atividade adulticida.....	42
<b>Figura 19:</b> Avaliação da enzima acetilcolinesterase .....	44
<b>Figura 20:</b> Cromatograma da amostra realizada no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectro de massas .....	46
<b>Figura 21:</b> Estrutura química dos 5 principais compostos majoritários da espécie <i>C. pulcherrima</i> .....	48
<b>Figura 22:</b> Exemplo de vias biossintéticas, pelos quais os compostos demonstrados estão relacionados frente a sua formação na respectiva planta. ....	49
<b>Figura 23:</b> Estruturas químicas dos outros componentes identificados na espécie <i>C. pulcherrima</i> .....	50
<b>Figura 24:</b> Porcentagem de várias categorias de sesquiterpenos com potencial inibitório da AChE. ....	56
<b>Figura 25:</b> Demonstração de como a nicotina pode ativar um receptor colinérgico.....	57
<b>Figura 26:</b> Espectro da espécie <i>Caesalpinia pulcherrima</i> nas eluições 1 a 3. ....	73
<b>Figura 27:</b> Espectro da espécie <i>Caesalpinia pulcherrima</i> nas eluições 4 a 6 .....	74
<b>Figura 28:</b> Espectro da espécie <i>Caesalpinia pulcherrima</i> nas eluições 7 a 9 .....	75
<b>Figura 29:</b> Espectro da espécie <i>Caesalpinia pulcherrima</i> nas eluições 10 a 12 .....	76
<b>Figura 30:</b> Espectro da espécie <i>Caesalpinia pulcherrima</i> nas eluições 13 a 15 .....	77
<b>Figura 31:</b> Espectro da espécie <i>Caesalpinia pulcherrima</i> nas eluições 16 a 18 .....	78
<b>Figura 32:</b> Espectro da espécie <i>Caesalpinia pulcherrima</i> nas eluições 19 a 20 .....	79

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1: Composição química do óleo essencial de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 2: Mortalidade na fase adulta e estágios imaturos.....</b>	<b>52</b>

**LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1:</b> Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase frente ao óleo essencial de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> .....	54
---	----

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIÇÕES

Å.....	Ângstrom(s)
µg.....	Micrograma(s)
µL.....	Microlitro(s)
µm.....	Micrometro(s)
AA.....	Aminoácido(s), representado(s) em figuras
ACh.....	Acetilcolina, um neurotransmissor colinérgico
AChE.....	Acetilcolinesterase, enzima que metaboliza a acetilcolina
AINEs.....	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
Ala.....	Alanina (Aminoácido)
°C.....	Graus Celcius
CDC.....	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (“ <i>Center for Disease Control and Prevention</i> ”), dos EUA
CEUA.....	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CG.....	Cromatografia Gasosa
CL <sub>50</sub> / CL <sub>90</sub> ....	Concentração Letal a 50% e a 90%
cm.....	Centímetro(s)
CYP450.....	Citocromo P450 (enzimas metabólicas)
DDT.....	Dicloro-difenil-tricloroetano, inseticida organoclorado
DEET.....	<i>N,N</i> -dietil- <i>m</i> -toluamida, repelente
DIC.....	Detector por Ionização de Chama
DMSO.....	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DTNB.....	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) [ <i>5,5'</i> - <i>dithiobis</i> (2-nitrobenzoic acid)]
EM.....	Espectrômetro de Massas
EUA.....	Estados Unidos da América
FG.....	Fórmula Geral
GABA.....	Ácido Gama-Aminobutírico ( <i>Gamma-AminoButyricAcid</i> )
Gly.....	Glicina (Aminoácido)
GPS.....	Sistema de Posicionamento Global ( <i>Global Positioning System</i> )
GST.....	Glutathione-S-Transferase
h.....	Hora(s)
HGT.....	Transferência de Genes Horizontalmente ( <i>Horizontal Gene Transfer</i> )
HP.....	Hewlett-Packard (marca)
Hys.....	Histidina (Aminoácido)
IGRs.....	Reguladores de Crescimento do Inseto ( <i>InsectGrowthRegulators</i> )
IV.....	Instituto de Veterinária
Leu.....	Leucina (Aminoácido)
LQEPV.....	Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia e Veterinária
m.....	Metro(s)
mg.....	Miligrama(s)
min.....	Minuto(s)
mL.....	Mililitro(s)
mm.....	Milímetro(s)
n.i.....	Não Identificado
nm.....	Nanômetro(s)
OE/OEs.....	Óleo Essencial / Óleos Essenciais
OECP.....	Óleo Essencial de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>
Phe.....	Fenilalanina (Aminoácido)
s.....	Segundo(s)
Ser.....	Serina (Aminoácido)
SN.....	Sistema Nervoso
Tyr.....	Tirosina (Aminoácido)
Val.....	Valina (Aminoácido)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1 As pulgas e sua importância para a saúde pública.....	16
2.2 Inseticidas e similares disponíveis no mercado.....	21
2.3 Características e mecanismo de ação da acetilcolina no sistema nervoso.....	25
2.4 O mecanismo de resistência e boas alternativas.....	27
2.5 Alternativas inovadoras – Óleos essenciais.....	30
2.6 Aplicação dos óleos essenciais em animais de estimação.....	33
2.7 Estudo da <i>Caesalpinia pulcherrima</i> como agente pulicida.....	34
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1 Material vegetal.....	39
4.2 Extração por hidrodestilação, componentes e caracterização química do óleo essencial de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> .....	39
4.3 Preparo das diluições para o teste in vitro.....	40
4.4 Avaliação da atividade aduicida <i>in vitro</i> do óleo essencial contra <i>C. felisfelis</i> ( <i>screening</i> ).....	41
4.5 Avaliação da atividade lavircidain <i>in vitro</i> do óleo essencial contra <i>C. felisfelis</i> ( <i>screening</i> ).....	42
4.6 Avaliação da atividade pupicidain <i>in vitro</i> do óleo essencial contra <i>C. felisfelis</i> ( <i>screening</i> ).....	43
4.7 Avaliação da atividade ovicida in vitro do óleo essencial contra <i>C. felisfelis</i> ( <i>screening</i> ).....	43
4.8 Cálculo da Mortalidade.....	43
4.9 Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase.....	44
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
5.1 Extração por hidrodestilação do óleo essencial de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> .....	45
5.2 Componentes e caracterização química do óleo essencial de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> .....	46
5.3 Mortalidade na fase adulta e estágios imaturos.....	52
5.4 Atividade da enzima acetilcolinesterase.....	54
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>60</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As pulgas são insetos hematófagos de grande importância, tanto na área humana quanto na área veterinária, parasitam animais domésticos causando dificuldades para seus proprietários no controle em casos de infestação. O ambiente doméstico acaba tornando-se um potencial alvo para as pulgas, e conseqüentemente causando problemas de saúde aos humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Atualmente, os estudos sobre esses parasitas, principalmente aqueles com potencial de infecção em humanos, tem crescido com pesquisas na busca de estratégias de combate destes possíveis vetores de doenças. Geralmente, a pulga do gato, *Ctenocephalides felis felis*, pode ser encontrada nos seus hospedeiros na forma adulta e também nas fases imaturas (ovo, larva e pupa), no entanto, as fases imaturas são encontradas tipicamente no ambiente (RUST, 2005). Para o controle e eliminação destes parasitas existem uma variedade de substâncias sendo a sua maioria ativos químicos como inseticidas (pulicidas) específicos para as pulgas, parasiticidas, pesticidas ou praguicidas, a base de compostos organofosforados, organoclorados, piretróides, seja pela aplicação de *sprays*, xampus específicos, *spot-ons*, coleiras, comprimidos mastigáveis entre outros.

O uso indiscriminado destes produtos, pode levar a uma redução da eficácia do tratamento pelo desenvolvimento de resistência a estas substâncias (TAYLOR *et al.*, 2007). Sabendo-se disto, os óleos essenciais têm se mostrado uma alternativa natural para o combate deste ectoparasita, visto que já são amplamente utilizados na agricultura com eficácia comprovada (LAHLOU, 2004).

A procura por produtos que minimizem os efeitos causados por parasitas, tem demonstrado que os óleos essenciais são uma possibilidade de novas tentativas para resolver o problema da transmissão e infestação desses parasitas. Considerando que os óleos essenciais apresentam muitos componentes fitoquímicos, diminuem a chance de parasitas desenvolverem resistência com sua utilização.

Os óleos essenciais são produtos naturais obtidos por várias técnicas disponíveis. A mais utilizada é a hidrodestilação de partes específicas de plantas, sendo os óleos formados por uma complexa rede de constituintes químicos, que juntos garantem uma série de atividades medicinais importantes, como: anti-inflamatória, para questões neurológicas, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, acaricidas e ação inseticida,

dependendo da planta, sua parte escolhida e de sua composição (BASSOLÉ *et al.*, 2014).

A espécie *Caesalpinia pulcherrima* é formada por um arbusto perene que pode atingir até 4 metros de altura, contém espinhos e pertence à família Fabaceae. É uma espécie exótica com origem na América Central, muito utilizada em todas as regiões brasileiras por possuir um rápido crescimento e lindas flores, sendo uma excelente alternativa para seu uso no paisagismo das cidades. Possui uma variedade de atividades terapêuticas, como antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, entre outras de extrema importância (YODSAOUE, *et al.*, 2011).

A presente dissertação tem como objetivo avaliar os resultados da atividade *in vitro* do óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima* no controle da pulga adulta e estágios imaturos (ovo, larva e pupa) da espécie *Ctenocephalides felis felis* e seu potencial ação inseticida.

A partir da extração do óleo essencial das folhas da planta, pela técnica de hidrodestilação, foi possível avaliar a composição química do óleo e a atividade inseticida contra o inseto.

Esta dissertação está organizada em cinco capítulos. O primeiro, a introdução, apresenta o contexto do problema da pesquisa. No segundo, são apresentados os referenciais teóricos que contribuirão para a revisão bibliográfica do estudo. No terceiro capítulo são identificados os objetivos da pesquisa. No quarto são descritos os materiais e métodos aplicados e são identificadas as estratégias que foram trilhadas para o desenvolvimento deste estudo. No quinto, são apresentados os resultados e discussão do trabalho com as análises dos experimentos. E finalmente no sexto capítulo são tecidas as conclusões ou considerações finais da pesquisa.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 As pulgas e sua importância para a saúde pública.

As pulgas são insetos hematófagos da ordem *Siphonaptera*, que podem possuir de 1-8 mm de comprimento, sem presença de asas, com o corpo achatado lateralmente, recoberto por cerdas e de coloração castanha (BENELLI& PAVELA, 2018).

Apresentam peças bucais perfurantes, o que lhes permitem grande perfuração da pele do hospedeiro para sua alimentação sanguínea. As pulgas são insetos de grande importância para a saúde pública e também veterinária, e se destacam por serem vetores de diversos agentes patogênicos, acometendo animais e humanos (LIMA *et al.*, 2020).

Do ponto de vista epidemiológico, as espécies que merecem maior atenção são *Pulex irritans* (conhecida como pulga do homem), *Xenopsylla cheopis* (a pulga do rato), *Ctenocephalides felis felis* (a pulga do gato) e *C. canis* (a pulga do cão) entre os Pulicidae; *Tunga penetrans* (o bicho-de-pé, Tungidae) e as incluídas no gênero *Polygenis* (presentes em roedores silvestres e sinantrópicos, coelhos, lebres e outros, Rhopalopsyllidae) (LINARDI& GUIMARÃES, 2000).

A maioria dessas espécies vivem sobre um determinado hospedeiro, mais especificamente sobre sua pelagem e se alimentando intermitentemente (NEVES, 2011). Consideradas ectoparasitas, podem transmitir vários agentes patogênicos como *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* (ambas bactérias gram-negativas), *Hymenolepis sp.*(tênia), entre outros – tanto para o ser humano quanto para outros animais (LIMONGI *et al.*, 2013).

São conhecidas pela habilidade de realizar grandes saltos, que são resultado tanto da adaptação de seu par de patas posterior quanto da presença de resilina, que é uma proteína extremamente elástica que auxilia no salto (SUTTON& BURROWS, 2011).

Dentre o gênero *Ctenocephalides*, são incluídas 13 espécies e subespécies, mas apenas as 2 apresentadas (*C. felis felis* e *C. canis*) são cosmopolitanas e detectadas na América do Sul. Entre estas, a *C. felis felis* é mais adaptável, e por infestar mais espécies se tornou mais presente em áreas muito extensas, se tornando mais importante na questão da transmissão de doenças, e sua maior distribuição é relacionada a fatores ambientais que influenciam na sua sobrevivência, desenvolvimento e reprodução (LINARDI & SANTOS, 2012).

Portanto, também já demonstra resistência a inseticidas comuns, e por esta razão, a identificação correta das espécies é essencial para as devidas medidas de controle (LINARDI& SANTOS, 2012).

A necessidade do parasitismo desses insetos, é resultado de um metabolismo ativo, embora resistam muito tempo ao jejum (OLIVEIRA *et al.*, 2008), o que pode caracterizar um período intenso de infestação, dificultando muitas vezes o tratamento e prevenção. Estes ectoparasitas são descritos como dos maiores responsáveis de doenças graves em pequenos animais, causando doenças dermatológicas e vetorizando agentes patogênicos como vírus, bactérias e protozoários (ZORZENON& JUNIOR, 2006).

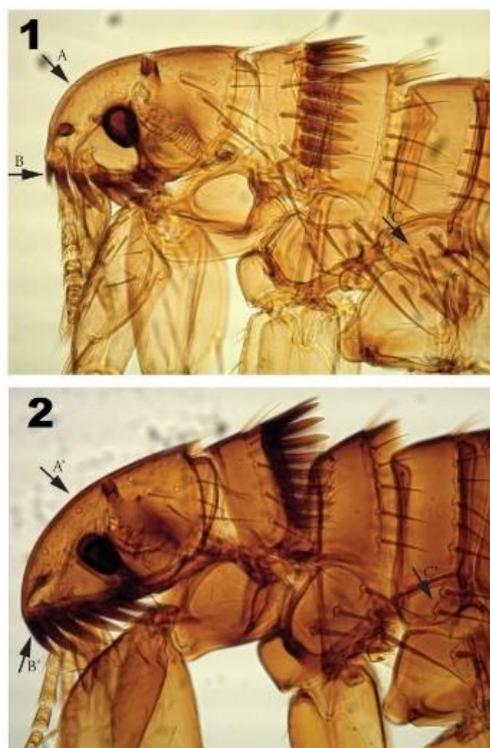
O comportamento dissoluto por uma alimentação a base de sangue de ambos os sexos de pulgas (*Siphonaptera*), sua mobilidade, sua persistência no meio ambiente e sua capacidade de atuar como vetores de uma variedade de patógenos contribuem para torná-los ectoparasitas clinicamente importantes de cães e gatos (DRUMMOND, 2018).

Essa espécie pode infestar carnívoros, edentados, lagomorfos, marsupiais, primatas, roedores e ungulados, podendo ser encontrada nos ninhos, tocas, trilhas e rastros dos hospedeiros. Pesquisas dos hospedeiros brasileiros incluíram, até 2012, exatamente 7 ordens e 41 espécies de mamíferos, assim como algumas aves. São comuns nos animais domésticos, resultando em irritações cutâneas, anemias, dermatites, e pelo convívio dos humanos com animais, tornam-se suscetíveis a ação das pulgas também (LINARDI& SANTOS, 2012; RUST, 2005; DRYDEN, 2009). Há a representação da *C. felis felis* na **Figura 1**.



**Figura 1:** Representação da pulga *Ctenocephalides felis felis* em seu estado adulto.

Existe uma dificuldade em diferenciar as espécies *C.canis* e *C.felis* por apresentarem pouca variação da aparência externa (morfologia), precisando de uma boa observação para diferenciá-las. As imagens apresentadas na **Figura 2** com recorte para a cabeça das duas espécies, trata-se de uma das estratégias mais usadas para identificação. Entretanto existem outras formas usadas para diferenciação, em outras partes de seus corpos, no entanto, pela complexidade, a cabeça se mostra mais fácil diferenciação (LINARDI & SANTOS, 2012).



**Figura 2:** Demonstração da diferença entre as fêmeas de *C. canis* (1) e de *C. felis felis* (2). A/A') Forma de sua cabeça; B/B') Comprimento da 1ª espinha da combinação frontal de suas espinhas; C/C') Número de cerdas na área lateral indicada (*Lateral Metanotal Area*, LMA). Fonte: LINARDI & SANTOS, 2012.

O ciclo biológico da pulga é composto por 4 fases: 1 – ovo; 2 – 3 estágios larvares; 3 – pupa; e 4 – adultos. Os ovos possuem aproximadamente 0,5 mm de comprimento, sendo ovais em suas formas e peroladas em suas aparências. É realizada a postura dos ovos sobre o respectivo hospedeiro, mas pela falta de aderência aos pelos do animal, caem no solo onde estes são encontrados. A fêmea realiza a postura dos ovos após cada uma de suas alimentações, podendo chegar a colocar até 50 unidades por dia (ESCCAP, 2015; DRYDEN, 2009).



**Figura 3:** Ciclo biológico da pulga *Ctenocephalides felis felis*

Fonte: INSETISAN

Após a eclosão dos ovos ocorre a liberação das larvas, que possuem 1,5 mm de comprimento, sendo filiformes, brancas e sem a presença de asas. Já apresentam mandíbulas adaptadas para morder, e no restante de seu corpo 3 segmentos torácicos e 10 segmentos abdominais, todos com a presença de cerdas e projeções em forma de gancho no segmento abdominal do terminal (ESCCAP, 2015; DRYDEN, 2009).

As larvas tendem a se abrigar em locais de baixa luminosidade (assim como podem fazer os adultos, em locais fechados, para sua profusa colonização), alimentando-se de resíduos orgânicos e fezes dos adultos (LINARDI& SANTOS, 2012).

Após aproximadamente 3 semanas, suas larvas iniciam o processo de tecer casulos pela incorporação de resíduos encontrados no ambiente, dando origem assim às suas pupas. É possível perceber uma alteração de cor no interior do casulo indicando o seu estado de desenvolvimento, que passa de castanho claro para castanho escuro à medida que ocorre a maturação das pupas (ESCCAP, 2015; DRYDEN, 2009).

As pulgas adultas emergem de seu pupário por meio de influências externas, como a vibração do solo, por exemplo. A pulga adulta é a única fase encontrada no hospedeiro e representa apenas 5% da infestação, sendo assim, 95% encontra-se no ambiente, sendo dividida aproximadamente em 50% de ovos, 35% de larvas e 10% de pupas (BAYER, 2021). Seu ciclo biológico está representado na **Figura 3**.

No Brasil em 2012, estas pulgas adultas já eram as mais comuns de todos os animais domésticos, e pesquisas já haviam as encontrado em 17 dos estados brasileiros: Alagoas, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco (incluindo a ilha Fernando de Noronha), Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Roraima, Santa Catarina e São Paulo (LINARDI & SANTOS, 2012).

Estes dados indicam a maior frequência das *C. felis felis* adultas, pois as *C. canis* haviam sido encontradas em apenas 9 estados, que não eram exatamente os mesmos: Amazonas, Bahia, Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (LINARDI & SANTOS, 2012).

Além de causar problemas como os já citados, as pulgas também podem ser vetores de doenças e transmitir alguns vermes parasitas. No caso da *Xenopsyllacheopsis* (pulga dos ratos), pode ocorrer a transmissão da peste bubônica (BENELLI & PAVELA, 2018).

A pulga *C. felis felis* pode causar dermatite alérgica, anemia, transmitir protozoários como gregarinas, microsporídios, alveolados (*Steinina sp.*) e tripanossomatídeos (*Leishmania infantumchagasi*, *Leptomonas*, *Stenoctenocephala*), além de helmintos, como *Dipylidium caninum* (cestódeo) e *Acanthocheilonema reconditum* (microfilária), vírus como Myxoma (causa mixomatose), fungos como *Nosema ctenocephali* (causa nosebose) e bactérias como as *Rickettsia typhi* e *R. felis*, e as *Bartonella henselae* e *B. vinsonii* (ESCCAP, 2015; HALOS *et al.*, 2014; LINARDI & SANTOS, 2012).

Portanto, existe uma preocupação dos responsáveis animais de estimação, utilizarem inseticidas/repelentes com muita frequência como meio de prevenção frente a estes insetos. Infelizmente, não percebem muitas vezes que estes produtos requerem uma dose segura para seu uso, e que o uso indiscriminado não deveria ser feito, pois os compostos não são tão seguros e muitas vezes acabam sendo tóxicos.

Ainda em relação ao uso indiscriminado, um fator relevante que deve ser considerado, é que a disponibilidade e a facilidade para aquisição desses produtos vêm crescendo, inclusive sendo possível a compra até por meio de canais digitais, motivo pelo qual, quem prioriza a saúde não deve utilizar os produtos químicos do mercado com frequência, pois podem ter problemas e agravantes como intoxicações e reações indesejáveis (HAWKINS *et al.*, 2019).

## 2.2 Inseticidas e similares disponíveis no mercado

As pulgas são vetores de doenças e podem levar a grande impacto na população. Existem muitas maneiras de realizar prevenção e controle desses ectoparasitas, inseticidas pelo uso de xampus, coleiras, sprays, *spot-ons* (líquidos de aplicação imediata sobre as pulgas), sabonetes, talcos, comprimidos, entre outros (RUST, 2005).

Antes da descoberta do organoclorado e inseticidas organofosforados no final da década de 1930 e início da década de 1940, os inseticidas botânicos permaneceram como arma importante no manejo de pragas de insetos de produtos agrícolas (FORIM *et al.*, 2012).

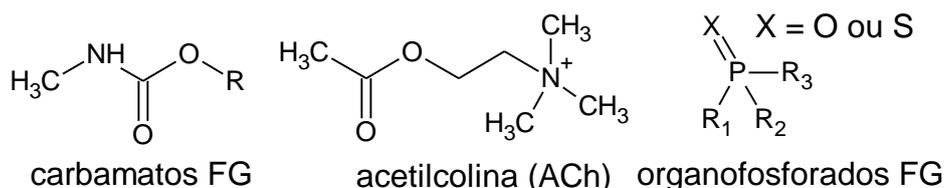
Inseticidas atuam por diferentes mecanismos, e além de combater pulgas pelo contato com o produto, diminuem sua alimentação prolongada, acarretando redução da produção de ovos e viabilidade de dar prosseguimento ao ciclo. O tratamento não deve ser voltado apenas para o hospedeiro, mas também para o ambiente, visto que ele comporta aproximadamente 95% da infestação das pulgas (RUST, 2010; 2005).

O uso indiscriminado e equivocado leva à resistência dos insetos, como nos carbamatos, organofosforados e organoclorados, utilizados a mais tempo e sabe-se da resistência, gerada de uso não controlado oferecido livremente.

Existem casos de tolerância, menor suscetibilidade dos insetos ao tratamento, resultado da variabilidade genética pela seleção natural (BENELLI& PAVELA, 2018; ELLSE& WALL, 2014; COLES& DRYDEN, 2014; HALOS *et al.*, 2014).

Estes produtos químicos colocam em risco tanto o ambiente e o homem (RUST, 2010), devido a toxicidade não seletiva e problemas residuais (GUPTA *et al.*, 2019; KABERA *et al.*, 2011). Os mais utilizados são neurotóxicos ao sistema nervoso dos insetos e a toxicidade pode causar problemas a animais e humanos. A seguir os alvos das classes mais utilizadas são apresentados, fórmulas gerais e exemplos de estruturas (KLAASSEN& WATKINS III, 2012):

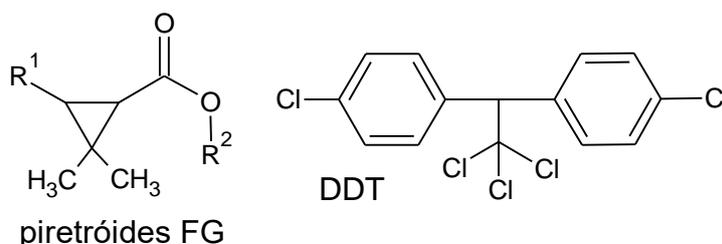
1) Acetilcolinesterase (AChE) – enzima que degrada a acetilcolina (ACh), inibida pelos organofosforados e carbamatos (estruturas na **Figura 4**);



**Figura 4:** Fórmula Geral (FG) dos organofosforados e carbamatos, e estrutura da acetilcolina (ACh). As semelhanças estruturais entre os inibidores e ACh faz com que se complexem à enzima, impedindo a ação da AChE.

FONTE: LARINI, 1999; 1997

2) Canais de sódio – ativados pelos piretróides tipo I, tipo II e o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano, um organoclorado – **Figura 5**), e inibidos pelos diidropirazóis;

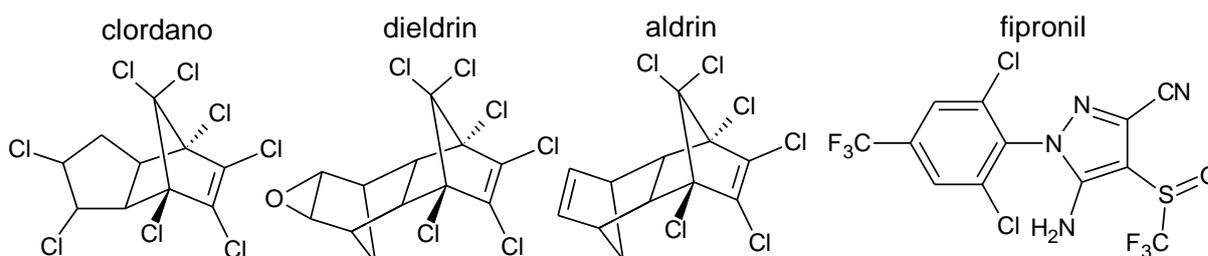


**Figura 5:** Fórmula Geral (FG) dos inseticidas piretróides e do DDT.

FONTE: LARINI, 1999.

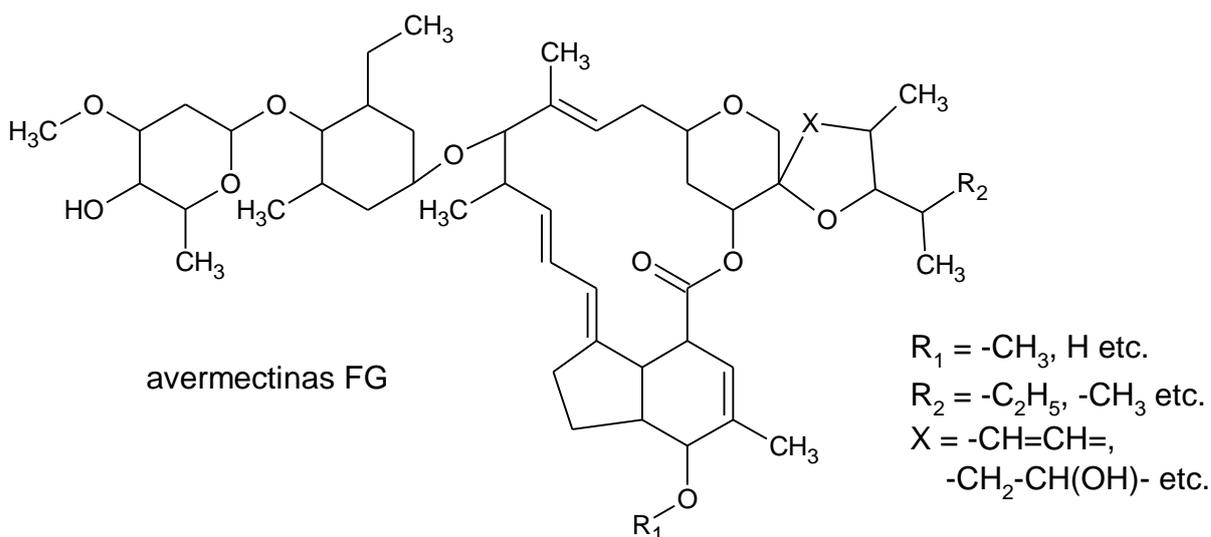
3) Receptores nicotínicos de acetilcolina (ACh) – ativados pela nicotina e pelos neonicotinóides, compostos baseados na estrutura da nicotina para a inibição destes receptores;

4) Canais de cloro mediados pelo receptor GABA – inibidos pelos ciclodienos (organoclorados), pelos fenilpirazóis (organoclorados e fenilpirazolona, o fipronil da classe dos fenilpirazóis na **Figura 6**) e pelos piretróides tipo II;



**Figura 6:** Estruturas dos ciclodienos clordano, dieldrina e aldrina (que é rapidamente biotransformado em dieldrina) e da fenilpirazolona fipronila. Fontes: VERÍSSIMO, 2015; KLAASSEN & WATKINS III, 2012.

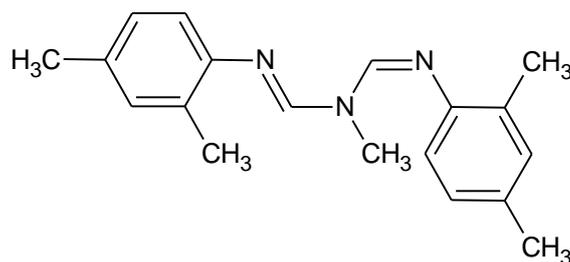
5) Canais de cloro mediados por glutamato – ativados pelas avermectinas (**Figura 7**), antibióticas para controle de bactérias, fungos, insetos e ácaros. Tais canais são encontrados apenas em insetos, em mamíferos avermectinas ativam os receptores GABA<sub>A</sub>;



**Figura 7:** Fórmula geral (FG) das avermectinas.

FONTE: LARINI, 1999

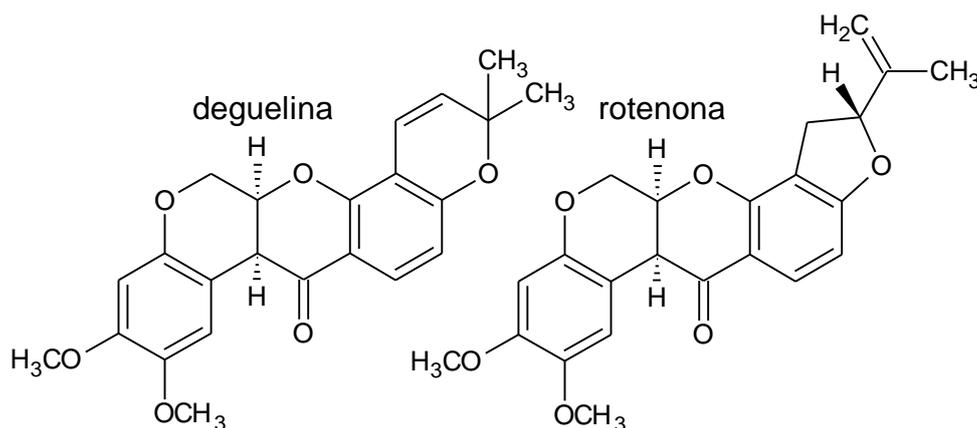
6) Receptores octopamina (ou  $\beta,4$ -dihidroxifenetilamina) – ativados pelas formamidinas (o amitraz, muito usado em animais de grande porte, **Figura 8**), que em mamíferos e insetos ativam os  $\alpha_2$ -adrenoceptores e inibem a enzima monoaminoxidase;



**Figura 8:** Estrutura do composto amitraz, uma formamidina.

FONTE: VERÍSSIMO, 2015.

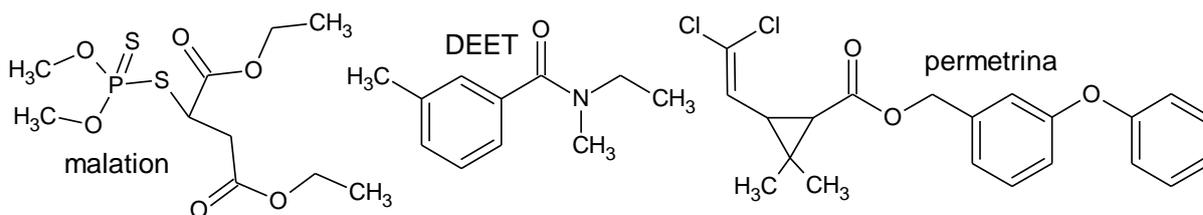
7) Complexo mitocondrial I – cadeia respiratória é inibida pelos rotenóides, constituídos por 6 ésteres naturais, sendo o mais abundante a rotenona (**Figura 9**), inseticida e acaricida.



**Figura 9:** Estruturas da deguelina e da rotenona, dois rotenóides naturais.  
 FONTE: LARINI, 1999.

Muitas pessoas no mundo utilizam esses compostos químicos como o malation, DEET (repelente mais vendido) e permetrina (**Figura 10**), obtendo muitos problemas; foram relatadas algumas situações:

- Trabalhadores que usaram DEET repetidamente queixaram-se de dores/chiado no peito, câibras musculares, erupções cutâneas, tontura, desorientação e dificuldade de concentração, diferente dos que usaram menos ou não usaram (ATSDR, 2017);
- Mistura de permetrina e DEET pode promover herança genética de doenças de início adulto e biomarcadores epigenéticos em exposições ambientais ancestrais (MANIKKAM *et al.*, 2012);
- DEET e permetrina são neuro tóxicos em veteranos da Guerra do Golfo Pérsico. Aplicação dérmica subcrônica leva a morte neuronal difusa no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo, causando anomalias fisiológicas, farmacológicas e comportamentais, como déficits motores e disfunções de memória e aprendizado (ABDEL-RAHMAN, SHETTY, ABOU-DONIA, 2001);
- DEET causa diminuição hematoencefálica no tronco cerebral e declínio na performance sensorial e motora; combinação com permetrina leva a diminuição na AChE, necessária na função neuromuscular, tronco e mesencéfalo cerebrais (ABOU-DONIA *et al.*, 2001; 2001b);
- Exposição a doses de malation, DEET e permetrina produzem neurotoxicidade, significantes déficits neurocomportamentais e degeneração neuronal (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2004).



**Figura 10:** Estruturas do malation (dos mais usados organofosforados), DEET (ou *N,N*-dietil-*m*-toluamida, repelente mais usado) e permetrina (um piretróide).

FONTES: KLANSEN & WATKINS III, 2012; pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/DEET-d10

### 2.3 Características e mecanismo de ação da Acetilcolina no Sistema Nervoso (SN) e seu metabolismo

O SN é direcionado no corpo por suas frações periféricas: o sistema colinérgico (ou parassimpático), pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh), proporcionando calma, melhor digestão, sono tranquilo, boa movimentação, descanso do corpo, fazendo com que tudo ocorra da melhor forma; e o sistema adrenérgico (ou simpático), pelo neurotransmissor adrenalina, proporcionando rapidez, agilidade, velocidade, defesa, medo e funcionamento eficaz (LEMKE *et al.*, 2008; MARCUS & JACOBSON, 2003).

Os seres humanos buscam de forma natural suas formas de diversão, risos e muitas outras aptidões que incluem o seu estado energético e o total estado de alerta. Como nosso sistema colinérgico funciona em um ritmo de sinalizações e respostas, é totalmente pertinente que tudo responda aos estímulos como por exemplo a digestão, hemostasia, e sem um funcionamento, não há indivíduo que consiga viver em um estado de bem estar. E não contempla apenas os humanos, também os animais e outros seres vivos (LEMKE *et al.*, 2008; MARCUS & JACOBSON, 2003).

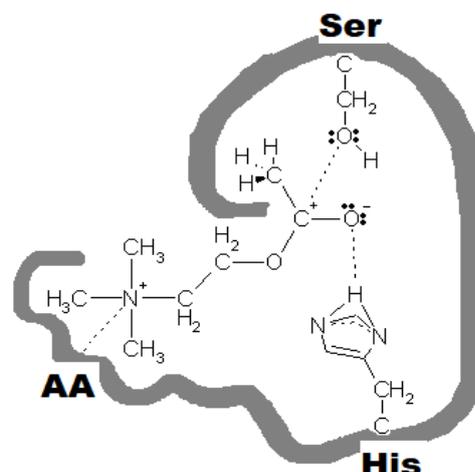
Quando um dos sistemas nervosos agir (central ou periférico), é necessário que ambos estejam em sincronia para que estímulos e respostas de diversas partes do corpo promovam suas ações. Sempre que um neurotransmissor desenvolver suas atividades, ele não deve continuar em atividade por muito tempo, pois caso não haja uma boa comunicação entre os sistemas, não estaremos em equilíbrio e isso não nos trará um bom funcionamento corporal (VANDERAH, 2019).

O sistema colinérgico age de forma muito mais ativa na comunicação do cérebro com a movimentação de músculos e do corpo. É significativo estar em conformidade com as formas as quais este sistema se encontra. Se as enzimas responsáveis pela forma dos neurotransmissores não estiverem em bom funcionamento, não há como sobreviver (VANDERAH, 2019; MARCUS & JACOBSON, 2003).

A forma de interação dos inibidores da AChE se dá através da semelhança estrutural com a ACh – não são muitas e não são grandes, mas envolvem as partes específicas da ACh que realizam as conexões necessárias para que se ligue à AChE, impedindo que a ACh se complexe, e fazendo com que a AChE perca sua atividade. Sua interação será demonstrada na **Figura 11**.

**AA** = aminoácido  
**His** = aminoácido histidina  
**Ser** = aminoácido serina  
**Linhas pontilhadas** = interações moleculares realizadas (iônica, dipolo-iônica, dipolo-dipolo, ligação de hidrogênio, van der Waals etc.)

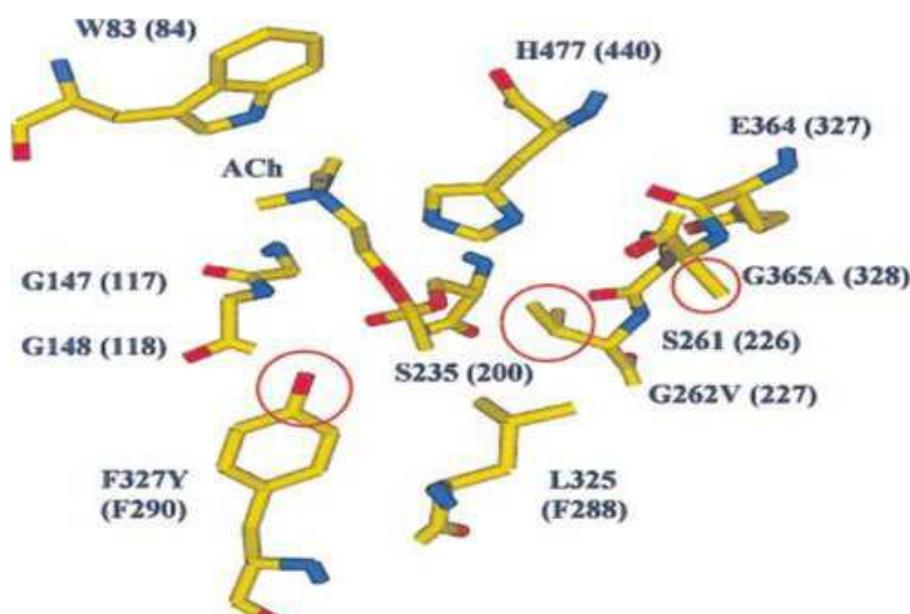
FONTE: adaptado de LEMKE *et al.*, 2008.



**Figura 11:** A forma como a ACh se complexa ao sítio ativo da AChE, e como promove suas interações para que a reação de decomposição da ACh ocorra.

Mutações na AChE são a principal forma de resistência de muitos insetos/artrópodes. Até ano de 2016, 5 pontos de mutação foram identificados, fazendo com que estes organismos ficassem extremamente resistentes, por impedir a ligação da ACh ao sítio de sua enzima (**Figura 12**) (NAQQASH *et al.*, 2016).

W83 = triptofano83  
 G147 = glicina147  
 G148 = glicina148  
 F327Y =  
 fenilalanina327  
 trocada por tirosina  
 S235 = serina235  
 L325 = leucina325  
 G262V = glicina262  
 trocada por valina  
 S261 = serina261  
 G365A = glicina365  
 trocada por alanina  
 E364 = glutamato364  
 Outros n<sup>os</sup> ao lado =  
 numeração da  
 sequência de outro  
 inseto.



**Figura 12:** Demonstração de 3 mutações no sítio ativo da AChE em insetos resistentes.

FONTE: NAQQASH *et al.*, 2016.

Estas mutações citadas compreendem a troca de aminoácidos que podem estar de alguma forma envolvidos na interação da ACh com seu sítio, impedindo que ela se complexe corretamente a ele, não permitindo o bom funcionamento muscular: valina (Val)→Leu, glicina (Gly) → alanina (Ala), Gly→ Val, Phe→ tirosina (Tyr) e Gly→ Ala, ocorrendo tanto isoladamente como em combinação (NAQQASH *et al.*, 2016).

Alguns exemplos de enzimas como a AChE não possuem apenas o sítio ativo para a ligação de compostos que a inibam ou a ativem, quase sempre existem sítios de ligação de um cofator, para modificação estrutural na enzima, e só então seu substrato natural pode se ligar a ela, portanto, inibidores podem também atuar nos sítios dos cofatores das enzimas (SOUZA *et al.*, 2019). Os mecanismos e formas como as resistências ocorrem serão demonstrados a seguir.

#### **2.4 O mecanismo da resistência e as boas alternativas**

O controle de doenças transmitidas por vetores depende muito da ação dos inseticidas, porém o uso prolongado de limitados compostos tem gerado resistência ao longo dos anos. Utilizar sempre o mesmo inseticida por muito tempo e em grande escala, tem favorecido o aumento de resistência de muitas espécies de insetos. Casos extremos a múltiplas classes de inseticidas são preocupantes.

Há uma permanente preocupação da população quanto ao uso de repelentes em crianças (STEFANI, *et al.*, 2009). Vários pontos devem ser observados pelos cuidadores para o uso correto de repelentes, propiciando uma proteção suficiente contra doenças transmitidas por insetos e vetores. A falta de informação e a orientação de um profissional qualificado são aspectos importantes que podem ajudar na utilização correta do produto e ajudar o consumidor a compreender o tempo de ação, eficácia e o modo correto de aplicação.

Os mecanismos criados por espécies são múltiplos, muitos ainda são desconhecidos, e muito tem se pesquisado, mas alguns já são descritos na sua forma genética, metabolismo e desenvolvimento (BALADANIDOU, GRIGORAKI, VONTAS, 2018; NAQQASH *et al.*, 2016).

Dentre os mecanismos, os maiores envolvem a mutação (modificações do alvo) levando à insensibilidade (afetam a eficiência da ligação aos sítios) ou modificação no processo metabólico (expressão de enzimas de desintoxicação inativam o inseticida por metabolismo ou sequestro). Três tipos de enzimas desintoxicantes são a glutathione-S-

transferase (GST), as monoxigenases (mais eficientes e comuns) e as carboxilesterases (BALADANIDOU, GRIGORAKI, VONTAS, 2018; NAQQASH *et al.*, 2016).

A insensibilidade ao alvo de ação foi a 1ª questão estudada. A resistência dos piretróides e organoclorados aos canais de sódio foi reportada à *Musca domestica* (mosca) por Farnham e Sawicki em 1976, a mutação de 1 aminoácido, leucina (Leu) trocada por fenilalanina (Phe) na sequência proteica, enquanto a DDT-desidroclorinase foi a 1ª enzima de desintoxicação do DDT (a GST na natureza) (CLARK & SHAMAAN, 1984).

O canal de cloro GABA-controlado mutante é resistência ao ciclodieno, como demonstra a **Figura 13** (GAO *et al.*, 2020). Enzimas GST têm sido associadas com a resistência a organofosforados e outros. O gene CYP6D1 é membro do citocromo P450 (CYP450), grande papel no metabolismo. Expressão aumentada desse gene faz com que a enzima seja muito sintetizada, e o composto metabolizado em rapidez não tem efeito (NAQQASH *et al.*, 2016).

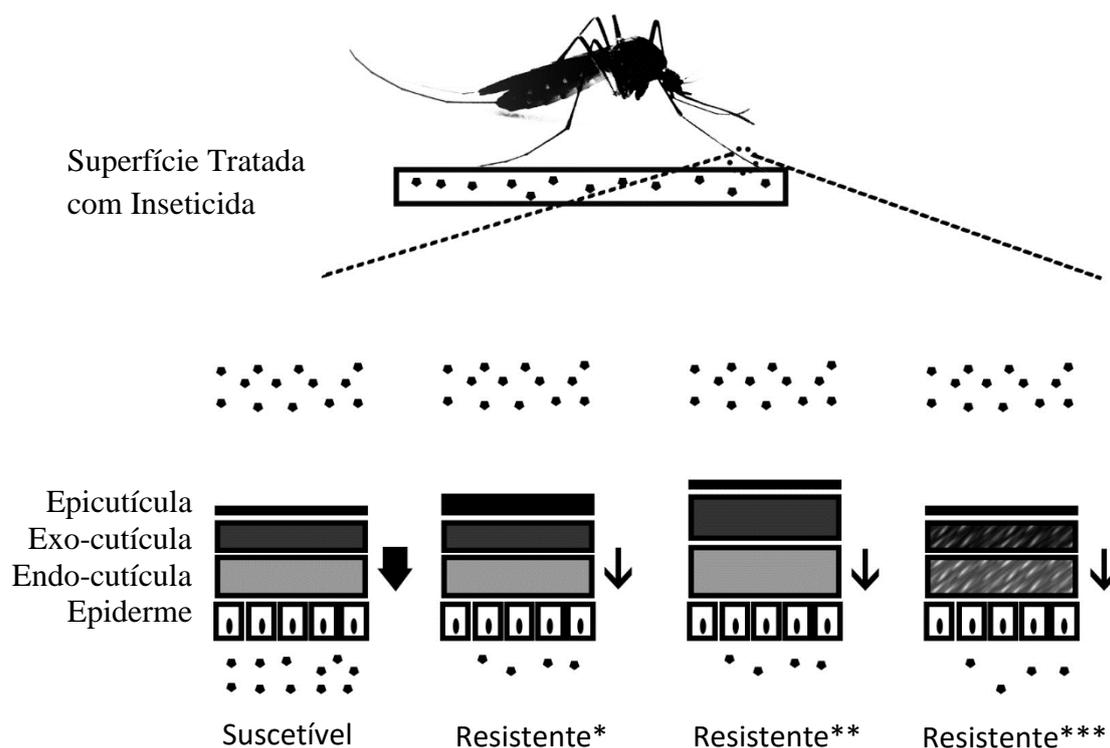


**Figura 13:** Representação dos locais de mutações no canal de sódio de insetos resistentes a organoclorados/piretróides (a parte vermelha demonstra o polimorfismo do canal de sódio).

FONTE: NAQQASH *et al.*, 2016

Outra forma é a redução da penetração do inseticida no corpo do inseto, pela modificação da sua cutícula: em *Cimex lectularius* (percevejo), a espessura foi correlacionada com o tempo de efeito do composto. A desaceleração da penetração permite que enzimas de desintoxicação tenham mais tempo para agir, com resistências fortes a inseticidas de diferentes classes (resistência múltipla, **Figura 14**) (BALADANIDOU, GRIGORAKI, VONTAS, 2018).

Este mecanismo é levado aos Reguladores de Crescimento do Inseto (IGRs, *Insect Growth Regulators*), até a larva tem redução na penetração cuticular e resistência metabólica, assim como rápida excreção do inseticida (NAQQASH *et al.*, 2016).



**Figura 14:** Resistência à penetração. Modificações cuticulares propostas para a absorção reduzida de inseticidas. \*Resistente: espessamento da epicutícula, \*\*Resistente: espessamento da exo-cutícula, \*\*\*Resistente: composição da cutícula alterada.

FONTE: BALADANIDOU, GRIGORAKI, VONTAS, 2018.

As resistências possuem muitas formas genéticas de serem adquiridas, o que os faz permanentemente insensíveis aos compostos. A melhor alternativa seria se a população de todo o mundo fosse advertida quanto às inúmeras possibilidades que estes seres encontram para obtê-las, gerando composto não mais ativo (YANG *et al.*, 2021; HAWKINS *et al.*, 2019):

- 1) Resistência originada por “mutações *de novo*” ocorre após uso do pesticida, seleção da variação genética permanente pré-existente. Espécies montam sua resistência via hibridização ou transferência de genes horizontalmente (o HGT, *Horizontal Gene Transfer*);
- 2) Origens da resistência têm implicações práticas na elaboração de avaliações de risco, sendo complicado impor confiabilidade dos métodos de detecção molecular em diferentes populações e espécies, e estipular medidas mais eficazes para gerenciar ou conter a resistência;
- 3) Pragas podem ser pré-adaptadas a pesticidas devido à exposição a inibidores, como compostos de defesa do hospedeiro ou toxinas patogênicas, como efeito de

características não relacionadas à resistência, e variação permanente pode se acumular por processos neutros;

4) Origens de alelo resistente (diferente forma de gene por mutação) pode ser detectada por seletivas varreduras duras ou suaves, detecção de resistência em populações não expostas, reconstrução filogenética das origens de alelo, ou mapeamento de haplótipos (combinação de alelos em mesmo cromossomo) dos antecedentes genéticos nos quais resistência é encontrada;

5) Resistência é muitas vezes devida a metabolismo poligênico a partir da variação permanente. Resistência a fungicidas é mais comumente devida a mutações de novo no local-alvo, a inseticidas há mutações de novo e seleção de variação permanente, tanto no local-alvo quanto nos principais genes codificadores de enzimas metabólicas;

6) Transferência de alelos, horizontal ou por hibridação, é mais rara em ervas daninhas, pragas e patógenos fúngicos do que HGT, na disseminação da resistência e criaturas resistentes por evolução convergente ou paralela nas espécies do que por escape de transgênicos;

7) Diferenças entre grupos de pesticidas podem refletir em fatores demográficos e epidemiológicos, taxas de mutação, repertório metabólico ou taxas de exposição a pesticidas em relação a fatores de resistência;

8) Resistência fornece muitos exemplos de evolução rápida e recente em ação, que aborda questões fundamentais sobre as origens das adaptações a novas pressões seletivas.

## **2.5 Alternativas inovadoras – Óleos essenciais**

Os óleos essenciais são produtos obtidos das plantas, principalmente através da destilação com arraste a vapor de água (SAID-AL AHL; HIKAL; TKACHENKO, 2017).

O óleo essencial é uma mistura de substâncias químicas com estruturas moleculares diversificadas, principalmente fenilpropanóides e/ou (monoterpenos e sesquiterpenos). Frente à resistência aos produtos químicos e ao risco que podem representar aos animais, humanos e ao meio ambiente, os óleos essenciais (OEs) aparecem como alternativa para o combate aos insetos, e vêm sendo utilizado por indivíduos em diversos tratamentos através de soluções, fármacos, cosméticos,

alimentos e todos os produtos que de alguma forma melhorem a qualidade de vida dos indivíduos.

Os óleos essenciais são compostos por metabólitos secundários como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Como a maioria destes é solúvel em lipídios, são facilmente absorvidos pelas células através da membrana plasmática de maneira pacífica, a melhor forma de absorção para as substâncias exógenas ao nosso corpo (SIMÕES *et al.*, 2017).

Estes metabólitos secundários das plantas agem no mecanismo de defesa para proteção contra predadores, como insetos, animais herbívoros, fungos, bactérias, vírus e seres que as debilitam, assim como fatores naturais ou da própria humanidade. Atividades antifúngicas, antioxidantes, antitumorais, antivirais e antibacterianas são muito estudadas. Possuem atividade inseticida na agricultura, combate a mosquitos, besouros e carrapatos, utilizados para proteção dos grãos armazenados (EL-KAREEM *et al.*, 2020; SIMÕES *et al.*, 2017; BALDIN, 2014).

Um fator importante que têm estimulado os estudos com óleos essenciais é a busca por inseticidas, fungicidas e bactericidas de origem vegetal que apresentam baixo impacto sobre a natureza e a saúde humana, servindo como uma alternativa ao uso de agrotóxicos na agropecuária (WEZEL *et al.*, 2014).

Sabendo-se da atividade inseticida já testada contra insetos, OEs são alternativa aos produtos químicos do mercado, apresentando menor toxicidade e maior variabilidade, visto que são obtidos de qualquer planta. Pretende-se avaliar atividade inseticida do OE de *C. pulcherrima* frente à pulga do gato, sabendo-se que alguns OEs já tiveram atividade demonstrada contra pulgas, mais especificamente *C. felis felis* (LAMBERT *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020; BATISTA *et al.*, 2016).

Para a formulação de um inseticida seguro e de boa qualidade, os OEs são considerados uma opção promissora. Há fatores que devem ser considerados: os fitoquímicos dos OEs podem mudar no momento do mês – se a planta se encontra ou não em processo de floração, sua forma de cultivo e vários fatores ambientais devem ser observados. OEs não duram como os constituintes tóxicos do DEET por exemplo, pois são voláteis de fácil evaporação, e podem ser absorvidos em minutos.

A forma pela qual os componentes contidos nos óleos funcionam é criando película na pele, como barreira odorífica. O aroma do corpo é uma das questões que atraem os insetos e bloquear este odor é justamente a questão para proteger-se deles. Os OEs possuem diferentes odores, e deve-se reaplicar de 60 a 90 minutos.

Existem OEs para repelência de insetos (e não para morte), que não protege de forma total e eficaz (THE STATIONERY OFFICE, 2020; ANVISA, 2019; MAIA & MOORE, 2011; MAGURANYI *et al.*, 2009; TRONGTOKIT *et al.*, 2005):

Cedro (*Juniperus virginiana*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*, reportado como o mais efetivo), citronela (*Cymbopogon nardus*), eucalipto-limão (*Eucalyptus citriodora*), patchuli (*Pogostemon cablin*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), tomilho (*Thymus vulgaris*).

Pesquisas sugerem a diluição destes OEs em pelo menos 2% de óleos carreadores, como óleo de coco, óleo de amêndoas, óleo de jojoba e vários outros, promovendo repelência similar ao DEET em baixa-concentração por mais de 1,5 hora. Em circunstâncias que animais ou indivíduos são picados, reações alérgicas são muito comuns no local, sendo necessário utilizar um produto que traga a sensação de alívio para coceiras ou urticárias. Os OEs ajudam no alívio da dor da picada, trazendo sensações refrescantes e relaxantes (FRADIN & DAY, 2002).

A procura por produtos de prevenção para pulgas/carrapatos como os OEs, tem aumentado significativamente, pois em muitas localidades de lazer como florestas, parques, cachoeiras entre outros, devem se tornar seguros frente a estas possíveis parasitas. Além da mistura descrita anteriormente para repelência de insetos, uma para repelência de pulgas e carrapatos também foi descrita: 2 colheres de óleo carreador e 1 gota dos OEs a seguir (ZIELINSKI, 2021; THE STATIONERY OFFICE, 2020; ANVISA, 2019):

Lavanda (*Lavandula angustifolia*), toranja (*Citrus X. paradisi*), eucalipto (*Eucalyptus radiata*), capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*), gerânio (*Pelargonium graveolens*).

O repelente aplicado não é utilizado apenas para cães, mas também para humanos. A mistura natural colocada é apenas para prevenção, e não para remoção. Se o desejo é tratamento para infestação, deve ser removido de boa forma e não aplicar OEs apenas depois de ser extraído. Pulgas/carrapatos podem ser irritados e regurgitar toxinas em seu corpo (<https://www.cdc.gov/lyme/removal/index.html>).

Gatos são sensíveis a óleos altos em limoneno, então em vez de toranja, melhor usar cedro. Avaliando repelentes naturais de pulgas/carrapatos, criou-se uma mistura de diluição 5% de orégano (*Origanum vulgare*) e hortelã-pimenta, borrifando-a nas roupas, tendo mesmo efeito que o DEET. Estas receitas fornecem diluição 2,5%, adaptável às

crianças. Altas concentrações também são úteis para tratamento de mancha (THE STATIONERY OFFICE, 2020; SOUTAR, COHEN, WALL, 2019).

Nesse contexto, e tendo em vista a possível utilização dos OEs como agentes terapêuticos, é importante considerar que o rendimento e a composição do OE são resultado de diversos fatores, incluindo genótipo, ambiente, estágio de desenvolvimento e práticas culturais. Dentre os OEs citados anteriormente, são considerados seus possíveis componentes estruturais e suas conhecidas ações (FALCO *et al.*, 2013). A obtenção e criação de novos inseticidas de fontes botânicas podem servir como alternativas aos inseticidas químicos e sintéticos, devido a sua biodegradabilidade e baixa toxidez nos organismos (ERHARUYI *et al.*, 2017)

## **2.6 Aplicação dos óleos essenciais aos animais de estimação**

É importante ressaltar que os OEs não são obtidos da mesma forma. Considerando quando ou não utilizar os OEs, deve-se cuidadosamente prezar pela qualidade do OE e seus benefícios nos pets, além de observar os seus estados físicos e emocionais durante e após o uso. Os OEs não demonstram a mesma resistência a bactérias como as terapias sintéticas, mas com a sua utilização, é possível obter resultados que sejam paliativos para combater condições difíceis, por aumentar a imunidade do animal com abordagem totalmente natural (ZIELINSKI, 2021; SOUTAR, COHEN, WALL, 2019).

Em animais que apresentam porte maior como cavalos, gado, lhamas, alpacas e até ovelhas, os OEs para pets são aplicados diretamente à área de preocupação, com ou sem diluição, por toda a coluna, a mesma forma como seria aplicado em um humano. Os pequenos animais como gatos e cães, é necessário atenção. Em pets como gatos, a falta de uma enzima no fígado, a glicuronil transferase, importante para a via de metabolismo hepático do CYP450 e que engloba o metabolismo de muitas questões corporais, torna os gatos mais suscetíveis a todos os tipos de toxidade, incluindo plantas, AINEs (como ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e paracetamol), chocolate, cafeína (metilxantinas), chumbo, zinco e muitos tipos de pesticidas. Os óleos dos quais estes animais devem ficar distantes apresentam altas concentrações de compostos como fenóis e cetonas, assim como a sua aplicação direta (interna e tópica) como por exemplo – manjerição, bétula (*birch*), canela, cravo, erva-doce, melaleuca, noz-moscada, orégano, hortelã-pimenta, tomilho, alecrim, hortelã-verde e gaultéria (*wintergreen*).

Eles são sensíveis a óleos contendo limoneno (bergamota, endro, toranja, limão, lima, laranja e tangerina) (ZIELINSKI, 2021).

Quanto aos cães, existem muitas raças e tamanhos diferentes e de uma forma geral, quanto menor for o cão, mais será necessário a diluição do OE. Alguns óleos devem ter sua utilização monitorada como o de melaleuca, bétula, cânfora e gaultéria, por apresentarem resultados muito rápidos para fungos e bactérias, ainda que seus mecanismos não sejam descritos. Alguns estudos mostram como os óleos essenciais têm beneficiado esses animais: questões comportamentais, como ansiedade separatória, ansiedade em um temporal, e medo ou agressão baseada no medo – é recomendado tanto o óleo essencial de lavanda como monoterapia ou sua combinação com vetiver obtendo um resultado satisfatório (ZIELINSKI, 2021).

Existem muitas utilizações dos óleos essenciais incluindo suporte ao fígado, ao rim, ao sistema imune e à saúde em geral. Na aplicação de OEs a pets, as vias de administração mais comuns são: tópica, inalatória e oral. O cuidado no início do tratamento deve ser acompanhado por um profissional especializado. Assim como é necessário a modificação na alimentação do animal que deve ser realizada lentamente.

Deve-se começar o início do tratamento com uma concentração pequena de OE diluído, e observar o comportamento do animal. Se a resposta for neutra, e caso não esteja obtendo o efeito terapêutico desejado, pode-se adicionar mais OE ou aumentar a frequência da aplicação, mas não deve iniciar o tratamento com uma quantidade alta desde o início.

É importante observar o comportamento, caso o animal apresente uma reação diferente do habitual, deve-se esfregar o óleo para fora da área de administração tópica, esfregar a região nasal com água e deixar o animal em exposição ao sol por alguns minutos (ZIELINSKI, 2021).

## **2.7 Estudo da *Caesalpinia pulcherrima* (L)Sw. como agente pulicida**

A *Caesalpinia pulcherrima* é uma espécie da família Fabaceae, um arbusto perene nativo da América Central, como Guatemala e localidades do México, porém é amplamente cultivada, distribuída e encontrada em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Austrália, Américas e Caribe – está altamente presente em todas as partes do mundo, sendo a Índia um dos países que mais a possui e mais a estuda. É um espécime extremamente comum no território brasileiro, denominado popularmente

como flamboyanzinho, flamboyant-mirim, flor-de-pavão, baio-de-estudante, barba-de-barataou asa-de-barata (dependendo da região), bastante utilizado no paisagismo de cidades, e encontrado até nas áreas mais semiáridas (**Figura 15**). Devido às suas cores vibrantes, à sua velocidade de crescimento e facilidade de adaptação, é amplamente utilizado na ornamentação, espalhada por todas as ruas das cidades e adorada pela população (ERHARUYI *et al.*,2017; FIGUEIREDO E SABER, 2016; BURITI *et al.*, 2014).



**A: Estado vegetativo de *C. pulcherrima* B: Folhas de *C. pulcherrima***

**Figura 15:** Demonstração da espécie *Caesalpinia pulcherrima*

FONTE: Blog plantas do Brasil (2003)

Disponível em <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2012/03/caesalpinia-pulcherrima-l-sw.html>

Os espécimes cultivados podem ter ampla variação da cor das pétalas, podendo ser laranja, rosa, vermelha ou amarela, sendo que estas cores podem estar em combinação, como mostra a **Figura 15** – a flor vermelha com suas extremidades amarelas.

Alguns espécimes são encontrados sem acúleos. Ocorrem ao longo de todo território brasileiro, em todas as regiões, principalmente em áreas antrópicas. São reconhecidos pelo hábito arbustivo, apresentando acúleos, pelas folhas bipinadas terminando em um par de pinas, pinas opostas, folíolos simétricos, opostos, curtamente mucronados, inflorescências em longos racemos axilares e terminais, flores geralmente avermelhadas com longos pedicelos e estames.

Tradicionalmente, as flores, folhas, sementes, raízes de *C. pulcherrima* estão em uso na Índia desde a antiguidade. As folhas têm sido utilizadas como purgantes, tônicos,

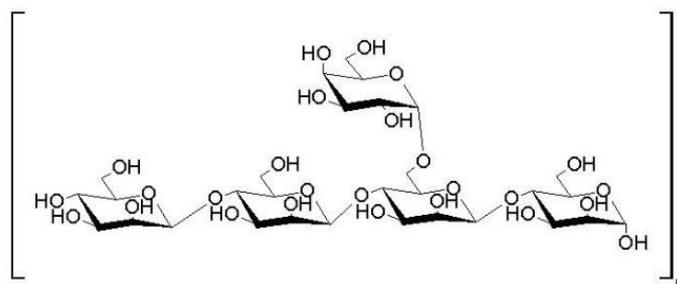
antipiréticos e emenagogos, enquanto as raízes têm uso em convulsões, febres, problemas respiratórios e doenças de pele; suas sementes podem ter diversos usos, sendo o mais explorado ultimamente o alimentar, para fornecimento de fibras e de substâncias para boas consistências e características sensoriais (BURITI *et al.*, 2014; CHATTERJE e PRAKASHI, 2006; PULLAIAH, 2006). Em outros estudos como de (CONSTANI *et al.*, 2019) demonstram que as folhas e flores da espécie *C. pulcherrima* contêm em seus óleos essenciais, fitoconstituintes como monoterpenos e sesquiterpenos.

Estudos etnofarmacológicos identificaram atividades antimicrobianas (antibacterianas, antifúngicas, antivirais), dermatológicas, anticonvulsivantes, antipiréticas, anti-inflamatórias, analgésicas, antiasmáticas, antiulcerosas, hipolipidêmicas, laxantes, antitussígenas, adstringentes, anti-helmínticas, leishmanicidas, antimaláricas, antineoplásicas e antioxidantes nas folhas, flores, sementes e raízes dos extratos de *C. pulcherrima*. Em outros estudos já foi destacada a presença de constituintes importantes na medicina, como: compostos ferrosos, compostos fenólicos, glicosídeos (como polímeros e fibras), saponinas, alcaloides, taninos, isoflavonas, flavonoides de diversos subtipos, diterpenos e esteroides (DEEPIKA, SELVARAJ, ROOPAN, 2020; ERHARUYI *et al.*, 2017; KHUMBARE *et al.*, 2012; PULIPATI *et al.*, 2012; DHAKED *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2010).

Estudos variados utilizando-se esta planta já foram realizados em muitos locais do mundo –alguns com análises comparadas a outras espécies para a verificação das possibilidades de seus efeitos farmacológicos ou dietéticos: *C. pulcherrima* + *Cassia fistula* + *Senna alata* frente ao emagrecimento, *C. pulcherrima*+ *Albizialebeck*+ *Diospyrosmes piliformis* frente à sua composição de compostos lipofílicos, *C. pulcherrima* + *C. férrea* + *C. pyramidalis* frente ao seu potencial citotóxico, genotóxico e citoprotetor (SILVA *et al.*, 2015; ADEWUYI, ODERINDE, 2014; CHICHIOCO-HERNANDEZ, LEONIDO, 2011).

Além destes estudos, estas associações ocorrem também com outros fármacos e compostos, gerando formas farmacêuticas que têm sido mais utilizadas ultimamente, testando-as e montando-as a partir dos componentes desta planta:

- A galactomanana (**Figura16**), composto presente em suas sementes, já foi usada como um excipiente para a montagem de comprimidos (SELVI *et al.*, 2010);



**Figura 16:** Estrutura da galactomanana, polissacarídeo presente nas sementes de *C. pulcherrima* muito utilizada por sua viscosidade, poder de fibras e muitas outras formas.

FONTE: SOUZA *et al.*, 2017

Embora a literatura disponha de estudos referentes à utilização de *C. pulcherrima* em várias doenças e sua atividade biológica é considerada promissora em diversas formas medicinais, foram encontrados poucos estudos sobre sua atividade inseticida e nenhum estudo sobre atividade pulicida.

O presente estudo considera importante a pesquisa desse espécime tão comum no Brasil, extremamente promissora e de grande utilidade ter registros de sua composição química em benefício ao mercado, proteção e estilo de vida que tem crescido no nosso país.

A pesquisa para a obtenção de um óleo essencial que apresente propriedades frente aos insetos não apenas de forma repelente, mas que também consiga uma interrupção no seu ciclo de vida, seria muito importante para a população considerando maior segurança para indivíduos e animais frente as doenças por eles transmitidas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar o potencial de utilização inseticida e a atividade *in vitro* do óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima* no controle da pulga adulta e estágios imaturos (ovo, larva e pupa) da espécie *Ctenocephalides felis felis*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a composição química do óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima* no controle de adultos da pulga *Ctenocephalides felis felis*.
- Avaliar o efeito inibitório da enzima acetilcolinesterase frente ao óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

As folhas de *Caesalpinia pulcherrima* (L) Sw. foram coletadas no município de Volta Redonda–Rio de Janeiro (bairro São João, GPS22°52'68.10 S; 44°09'30.00 W). Estas foram posteriormente secas em uma estufa com renovação de ar a 45°C por 72 horas interrompidas, e a pulverização foi realizada manualmente. Uma exsicata foi preparada e a espécie foi depositada do Herbário do Instituto de Botânica nº do registro RBR28926 da mesma instituição (UFRRJ, Brasil).

### 4.2 Extração e caracterização química do óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima*

Amostras constituídas de partes aéreas (folhas secas e galhos) de *C. pulcherrima* (50g cada) foram submetidas à hidrodestilação usando um aparelho do tipo Clevenger. Os óleos essenciais (OE) das folhas foram recolhidos após quatro horas para a avaliação da composição química. Os OE's foram secos utilizando-se sulfato de sódio anidro Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrados com gás Nitrogênio (N<sub>2</sub>). Após a secagem a amostra do óleo foi acondicionada devidamente em pequenos frascos âmbar e direcionadas para a análise de cromatografia gasosa.

A análise por cromatografia gasosa (CG) foi realizada no aparelho Hewlett-Packard 5890 II (Palo Alto, USA) equipado com detector por ionização de chama (DIC) e com um injetor *split-splitless* foi utilizado para separar e detectar os constituintes dos óleos essenciais.

As substâncias foram separadas dentro de uma coluna capilar de sílica fundida (HP – 30 m x 0,25 mm i.d., espessura do filme 0,25 µm, Agilent J&W).

As temperaturas do forno, do injetor e do detector foram programadas como indicado por Adams (2007). O gás de arraste utilizado foi o Hélio (1 mL/min). O volume injetado foi de 1 µL em uma razão de 1:20.

A porcentagem dos componentes dos óleos essenciais foi calculada através da área relativa de cada sinal analisado pela CG-DIC.

O óleo essencial foi analisado também por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM – QP2010 Plus, Shimadzu JPN). As condições de

temperatura, corrente do gás de arraste e coluna capilar para a análise CG/EM foram as mesmas descritas para a análise anterior por CG/DIC, conforme Adams (2007).

As condições de operação para o espectrômetro de massas foram de voltagem de ionização a 70 eV e alcance de massa de 40-400  $m/z$  e 0,5 scan/s. Os índices de retenção dos compostos foram calculados baseado na co-injeção de amostras com uma mistura de hidrocarbonetos C8-C20 conforme van DenDool e Dec. Kratz (1963).

Os constituintes foram identificados pela comparação de seus espectros de massa de acordo com a biblioteca NIST (2008) e com os já descritos por Adams (2007).

#### **4.3 Obtenção de *Ctenocephalides felis felis* e preparo das diluições para o teste *in vitro***

Os experimentos realizados seguiram os padrões estabelecidos pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Instituto de Veterinária (CEUA/IV).

Ovos e pulgas adultas de *C. felis felis* utilizados no estudo foram obtidas de uma colônia mantida desde 1998, nas dependências do LQEPV. Para manutenção da colônia foram utilizados gatos infestados duas vezes por semana com 50 casais de pulgas e realizadas coletas do material contido na bandeja das gaiolas, onde ficam os gatos. Esse material foi coletado com auxílio de pincel e pá, logo após foi peneirado e acondicionado em potes plásticos adaptados com tampas teladas para manutenção dos diferentes estágios de pulgas e mantidos em câmara climatizada com demanda bioquímica de oxigênio (tipo DBO) a  $27\pm 1^\circ\text{C}$  e  $75\pm 10\%$  até a emergência das pulgas adultas.

Realizou-se a avaliação da atividade *in vitro* do OE de *C. pulcherrima* pela técnica de impregnação de papel filtro (**Figura 17**), em que se preparam 10 diluições seriadas (1:2) do OE com concentrações variando entre  $800\ \mu\text{gcm}^{-2}$  e  $1,56\ \mu\text{gcm}^{-2}$ .



Arquivo Pessoal Dr. Diefrey Ribeiro Campos

**Figura 17:** Impregnação das fitas de papel filtro.

Utilizou-se acetona como diluente e controle negativo, visto que a mesma possui capacidade de solubilizar os OEs sem interferir nas análises, confirmando assim a viabilidade da colônia envolvida nos testes.

Após preparadas, homogeneizou-se as diluições em ultrassom Ultronique por aproximadamente 20 minutos.

Utilizou-se uma solução de fipronil  $8 \mu\text{gcm}^{-2}$  em acetona (diluente) como controle positivo, preparada a partir de uma solução de fipronil  $1 \text{ mg/mL}^{-1}$  em acetonitrilina, confirmando a suscetibilidade da colônia utilizada.

#### **4.4 Avaliação da atividade adulticida *in vitro* do óleo essencial contra *Ctenocephalides felis felis* (Screening)**

Impregnou-se as fitas de papel filtro (com aproximadamente  $10 \text{ cm}^2$ ) com  $200 \mu\text{L}$  da respectiva diluição em duplicata, deixando secar em repouso a temperatura ambiente por uma hora.

Inseriu-se as fitas secas em tubos de ensaio contendo 10 pulgas adultas não alimentadas (cinco machos e cinco fêmeas), que foram posteriormente vedados com parafilme e fitas de borracha (**Figura 18**).



**Figura 18:** Avaliação da atividade adulticida

Arquivo Pessoal Dr. Diefrey Ribeiro Campos

Alocou-se então os tubos de ensaios em câmaras climatizadas a  $27\pm 1$  °C com umidade reativa de  $75\pm 10$  %, avaliando-se a motilidade das pulgas entre 24 e 48 horas após as mesmas serem colocadas em contato com as fitas impregnadas.

Esta avaliação é realizada após leves batidas do tubo de ensaio em superfície sólida, em que as pulgas que permanecem estáticas sem nenhuma movimentação são consideradas mortas; e aquelas que se movimentam são consideradas vivas, mesmo se o movimento observado for mínimo.

Contabiliza-se as pulgas vivas por concentração com auxílio de um microscópio estereoscópico.

#### **4.5 Avaliação da atividade larvicida *in vitro* do óleo essencial contra *Ctenocephalides felis felis* (Screening)**

Impregnou-se discos de papel filtro (com aproximadamente 51 mm de diâmetro) com  $451\mu\text{L}$  da respectiva diluição em duplicata, deixando secar em repouso a temperatura ambiente por uma hora.

Inseriu-se os discos secos em placas de petri (60 mm x 15 mm), juntamente com 10 larvas alimentadas, no terceiro instar de desenvolvimento, que foram fechadas posteriormente.

As placas de petri foram alocadas em câmaras climatizadas a  $27\pm 1$  °C com umidade reativa de  $75\pm 10$  %, avaliando-se a motilidade das pulgas 24 e 48 horas após as mesmas serem colocadas em contato com os discos impregnados.

As pulgas que permanecem estáticas sem nenhuma movimentação são consideradas mortas; e aquelas que se movimentam são consideradas vivas, mesmo se o movimento observado for mínimo.

Contabiliza-se as pulgas vivas por concentração com auxílio de um microscópio estereoscópico.

#### **4.6 Avaliação da atividade pupicida *in vitro* do óleo essencial contra *Ctenocephalides felis felis* (Screening)**

Impregnou-se discos de papel filtro (com aproximadamente 51 mm de diâmetro) com 451 $\mu$ L da respectiva diluição em duplicata, deixando secar em repouso a temperatura ambiente por uma hora.

Inseriu-se os discos secos em placas de petri (60 mm x 15 mm), juntamente com 10 pupas com 15 dias de vida, que foram fechadas posteriormente.

As placas de petri foram alocadas em câmaras climatizadas a 27 $\pm$ 1 °C com umidade reativa de 75 $\pm$ 10 %, quantificando-se os adultos emergidos do pupário após incubação por 15 dias, com auxílio de um microscópio estereoscópico.

#### **4.7 Avaliação da atividade ovicida *in vitro* do óleo essencial contra *Ctenocephalides felis felis* (Screening)**

Impregnou-se discos de papel filtro (com aproximadamente 51 mm de diâmetro) com 451 $\mu$ L da respectiva diluição em duplicata, deixando secar em repouso a temperatura ambiente por uma hora.

Inseriu-se os discos secos em placas de petri (60 mm x 15 mm), juntamente com 10 ovos de pulga, que foram fechadas posteriormente.

As placas de petri foram alocadas em câmaras climatizadas a 27 $\pm$ 1 °C com umidade reativa de 75 $\pm$ 10 %, avaliando-se a eclodibilidade após 72 horas, ou seja, ovos que eclodiram dando origem as larvas eram contabilizadas como vivas.

#### **4.8 Cálculo da mortalidade**

O cálculo da mortalidade foi realizado pela fórmula de Abbott (1987):  
Percentual de eficácia = [(média de pulgas do grupo controle – média de pulgas do grupo tratado) / (média de pulgas do grupo controle)]  $\times$  100.

#### 4.9 Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase

A determinação da interação do OE com a AChE foi realizada pelo método adaptado segundo Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961) e para determinação da inibição da enzima AChE, utilizou-se o ensaio quantitativo em microplaca (RHEE *et al.*, 2001; TREVISAN *et al.*, 2003), utilizando-se leitor de microplaca de 96 poços Bio-rad 3550 UV.

Para o ensaio utilizou-se acetiltiocolina como substrato, os quais são hidrolisados pelas enzimas à tiocolina que reage com o reagente de Ellman (DTNB) produzindo 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato que é detectado a 412 nm.

Com o auxílio de micropipetas, foi pipetado nos poços da microplaca o tampão TRIS/HCl pH 8, DMSO à 40%, o óleo diluído em DMSO 40%, a enzima acetilcolinesterase (AChE) e o DTNB.

Após isso, pipetou-se a acetiltiocolina, dando início a reação, esperando-se 10 min para realizar a leitura da placa no aparelho em comprimento de onda de 412 nm, obtendo-se os valores de absorbâncias em cada poço (representação dos poços na **Figura 19**).

As velocidades de reação foram então calculadas utilizando-se o programa de computador Microplate Manager (Bio-Rad). A medida da velocidade de reação catalítica para o OE também se fez pelo uso do método de Ellman.

Assim, utilizando-se das reações descritas, a absorbância do 5-tio-2-nitrobenzoato foi determinada em função do tempo.

Construiu-se o gráfico de determinação de  $IC_{50}$ , em que para determinar  $IC_{50}$ , foi feita uma curva com diferentes diluições do óleo.



**Figura 19:** Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase

Fonte:Arquivo do autor.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Extração por hidrodestilação do óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima*.

Dentre as técnicas de extração conhecidas e disponíveis, a hidrodestilação foi a técnica escolhida para este estudo, pois permite conhecer os componentes de uma matriz complexa de maneira prática em escala laboratorial, além de ser uma alternativa eficiente para a extração de óleos essenciais (SCHLOSSER *et al.*, 2020).

Sendo assim, o rendimento do OE de *C. pulcherrima* obtido foi de 0,20%. O rendimento do OE de *C. pulcherrima* foi considerado baixo quando comparado com outros estudos realizados de outras partes da planta como raízes, flores e caule. Alguns estudos demonstraram um rendimento que variou entre 0,8% entre 1,7% (AZEVEDO *et al.*, 2018 USMAN *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado por (NJOKU *et al.*, 2016) com folhas de *C. pulcherrima* no norte da Nigéria foi demonstrado que o processo de secagem das folhas em diferentes condições, influenciava diretamente nos resultados no rendimento do óleo essencial. As folhas foram secas em quatro condições diferentes, sendo (1) secagem diretamente no ambiente após a coleta 0,63%, (2) secagem ao ar 0,90%, (3) secagem ao sol 0,20% e (4) secagem na estufa 0,58%. É perceptível que houve uma diferença significativa em relação aos rendimentos do óleo essencial nas diferentes condições de secagem, sendo possível identificar o mesmo rendimento no presente estudo com a condição (3) secagem ao sol.

Em relação a floração da *C. pulcherrima*, esses arbustos apresentam ciclos intermitentes o ano todo desde janeiro até dezembro, e como foi utilizado as partes das folhas da planta para estes estudos, é relevante considerar a influência de fatores externos como chuvas, temperatura e habitat.

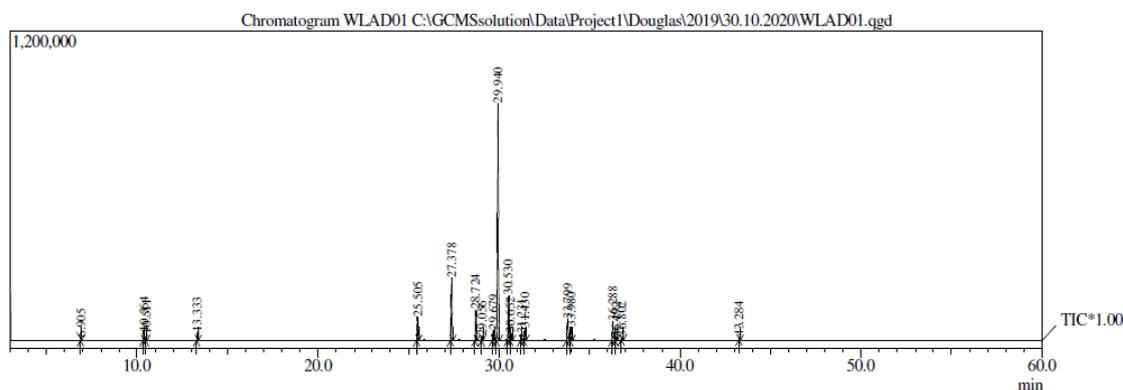
O método de geração do OE possui grande importância. O OE das partes aéreas de orégano por exemplo quando feito por técnica de pulverização gerando linalol (2,6%), *a*-pineno (0,7%), óxido de cariofileno (0,6%), espatulenol (0,5%), germacreno D (0,3%) e 1,8-cineol (0,3%); por hidrodestilação, 1,8-cineol (3,8%), cariofileno (1,9%), germacreno D (1,1%), óxido de cariofileno (0,7%), espatulenol (0,6%), (*E*)- $\beta$ -farneseno (0,4%), *a*-pineno (0,4%) e linalol (0,3%) (VAZIRIAN *et al.*, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Quando os OEs forem produzidos, a importância da classificação botânica da espécie é primordial. Quanto ao eucalipto, por exemplo, se o OE for obtido da espécie *Eucalyptus globulus* obtêm-se 1,8-cineol (63,8%),  $\alpha$ -pineno (16,1%) e cariofileno (0,3%); de *E. radiata*, limoneno (68,5%),  $\alpha$ -pineno (3,0%), cariofileno (0,25%), linalol (0,4%), espatulenol (0,2%) e óxido de cariofileno (0,1%). De fato, a importância de estudos com espécimes diferentes mais que ainda constituam o mesmo gênero, pode possibilitar através da literatura qual a melhor parte de uma planta para a extração, a melhor estação para a coleta, para a obtenção de uma maior quantidade do composto desejado, logo as suas atividades biológicas, (LUÍS *et al.*, 2016).

Compostos e quantidades dependerão muito da parte da espécie e seu quimiotipo. No tomilho, OE dos talos secos produz 1,8-cineol (6,7%), linalol (4,4%), cariofileno (2,3%),  $\alpha$ -pineno (2,1%), limoneno (1,3%) e óxido de cariofileno (0,3%); das folhas frescas, cariofileno (3,2%), óxido de cariofileno (2,9%),  $\alpha$ -pineno (1,9%), germacreno D (1,8%), limoneno (0,6%) e linalol (0,2%), repelência será diferenciada (GALOVÍČOVÁ *et al.*, 2021; FACHINI-QUEIROZ *et al.*, 2012).

## 5.2 Componentes e caracterização química do óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima*

A análise do OE de *C. pulcherrima* por cromatografia gasosa permitiu observar a complexidade deste produto natural, possibilitando a identificação dos diferentes constituintes que o compõem e que são responsáveis pelas propriedades do OE (**Figura 20**). Os compostos identificados por cromatografia gasosa encontram-se listados abaixo (**Tabela 1**).



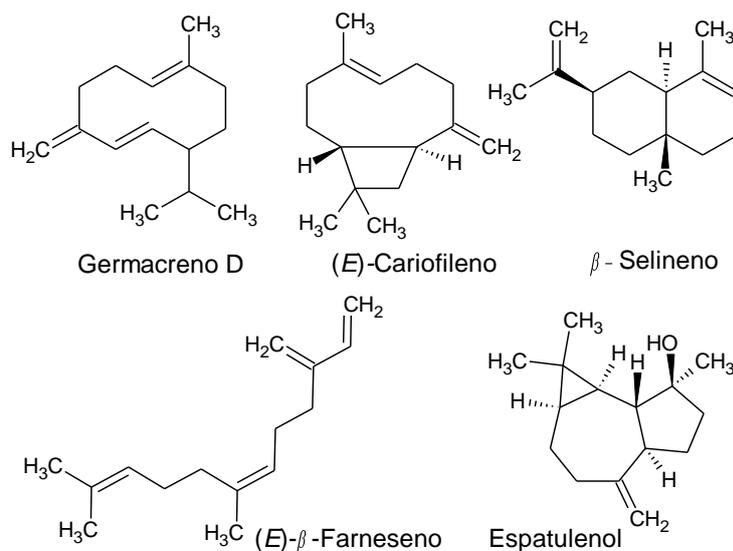
**Figura 20:** Cromatograma gasoso do óleo essencial obtido de *Caesalpinia pulcherrima*.

**Tabela1:** Composição química do óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima*.

Ordem de Eluição	Componentes	IA <sub>c</sub>	OECP (%)
1	$\alpha$ -Pineno	933	0,42
2	Limoneno	1029	1,18
3	1,8-Cineol (ou Eucaliptol)	1033	0,85
4	Linalol	1101	1,17
5	Isoledeno	1376	4,07
6	(E)-Cariofileno	1420	11,63
7	(E)- $\beta$ -Farneseno	1453	5,06
8	9- <i>epi</i> -(E)-Cariofileno	1461	0,65
9	n.i.	1476	1,73
10	Germacreno D	1482	47,04
11	$\beta$ -Selineno	1496	8,41
12	$\alpha$ -Muuroleno	1499	1,51
13	n.i.	1514	1,04
14	$\delta$ -Amorfenol	1519	2,28
15	Espatuleno	1579	4,45
16	Óxido de Cariofileno	1584	2,49
17	n.i.	1645	4,58
18	n.i.	1650	0,63
19	n.i.	1659	0,52
20	n.i.	1841	0,29
	Monoterpenos hidrocarbonados		1,60
	Monoterpenos oxigenados		2,02
	Sesquiterpenos hidrocarbonados		80,65
	Sesquiterpenos oxigenados		6,94
	Fenilpropanoides		-
	Total		91,21

OECP – óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima*; n.i. – não identificado. Ordem de eluição e índice aritmético (IA<sub>c</sub>) foram calculados com base em uma série de alcanos.

A partir da análise de CG-EM (espectros em anexo) obteve-se que o fitoconstituente majoritário do OE de *C. pulcherrima* foi o germacreno D (**Figura 21**), que corresponde a 47,04% da composição deste. O germacreno D é um sesquiterpeno com atividade anti-inflamatória e antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (DUARTE, 2006), atividade fungicida (PIETRO *et al.*, 2011) e atividade inseticida de forma inibitória para alimentação de insetos (PETRAKIS *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2005).

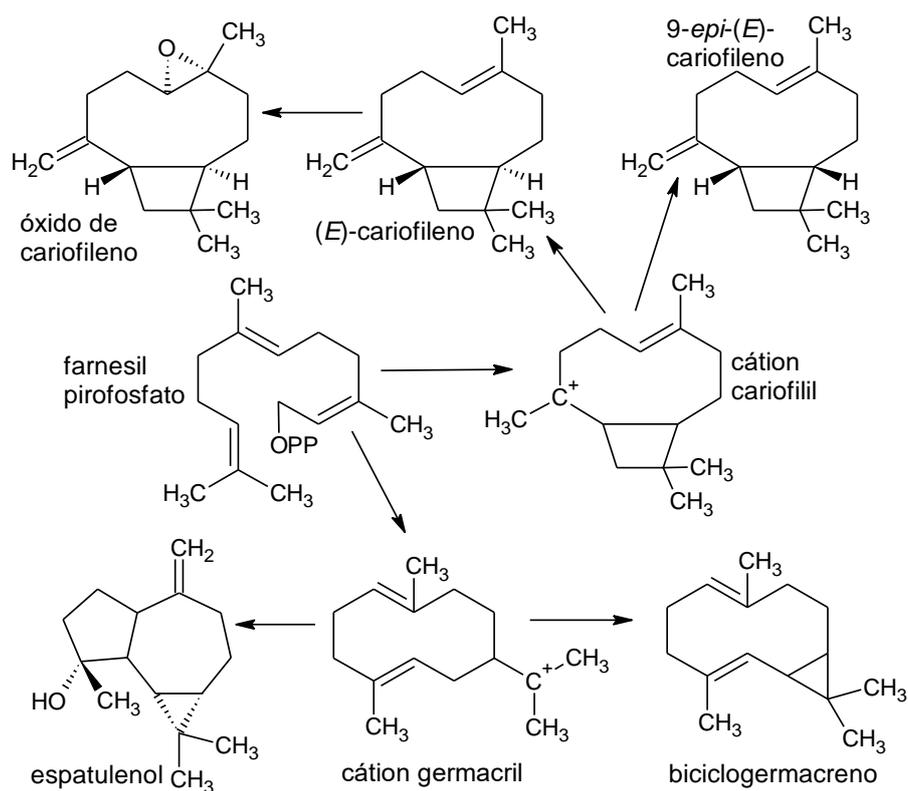


**Figura 21:** Estruturas químicas dos cinco principais componentes identificados na espécie *Caesalpinia pulcherrima*, por Cromatografia gasosa acoplada ao Espectro de massa.

O germacreno D também é considerado um precursor de outros sesquiterpenos (BULLOW & KÖNIG, 2000). Alguns OEs ricos em germacreno D, apresentam atividade acaricida contra *T. urticae* (TENÓRIO *et al.*, 2019). No estudo realizado por Simões (2019), o germacreno D apresentou atividade antineoplásica, sendo um composto que futuramente terá grande importância contra as células tumorais.

Deve-se ressaltar que o mesmo pode ser encontrado em abundância na natureza, apresentando instabilidade, visto que quando submetido a elevadas temperaturas por um longo período, pode sofrer degradação ou rearranjo molecular, originando artefatos sesquiterpenoides (KRAKER *et al.*, 1998; RADULOVIĆ *et al.*, 2007).

Vários dos compostos obtidos por meio deste OE, como os cinco principais, podem ser explicados, pois estão totalmente correlacionados um ao outro na forma como as plantas os sintetizam, por fazerem parte das mesmas vias biossintéticas das plantas, sendo produtos metabólicos um dos outros (**Figura 22**). Se as condições sazonais diminuem a concentração de 1 destes compostos, influenciarão na quantidade de todos os outros, por suas grandes correlações (CRUZ *et al.*, 2022).



**Figura 22:** Exemplo de vias biossintéticas pelos quais os compostos demonstrados estão relacionados frente à sua formação na respectiva planta.

FONTE: CRUZ *et al.*, 2022

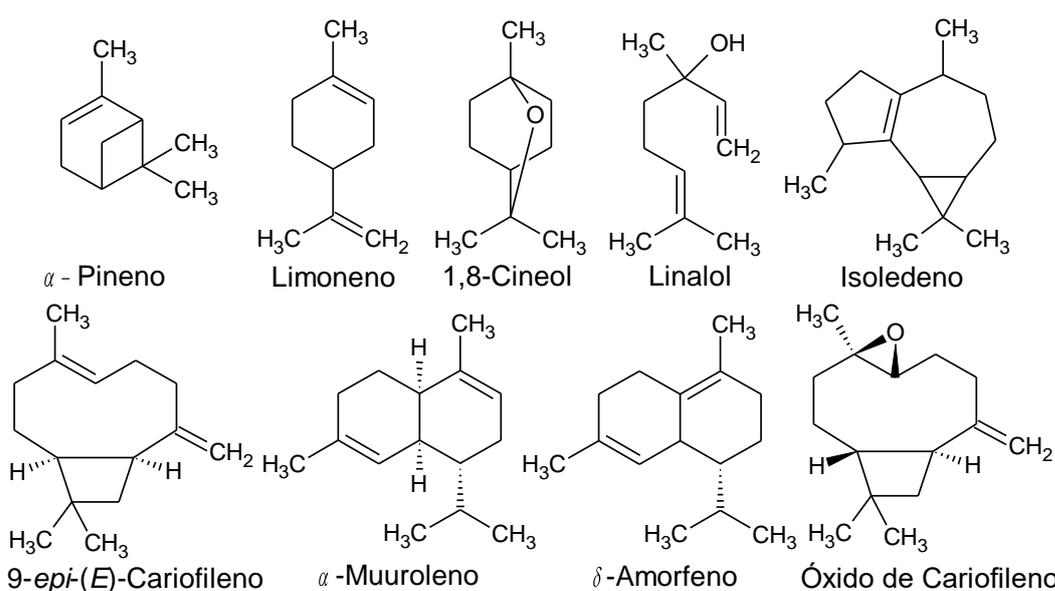
O (*E*)-cariofileno é um sesquiterpeno composto presente em muitas plantas, e tem sido utilizado por muitos anos em especiarias, sabores cítricos, sabonetes, detergentes, cremes, loções, produtos alimentícios, bebidas, mas sua utilidade tem maior valor comercial na produção de fragrâncias desde a década de 1930 (OPDYKE, 1973). As atividades anti-inflamatórias e anestésicas são descritas nos estudos realizados por (GHERLADINI *et al.*, 2001). Uma vez que os constituintes do óleo essencial, como (*E*)-cariofileno e germacreno-D, podem ser purificados, a planta investigada torna-se um potencial de fontes alternativas desses importantes compostos bioativos (MONTANARI *et al.*, 2011). Outros óleos podem ser utilizados como exemplo por apresentarem compostos que apresentam atividade inseticida. O óleo essencial de cravo, tendo seu OE extraído por hidrodestilação, o mesmo apresenta entre seus 5 principais compostos em 1,4%, com ação inseticida (inibindo larvas de *Culex pipiens*) e acaricida (HYLDGAARD, MYGIND, MEYER, 2012; CHAIEB *et al.*, 2007); a lavanda o possui em 4,8%, junto ao linalol (26,8%) e 1,8-cineol (2,1%) em comum (NAJIBULLAH *et al.*, 2021; HASSIOTIS *et al.*, 2014).

Outro sesquiterpeno identificado foi o  $\beta$ -selineno, em que (Chandra *et al*, 2017) relataram esse composto como majoritário do OE de *Callicarpa macrophylla* (Varbenaceae), e apresentou atividades antioxidante, anti-inflamatória, analgésica e antipirética, comparado com a ação de AINEs. Estudo realizado por Akter *et al*, 2016 identifica além da atividade antimicrobiana, a ação antifúngica para  $\beta$ -selineno no OE de *Erythrina stricta* Roxb. (Fabaceae).

O(*E*)- $\beta$ -farneseno apresenta uma particularidade, funciona como feromônio para muitos insetos, inclusive como alarme para, por exemplo, muitas espécies de pulgões (SATIAL *et al*, 2015). E segundo Zhang *et al*. (2019), apresentou taxas significativas de repelência quando comparado a alguns inseticidas no mercado em estudo realizado para o controle de uma determinada espécie de pulgões.

O espatunelol é um sesquiterpeno tricíclico presente em diversos OEs de várias plantas aromáticas (NASCIMENTO *et al*, 2018), e suas atividades já foram descritas como antimicrobiana (TAN *et al*, 2016), anti-inflamatória e imunomoduladora (ZAIEL *et al*, 2011).

Os sesquiterpenos descritos acima (*E*)-cariofileno,  $\beta$ -selineno, espatunelol mostraram diversidade de atividades, mas podemos destacar que os compostos germacreno D e o (*E*)- $\beta$ -farneseno apresentaram resultados que podem contribuir para a compreensão dos resultados apresentados no presente estudo. Os outros componentes identificados encontram suas estruturas demonstradas na **Figura 23**.



**Figura 23:** Estrutura química dos 9 outros componentes identificados na espécie *Caesalpinia pulcherrima*, por Cromatografia gasosa acoplada ao Espectro de massa

Dentre os componentes secundários, muitos deles também se encontram presentes em outros óleos essenciais já determinados como sendo repelentes ou inseticidas, conforme demonstrado anteriormente.

O composto químico 1,8-cineol, é um monoterpeneo presente na espécie *C. pulcherrima* possui ação repelente e inseticida para *Periplaneta americana*, assim como larvicida e repelente ovipositivo para mosquitos (TRIPATHI *et al.*, 2016). Em um outro estudo com o óleo essencial de *Stachyriederi* var. *japônica* o composto 1,8 cineol demonstrou atividades inseticidas e acaricidas, bem como repelência contra vários insetos/ácaros, incluindo os males de milho (*S. zeamais*) e a (*L. bostrychophila*) (QUAN *et al.*, 2018).

O limoneno se encontra em 2,5% no OE de citronela, que é muito utilizada como repelente, dentre várias outras ações (TOLEDO *et al.*, 2016); o OE de toranja o possui em 75,1%, junto ao  $\alpha$ -pineno (2,1%) e cariofileno (1,9%), e ação antibiótica frente a fortes bactérias (tanto OE quanto combinação com antibióticos sintéticos) e antifúngica, com estas ações devidas ao limoneno (KHALIL, FARGHAL, FARAG, 2020; OKUNOWO *et al.*, 2013).

O linalol constitui 10,1% do OE das flores e folhas de gerânio, possuindo atividade antibacteriana (EL-KAREEM *et al.*, 2020), e no OE de capim-limão, feito com *Cymbopogonflexuosus*, há 0,7% de linalol, tendo estes OEs como repelente natural de insetos e protegendo contra certas ameaças ambientais, além de outras ações (SILVA *et al.*; 2018).

O óxido de cariofileno (1,5%), 1,8-cineol (1,0%), limoneno (0,5%) e  $\alpha$ -pineno (0,8%) fazem com que o OE de eucalipto-limão, extraído das folhas, brotos e caules por hidrodestilação, possua dentre seus compostos ação repelente, inseticida, fungicida, bactericida potente, herbicida, biopesticida, aroma refrescante e cura da pele (BENCHAA, HAZZIT, ABDELKRIM, 2018).

Algumas plantas podem possuir uma grande quantidade de compostos em comum e o OE de hortelã-pimenta, com atividade repelente já determinada, possui vários compostos: se extraídos das partes aéreas da planta, pode-se determinar 1,8-cineol (7,9%), germacreno D (1,7%), limoneno (1,2%), cariofileno (1,0%),  $\alpha$ -pineno (0,7%), linalol (0,5%) e *E*- $\beta$ -farneseno (0,2%), possuindo inúmeras atividades, junto à repelência (ASKARY *et al.*, 2016).

### 5.3 Determinação da mortalidade de *Ctenocephalides felis felis* nos estágios imaturos e na fase adulta

Para determinar se a concentração em que o OE de *C. pulcherrima* é capaz de causar a mortalidade em todas as fases das pulgas, foi realizado o *screening* do mesmo nas fases separadamente, para que seja possível determinar a faixa de concentração que o mesmo possui eficácia e assim, ajustá-la e determinar a concentração letal 50 e 90 (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>).

Quando aplicado sobre os ovos, o OE promoveu suas mortalidades logo na primeira concentração analisada, sendo possível perceber o aumento da mortalidade para os outros estágios à medida em que a concentração aumentava. O resultado foi de 100% de mortalidade contra larvas, ovos e pupas na maior concentração analisada (800 µg cm<sup>-2</sup>). Deste modo, realizou-se o *screening* em 10 concentrações, cujo resultado está abaixo (**Tabela 2**).

Pode-se perceber que o OE de *C. pulcherrima* possui atividade inseticida contra adultos de *C. felis*, embora não tenha alcançado 100% de mortalidade na faixa de concentração analisada. Contudo, o mesmo apresentou eficácia no período de 24 e 48 horas em concentrações acima de 400 µg cm<sup>-2</sup>, chegando a 15% e 40%, respectivamente.

**Tabela 2:** Determinação de mortalidade das larvas, ovos, pupas e pulgas adultas de *Ctenocephalides felis felis*, pelo óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima* (OECP).

Concentração (µgcm <sup>-2</sup> )	OECP					
	LARVA		OVO	PUPA	ADULTA	
	24 horas	48 horas			24 horas	48 horas
1,56	0,00	0,00	23,5	0,00	0,00	0,00
3,13	0,00	0,00	23,5	0,00	0,00	0,00
6,25	0,00	0,00	23,5	0,00	0,00	0,00
12,5	0,00	0,00	70,6	5,00	0,00	0,00
25	0,00	0,00	41,2	10,00	0,00	0,00
50	0,00	0,00	29,4	20,00	0,00	0,00
100	60,00	75,00	41,2	25,00	0,00	5,00
200	95,00	95,00	82,4	40,00	0,00	0,00
400	100,00	100,00	94,1	90,00	10,00	10,00
800	100,00	100,00	100,0	100,00	15,00	40,00

Resultados expressos em % de mortalidade

O OE de *C. pulcherrima* apresentou atividade inseticida contra *C. felis* de maneira mais pronunciada frente aos estágios imaturos, indicando que são mais suscetíveis a ação do OE do que as pulgas adultas. A ação sobre as larvas iniciou em concentrações mais elevadas, quando comparado ao ovo e a pupa, mas as mortalidades apresentadas já estavam acima de 50%, alcançando a mortalidade máxima em 100% em 400  $\mu\text{gcm}^{-2}$ .

Não foram encontrados na literatura trabalhos realizados a partir de extratos de *C. pulcherrima* frente as pulgas. Mas muitos estudos demonstraram a atividade inseticida de extratos das partes da planta.

Em relação a atividade inseticida da *C.pulcherrima* um estudo mostrou que o extrato bruto exerceu zero eclodibilidade (100% de mortalidade) a 375, 300 e 225 ppm para os mosquitos (*Culex quinquefasciatus*), febre amarela mosquitos (*Aedes aegypti*) e mosquitos da malária (*Anopheles stephensi*) respectivamente e apresentaram LD<sub>50</sub> de 99,52 e 110,886  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$  em (*Artemia salina*) citotoxicidade para extrato aquoso e metanólico respectivamente (Govindarajan *et al.*, 2011, Pawar *et al.*, 2009, Govindarajan *et al.*, 2013).

Um outro estudo proposto também por (Govindarajan *et al.*, 2013) avaliou a atividade larvicida do benzeno bruto e extratos de acetato de etila de folhas de *Caesalpinia pulcherrima* para toxicidade contra três importantes mosquitos vetores, nomeadamente, *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* e *Anopheles subpictus*. Os extratos mostraram efeitos larvicidas moderados, com a extrato de benzeno mostrando a maior mortalidade para o estágio larval.

Uma investigação para uma possível atividade inseticida realizada por (ERHARUYI *et al.*, 2011) mostrou a ação do óleo essencial de *C.pulcherrima* da raiz frente a quatro espécies de pragas incluindo besouro de farinha vermelha (*Tribolium castaneum*), gorgulho do arroz (*Sitophilus oryzaea*), broca do grão menor (*Rhyzopertha dominica*) e besouro de pulso (*Callosobruchus analis*). As taxas de mortalidade alcançadas foram de 20% contra (*Tribolium castaneum*) e 40% contra (*Callosobruchus analis*) em 1019,10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . O estudo comparou a atividade do óleo essencial da raiz de *C.pulcherrima* com a ação do inseticida permetrina sendo o óleo significativamente menos ativo contra as pragas de grãos testadas.

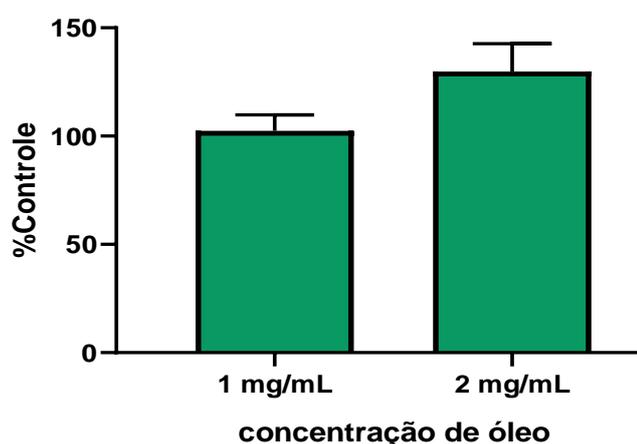
Podemos considerar determinante que compostos possam eliminar não apenas sua forma adulta, mas também em todas suas formas imaturas, pois estas se encontram aos arredores dos animais infectados, e as formas adultas são apenas uma pequena proporção de sua população total. Portanto, o controle de todas as suas formas deve ser considerado, especialmente em casos de forte infestação (ESCCAP, 2015).

Ovos, larvas e pupas devem ser alvos para um tratamento que apresenta eficácia e segurança para os hospedeiros, pois dessa forma o ambiente também estará protegido. A alternativa de se utilizar um OE como este, possibilitará, menos riscos de eventos adversos pois fará com que não haja intoxicações ou problemas ambientais, causados pelos inseticidas químicos (ESCCAP, 2015). Os resultados apresentados evidenciam que ao eliminar os estágios imaturos outros animais/seres não terão o risco de um parasitismo recorrente ou um reinfestação, considerando uma interrupção do ciclo efetivo da pulga. O óleo essencial de *C. pulcherrima* apresentou atividade significativa o que estima a continuidade de pesquisas na área de produtos naturais.

#### 5.4 Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase

Avaliou-se a atividade da enzima acetilcolinesterase frente a duas concentrações do OE de *C. pulcherrima*, cujo resultado está demonstrado no gráfico abaixo (**Gráfico 1**).

Pode-se perceber que o OE de *C. pulcherrima*, em ambas as concentrações analisadas, não foi capaz de promover inibição da enzima AChE, visto que a mesma permaneceu com atividade máxima. A atividade observada utilizando-se o óleo essencial assemelhou-se com a apresentada pelo controle, comprovando-se assim ausência de inibição por parte do OE.



**Gráfico 1:** Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase frente ao óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima*

As etiologias dos problemas cognitivos destacam os problemas com a transdução de sinal através das sinapses, em contrapartida, regular e compreender como as atividades da AChE funcionam tornou-se um importante foco de pesquisa (BRENNER *et al.*, 2012, CHOUDHARY 2001).

Para o controle e manejo de pragas na agricultura, inibidores da acetilcolinesterase tem sido utilizado em formulações de produtos como herbicidas organofosforados, carbamatos, produtos como repelentes e pulcidas todos com o mesmo objetivo, levar a hiperestimulação dos receptores de acetilcolina (nicotínicos e muscarínicos), impedido a neurotransmissão desses insetos (COLOVIC *et al.*, 2013).

Os organofosforados são inibidores irreversíveis da AChE e seu efeito pode causar letalidade dependendo da dosagem. Esse efeito está relacionado a ligação covalente entre fósforo do composto e o oxigênio pertencente ao grupo hidroxila de serino catalítica (OCHOA *et al.*, 2016).

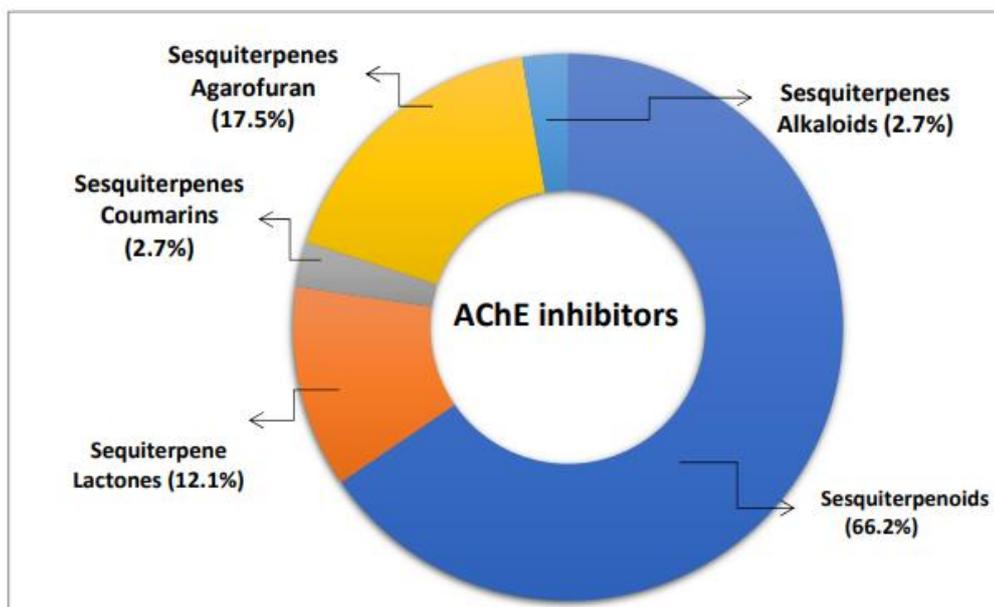
A acetilcolinesterase está envolvida na interrupção da transmissão do impulso, através da hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina em numerosas vias colinérgicas, nos sistemas nervosos central e periférico (SILVA, 2015).

A AChE destaca-se por ser uma serina hidrolase, isso significa que pertence a uma das maiores classes de enzimas que se encontram na natureza, já que esta classe inclui as esterases, amidases, proteases, dentre outras (BACHOVCHIN *et al.*, 2012).

A AChE tem sido o alvo mais explorado entre os inseticidas, havendo pesquisas como por exemplo em que o fitoconstituente cariofileno, apresentou inibições frente à AChE; mas não são todos os sesquiterpenos que possuem tal atividade, porém monoterpenos como o linalol também podem possuir tal atividade (BURČUL *et al.*, 2020).

Uma revisão sistemática realizada recentemente mostrou que de um total de 58 sesquiterpenos analisados, 12 compostos apresentaram potencial de candidatos a anticolinesterásicos, apresentando  $IC_{50} \leq 9\mu M$ . Os sesquiterpenos são considerados uma importante classe de terpenóides que apresentam um grande espectro de atividades biológicas, inclusive por desempenharem um papel significativo na transmissão colinérgica e apresentarem atividade inibitória da Ache. (ARYA *et al.*, 2021). A literatura destacou que compostos como amberboin, lipidiol, farneseno, ambrosina, bilobalida, huperzina A e jatamansona apresentaram atividade inibitória significativa

frente a Ache e foram relatadas de acordo com as suas categorias como demonstrada na **Figura 24**.



**Figura 24:** Porcentagem de várias categorias de sesquiterpenos com potencial inibitório da AChE.

Fonte: ARYA *et al.*, 2021.

O estudo concluiu que vários sesquiterpenos podem atuar na melhora da transmissão colinérgica retardando e aliviando os sintomas como por exemplo em indivíduos que apresentam diagnóstico da Doença de Alzheimer (ARYA *et al.*, 2021).

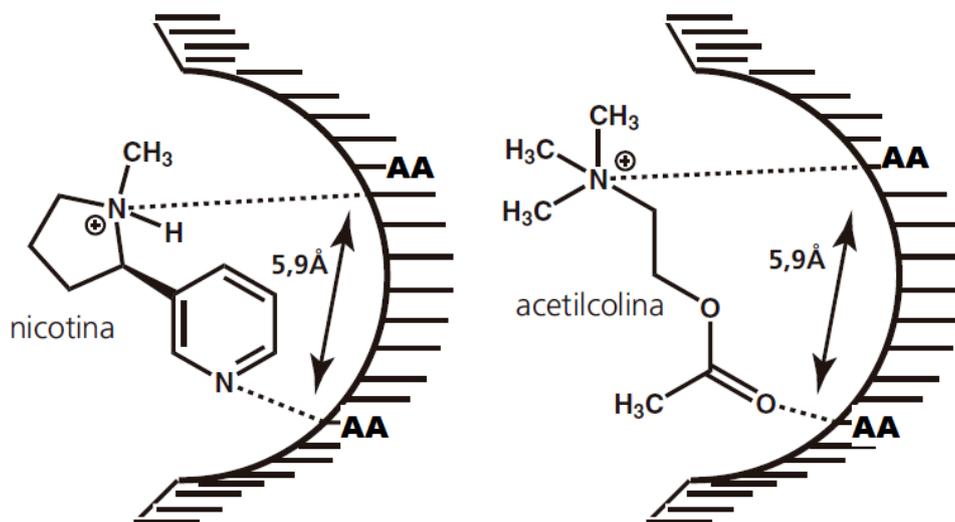
A atividade de não inibir a enzima AChE já foi observada para sesquiterpenos, como o (*E*)- cariofileno nos estudos de (BARREIRO *et al.*, 2015) portanto a ação das folhas de *C. pulcherrima* como inibidora da acetilcolinesterase pode estar relacionada com as substâncias do óleo essencial considerando que o óleo apresentou uma quantidade significativa de sesquiterpenos.

Se a atividade não foi encontrada, o organismo utilizado para determiná-la pode ser a questão responsável, pois a modificação de um único aminoácido em um sítio ativo pode fazer com que não haja a complexação de tais compostos nesta enzima.

Muitos autores consideram que compostos não se complexariam à AChE pelo seu tamanho e pela forma da ACh, mas isso não altera complexações – a **Figura 25** mostra como um composto estruturalmente maior, como a nicotina, se complexa de forma muito específica ao mesmo sítio da ACh.

Compostos como estes presentes no OE estudado acabam sendo efetivos inibidores de seus respectivos sítios ativos, pois se são maiores que o substrato natural,

podem realizar melhores interações se complexando de forma mais específica, impedindo totalmente que o substrato se complexe.



**Figura 25:** Demonstração de como a nicotina pode ativar um receptor colinérgico – por sua similaridade molecular com aACh, o substrato natural, e tal semelhança pode ser confirmada pela distância molecular mostrada (5,9Å) entre os grupamentos que realizam as interações necessárias. AA = aminoácido realizando as interações moleculares para que este ligante se complexe; **linhas pontilhadas** = qualquer interação molecular por eles realizadas (iônica, dipolo-dipolo, ligação de hidrogênio, Van der Waalsetc.).

FONTE: BARREIRO & FRAGA, 2015.

Muitos outros alvos podem ser explorados, conforme demonstrado anteriormente, e inseticidas como organofosforados podem trazer prejuízos tanto para os parasitas quanto para os mamíferos, e são responsáveis por grande número de intoxicações humanas e mortes. Para o CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention*), EUA – são os mais usados, e limitaram a disponibilidade em produtos, reduzindo a exposição evitando-os (KLAASSEN & WATKINS III, 2012; <https://www.cdc.gov/index.htm>).

Isso porque quando entram no corpo por inalação, digestão ou contato, inibindo a AChE, acumulam a ACh nos nervos, e sintomas como neuropatia retardada, disfunção autonômica, baixo tônus vagal e fadiga crônica são comuns. Outros menos comuns incluem depressão, problemas de memória e concentração, irritabilidade, dores de cabeça persistentes e fraqueza motora (KLAASSEN & WATKINS III, 2012;)

Os organofosforados têm capacidade de causar danos prejudiciais e devem ser evitados, e a exposição pode gerar problemas neurológicos, psiquiátricos e no sistema

nervoso, portanto, é necessário limitar a exposição química, e a redução inclui: evitar exterminantes à sua base; compra de produtos orgânicos; viver/trabalhar longe de uma instalação para sua produção (<https://www.cdc.gov/index.htm>).

Os terpenos são a classe de moléculas aromáticas sintetizadas pelas plantas, por centenas de enzimas especiais terpeno sintases para construir a partir de blocos menores, os isoprenos, de 5 carbonos. Existem 3 tipos principais de terpenos: monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (SIMÕES *et al.*, 2017).

Diterpenos podem estar presentes em OEs, mas em quantidades muito pequenas. Seu grande peso molecular evita que evaporem durante a destilação a vapor. Monoterpenos e sesquiterpenos são os principais compostos encontrados e extraídos em óleos essenciais. Devido às suas diferenças de tamanho e estrutura, possuem efeitos diferentes no corpo (SIMÕES *et al.*, 2017).

Os monoterpenos são encontrados em quase todos os OEs. Eles apresentam 10 átomos de carbono derivados de 2 isoprenos. Podem ter cadeia reta ou um único anel. Devido ao seu tamanho menor, tendem a reagir rapidamente ao ar e calor, e sofrerem a quebra mais rapidamente do que suas contrapartes sesquiterpênicas. Apresentam atividade específica nas membranas por se encaixarem entre as moléculas que a compõem. Atravessam-na completamente sem afetar alvos dentro da célula (GOVIL & TIWARI, 2013).

Os sesquiterpenos têm 15 átomos de carbono derivados de 3 isoprenos. Pelo peso molecular mais alto, são menos voláteis e menos prevalentes nos OEs. Podem ter cadeia reta, 1 ou 2 anéis. Não são pequenos para atravessar a membrana como os monoterpenos, mas possuem formas únicas que lhes permitem aderir às proteínas, afetando a atividade. São conhecidos por ativar vários receptores da superfície celular (SIMÕES *et al.*, 2017; GOVIL & TIWARI, 2013).

## 6 CONCLUSÕES

O presente estudo se dedicou a avaliar os resultados da atividade *in vitro* do óleo essencial de *Caesalpinia pulcherrima* no controle da pulga adulta e estágios imaturos (ovo, larva e pupa) da espécie *Ctenocephalides felis felis*, além de conhecer o potencial de utilização inseticida do óleo essencial. O óleo analisado apresentou atividade inseticida significativa de 40% contra as pulgas adultas e 100% contra os estágios imaturos.

Sendo assim, o óleo essencial pesquisado pode ser um ótimo candidato para o controle dos estágios imaturos da pulga podendo assim ser utilizado como uma alternativa para o desenvolvimento de pulcidas naturais. Como esta pesquisa não teve o objetivo de avaliar a atividade biológica de cada componente do óleo essencial de forma particular, acreditamos que uma nova investigação possa ser realizada no intuito de conhecer um pouco mais sobre os potenciais dos compostos majoritários encontrados no referido óleo de *Caesalpinia pulcherrima*.

Este é o primeiro estudo que descreve ou que avalia os efeitos pulcidas *in vitro* de óleos essenciais e extratos obtidos de *Caesalpinia pulcherrima*. Os resultados obtidos evidenciam a necessidade de novas informações e dados para avaliação da atividade inseticida dos mesmos. As substâncias identificadas como majoritárias devem ser testadas isoladamente e em sinergismo porque pelos resultados obtidos, são possíveis precursoras de novos fármacos para o controle alternativo de pulga. Embora óleo essencial de *C.pulcherrima* não tenha inibido a atividade da enzima AChe, é importante que estudos sejam realizados para a compreensão de possíveis mecanismos para a mortalidade dos estágios imaturos e pulgas adultas.

## 7. PERSPETCTIVAS FUTURAS

- ▶ Realizar os testes referentes aos compostos majoritários isoladamente.
  
- ▶ Avaliar a toxicidade do óleo essencial em modelo eucarioto de *Saccharomyces cerevisiae* in vitro.
  
- ▶ Avaliar o impacto dos óleos essenciais na sobrevivência das células e na funcionalidade mitocondrial.
  
- ▶ Realizar os testes in vivo e proposição de formulação para o uso em animais.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, A.; DECHKOVSKAIA, A.M.; GOLDSTEIN, L.B.; BULLMAN, S.H.; KHAN, W.; EL-MASRY, E.M.; MOHAMED, B. Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, v.67,n.4, pp 331-356, **2004**.

ABDEL-RAHMAN, A.; SHETTY, A.K.; ABOU-DONIA, M.B. Subchronic dermal application of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) and permethrin to adult rats, alone or in combination, causes diffuse neuronal cell death and cytoskeletal abnormalities in the cerebral cortex and the hippocampus, and Purkinje neuron loss in the cerebellum. *Experimental Neurology*, v.172,n.1, pp 153-171, **2001**.

ABOU-DONIA, M.B.; GOLDSTEIN, L.B.; DECHKOVSKAIA, A.; BULLMAN, S.; JONES, K.H.; HERRICK, E.A.; ABDEL-RAHMAN, A.A.; KHAN, W.A. Effects of daily dermal application of DEET and epermethrin, alone and in combination, and sensorimotor performance, blood-brain barrier, and blood-testis barrier in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, v.62,n.7, pp 523-541, **2001**.

ABOU-DONIA, M.B.; GOLDSTEIN, L.B.; JONES, K.H.; ABDEL-RAHMAN, A.A.; DAMODARAN, T.V.; DECHKOVSKAIA, A.M.; BULLMAN, S.L.; AMIR, B.E.; KHAN, W.A. Locomotor and sensorimotor performance deficit in rats following exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin, alone and in combination. *Toxicological Sciences*, v.60, pp 305-314, **2001b**.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, **2007**.

ADEWUYI, A.& ODERINDE, R.A. Fatty acid composition and lipid profile of *Diospyros mespiliformis*, *Albizia lebeck*, and *Caesalpinia pulcherrima* seed oils from Nigeria. *International Journal of Food Science*, ID 283616, pp 1-6, **2014**.

AZEVEDO, A.M.A.; JUNIOR, S.P.A.; CARVALHO, G. M.; Mário,; ARAÚJO, F. T. & JUNIOR, C.A.E.F Chemical Composition of Flowers Essential Oils of Four Varieties from *Caesalpinia pulcherrima* (L) W, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21:4, 987-993, **2018**. DOI: [10.1080/0972060X.2018.152612](https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.152612)

AKTER, K.; BARNES, E.C.; LOA-KUM-CHEUNG, W.L.; YIN, P.; KICHU, M.; BROPHY, J.J.; BARROW, R.A.; IMCHEN, I.; VEMUPALD, S.R.; JAMIE, J.F. Atividade antimicrobiana e antioxidante e caracterização química de *Erythrina stricta* Roxb. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.185, pp 171-181, **2016**. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.011>

ALMEIDA, L.F.R.; DELACHIAVE, M.E.A.; MARQUES, M.O.M. Composição do óleo essencial de rubim (*Leonurus sibiricus* L. - Lamiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.8, n.1, pp 35-8, **2005**.

ANVISA. *Farmacopéia Brasileira*. Volume 2. 6ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, **2019**.

ARYA, A., C. R., RAO, R., RAHMAN, M., KAUSHIK, D., AKHTAR, M. F., SALEEM, A., KHALIFA, S., EL-SEED, H., ALBADRANI, G., ABDEL D. M., MITTAL, V. Acetylcholinesterase Inhibitory Potential of Various Sesquiterpene Analogues for Alzheimer's Disease Therapy. *Biomolecules*. 11. 10.3390/biom11030350, (2021).

ASKARY, M.; TALEBI, S.M.; AMINI, F.; BANGAN, A.D.B. Effect of NaCl and iron oxide nanoparticles on *Mentha piperita* essential oil composition. *Environmental and Experimental Biology*, v.14, pp 27-32, 2016.

ATSDR. *Toxicological profile for DEET (N,N-diethyl-meta-toluamide)*. U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2017. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp185.pdf>. Acesso em 20 de abril de 2022.

BACHOVCHIN, D. A.; CRAVATT, B. F. The pharmacological landscape and therapeutic potential of serine hydrolases. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 11, n. 1, p. 52–68, 2012.

BALADANIDOU, V.; GRIGORALI, L.; VONTAS, J. Insectcuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, v.27, pp 68-74, 2018.

BALDIN, E.L.L.; AGUIAR, G.P.; FANELA, T.L.M.; SOARES, M.C.E.; GROppo, M.; CROTTI, A.E.M. Bioactivity of *Pelargonium graveolens* essential oil and related monoterpenoids against sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. *Journal of Pest Science*, v.88, n.1, pp 191–199, 2014.

BARREIRO, E.J. & FRAGA, C.A.M. *Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. 3ª edição. Porto Alegre: Editora ArtMed, 2015. 590p.

BASSOLÉ, I.H.N. and JULIANI, H.R., 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, vol. 17, no. 4, pp. 3989-4006. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules17043989> PMID:22469594.

BATISTA, L.C.S.O.; CID, Y.P.; ALMEIDA, A.P.; PRUDÊNCIO, E.R.; RIGER, C.J.; SOUZA, M.A.A.; COUMENDOUROS, K.; CHAVES, D.S.A. *In vitro* efficacy of essential oils and extracts of *Schinus mole* L. Against *Ctenocephalides felis felis*. *Parasitology*, v.143, n.5, pp 627–638, 2016.

BAYER 2021: Pulga de gato. Bayer BayerCropScience, Portugal. Disponível em: <https://www.environmentalscience.bayer.pt/pest-management/o-que-controlar/cat-flea>. Acesso em 10 de novembro de 2021.

BENCHAA, S.; HAZZIT, M.; ABDELKRIM, H. Allelopathic effect of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its potential use of bioherbicide. *Chemistry & Biodiversity*, v.15, pp e1800202, 2018.

BENELLI, G. & PAVELA, R. Beyond mosquitoes—Essential oil toxicity and repellency against bloodsucking insects. *Industrial Crops and Products*, v.117, pp 382–392, **2018**.

BRENNER, G. M., CRAIG W. S. *Farmacologia*. 4 edição, Elsevier Health Sciences, **2012**.

BULLOW, N.& KÖNIG, W.A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry*, v. 55,n.2, pp 141-168, **2000**.

BURČUL, F.; BLAŽEVIĆ, I.; RADAN, M.; POLITEO, O. Terpenes, phenylpropanoids, sulfur and other essential oils constituents as inhibitors of cholinesterases. *Current Medicinal Chemistry*, v.27, n.26, pp 4297-4343, **2020**.

BURITI, F.C.A.; FREITAS, S.C.; EGITO, A.S.; SANTOS, K.M.O. Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat diary beverages. *LWT – Food Science and Technology*, v,59, pp 196-203, **2014**.

CDC. <https://www.cdc.gov/index.htm>, com os inseticidas organofosforados disponíveis em

<https://www.cdc.gov/nceh/clusters/fallon/organophosfaq.htm#:~:text=Organophosphates%20are%20a%20group%20of,that%20poison%20insects%20and%20mammals.&text=Organophosphate%20insecticides%20>. Acesso em 20 de abril de 2022.

CDC. <https://www.cdc.gov/lyme/removal/index.html>. Acesso em 20 de abril de 2022.

CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A.B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The Chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*, v.21, pp 501-506, **2007**.

CHANDRA, M.; PRAKASH, O.; KUMAR, R.; BACCHETTI, R.K.; BHUSHAN, B.; KUMAR, M.; PANT, A.K.  $\beta$ -Selinene-Rich Essential Oils from the Parts of *Callicarpa macrophylla* and Their Antioxidant and Pharmacological Activities. *Medicines*, v.4,n.2, pp 52, **2017**. <https://doi.org/10.3390/medicines4030052>

CHICHIOCO-HERNANDEZ, C.L. & LEONIDO, F.M.G. Weight-lowering effects of *Caesalpinia pulcherrima*, *Cassia fistula* and *Senna alata* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.5,n.3, pp 452-455, **2011**.

CHOUDHARY, M. I. "Produtos naturais bioativos como fonte potencial de novos farmacopróprios. Uma teoria da memória." *Química Pura e Aplicada* 73.3 pp, 555-560, **(2001)**.

CLARK, A.G.& SHAMAAN, N.A. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione-S-transferase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.22,n.3, pp 249-261, **1984**.

COLES, T.B.& DRYDEN, M.W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. *Parasites and Vectors*, v.7, n.1, pp 1–10, **2014**.

COLOVIC´, M.B, KRSTIC´ D.Z, LAZAREVIC´-PASTI T.D, BONDZIC´ A.M, VASIC´ V.M. Inibidores de acetilcolinesterase: farmacologia e toxicologia. *Curr Neuropharmacol*. 11(3):315-35, Maio: **2013**.

CONSTANI, N.R.R., SOETJPITO, H. e HARTINI, S. "Atividade Antibacteriana e Composição Química da Flor do Pavão Vermelho (*Caesalpinia pulcherrima* L.) Óleo Essencial da Folha", *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, vol. 22, nº 6, pp. 269-274, Nov. **2019**

CRUZ, E.N.S.; PEIXOTO, L.S.; COSTA, J.S.; MOURÃO, R.H.V.; NASCIMENTO, W.M.O.; MAIA, J.G.S.; SETZER, W.N.; SILVA, J.K.; FIGUEIREDO, P.L.B. Seasonal variability of a caryophyllene chemotype essential oil of *Eugenia patrisii* Vahl occurring in the Brazilian Amazon. *Molecules*, v.27, n.8, pp 2417, **2022**.

DEEPIKA, S.; SELVARAJ, C.I.; ROOPAN, S.M. Screening bioactivities of *Caesalpinia pulcherrima* L. swartz and cytotoxicity of extract synthesized silver nanoparticles on HCT116 cell line. *Materials Science & Engineering C*, v.106, pp 110279, **2020**.

DEET: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/DEET-d10>. Acesso em 01 de junho de **2022**.

DHAKED, P.S.; KSHIRSAGAR, S.N.; SAKARAR, D.M. Antimicrobial activity of ethanolic and aqueous extract of *Caesalpinia pulcherrima* flowers. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v.2,n.10, pp 2643-2646, **2011**.

DRUMMOND, M.R.; LANIA, B.G.; DINIZ, P.P.V.P.; GILIOLI, R.; DEMOLIN, D.M.R.; SCORPIO, D.G.; BREITSCHWERDT, E.B.; FERREIRA VELHO, P.E.N. Improvement of *Bartonella henselae* DNA detection in cat blood samples by combining molecular and culture methods. *Journal of Clinical Microbiology*, v.56,n.5, pp e01732-17, **2018**.

DRYDEN, M.W. Flea and tick control in the 21st century: challenges and opportunities. *Veterinary Dermatology*, v.20, n.5-6, pp 435–440, **2009**.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *MultiCiência*, v.7, pp 1-16, **2006**.

EL-KAREEM, M.S.M.A.; RABBIH, M.A.; ELANSARY, H.O.; AL-MANA, F.A. Mass spectral fragmentation of *Pelargonium graveolens* essential oil using GC-MS semi-empirical calculations and biological potential. *Processes*, v.8, n.128, pp 1-19, **2020**.

ELLSE, L.& WALL, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: A review. *Medical and Veterinary Entomology*, v.28, n.3, pp 233–243, **2014**.

ELLMAN, G.L.; COURTEY, K.D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v.7, n.2, pp 88–90, **1961**.

ERHARUYI, O.; ADHIKARI, A.; FALODUN, A.; JABEEN, A.; IMAD, R.; AMMAD, M.; CHOUDHARY, M. I.; GÖREN, N. Cytotoxic, anti-inflammatory, and leishmanicidal activities of diterpenes isolated from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*. *Planta Medica*, v.83, pp 104-110, **2017**.

ERHARUYI, O.; IMIEJE, V. O.; OSEGHLE, I. O.; UBHENIN, A. E.; FALODUN, A. & CHOUDHARY, M. I. Identification of Compounds and Insecticidal Activity of Barbadian Pride Root (*Caesalpinia Pulcherrima* check for this species in other resources L *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, Vol. 21, No. 2, pp. 281-287, **2017**.

ESCCAP. Control of Ectoparasites in Dogs and Cats. 4 ed., **2015**.

FACHINI-QUEIROZ, F.C.; KUMMER, R.; ESTEVÃO-SILVA, C.F.; CARVALHO, M.D.B.; CUNHA, J.M.; GRESPAN, R.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2012, pp 657026, **2012**.

FALCO, E.; MANCINI, E.; ROSCIGNO, G.; MIGNOLA, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; SENATORE, F. Chemical composition and biological activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *Vulgare* L. under different growth conditions. *Molecules*, v.18, pp 14948-14960, **2013**.

FORIM, M.R., MATOS, A.P., da SILVA, M.F.G.F., CASS, Q.B., VIEIRA, P.C., & FERNANDES, J.B. (2010b). Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de nim: reprodutibilidade da ação inseticida. *Química Nova*, 33, 5, pp. 1082-1087 **2012**.

FRADIN, M.S. & DAY, J.F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *The New England Journal of Medicine*, v.347,n.1, pp 13-18, **2002**.

GALOVIČOVÁ, L.; BOROTOVÁ, P.; VALKOVÁ, V.; VUKOVIC, N.L.; VUKIC, M.; ŠTEFÁNIKOVÁ, J.; ĎURANOVÁ, H.; KOWALCZEWSKI, P.L.; ČMIKOVÁ, N.; KAČANIOVÁ, M. *Thymus vulgaris* essential oil and its biological activity. *Plants*, v.10, n.9, 1959, **2021**.

GAO, S.; LIU, G.; LI, J.; CHEN, J.; LI, L.; LI, Z.; ZHANG, X.; ZHANG, S.; THOME, R.F.; ZHANG, S. Antimicrobial activity of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and its active component citral against dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10:603858, **2020**. doi: 10.3389/fcimb.2020.603858.

GOVIL, J.N. & TIWARI, L. *Recent progress in medicinal plants: phytoconstituents and biochemical processes*. Vol.35. Houston: Studium Press LLC LTD., **2013**.

GOVINDARAJAN, M. et al. Ovicidal and repellent activities of botanical extracts against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1: 43-48, **2011**.

GOVINDARAJAN, M. RAJAMOCHAN, S., RAJESWARY, M., & YOGALAKSHMI, K. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Experimental parasitology*. 134. 10.1016/j.exppara. **2013**.

GUPTA, R.C.; DOSS, R.B.; SRIVASTAVA, A.; LALL, R.; SINHA, A. Nutraceuticals for control of ticks, fleas and other ectoparasites. *Springer Nature Switzerland*, pp 625-632, **2019**.

HALOS, L.; BEUGNET, F.; CARDOSO, L.; FARKAS, R.; FRANC, M.; GUILLOT, J.; PFSISTER, K.; WALL, R. Flea control failure? Myths and realities. *Trends in Parasitology*, v.30, n.5, pp 228–233, **2014**.

HASSIOTIS, C.N.; NTANA, F.; LAZARI, D.M.; POULIOS, S.; VLACHONASIOS, K.E. Environmental and developmental factors affect essential oil production and quality of *Lavandula angustifolia* during flowering period. *Industrial Crops and Products*, v.62, pp 359-366, **2014**.

HAWKINS, N.J.; BASS, C.; DIXON, A.; NEVE, P. The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews*, v.94, pp 135-155, **2019**.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, v.3, n.12, **2012**, doi: 10.3389/fmicb.2012.00012

IGE, P.P.; AGRAWAL, K.; PATIL, U. Enhanced *in vitro* dissolution of iloperidone using *Caesalpinia pulcherrima* mucoadhesive microspheres. *ScienceDirect*, v.4, pp 26-32, **2015**.

KABERA, J.; GASOGO, A.; UWAMARIYA, A.; UGIRINSHUTI, V.; NYETERA, P. Insecticidal effects of essential oils of *Pelargonium graveolens* and *Cymbopogon citratus* on *Sitophilus zeamais* (Motsch.). *African Journal of Food Sciences*, v.5,n.6, pp 366–375, **2011**.

KHALIL, M.N.A.; FARGHAL, H.H.; FARAG, M.A. Outgoing and potential trends of composition, health benefits, juice production and waste management of the multi-faceted Grapefruit *Citrus X paradisi*: A comprehensive review for maximizing its value. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,v.62, n.4, pp 935-956,**2020**.

KLASSEN, C.D.& WATKINS III, J.B. *Fundamentosemtoxicologia de Casarett e Doull*. 2ª edição. Porto Alegre:AMGHEditora Ltda., **2012**, 460ps.

KRAKER, J.W.; FRANSSEN, M.C.R.; GROOT, A.; KÖNIG, W.A.; BOUWMEESTER, H.J. (+)-Germacrene a biosynthesis: the committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. *Plant Physiology*, v.117, n.4, pp

1381-1392, **1998**.

KUMAR, D.; SINGH, J.; BAGHOTIA, A.; KUMAR, S. Anticonvulsant effect of the ethanol extract of *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw., Fabaceae, leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20,n.5, pp 751-755, **2010**.

KUMBHARE, M.R.; SIVAKUMAR, T.; UDAVANT, P.B.; DHAKE, A.S.; SURANA, A.R. *In vitro* antioxidant activity, phytochemical screening, cytotoxicity and total phenolic content in extracts of *Caesalpinia pulcherrima* (Caesalpinaceae) pods. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.15,n.7, pp 325-332, **2012**.

LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 6, p. 435-48, **2004**

LAMBERT, M.M.; CAMPOS, D.R.; BORGES, D.A.; AVELAR, B.R.; FERREIRA, T.P.; CID, Y.P.; BOYLAN, F.; SCOTT, F.B.; CHAVES, D.S.A.; COMENDOUROS, K. Activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and its main constituent eugenol in the inhibition of the development of *Ctenocephalides felis felis* and the control of adults. *Veterinary Parasitology*, v.282, pp 109126, **2020**.

LARINI, L. *Toxicologia dos Praguicidas*. São Paulo: Editora Manole Ltda., **1999**. 230ps.

LARINI, L. *Toxicologia*. 3ª edição. São Paulo: Editora Manole Ltda., **1997**. 301p.

LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A.; ROCHE, V.F.; ZITO, S.W. *FOYE's Principles of medicinal chemistry*. 6ª edição. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, **2008**. 1377ps.

LIMA, E.A.S.; CONCEIÇÃO, C.L.; GIJSEN, I.S.; CHAVES, J.K.O.; CAMPOS, D.R.; FERREIRA, T.P.; ALVES, M.C.C.; COMENDOUROS, K. Avaliação do potencial inseticida do óleo essencial de *Citrus paradisi* no controle dos estágios imaturos e adultos de *Ctenocephalides felis*. *Archives of Veterinary Science*, v.25, n.5, pp107, ISSN 2317-6822, **2020**. doi:<http://dx.doi.org/10.5380/avs.v15i5.77064>. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/77064>. Acesso em: 16 maio 2022.

LINARDI, P.M. & SANTOS, J.L.C. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identifying these species. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.21,n.4, pp 345-354, **2012**.

LINARDI, P.M. & GUIMARÃES, L.R. *Sifonápteros do Brasil*. São Paulo: Editora Museu de Zoologia USP/FAPESP, **2000**. 291p.

LIMONGI, J.E.; SILVA, J.J.; PAULA, M.B.C; MENDES, J. Aspectos epidemiológicos das infestações por sifonápteros na área urbana do município de Uberlândia, Minas Gerais, 2007-2010. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v.22,n.2, pp 285-294, **2013**.

LUÍS, A.; DUARTE, A.; GOMINHO, J.; DOMINGUES, F.; DUARTE, A.P. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils.

*Industrial Crops and Products*, v.79, pp 274-282, **2016**.

MAGURANYI, S.K.; WEBB, C.E.; MANSFIELD, S.; RUSSELL, R.C. Are commercially available essential oils from Australian native plants repellent to mosquitoes? *Journal of the American Mosquito Control Association*, v.25, n.3, pp 292-300, **2009**.

MAIA, M.F.& MOORE, S.J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, v.10, n.511, pp 1-14, **2011**.

MANIKKAM, M.; TRACEY, R.; GUERRERO-BOSAGNA, C.; SKINNER, M.K. Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reproductive Toxicology*, v.34, n.4, pp 708-719, **2012**.

MARCUS, E.M. & JACOBSON, S. *Integrated neuroscience: a clinical problem solving approach*. New York: Springer Science Business Media, **2003**.

MONTANARI, R.M.; BARBOSA, L.C. A.; DEMUNER, A.J.; SILVA, C.J.; CARVALHO, L.S.; ANDRADE, N.J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from verbenaceae species: alternative sources of (*E*)-caryophyllene and germacrene-D *Quimica Nova* 34(9): pp 1550-1555, **2011**.

MUNDO ECOLOGIA: Pulga de gato. Disponível em: <https://www.mundoecologia.com.br/animais/pulga-do-gato-caracteristicas-nome-cientifico-e-fotos/>. Acesso em 09 de novembro de 2021.

NAJIBULLAH, S.N.M.; AHAMAD, J.; ALDAHISH, A.A.; SULTANA, S.; SULTANA, S. Chemical characterization and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of essential oil of *Lavandula angustifolia* flowers. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, v.24, n.3, pp 431-438, **2021**.

NAQQASH, M.N.; GÖKÇE, A.; BAKHSH, A.; SALIM, M. Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *ParasitologyResearch*, v.115, pp 1363-1373, **2016**.

NASCIMENTO, K.F.; MOREIRA, F.M.F.; SANTOS, J.A.; KASSUYA, C.A.L.; CRODA, J.H.R.; CARDOSO, C.A.L.; VIEIRA, M.C.; RUIZ, A.L.T.G.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; FORMAGIO, A.S.N. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. *Journal of Ethnopharmacology*, v.210, pp 351–358, **2018**.

NJOKU, I., OLAYNKA, A. & FAMILONI, O. The Effect of Drying Methods on the Chemical Composition of the Essential Oil of *Caesalpinia Pulcherrima* Growing in Lagos, Nigeria. v.4, pp 1-3 (**2016**).

OCHOA, R.; RODRIGUEZ, C. A.; ZULUAGA, A. F. Perspectives for the structure based design of acetylcholinesterase reactivators. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 68, p. 176–183, **2016**.

OKUNOWO, W.O.; OYEDEJI, O.; AFOLABI, L.O.; MATANMI, E. Essential oil of grape fruit (*Citrus paradisi*) peels and its antimicrobial activities. *American Journal of Plant Sciences*, v.4, pp 1-9, **2013**.

OLIVEIRA, A.C.; MACHADO, J.A.C; ANTÔNIO, N.S.; NEVES, M.F. *Ctenocephalides Canis Canis* e *Ctenocephalides Felis*: Revisão de Literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.06, n.11, pp I–V, **2008**.

OPYDIKE, D. L. J.; *Food and Cosmetics Toxicol.* **1973**,11,1059

ORAPUN Y., CHATCHANOK K., CHANITA P., SUPINYA T., SUCHADA C. *Pulcherrins D-R, potenciais diterpenóides anti-inflamatórios das raízes de Caesalpinia pulcherrima*. *Tetraedro* 2011, 67 (36), 6838-6846. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.06.087>

PAWAR C.R, MUTHA R.E, LANDGE A.D, JADHAY R.B, and SURANA S.J. Antioxidant and cytotoxic activities of *Caesalpinia pulcherrima* wood. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics.*; v 46: pp, 198-200, **2009**.

PETRAKIS, P.V.; ROUSSIS, V.; PAPADIMITRIOU, D.; VAGIAS, C.; TSITSIMPIKOU, C. The effect of terpenoid extracts from 15 pine species on the feeding behavioural sequence of the late instars of the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa*. *Behavioural Processes*, v.69, n.3, pp 303-322, **2005**.

PRIETO, J.A.; PATINO, O.J.; DELGADO, W.A.; MORENO, J.P.; CUCA, L.E. Chemical Composition, Insecticidal, and Antifungal Activities of Fruit Essential Oils of Three Colombian *Zanthoxylum* Species. *Chilean Journal of Agricultural Research*, v.71, n.1, pp 73-82, **2011**.

QUAN M, LIU Q. Z, LIU Z. L. Identification of Insecticidal Constituents of the Essential Oil of Aerial Parts *Stachys riederi* var. *japonica*. *molecules*. May 17,;23(5):1200, **2018**. doi: 10.3390/molecules23051200. PMID: 29772795; PMCID: PMC6099633.

PULIPATI, S.; PALLAVI, G.; SUJAN, B.; BABU, K.A.; BABU, P.S. Evaluation of antibacterial activity of fresh and dry flower extracts of *Caesalpinia pulcherrima* L. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, v.3,n.3, pp 360-365, **2012**.

RADULOVIĆ, N.; LAZAREVIĆ, J.; RISTIĆ, N.; PALIĆ, R. Chemotaxonomic significance of the volatiles in the genus *Stachys* (Lamiaceae): essential oil composition of four Balkan *Stachys* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.35, n.4, pp 196-208, **2007**.

RHEE, I.K.; MEENT, M.V.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, v.915, n.1–2, pp 217–223, **2001**.

RUST, M. Advances in the control of (cat flea) on cats and dogs. *Trends in Parasitology*, v.21, n.5, pp 232–236, **2005**.

SAID-AL AHL, H.A.H.; HIKAL, W.M.; TKACHENKO, K.G. Essential Oils with Potential as Insecticidal Agents: A Review. *International Journal of Environmental Planning and Management*, v.3, n.4, pp 23–33, **2017**.

SATIAL, P.; SHRESTHA, S.; SETZER, W.N. Composition and Bioactivities of an (*E*)- $\beta$ -Farnesene Chemotype of Chamomile (*Matricaria chamomilla*) Essential Oil from Nepal. *Natural Product Communications*, v.10, n.8, pp 1453-1457, **2015**.

SELVI, R.S.; GOPALAKRICHANAN, S.; RAMAJAYAM, M.; SOMAN, R. Evaluation of mucilage of *Caesalpinia pulcherrima* as binder for tablets. *International Journal of ChemTech Research*, v.2, n.1, pp 436-442, **2010**.

SILVA, S. M. S. DA. Intoxicações por inibidores da acetilcolinesterase: etiologia, diagnóstico e tratamento. 47 f. Artigo de revisão (Mestrado integrado em Medicina) - Faculdade De Medicina Da Universidade De Coimbra, Coimbra, **2015**.

SILVA, L.E.; GONÇALVES, M.V.S.; AMARAL, W.; QUADROS, D.A.; REIS, R.A.; AMARAL, L.D.P.; HUERGO, L.F.; GARCIA, B. Chemical composition and antibacterial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon flexuosus* essential oils. *Ciência e Natura*, v.40, e2, **2018**.

SILVA, F.D.B.; SALES, M.A.G.; SÁ, O.R.M.; DEUS, M.S.M.; SOUZA, J.M.C.; PERON, A.P.; FERREIRA, P.M.P. Potencial citotóxico, genotóxico e citoprotetor de extratos aquosos de *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Caesalpinia ferrea* Mart. e *Caesalpinia pulcherrima* Sw. *Revista Brasileira de Biociências*, v.13, n.2, pp 101-109, **2015**.

SIMÕES, M. M, LEITE, M.F.M.S, MEDEIROS, M.A.C, *Atividade antineoplásica do germacreno-d: um teste in silico*. Anais I CONIMAS e III CONIDIS... Campina Grande: Realize Editora, **2019**. Disponível em: <<https://www.editorarealize.com.br/artigo/visualizar/63235>>. Acesso em: 25/05/2022 12:54

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Editora ArtMed, **2017**. 486ps.

SOUTAR, O.; COHEN, F.; WALL, R. Essential oils as tick repellents on clothing. *Experimental and Applied Acarology*, v.79, pp 209-219, **2019**.

SOUZA, G.A.; SILVA, S.J.; CISTIA, C.N.D.; PITASSE-SANTOS, P.; PIRES, L.O.; PASSOS, Y.M.; CORDEIRO, Y.; CARDOSO, C.M.; CASTRO, R.N.; SANT'ANNA, C.M.R.; KÜMMERLE, A.E. Discovery of novel dual-active 3-(4-(dimethylamino)phenyl)-7-aminoalkoxy-coumarin as potent and selective acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v.34, n.1, pp 631-637, **2019**.

SOUZA, R.A.; ALMEIDA, R.M.; SILVA, C.C.; MACÊDO, A.A.M. Propriedades elétricas dos filmes de polissacarídeos. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v.3, n.8, pp 1243-1249, **2017**.

STEFANI, G. P; PASTORINO, A. C; CASTRO, A. P. B. M.; FOMIN, A. B. F.; JACOB, C. M. A. Repelentes de insetos: recomendações para uso em crianças. *Rev Paul Pediatr*;27(1):81-9, 2009

SURYAWANSHI, S.R.; THAKARE, N.P.; MORE, D.P.; THOMBRE, N.A. Bioavailability enhancement of ondansetron after nasal administration of *Caesalpinia pulcherrima*-based microspheres. *Drug Delivery*, v.22, n.7, pp 894-902, **2015**.

SUTTON, G.P. & BURROWS, M. Biomechanics of jumping in the flea. *Journal of Experimental Biology*, v.214, n.5, pp 836–847, **2011**.

TAN, N., SANTANA, D., SEM, B., TAN, E., ALTAN, H.B., DEMIRCI, B.; UZUN, M. Antimycobacterial and antifungal activities of selected four *Salvia* species. *Records of Natural Products*, v.10, n.5, pp 593–603, **2016**.

TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 3, p. 253 – 268, 2001

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; SERRANO, C.; MATOS, O.; NENG, N.R.; NOGUEIRA, J.M.F.; SARAIVA, J.A.; NUNES, M.L. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.93, n.11, pp 2707-2714, **2013**.

TENÓRIO, T.M.A.; MORAES, M.M.; CAMARA, C.A.G. Composição química e atividade acaricida dos óleos essenciais de duas espécies da família Myrtaceae. *Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v.9, n.5, b-90, **2019**.

THE STATIONERY OFFICE. *British Pharmacopoeia*, 10<sup>a</sup> edition, vol.1-5. London: Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA), **2020**.

THOMBRE, N.A.& GIDE, P.S. Floating-bioadhesivegastroretentive*Caesalpinia pulcherrima*-based beads of amoxicillin trihydrate for *Helicobacter pylori* eradication. *Drug Delivery*, v.23, n.2, pp 405-419, **2016**.

TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V.; MEENT, M.V.; RHEE, I.K.; VEPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from plants to treat Alzheimer's disease. *Química Nova*, v.26, n.3, pp 301–304, **2003**.

TRIPATHI, A. K.; MISHRA, S. Plant monoterpenoids (prospective pesticides). In: **ECOFRIENDLY** pest management for food security. Amsterdam: Academic Press, 2, p. 507-524, **2016**.

TOLEDO, L.G.; RAMOS, M.A.S.; SPÓSITO, L.; CASTILHO, E.M.; PAVAN, F.R.; LOPES, E.O.; ZOCCOLO, G.J.; SILVA, F.A.N.; SOARES, T.H.; SANTOS, A.G.; BAUAB, T.M.; ALMEIDA, M.T.G. Essential oil of *Cymbopo gonnardus*(L.) rendle: a strategy to combat fungal infections caused by *Candida* species. *International Journal of Molecular Sciences*, v.17, n.8, pp 1252, **2016**. doi:10.3390/ijms17081252

TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; KOMALAMISRA, N.; APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research*, v.19, n.4, pp 303-309, **2005**.

USMAN, L.A., ZUBAIR, M.F., OLAWORE, N.O., ASHAMU, M., ISMAELL, R.O. and OLADOSU, I.A. (2012). Chemical constituents of leaf essential oils of two varieties of *Caesalpinia pulcherrima* Linn growing in north central Nigeria. *Elixir. Org. Chem.* 44: 7085-7087.

VANDERAH, T.W. *Nolte – fundamentos de neuroanatomia*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, **2019**.

VAZIRIAN, M.; MOHAMMADI, M.; FARZAEI, M.H.; AMIN, G.; AMANZADEH, Y. Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* subsp. *Vulgare* essential oil from Iran. *Research Journal of Pharmacognosy*, v.2, n.1, pp 41-46, **2015**.

VERÍSSIMO, C.J. *Resistência e controle do carrapato-do-boi*. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, **2015**. 135p.

YANG, X.; WEI, X.; YANG, J.; DU, T.; YIN, C.; FU, B.; HUANG, M.; LIANG, J.; GONG, P.; LIU, S.; XIE, W.; GUO, Z.; WANG, S.; WU, Q.; NAUEN, R.; ZHOU, X.; BASS, C.; ZHANG, Y. Epitranscriptomic regulation of insecticide resistance. *Science Advances*, v.7, pp eabe5903, **2021**

WEZEL, A. *et al.* Agroecological practices for sustainable agriculture. A review.

**Agronomy**

**for Sustainable Development**, v. 34, n. 1, p. 1-20, jan. 2014.

ZHANG, J-P.; QIN, Y-G.; DONG, Y-W.; SONG, D-L.; DUAN, H-X.; YANG, X-L. Synthesis and biological activities of (*E*)- $\beta$ -farnesene analogues containing 1,2,3-thiadiazole. *Chinese Chemical Letters*, v.28, n.2, pp 372-376, **2017**.

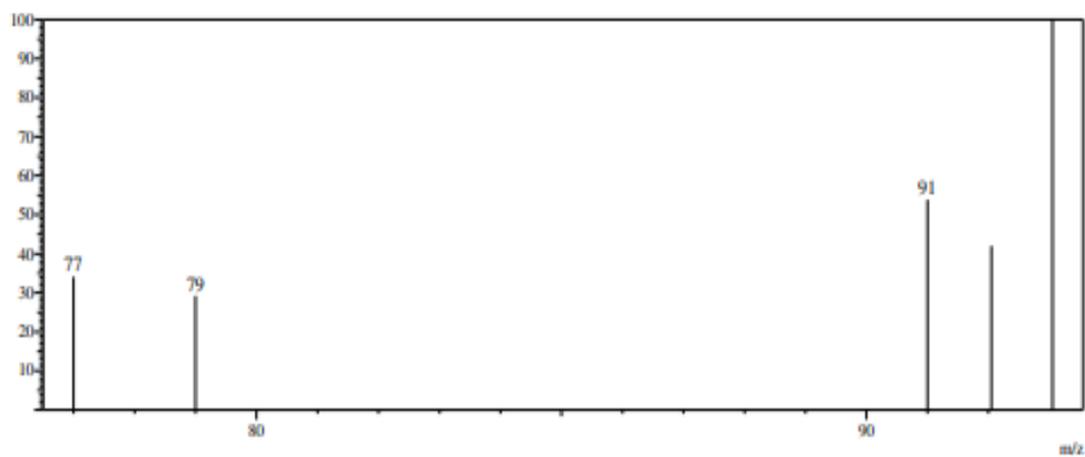
ZIELINSKI, E. *Indispensable essential oils starter guide*. Natural Living Family, **2021**. 150ps.

ZORZENON, F.J.& JUNIOR, J.J. *Manual ilustrado de pragas urbanas e outros animais sinantrópicos*. CIDADE?: Instituto Biológico, 151p, **2006**.

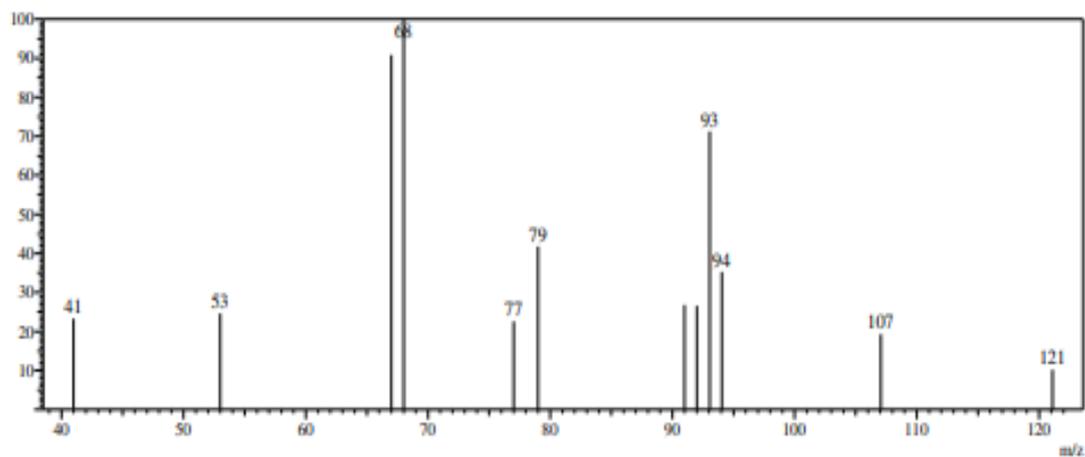
## 9. ANEXOS

Espectros da identificação dos compostos por cromatografia gasosa da espécie *Caesalpinia pulcherrima* (Figuras 26 ao 32).

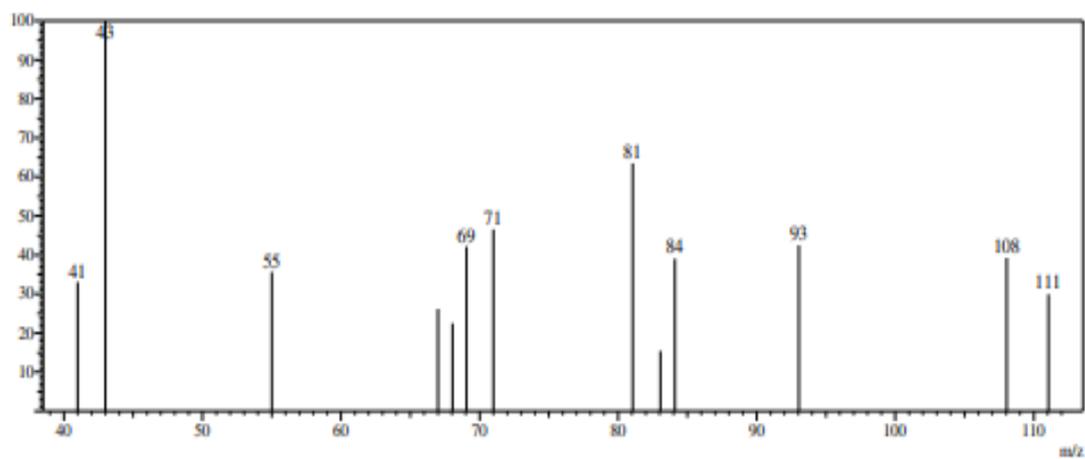
Line#1 R.Time:6.9(Scan#470)



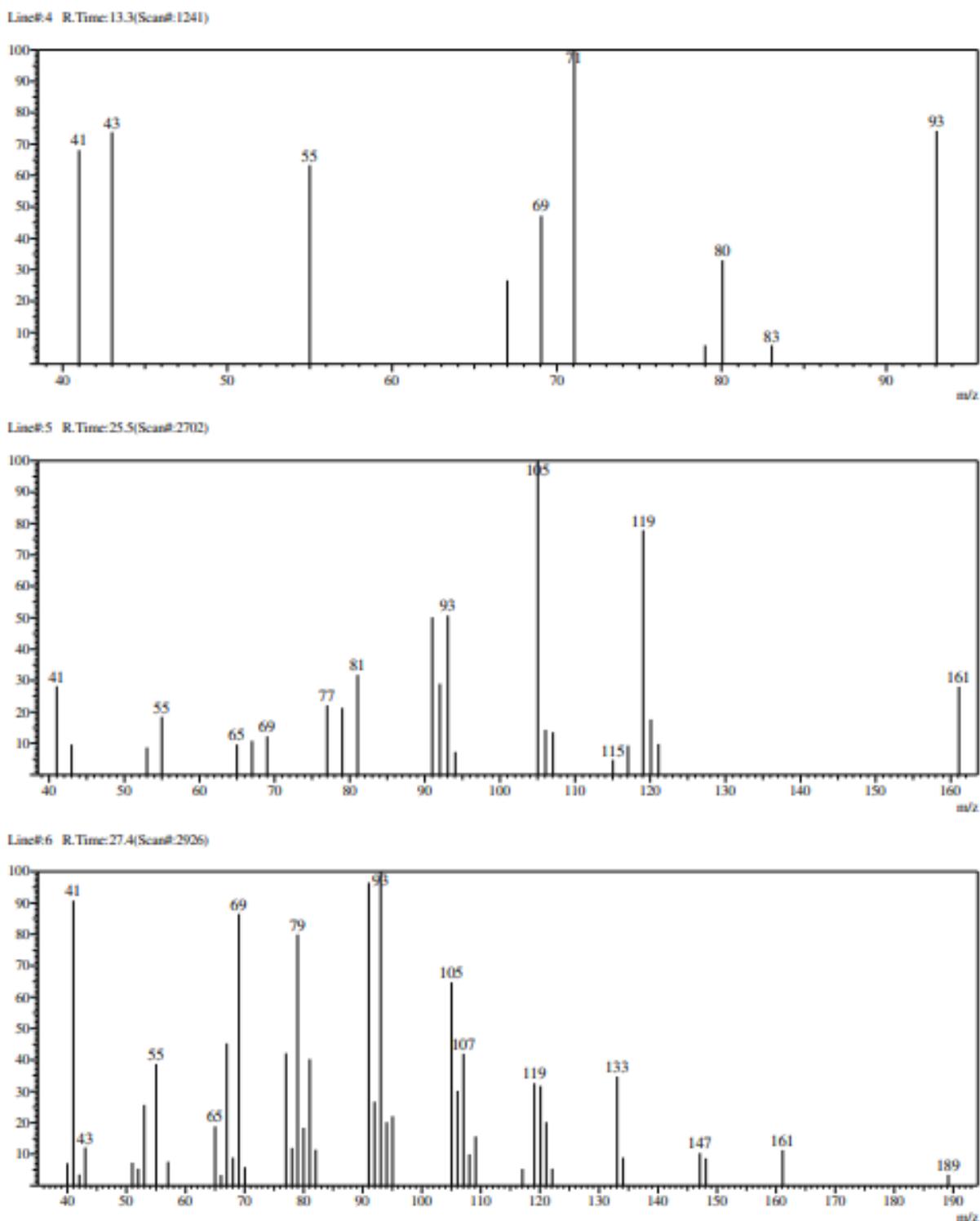
Line#2 R.Time:10.4(Scan#885)



Line#3 R.Time:10.5(Scan#902)

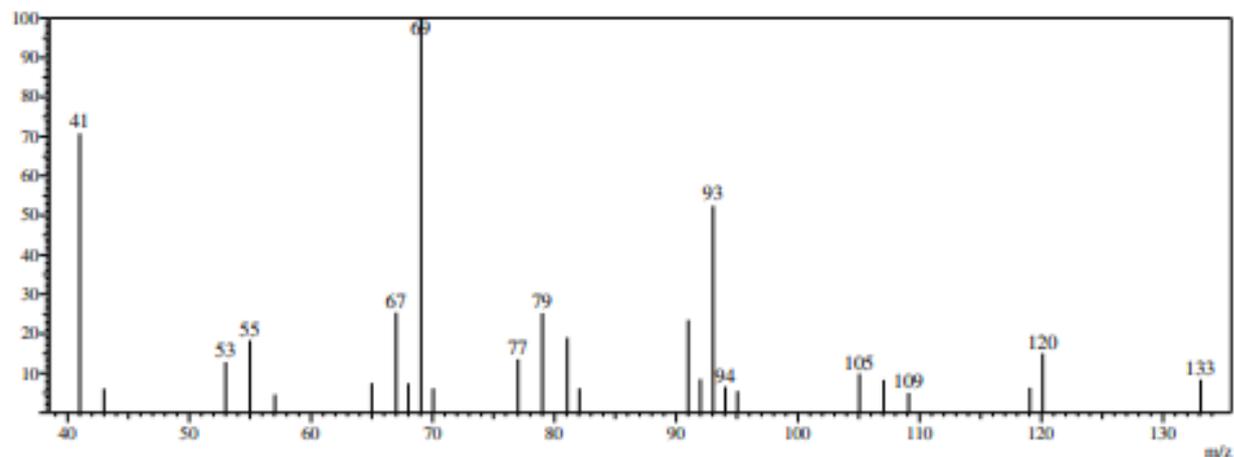


**Figura 16:** Espectro da espécie *C.pulcherrima* nas eluições 1 a 3.

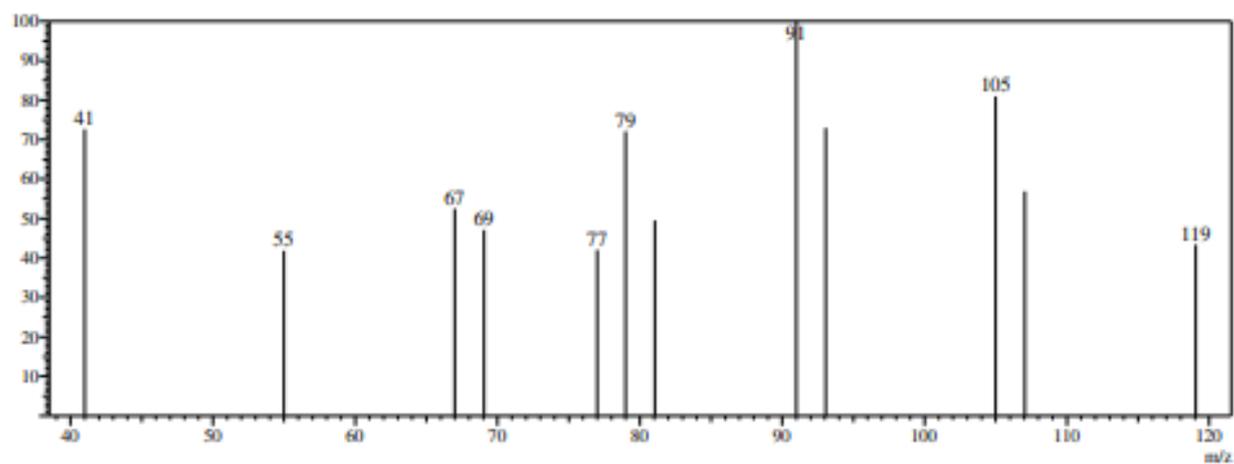


**Figura 27:** Espectro da espécie *C.pulcherrima* nas eluições 4 a 6.

Line#7 R.Time:28.7(Scan#:3088)



Line#8 R.Time:29.1(Scan#:3128)



Line#9 R.Time:29.7(Scan#:3203)

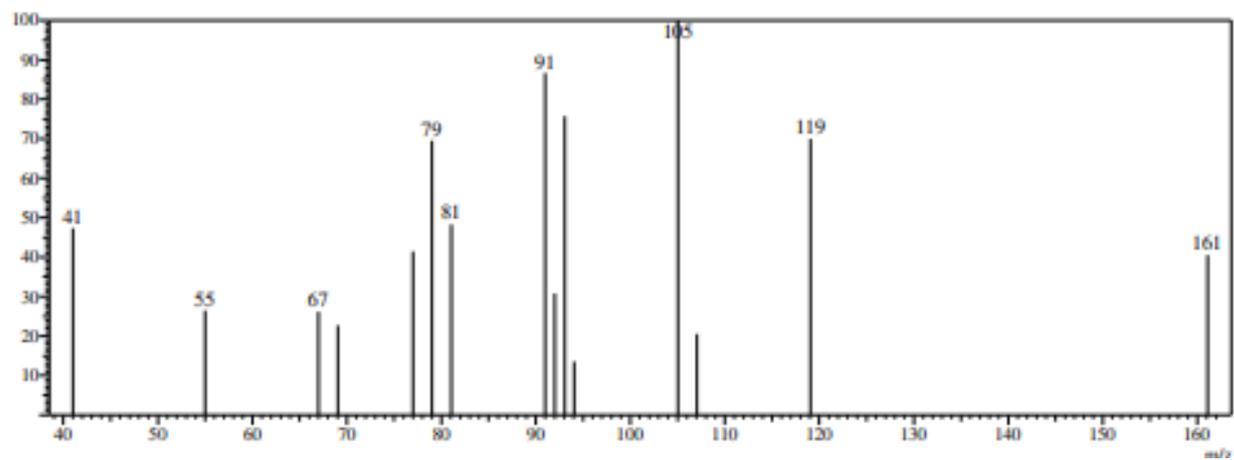
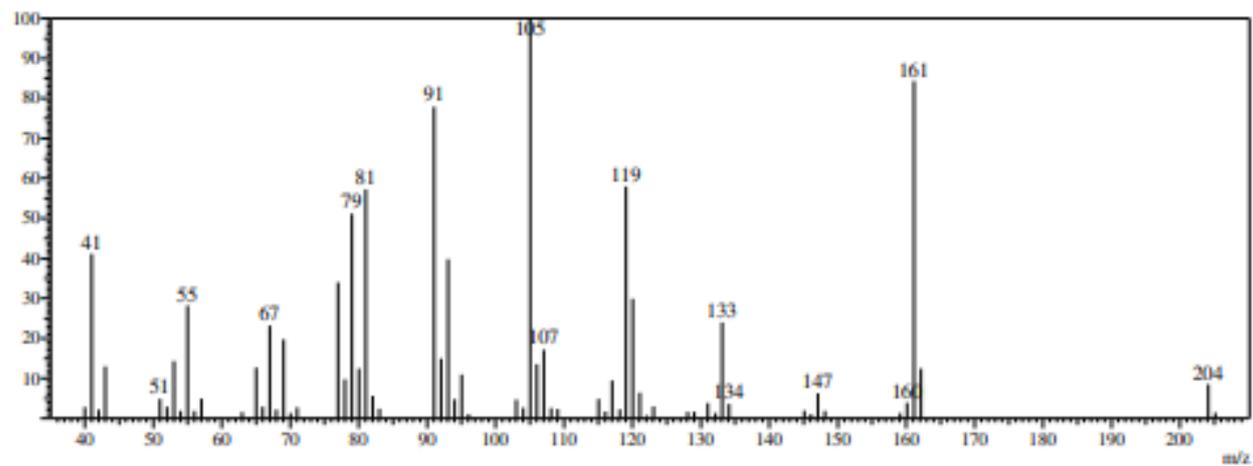
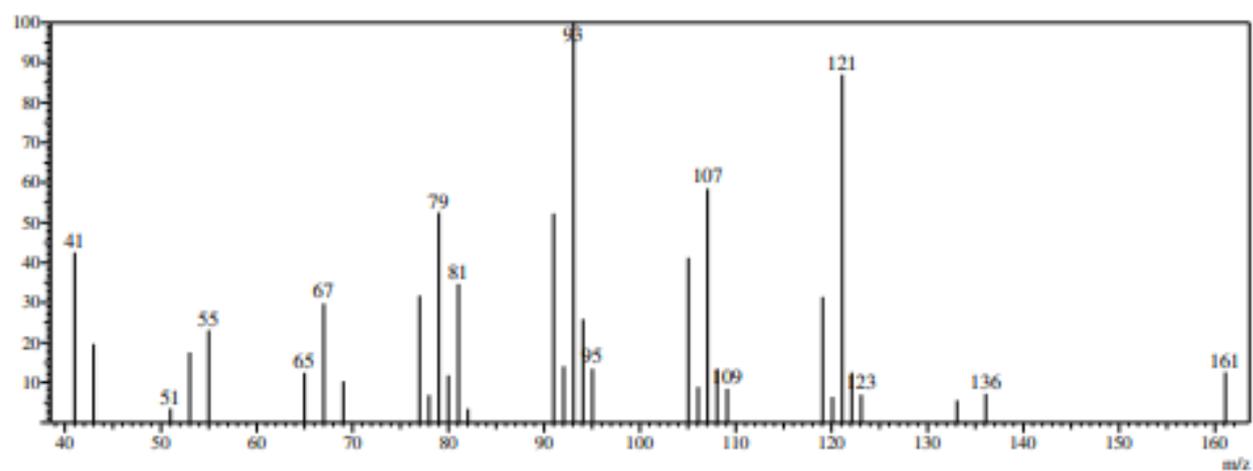


Figura 38: Espectro da espécie *C.pulcherrima* nas eluições 7 a 9.

Line#:10 R.Time:29.9(Scan#:3234)



Line#:11 R.Time:30.5(Scan#:3305)



Line#:12 R.Time:30.6(Scan#:3319)

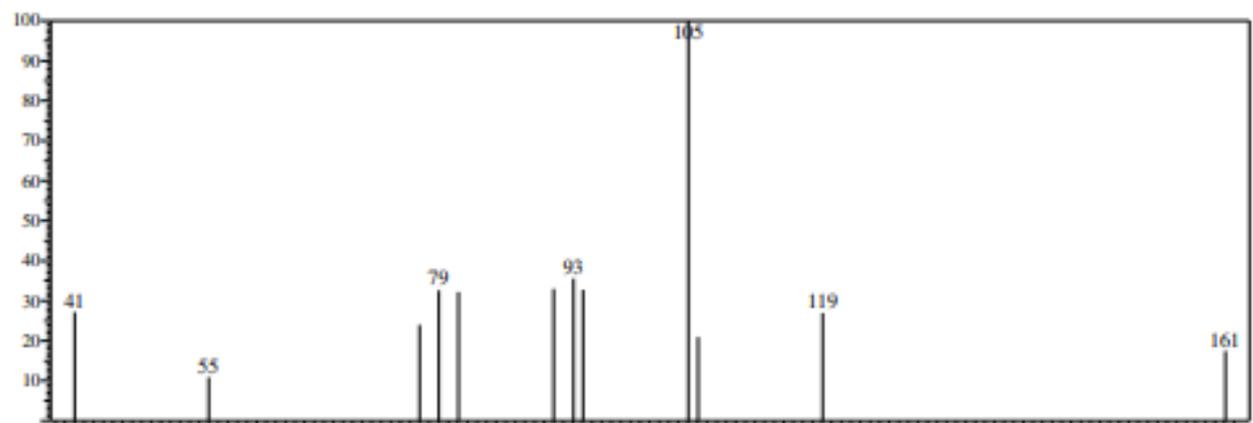
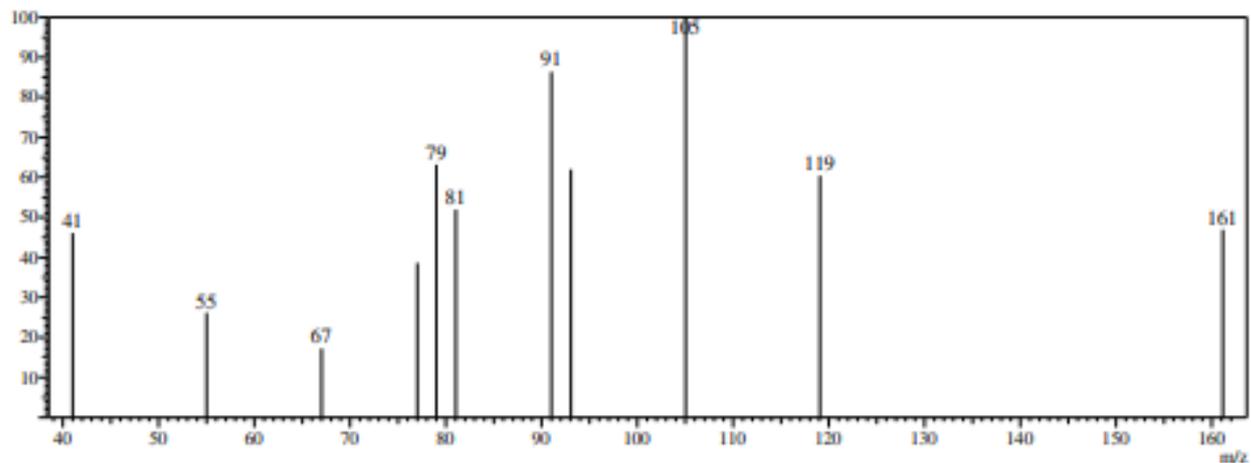
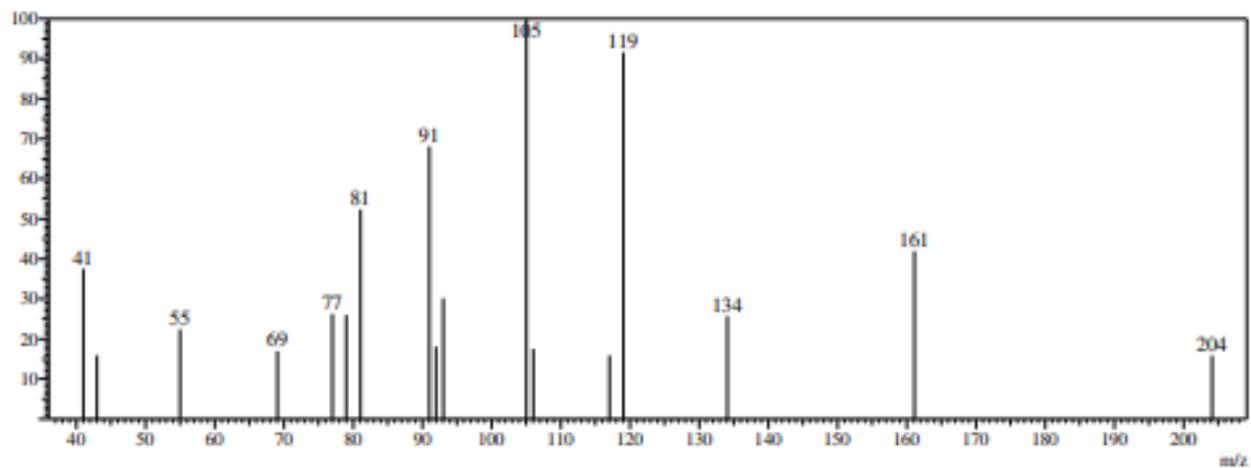


Figura 49: Espectro da espécie *C.pulcherrima* nas eluições 10 a 12.

Line#13 R.Time:31.2(Scan#:3389)



Line#14 R.Time:31.4(Scan#:3413)



Line#15 R.Time:33.8(Scan#:3697)

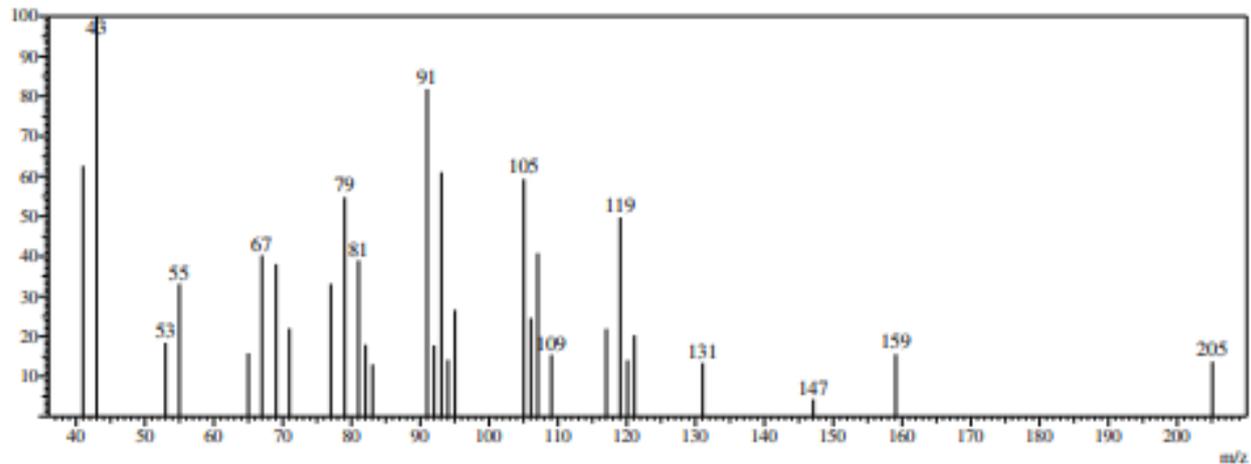
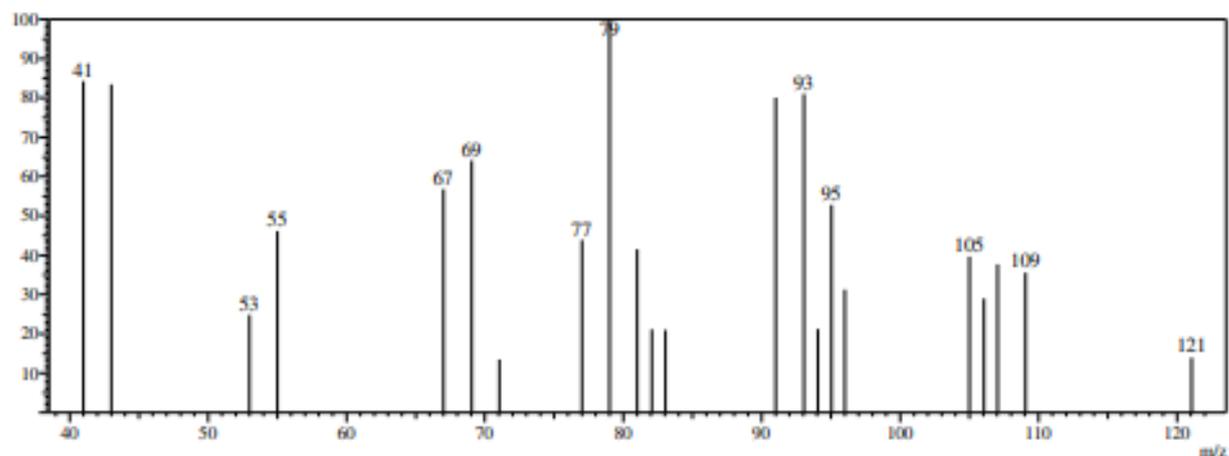
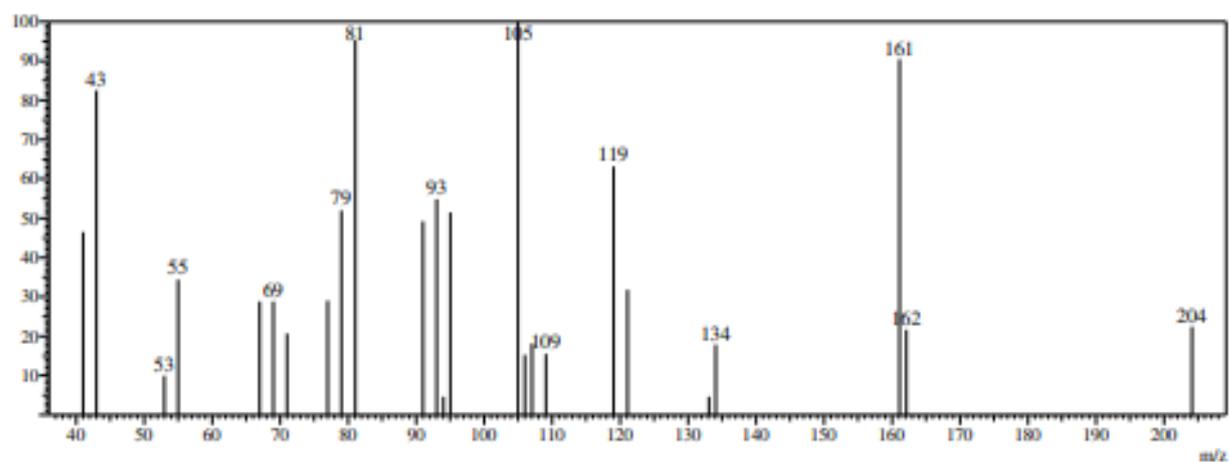


Figura 30: Espectro da espécie *C.pulcherrima* nas eluições 13 a 15.

Line#16 R.Time:34.0(Scan#:3719)



Line#17 R.Time:36.3(Scan#:3995)



Line#18 R.Time:36.5(Scan#:4020)

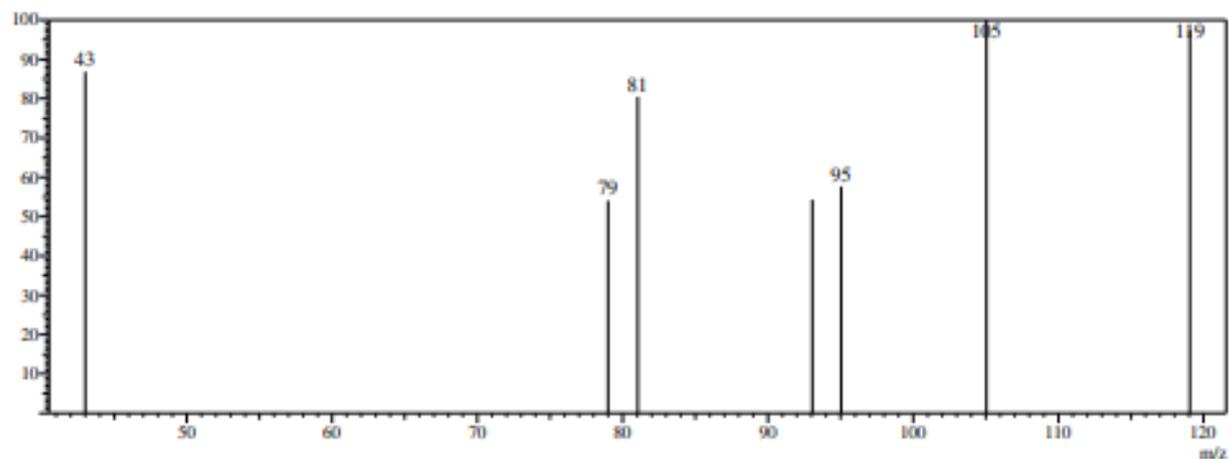
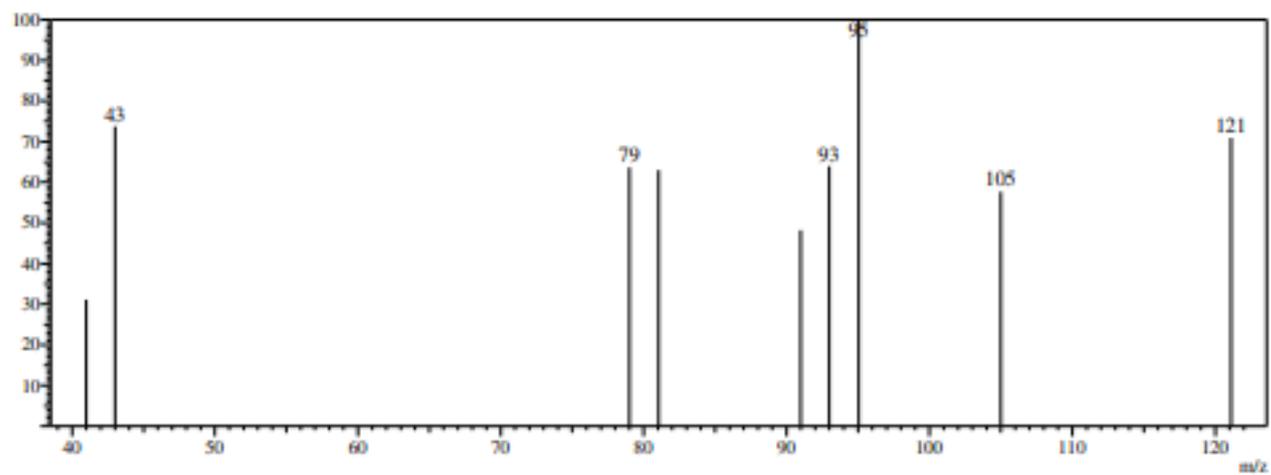


Figura 31: Espectro da espécie *C.pulcherrima* nas eluições 16 a 18.

Line#19 R.Time:36.8(Scan#:4057)



Line#20 R.Time:43.3(Scan#:4835)

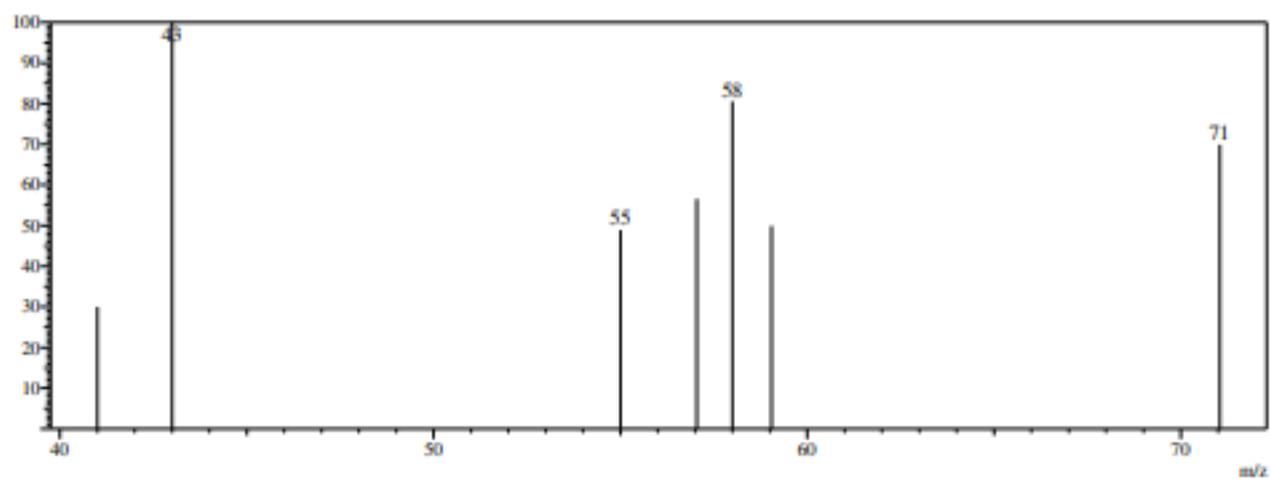


Figura 32: Espectro da espécie *C.pulcherrima* nas eluições 19 a 20.