

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**DISSERTAÇÃO**

**Atividade *in vitro* do Óleo Essencial de *Ocimum gratissimum* L.  
sobre *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) e *Rhipicephalus  
sanguineus* (Latreille, 1806)**

**Leandra Oliveira Moreira**

**2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum gratissimum* L. SOBRE *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835)  
E *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)**

**LEANDRA OLIVEIRA MOREIRA**

*Sob Orientação da Professora  
Yara Peluso Cid*

*e Co-orientação do Professor  
Douglas Siqueira de Almeida Chaves*

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**, no  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Março 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)

M835a Moreira, Leandra Oliveira, 1993-  
Atividade in vitro do Óleo Essencial de *Ocimum gratissimum* L. sobre *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) / Leandra Oliveira Moreira. - Seropédica, 2022. 63 f.

Orientadora: Yara Peluso Cid.  
Coorientador: Douglas Siqueira de Almeida Chaves.  
Dissertação(Mestrado) . -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/Mestrado., 2022.

1. *Ocimum gratissimum* L... . 2. Ectoparasitas. .  
3. Inseticida.. I. Cid, Yara Peluso, 1982-, orient.  
II. Chaves, Douglas Siqueira de Almeida, -, coorient.  
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias/Mestrado.. IV. Título.



ATA N° 994/2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.020116/2022-10

Seropédica RJ, 31 de março de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

LEANDRA OLIVEIRA MOREIA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 31/03/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da dissertação.

*(Assinado digitalmente em 31/03/2022 11:52)*

YARA PELUSO CID  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DCFur (12.28.01.00.00.47)  
Matrícula: ##004#7

*(Assinado digitalmente em 20/07/2022 19:06)*

DIEFREY RIBEIRO CAMPOS  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ####.###.737-#8

*(Assinado digitalmente em 31/03/2022 15:58)*

NEIDE MARA DE MENEZES EPIFANIO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ####.###.447-#8

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico aos meus amados pets Brutus, Cindy e Thor que tanto me ensinaram e  
infelizmente já não estão mais aqui.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me permitir concluir mais essa etapa na minha vida. Por me mostrar que nas tribulações sempre esteve ao meu lado, por nunca me abandonar e sempre se fazer presente em minha vida.

Aos meus pais Leila e Kilmer, aos meus avós Marlene e José Moreira e aos meus amados irmãos, Emily, Kadmylla e Pedro Isaac para quem dedico as minhas conquistas.

Agradeço imensamente aos meus amigos, pois em nenhum momento desistiram de me dar todo suporte possível, estiveram comigo em momentos que eu mesma só me afastava de tudo e todos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por todo acolhimento e oportunidades.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, aos animais do plantel, ao setor da Farmacometria, e ao Laboratório de Química de Bioativos Naturais que contribuíram grandemente na minha formação.

A minha orientadora e coorientador que me deram a oportunidade da realização da minha dissertação, meus mais sinceros agradecimentos.

À banca examinadora do trabalho, pela participação e contribuição ao projeto.

Enfim, agradeço a todos que dividiram, apoiaram e me incentivaram durante esse período muito difícil da minha vida. Meu sentimento de gratidão sempre será pouco diante do que me foi dado.

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

## RESUMO

MOREIRA, Leandra Oliveira. **Atividade *in vitro* do Óleo Essencial de *Ocimum gratissimum* L. sobre *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806).** 2022. 76p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Biotecnologia e Inovação Tecnológica em Medicina Veterinária) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

A pulga *Ctenocephalides felis felis* e o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* são os principais ectoparasitas que acometem cães e gatos, por serem espécies presentes por todo o mundo, e com capacidade vetorial de uma série de doenças tanto para os animais, quanto para ao homem. O controle de infecções por ectoparasitas de importância veterinária ainda depende muito do uso de substâncias químicas que atinjam o sistema nervoso dos artrópodes. Tais compostos sofreram de uma série de inconvenientes, tais como o desenvolvimento de resistência e preocupações com a segurança do animal, humana e ambiental. Por isso, a busca por produtos e tecnologias mais seguras e eficazes tem sido um desafio para a indústria, é nesse contexto, que os estudos e o desenvolvimento de produtos de origens naturais ganham relevância. Na área na medicina veterinária, temos estudos no controle de carapatos e pulgas com o óleo essencial de *Ocimum sp* que exibem uma gama de atividades biológicas como inseticida, acaricida e repelência de insetos. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. no controle de formas imaturas e adultos da pulga *C. felis felis* e do carrapato *R. sanguineus*. Dentre os objetivos específicos estão a obtenção e caracterização química do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* L., a avaliação da atividade *in vitro* em diferentes fases do ciclo da pulga *C. felis felis* (ovo, larva, pupa e adultos) e do carrapato *R. sanguineus* (larva, ninfa e adultos), e a determinação através da análise de probito da CL<sub>50</sub> e a CL<sub>90</sub> do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* L. em diferentes fases do ciclo da pulga *C. felis felis* e do carrapato *R. sanguineus*. Observamos que o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. apresentou 100% de mortalidade em todos os estágios analisados da pulga. Para o carrapato podemos observamos que na fase de larva atingimos 100% de mortalidade, enquanto que o máximo atingido de mortalidade para ninhas foi de 80,8%, e na fase adulta não atingimos mortalidade. A análise da composição química do óleo essencial de *O. gratissimum* mostrou que os principais compostos encontrados foram Eugenol (77,7%) e Pineno (5,26%). Determinamos através da análise de probito as CL<sub>50</sub> e a CL<sub>90</sub> a seguir: ovo (CL<sub>50</sub> = 10,54; CL<sub>90</sub> = 22,00), larva 24h (CL<sub>50</sub> = 21,06; CL<sub>90</sub> = 59,79), larva 48h (CL<sub>50</sub> = 13,20; CL<sub>90</sub> = 38,56), pupa (CL<sub>50</sub> = 18,69; CL<sub>90</sub> = 69,26), adulto 24h (CL<sub>50</sub> = 20,24; CL<sub>90</sub> = 55,90), adulto 48h (CL<sub>50</sub> = 15,72; CL<sub>90</sub> = 44,72) e ID (CL<sub>50</sub> = 2,00; CL<sub>90</sub> = 5,18). Foi possível obter, caracterizar, avaliar o potencial inseticida e acaricida e determinar através da análise de probito a CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. em todas as fases do ciclo da pulga *C. felis felis* (ovo, larva, pupa e adultos) e do carrapato *R. sanguineus* (larva, ninfa e adultos).

Palavras-chaves: *Ocimum gratissimum* L.. Ectoparasitas. Inseticida.

## ABSTRACT

MOREIRA, Leandra Oliveira. **In vitro activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil on *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) and *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806).** 2022. 76p Dissertation (Master in Veterinary Science, Biotechnology and Technological Innovation in Veterinary Medicine). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

The flea *Ctenocephalides felis felis* and the tick *Rhipicephalus sanguineus* are the main ectoparasites that affect dogs and cats, as they are species present all over the world, and with vector capacity of a series of diseases for both animals and humans. The control of infections by ectoparasites of veterinary importance still depends a lot on the use of chemical substances that reach the nervous system of arthropods. Such compounds have suffered from a number of drawbacks, such as the development of resistance and concerns for animal, human and environmental safety. Therefore, the search for safer and more effective products and technologies has been a challenge for the industry, it is in this context that the studies and development of products from natural origins gain relevance. In the area of veterinary medicine, we have studies in the control of ticks and fleas with the essential oil of *Ocimum sp* that exhibit a range of biological activities such as insecticide, acaricide and insect repellency. Therefore, this work aimed to evaluate the potential of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in the control of immature and adult forms of the flea *Ctenocephalides felis felis* and the tick *R. sanguineus*. Among the specific objectives are the obtaining and chemical characterization of the essential oil from the leaves of *Ocimum gratissimum* L., the evaluation of the in vitro activity in different phases of the cycle of the flea *C. felis felis* (egg, larva, pupa and adults) and the tick *R. sanguineus* (larva, nymph and adults), and the determination through probit analysis of the LC50 and LC90 of the essential oil of the leaves of *Ocimum gratissimum* L. in different phases of the cycle of the flea *Ctenocephalides felis felis* and the tick *R. sanguineus*. We observed that the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. presented 100% mortality in all analyzed flea stages. For the tick we can observe that in the larval stage we reached 100% mortality, while the maximum mortality reached for nymphs was 80.8%, and in the adult stage we did not reach mortality. The analysis of the chemical composition of the essential oil of *O. gratissimum* showed that the main compounds found were Eugenol (77.7%) and Pinene (5.26%). We determined by probit analysis the following LC50 and LC90: egg (LC50 = 10.54; LC90 = 22.00), larva 24h (LC50 = 21.06; LC90 = 59.79), larva 48h (LC50 = 13.20; LC90 = 38.56), pupa (LC50 = 18.69; LC90 = 69.26), adult 24h (LC50 = 20.24; LC90 = 55.90), adult 48h (LC50 = 15.72; LC90 = 44.72) and ID (CL50 = 2.00; CL90 = 5.18). It was possible to obtain, characterize, evaluate the insecticidal and acaricidal potential and determine through probit analysis the LC50 and LC90 of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in all phases of the flea cycle *C. felis felis* (egg, larva, pupa and adults) and the tick *R. sanguineus* (larva, nymph and adults).

Key words: *Ocimum gratissimum* L. Ectoparasites. Insecticide.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ciclo evolutivo da pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i> . (Adaptado de ESCCAP, 2022).....	6
<b>Figura 2</b>	Ciclo evolutivo do carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . (Adaptado de ESCCAP, 2022).....	9
<b>Figura 3</b>	População de animais Pets no Brasil (Fonte: ABINPET, 2021).....	12
<b>Figura 4</b>	Aparelho de Clevenger utilizado para extração por hidrodestilação (Fonte: Adaptado de BOONE, 2011).....	22
<b>Figura 5</b>	<i>Ocimum gratissimum</i> L. ....	25
<b>Figura 6</b>	Estruturas químicas de alguns constituintes principais do <i>O. gratissimum</i> .....	25
<b>Figura 7</b>	Processo de beneficiamento do <i>Ocimum gratissimum</i> L. para obtenção do óleo essencial (Arquivo pessoal).....	31
<b>Figura 8</b>	Processo de extração do óleo essencial do <i>Ocimum gratissimum</i> L. (Arquivo pessoal).....	32
<b>Figura 9</b>	Bioensaio com as pulgas adultas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> . (Arquivo pessoal).....	34
<b>Figura 10</b>	Bioensaio com ovos, larvas e pupas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> .(Arquivo pessoal).....	35
<b>Figura 11</b>	Bioensaio com larvas e ninfas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . (Arquivo Pessoal).....	36
<b>Figura 12</b>	Cromatograma do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> L.....	38
<b>Figura 13</b>	Espectro de massas e estrutura química do constituinte majoritário Eugenol, do óleo essencial de <i>Ocimumum gratissimum</i> L.....	39
<b>Figura 14</b>	Espectro de massas e estrutura química do constituinte Pineno, do óleo essencial de <i>Ociumum gratissimum</i> L.....	39

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

<b>Tabela 1</b>	Mortalidade (%) nas fases de larva, pupa e adulto da pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i> .....	40
<b>Tabela 2</b>	Mortalidade (%) na fase ovo e avaliação da inibição de crescimento da pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i> .....	41
<b>Tabela 3</b>	Mortalidade (%) nas fases de larva e ninfa e adulto do carrapato de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	42
<b>Tabela 4</b>	Análise de probit dos dados de mortalidade obtidos a partir dos bioensaios do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum L</i> .....	43

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS**

ABINPET	Associação Brasileira de Produtos para Animais de Estimação;
APPAA	American Pet Products Association;
BR	Brasil;
CG	Cromatografia Gasosa;
CL <sub>50</sub>	Concentração letal 50;
CL <sub>90</sub>	Concentração letal 90;
COMAC	Comissão de Animais de Companhia;
DAPE	Dermatite Alérgica a Picada de Ectoparasitas;
DPA	Departamento de Parasitologia Animal;
EMA	Agência Europeia de Medicamentos;
EMA	Agência Europeia de Medicamentos;
ESCCAP	European Scientific Counsel Companion Animal Parasites;
EUA	Estados Unidos da América;
FAO	Food and Agriculture Organization;
FDA	Food and Drug Administration;
FID	Detector de ionização por chama;
GABA	ácido gama-aminobutírico ;
ID	Inibição de desenvolvimento;
IGRs	Reguladores de crescimento de insetos;
LQBioN	Laboratório de Química de Bioativos Naturais;
LQEPV	Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Animal;
mg	Miligrama;

mL	Millilitro;
MS	Espectrometria de Massas;
Na <sup>+</sup>	Sódio;
OE	Óleo essencial;
OEOG	Óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> ;
SINDAN	Sindicato Nacional de Produtos de Saúde Animal;
SNC	Sistema Nervoso Central;
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Ectoparasitos que acometem os Pet.....	4
2.1.1 <i>Ctenocephalides felis felis</i> (Bouché, 1835).....	5
2.1.2 <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806).....	8
2.2 Populações de Pets no Brasil e no mundo.....	11
2.3 Ectoparasiticidas atualmente utilizados e seus inconvenientes .....	13
2.3.1 Formamidinas.....	14
2.3.2 Piretrinas e Piretróide.....	14
2.3.3 Fenilpirazóis.....	15
2.3.4 Lactonas macrocíclicas.....	16
2.3.5 Oxadiazinas.....	16
2.3.6 Spinosinas.....	17
2.3.7 Reguladores de Crescimento.....	17
2.3.8 Neonicotinóides.....	18
2.3.9 Isoxazolininas.....	19
2.4 O uso de plantas medicinais na medicina veterinária.....	20
2.4.1 Técnica de extração do óleo essencial: Hidrodestilação.....	20
2.5 O uso de óleos essenciais como ectoparasiticidas.....	22
2.6 Família Lamiaceae.....	24
2.6.1 <i>Ocimum gratissimum</i> .....	24
2.7 A importância da avaliação <i>in vitro</i> .....	27
2.7.1 Teste de pacote de larvas (LPT).....	28
2.7.2 Avaliação por contato para pulgas.....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 Localização do estudo .....	30
3.2 Obtenção do material vegetal.....	30
3.3 Obtenção óleo essencial das folhas de <i>Ocimum gratissimum</i> L. .....	30
3.4 Caracterização química do óleo essencial das folhas de <i>Ocimum gratissimum</i> L. .....	32
3.5 Origem dos ectoparasitas .....	33

3.6 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> contra formas imaturas (ovo, larva e pupa) e adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> .....	33
3.7 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> contra formas imaturas (larva e ninfa) e adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	35
3.8 Avaliação da eficácia e determinação da CL <sub>50</sub> e a CL <sub>90</sub> do óleo essencial das folhas de <i>Ocimum gratissimum L.</i> através da análise de probito .....	37
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
4.1 Obtenção, rendimento e caracterização química do óleo essencial das folhas de <i>Ocimum gratissimum L.</i> .....	38
4.2 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> contra formas imaturas (ovo, larva e pupa) e adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> .....	40
4.3 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> contra formas imaturas (larva e ninfa) e adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	42
4.4 Avaliação da eficácia e determinação da CL <sub>50</sub> e a CL <sub>90</sub> do óleo essencial das folhas de <i>Ocimum gratissimum L.</i> através da análise de probito .....	43
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Desde o princípio da civilização, o homem é o principal agente responsável pelas modificações ocorridas na natureza devido à evolução da sua espécie e da crescente busca por espaço e alimentos. Ainda no século XIV, os chineses começaram a desenvolver métodos de controle de pragas, incluindo o uso de ervas, óleos e cinzas, para tratar sementes e grãos armazenados. A nicotina é um exemplo de inseticida natural orgânico extraído das folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*), que começou a ser utilizada no século XVII para controlar insetos em jardins, cuja prática ainda é utilizada na atualidade.

O Brasil abriga em seu território uma diversidade de insetos e plantas devido às peculiaridades e pluralidade climáticas e geográficas. Além das espécies nativas, historicamente muitas espécies vegetais foram introduzidas por colonizadores e imigrantes, sendo responsáveis pela introdução de espécies exóticas de predadores fitófagos. Durante décadas a economia brasileira foi baseada no setor primário de produção e, ainda hoje, ocupa uma posição privilegiada no abastecimento mundial de cereais, frutas e outros produtos de origem vegetal sendo, portanto, o controle de pragas nativas ou exóticas um desafio que persiste e tem se agravado com o passar dos anos.

Atualmente, o Brasil possui a segunda maior população mundial de cães, gatos, aves canoras e ornamentais, e o quarto maior do mundo em população total de animais de estimação. A pulga *Ctenocephalides felis felis* e o carapato *Rhipicephalus sanguineus* são os principais ectoparasitas que acometem cães e gatos, por serem espécies presentes por todo o mundo, e com capacidade vetorial de uma série de doenças tanto para os animais, quanto para ao homem.

Os carapatos *R. sanguineus* são vetores conhecidos de patógenos, como *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii*, e sua interação com os humanos pode ser mais comum do que se reconhece, pois, o aumento de casos de parasitismo humano é crescente. O uso indiscriminado de acaricidas e inseticidas é um problema emergente em todo o mundo e levou à seleção de cepas resistentes, agravando desse modo o combate a essas zoonoses.

A pulga *C. felis felis* também é um importante vetor de doenças, e acomete injúrias aos animais como a dermatite alérgica e anemia por deficiência de ferro no caso de infestações intensas em animais jovens. Mais de vinte tipos diferentes de

endossimbiontes ou patógenos foram encontrados associados a espécies de *Ctenocephalides* como vetores biológicos ou hospedeiros intermediários, incluindo bactérias, protozoários e helmintos, representando assim um potencial risco à saúde do homem. A pulga do gato também aloja outros organismos monoxênicos como microsporídeos e tripanossomatídeos.

O uso e a comercialização de ectoparasiticidas para o controle de parasitas artrópodes de animais domésticos constituem um setor importante do mercado global de saúde animal, e devido aos problemas de saúde pública por causar das doenças zoonóticas. O controle de infecções por ectoparasitas de importância veterinária ainda depende muito do uso de substâncias químicas que atinjam o sistema nervoso dos artrópodes. Tais compostos sofreram de uma série de inconvenientes, tais como o desenvolvimento de resistência e preocupações com a segurança do animal, humana e ambiental. Por isso, a busca por produtos e tecnologias mais seguras e eficazes tem sido um desafio para a indústria, é nesse contexto, que os estudos e o desenvolvimento de produtos de origens naturais ganham relevância.

O *Ocimum gratissimum* é da família Lamiaceae, originário da Ásia e comumente encontrado em regiões de temperaturas tropicais e quentes, Oriente e países tropicais. É subespontânea em todo o Brasil, sendo principalmente encontrado na região Nordeste, e conhecida popularmente como alfavaca, alfavacão, alfavaca-cravo, favacão e quioio-cravo.

O óleo esencial de *Ocimum gratissimum* L. já foi relatado como fonte de eugenol. A mortalidade e repelência de eugenol por inseticidas tem sido descrita contra *Sitophilus zeamais*, *Dinoderus bifoveatus*, *Ixodes ricinus*, *C. Maculatus*, e é listado pelo FDA (Food and Drug Administration) como “seguro” quando consumido por via oral.

Os óleos essenciais têm se mostrado com alto potencial promissor, devido apresentam efeitos mais específicos e provavelmente com menos danos colaterais ao meio ambiente e espécies não alvo e são considerados como uma nova classe de produtos ecológicos para o controle de insetos para uso industrial e doméstico. Além disso, sua obtenção mesmo que possua baixo rendimento, quando comparada aos produtos sintéticos é mais econômica e de fácil obtenção, podendo causar menos impacto ao meio ambiente.

Vale ressaltar, que o método de bioensaio é necessário para realizar uma pré-triagem de vários óleos essenciais, contribuindo de modo, para a seleção de óleos essenciais potenciais para o desenvolvimento de produtos para o controle de

ectoparasitas, inclusive, porque é a partir dele que se é possível determinar a CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> que são cruciais para determinação das dosagens das futuras formulações.

Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. no controle de formas imaturas e adultos da pulga *C. felis felis* e do carrapato *R. sanguineus*. Dentre os objetivos específicos estão a obtenção e caracterização química do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* L., a avaliação da atividade *in vitro* em diferentes fases do ciclo da pulga *C. felis felis* (ovo, larva, pupa e adultos) e do carrapato *R. sanguineus* (larva, ninfa e adultos), e a determinação através da análise de probito da CL<sub>50</sub> e a CL<sub>90</sub> do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* L. em diferentes fases do ciclo da pulga *C. felis felis* e do carrapato *R. sanguineus*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ectoparasitos que acometem os Pets

Os animais que compõe o grupo pets, também denominados animais de estimação, são representados pelos cães, gatos, aves ornamentais, peixes ornamentais, pequenos anfíbios e pequenos mamíferos (INSTITUTO PET BRASIL, 2022), sendo os cães e gatos os mais difundidos em todo mundo (OLIVEIRA, *et al.*, 2021).

Os ectoparasitos podem parasitar uma série de organismos, oferecendo danos diretamente ao hospedeiro ou indiretamente, através da transmissão de patógenos (MCNAIR, 2015).

Entre os ectoparasitos, os artrópodes hematófagos, incluindo os carapatos e as pulgas, são capazes de parasitar um grande número de hospedeiros vertebrados, incluindo animais domésticos, animais selvagens e humanos (OLIVEIRA, *et al.*, 2021).

Muitos desses ectoparasitos atuam como vetores de várias doenças, globalmente distribuídas e disseminadas, importantes aos animais de companhia. Além disso, eles também podem causar lesões cutâneas e induzirem respostas imunopatológicas (CVEJIĆ *et al.*, 2017; ESCCAP, 2022). Além de sua importância veterinária, alguns dos patógenos transmitidos por esses vetores também podem afetar a população humana, devido ao seu potencial zoonótico (CVEJIĆ *et al.*, 2017), interferindo no vínculo humano-animal ESCCAP, 2022).

Os patógenos e as doenças transmitidas por vetores são importantes porque podem ser altamente patogênicos em cães e gatos. A transmissão deles é muitas vezes imprevisível, seu diagnóstico e controle são difíceis, os sinais clínicos são variáveis, podendo se aparecer após longos períodos de incubação e raramente são patognomônicos. Os animais podem ter infecções persistentes, atuando como reservatórios. Além disso, vários desses patógenos são responsáveis por zoonoses importantes como: leishmaniose, borreliose, riquetsiose, bartonelose, anaplasmosse e dirofilariose (ESCAAP, 2019).

Os cães e os gatos podem ser acometidos por diversos artrópodes que vivem como ectoparasitas, como ácaros e piolhos, no entanto, a pulga e o carapato são os mais prevalentes em todo mundo (CVEJIĆ *et al.*, 2017; ZARDO *et al.*, 2019).

Os carapatos apresentam grande importância médica e veterinária, pois são responsáveis por perdas incalculáveis para a indústria pecuária e podem causar danos

para animais de companhia e populações humanas em todo o mundo (DANTAS-TORRES, 2018).

As pulgas são um dos grupos de insetos mais comuns, podem transmitir seus patógenos através das fezes contaminadas, regurgitação do conteúdo intestinal e da saliva (RUST, 2017; MALEKI-RAVASAN *et al.*, 2017).

Dentre as principais espécies de ectoparasitas que acometem os cães e gatos, podemos destacar a pulga da subespécie *Ctenocephalides felis felis* e o carapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (CVEJIĆ *et al.*, 2017). Essas espécies estão amplamente distribuídas em todo mundo (DANTAS-TORRES, 2008; CVEJIĆ *et al.*, 2017), por isso, medidas de controle para fins de tratamento ou prevenção das infestações são extremamente necessárias (ZARDO *et al.*, 2019).

### **2.1.1 *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835)**

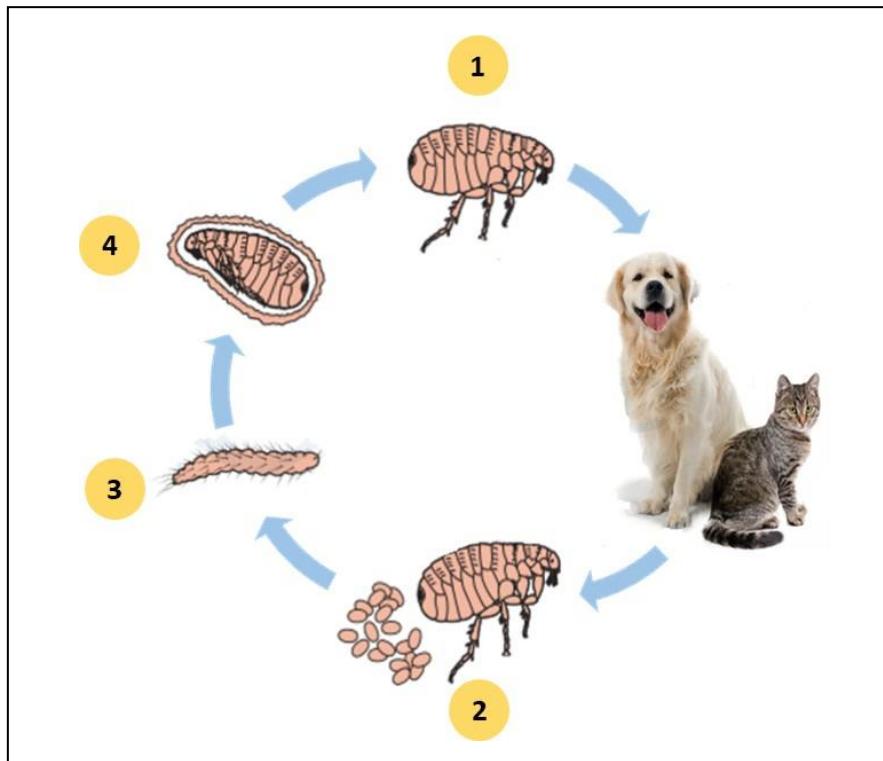
As pulgas são insetos hematófagos de grande importância tanto na área médica quanto na veterinária devido à sua capacidade de transmitir diversas doenças infecciosas e parasitárias que acometem animais e humanos (SHAKYA *et al.*, 2019; TAVARES *et al.*, 2020).

No Brasil, as principais espécies de pulgas encontradas são *Xenopsylla cheopis* (Rothschild, 1903), *Pulex irritans* (Linnaeus, 1758), *Ctenocephalides canis* (Curtis, 1826) e *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (TAVARES *et al.*, 2020).

O gênero *Ctenocephalides* (Classe Insecta, Ordem Siphonaptera, Família Pulicidae), inclui 13 espécies e subespécies de pulgas, mas apenas duas, a *Ctenocephalides canis* (Curtis, 1826) e *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835), são espécies cosmopolitas (LINARDI; SANTOS, 2012; RUST, 2017). A subespécie *C. felis felis* é mais adaptável do que *C. canis*, pois infesta mais espécies hospedeiras e, portanto, se estabeleceu em áreas mais extensas. A distribuição dessas espécies está relacionada a fatores ambientais que influenciam na sua sobrevivência, desenvolvimento e reprodução (LINARDI; SANTOS, 2012).

A *C. felis felis*, também denominada pulga do gato, é a principal subespécie encontrada em animais de estimação devido à sua ampla distribuição e capacidade de parasitar diversas categorias de hospedeiro (LINARDI; SANTOS, 2012; RUST, 2017; TAVARES *et al.*, 2020), incluindo humanos e outros animais (ZHANG *et al.*, 2021).

O ciclo da pulga *C. felis felis* inclui quatro estágios: ovo, larva (três instares larvais), pupa e a fase adulta (ALMEIDA *et al.*, 2019). O ciclo de vida da pulga *C. felis felis* está representado na Figura 1.



**Figura 1** - Ciclo evolutivo da pulga *Ctenocephalides felis felis*. 1 – Pulga adulta. 2 – Fêmea realizando postura dos ovos. 3 – Larva em desenvolvimento. 4 – Larvas tornando-se pupa (Adaptado de ESCCAP, 2022).

O ciclo biológico médio da *C. felis felis* ocorre entre 25 a 30 dias, embora isso possa variar de acordo à temperatura, umidade e disponibilidade de alimento nas fases larvares (TAVARES *et al.*, 2020).

A seguir estão descritos os números correspondentes a cada estágio do ciclo de vida da pulga *C. felis felis* de acordo com a Figura 1. 1 - Uma vez emergidas da pupa, as pulgas adultas masculinas e femininas começam a procurar ativamente um hospedeiro. Já no hospedeiro, as pulgas alimentam-se diariamente de sangue podendo sobreviver por até 5 meses. 2 – A produção e deposição de ovos (uma pulga fêmea é capaz de colocar uma média de 20 ovos) ocorrem no hospedeiro, no entanto, após a deposição os ovos caem no ambiente. 3 - Após alguns dias e no máximo de 96 horas (se ultrapassar esse tempo, provavelmente o ovo não estará mais viável para eclodir), em condições ideais, as larvas eclodem e se alimentam de detritos como caspa e sangue contendo

fezes de pulgas no ambiente e desenvolvem-se através de três estágios larvais. 4 – Ao atingir o terceiro instar larval, as larvas tecem um casulo e formando a pupa. A pupa pode-se manter viável no ambiente por até 1 ano, isso para assegurar que o adulto só irá emergir na presença de um hospedeiro. Após o desenvolvimento, o adulto emerge do pupário e imediatamente inicia-se um novo ciclo (ESCAAP, 2022).

Altas cargas de infestações por pulgas, especialmente em animais jovens, podem ocasionar anemia por deficiência de ferro, devido à hematofagia, inflamações localizadas, prurido e reações de hipersensibilidade tipo I e IV devido às picadas (ALMEIDA *et al.*, 2019; DAHM *et al.*, 2021).

Diferentes patógenos estão associados a espécies de *Ctenocephalides* como vetores biológicos ou hospedeiros intermediários, incluindo bactérias, protozoários e helmintos (LINARD; SANTOS, 2012). Dentre os patógenos transmitidos pela *C. felis felis* podemos destacar as bactérias intracelulares gram-negativas *Rickettsia typhi*, responsável pelo tifo, *Rickettsia felis*, responsável pela febre maculosa transmitida por pulga e a *Bartonella henselae*, responsável pela doença da arranhadura de gato (PAROLA, 2011; RUST, 2017; RENNOLL *et al.*, 2018). Tanto as *Rickettsias* quanto a *Bartonella* são bactérias patogênicas que possuem distribuição mundial e suas infecções são zoonóticas podendo causar doenças graves em humanos (AZRIZAL-WAHID *et al.*, 2021).

Dentre os helmintos, a pulga *C. felis felis* é hospedeiro intermediário do *Dipylidium caninum* e o *Achantaechilonema reconditum*. Acredita-se que as larvas das pulgas de gato se infectam a partir do consumo do ovo desses parasitos e a transmissão provavelmente ocorra através da ingestão de pulgas infectadas pelos gatos (RUST, 2017; NAPOLI, *et al.*, 2014).

O controle de pulgas em animais de companhia geralmente depende do uso de inseticidas para eliminar os parasitas adultos em associação com a implementação de métodos higiênicos para evitar a reinfestação do ambiente (DAHM *et al.*, 2021).

O pupário é o estágio que confere uma barreira de proteção contra a aplicação de ectoparasiticidas o que o torna tão resistente quanto ao adulto. Porém, o adulto é o único estágio parasitário, os demais (ovo, larva e pupa) são formas evolutivas que se desenvolvem no ambiente (não parasitam), mas o seu controle é de extrema importância para impedir a continuação do ciclo, evitando desse modo, a infestação dos hospedeiros pelo parasita adulto (RUST, 2020; HALOS *et al.*, 2014). Por isso, os animais infestados devem sempre que possível ser tratados antes que as pulgas iniciem a reprodução pois,

além de prevenir doenças, controle de pulgas visa preservar o conforto e bem-estar geral do hospedeiro devido ao severo estresse causado por suas picadas (TAVARES *et al.*, 2020).

### **2.1.2 *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)**

Os carapatos são artrópodes de grande relevância médica e veterinária. Como são parasitas hematófagos, podem causar danos direto ao hospedeiro ou também atuar como vetores de agentes de várias doenças, podendo afetar animais de companhia e populações humanas em todo o mundo e levando a perdas incalculáveis para a indústria pecuária, (DANTAS-TORRES, 2008; DANTAS-TORRES, 2018).

O carapato *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) foi descrito pela primeira vez por Latreille (1806) como *Ixodes sanguineus* e posteriormente colocado no gênero *Rhipicephalus* (Koch, 1884) (GRAY *et al.*, 2013). O complexo *Rhipicephalus sanguineus* inclui pelo menos 12 espécies de carapatos, *R. camicasi*, *R. guilhoni*, *R. leporis*, *R. moucheti*, *R. pumilio*, *R. pusillus*, *R. rossicus*, *R. schulzei*, *R. sulcatus*, *R. turanicus*, *R. sanguineus* s. s e *R. aficanicus*, amplamente distribuídos em todo mundo (NAVA *et al.*, 2015).

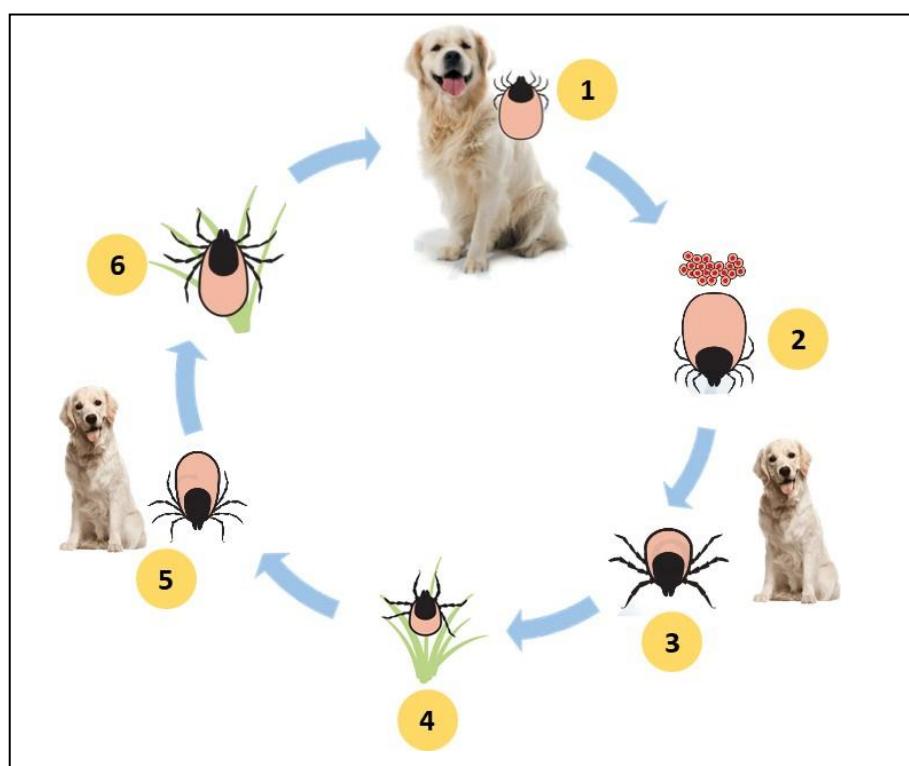
O *R. sanguineus* é também conhecido como carapato marrom do cão, tem ampla distribuição geográfica, sendo mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais (GRAY *et al.*, 2013). Estudos envolvendo essa espécie têm demonstrado diferenças morfológicas entre as populações desse carapato (NAVA *et al.*, 2018). Por meio de biologia molecular foi possível identificar a existência de múltiplas linhagens, entre as quais se destacam as linhagens de regiões tropicais (*R. sanguineus* sensu lato) e temperadas (*R. sanguineus* sensu stricto) (NAVA *et al.*, 2018; SÁNCHEZ-MONTES *et al.*, 2021).

O cão doméstico é o principal hospedeiro do *R. sanguineus*, tanto em áreas urbanas quanto rurais. No entanto, ocasionalmente, *R. sanguineus* pode infestar outros hospedeiros domésticos e selvagens, incluindo gatos, roedores, pássaros e humanos (DANTAS-TORRES, 2010).

Os carapatos possuem um ciclo de vida complexo, uma vez que, são ectoparasitas obrigatórios, apresentando fases parasitárias de alimentação sanguínea e também etapas de vida livre longe do hospedeiro, onde realizam a ovoposição e ecdíase (muda) (BRITO *et al.*, 2006).

O *R. sanguineus* é um carrapato de ciclo de vida trióxeno, ou seja, precisa ir ao ambiente realizar a ecdíase, o que acaba se tornando um grande problema, pois toda vez que um estágio vai para o ambiente, por uma característica de espécie, eles se dirigem à locais altos (geotropismo negativo) e procuram abrigo. Portanto, essas características são as que mais dificultam o controle, pois esses locais são de difícil acesso dos antiparasitários desse modo ocorrem constantes reinfestações. (DANTAS-TORRES, 2008).

Em seu ciclo estão presentes as fases evolutivas, ovo, larvas, ninfas e adultos (DANTAS-TORRES, 2008). O ciclo de vida do carrapato *R. sanguineus* está representado na Figura 2.



**Figura 2** - Ciclo evolutivo do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. 1 – Fêmea adulta se alimentando do sangue do hospedeiro. 2 – Fêmea ingurgitada realizando a postura dos ovos. 3 – Larvas eclovidas se alimentando. 4 – Larvas transformando-se em ninfas no ambiente. 5 – Ninfas se alimentando. 6 – Ninfas transformando-se em adultos (Adaptado de ESCCAP, 2022).

A seguir estão descritos os números correspondentes a cada estágios do ciclo de vida do carrapato *R. sanguineus* de acordo com a Figura 2. 1 - As fêmeas adultas se alimentam de uma única refeição de sangue, por aproximadamente 5 a 14 dias, de um

hospedeiro mamífero. 2 – A fêmea ingurgitada se desprende do hospedeiro, realiza a postura dos ovos e morre. 3 - No ambiente, os ovos eclodem para larvas de seis patas que imediatamente procuram um hospedeiro para se alimentarem (2 - 3 dias). 4 - As larvas retornam ao ambiente e mudam para ninfas de oito patas. 5 - As ninfas de oito patas procuram um hospedeiro para se alimentarem (4 - 6 dias). 6 - As ninfas retornam ao ambiente e mudam para adultos que irão em busca de um hospedeiro para o início de um novo ciclo (DANTAS-TORRES, 2008; ESCCAP, 2022).

Devido a hematofagia em todas às fases do seu ciclo de vida, o carrapato *R. sanguineus* é responsável por vários tipos de dermatoses e lesões na pele do hospedeiro, como inflamação, dor e inchaço que servem de porta de entrada para infecções secundárias (NICHOLSON *et al.*, 2019).

Outro problema associado a infestações por *R. sanguineus* em cães é paralisia do carrapato, que ocorre devido a capacidade de produção de neurotoxinas, pelas fêmeas de carrapatos ingurgitadas, que interferem na liberação de acetilcolina induzindo a paralisia (OTRANTO *et al.*, 2012).

Além desses fatores, sua importância médica e veterinária está diretamente relacionada com o fato desses ectoparasitos serem vetores de vários patógenos que além de infectar os animais possuem potencial zoonótico, tornando-se assim um problema de saúde pública (GRAY *et al.*, 2013; NICHOLSON *et al.*, 2019).

Dentre os patógenos caninos podemos destacar *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, de *Anaplasma platys* e *Hepatozoon canis*, e dentre os humanos *Rickettsia conorii* e *Rickettsia rickettsii* (OTRANTO *et al.*, 2012; DANTAS-TORRES *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2017).

Tanto a babesiose como a erliquiose podem apresentar quadros subclínicos ou seguirem um para um curso agudo ou crônico. Essas doenças podem apresentar sintomas graves podendo levar o animal a óbito (ESCCAP, 2019).

Em relação aos patógenos que acometem os humanos, a *Rickettsia conorii* causa a febre maculosa do Mediterrâneo e a *Rickettsia rickettsii* causa a febre maculosa das Montanhas Rochosas (GRAY *et al.*, 2013; NICHOLSON *et al.*, 2019).

Diante disso, o controle e tratamento de carrapatos em cães são de grande importância. Uma vez que os carrapatos são extremamente resistentes e parte de seu ciclo de vida ocorre no ambiente, este também deve ser tratado para combater os ectoparasitas indesejáveis (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

## 2.2 Populações de Pets no Brasil e no mundo

A criação de animais de estimação (pets) é uma característica universal nas sociedades humanas. O relacionamento entre homens e animais é uma entidade complexa iniciada nos primórdios da história da humanidade com a domesticação dos animais e mantida até hoje graças a sentimentos muito peculiares (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Como o passar dos anos e as modificações ocorridas na sociedade, os animais de estimação estão assumindo grande importância. Para a maioria dos donos, os animais de estimação são parte integrante de suas famílias. Os vínculos e relacionamentos únicos, íntimos e emocionais que as pessoas compartilham com seus animais dão um significado importante às suas vidas (CAVANAUGH *et al.*, 2008; TATIBANA; COSTA-VAL, 2009).

Dentro do grupo denominado animais pets estão os cães, gatos, aves ornamentais, peixes ornamentais, cavalos, pequenos anfíbios e répteis e pequenos mamíferos, como os coelhos, por exemplo, (APPA, 2018; INSTITUTO PET BRASIL, 2022; ABINPET, 2021).

De acordo com dados do ano de 2018, os cães se destacaram mundialmente como o principal tipo de animal de estimação. Foi estimado que a população mundial de cães e gatos estaria em torno 471 e 373 milhões, respectivamente (STATISTA, 2022a).

Dados da Associação Americana de Produtos para Animais de Estimação (APPA), estimaram que nos Estados Unidos da América (EUA), entre os anos de 2017 e 2018, pelo menos 84,6 milhões de residências (68%) haviam animais de estimação, onde os cães correspondiam a 48 %, gatos 38 %, peixes 12 %, aves 6 %, répteis 4 %, cavalos 2 % e outros pequenos animais 5% (APPA, 2018).

Ainda segundo a APPA, a combinação de cães e gatos nos domicílios é o mais comum. Estima-se que, em 2016 nos EUA, havia cerca de 89,70 milhões de cães e 94,20 milhões de gatos (APPA, 2018).

Os gatos e os cães também são os animais favoritos das famílias europeias, embora escolhas mais não convencionais, como répteis e pequenos mamíferos, também sejam opções. Em 2020, a população de gatos de estimação na Europa foi superior a 110 milhões e de cães a 89 milhões. Países como Alemanha e França foram as populações de gatos que se apresentaram maiores (STATISTA, 2022b).

Levantamentos em relação à população de animais pets no Brasil relataram que os cães e os gatos correspondem a maior parcela da população assim como em outros locais do mundo, segundo à Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, 2021). Dados referentes a esses números podem ser observados na Figura 3.



**Figura 3** – População de animais Pets no Brasil (Fonte: ABINPET, 2021).

De acordo com Pesquisa Radar Pet de 2020, realizada pela Comissão de Animais de Companhia (COMAC), cada domicílio brasileiro possui aproximadamente em média dois cães ou gatos, totalizando mais de 37,60 milhões de domicílios com a presença desses animais (SINDAN, 2021).

Os animais de estimação são criados para convívio com seres humanos por razões afetivas (ABINPET, 2021). No entanto, em alguns casos, os cães desempenham papéis utilitários ajudando as pessoas a realizarem tarefas consideradas trabalho como, auxiliar pessoas deficientes, pastorear gado, fornecer segurança ou farejar bombas e drogas (CAVANAUGH *et al.*, 2008).

A posse de um cão pode oferecer muitos benefícios à saúde humana, incluindo oportunidade de praticar exercício, redução do impacto de eventos estressantes e desenvolvimento da capacidade de empatia, especialmente em crianças. No entanto, as infestações de carrapatos e pulgas ameaçam diretamente a saúde humana e canina, tornando-se um incômodo para o cão e para o dono, que muitas vezes é desencorajado de ter o animal de estimação ou mantê-lo dentro de casa (LITTLE, 2017).

Devido a esse aumento da relação entre os donos e os animais de companhia existe uma preocupação com a saúde dos animais, o que inclui a prevenção e o tratamento de infestações por parasitas como pulgas e carrapatos bem como a redução

do potencial de intoxicações acidentais por praguicidas de uso doméstico (BAUER *et al.*, 2015).

### **2.3 Ectoparasiticidas atualmente utilizados e seus inconvenientes**

O controle seguro e eficaz de carrapatos e pulgas é extremamente importante para a saúde e o bem-estar dos animais de companhia e das pessoas com quem eles compartilham suas vidas (LITTLE, 2017).

Medidas de controle são necessárias para fins de tratamento ou prevenção das infestações por ectoparasitas. Para que essa proteção seja devidamente eficaz, conhecer os diferentes medicamentos veterinários disponíveis, bem como o seu respectivo modo e espectro de atuação antiparasitária são de suma importância (ZARDO *et al.*, 2019).

Existe uma série de princípios ativos com ação ectoparasiticida que apresentam níveis de eficácia e segurança satisfatórios em diversas apresentações, como xampu, sabonete, talco, “spray”, coleira, pipeta (“spot-on”) e comprimidos (MARCHIONDO *et al.*, 2013; ZARDO *et al.*, 2019).

Esses compostos agem de forma sistêmica, após a absorção nos tecidos dos hospedeiros, ou por contato direto com os parasitas-alvo após aplicação externa (TAYLOR, 2001).

O controle de pulgas e carrapatos a partir desses compostos químicos é amplamente praticado, embora o uso indiscriminado e exclusivo desses produtos possa levar à contaminação ambiental. Além disso, as populações de parasitos se adaptem às mudanças após a exposição a esses produtos químicos para sobreviver levando à resistência (RUST, 2017; ALVES *et al.*, 2017; REMNANT *et al.*, 2014).

Como tais compostos sofreram de uma série de inconvenientes, tais como o desenvolvimento de resistência e preocupações com a segurança do animal, humana e ambiental. Por isso, a busca por produtos e tecnologias mais seguras e eficazes tem sido um desafio para a indústria, é nesse contexto, que os estudos e o desenvolvimento de produtos de origens naturais ganham relevância (TAYLOR, 2001).

Os principais grupos químicos usados no controle de ectoparasitos são: formamidinas, piretrinas e piretróides, fenilpirazóis, lactonas macrocíclicas, oxadiazinas, spinosinas, reguladores de crescimento de insetos, neonicotinóides, e isoxazolininas (TAYLOR, 2001; ARMSTRONG *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017; ZARDO *et al.*, 2019).

### **2.3.1 Formamidinas**

O amitraz é o principal membro das formamidinas com utilidade na medicina veterinária (TAYLOR, 2001). Ele possui ação acaricida e inseticida e é bastante utilizado na agropecuária, desde 1975, como um agente antiparasitário (BARRETO *et al.*, 2017).

Nos ectoparasitas, o amitraz atua em sítios receptores de octopamina resultando em hiperexcitabilidade neuronal e morte (TAYLOR, 2001). Suas apresentações no mercado encontram-se como solução para banhos (e uso no ambiente), *spot on* e impregnado em coleiras (ZARDO *et al.*, 2019).

Embora ainda seja bastante empregado, atualmente está molécula já não é tão efetiva, tendo em vista que os parasitos adquiriram resistência (BARRETO *et al.*, 2017). Além disso, é tóxico para humanos e não deve ser manipulado sem proteção apropriada (ZARDO *et al.*, 2019).

### **2.3.2 Piretrinas e Piretróides**

As piretrinas são substâncias ativas naturais contidas nos extratos de flores de crisântemo ou piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) Foram identificadas no início do século XX e isoladas como ésteres dos ácidos crisantêmico e pirétrico. Os seis principais ésteres que constituem os extratos são as piretrinas I e II, as jasmolinas I e II e as cinerinas I e II (RODRIGUES, 2010).

Os piretróides são produtos químicos sintetizados modelados a partir molécula de piretrina natural (TAYLOR, 2001). Os piretróides sintéticos são solúveis na maioria dos solventes orgânicos, são biodegradáveis, possuem a vantagem de serem estáveis quando expostos ao ar e à luz e têm uma potência mais alta do que as piretrinas naturais (TAYLOR, 2001; FIDELIS JUNIOR *et al.*, 2014).

Os piretróides atuam no sistema nervoso central (SNC) do inseto, modulando a cinética de abertura dos canais de sódio. Esta ação resulta em descargas repetitivas ou na despolarização da membrana e subsequente morte do artrópode alvo (TAYLOR, 2001; FIDELIS JUNIOR *et al.*, 2014). Pesquisas recentes também indicam que os inseticidas piretróides suprimem os complexos ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA),

receptores de glutamato e canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por voltagem (FIDELIS JUNIOR *et al.*, 2014).

As piretrinas e os piretróides são moléculas lipofílicas que geralmente sofrem rápida absorção, distribuição e excreção (TAYLOR, 2001).

Alguns dos piretróides mais comuns usados em medicina veterinária incluem bioalletrina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, flumetrina, lambda-cialotrina, fenotrina e permetrina (TAYLOR, 2001).

Foram identificados alguns padrões de resistência de carapatos para os piretróides que envolvem a insensibilidade do sítio de ação do ativo por mutações gênicas e também através de mecanismos de resistência metabólica (FIDELIS JUNIOR *et al.*, 2014).

### 2.3.3 Fenilpirazóis

Os principais ativos inseticidas e acaricidas da família do fenilpirazóis, utilizados na medicina veterinária, são o fipronil e o piriprol (REMNANT *et al.*, 2014).

O fipronil é usado mundialmente no controle de pragas agrícolas e domésticas, incluindo espécies de gafanhotos, formigas, baratas, pulgas e carapatos (ROMERO *et al.*, 2016). Seu mecanismo de ação envolve principalmente o bloqueio dos canais de cloreto dos receptores regulados por GABA<sub>A</sub> (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) (subunidade  $\beta 3$ ), interferindo na neuromodulação, levando à paralisia e morte do inseto por hiperexcitação neural (ISLAM; LINCH, 2012). Outra forma de ação ocorre sobre os canais ativados por glutamato, que existem especificamente em invertebrados, mas não em mamíferos (ZHAO *et al.*, 2004).

Comercialmente, o fipronil está disponível nas formas em “spray” e “spot-on” para cães e gatos, e em “pour-on” e “spray” para animais de produção. Pode ser encontrado também em associação com metoprene e também em associações com amitraz, permetrina e piriproxifen (TAYLOR, 2001; BOUSHIRA *et al.*, 2011; GUPTA; ANADÓN, 2018; DOS SANTOS *et al.*, 2020).

O piriprol atua pelo mesmo mecanismo de ação do fipronil e é encontrado no mercado sob a forma de “spot-on” para cães (EMA, 2011).

Existe preocupação, devido à sua toxicidade, ao uso indiscriminado do fipronil que pode levar à contaminação ambiental, danos a organismos aquáticos, pássaros, mamíferos e à saúde humana (MAGALHÃES *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019).

### **2.3.4 Lactonas macrocíclicas**

Derivados macrocíclicos da lactona, as avermectinas e as milbemicinas, são compostos estruturalmente semelhantes. São produtos de fermentação macrocíclica de *Streptomyces avermilitis* e *Streptomyces cyanogriseus*, respectivamente (TAYLOR, 2001; ALMEIDA; AYRES, 2006).

As avermectinas diferem umas das outras quimicamente nas substituições de cadeias laterais no anel de lactona, enquanto as milbemicinas diferem das avermectinas pela ausência de uma porção de açúcar do esqueleto da lactona (TAYLOR, 2001).

O mecanismo de ação das lactonas macrocíclicas é potencializar a ação inibidora neuronal mediada pelo GABA, promovendo hiperpolarização neuronal do parasito e, portanto, inibindo a transmissão nervosa (FIDELIS JUNIOR *et al.*, 2014). Em artrópodes, possui alta afinidade por receptores glutamato em nível neuromuscular, provocando hiperpolarização por influxo de íons cloro e consequente paralisia flácida e morte (ZARDO *et al.*, 2019).

Dentre os compostos disponíveis para uso em medicina veterinária das avermectinas estão a ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e selamectina. E das milbemicinas estão a milbemicina e moxidectina. Esses compostos são ativos contra uma ampla gama de nematóides e artrópodes e são frequentemente chamados de endectocidas (TAYLOR, 2001; ALMEIDA; AYRES, 2006).

Mecanismos de resistência às lactonas macrocíclicas têm sido descritos mundialmente em várias espécies de nematóides e artrópodes. O uso intensivo de agrotóxicos aliado à falta de detecção precoce do aumento do número de indivíduos resistentes tem sido característico de muitos casos de resistência no campo (KLAFKE *et al.*, 2010).

### **2.3.5 Oxadiazinas**

O Indoxacarbe é uma nova molécula inseticida representante do grupo das Oxadiazinas (ABBAS *et al.*, 2020). Ela atua através do bloqueio dos canais de  $\text{Na}^+$  voltagem-dependente dos insetos, causando inibição da atividade nervosa e paralisia letal (BEUGNET; FRANC, 2012).

O indoxacarbe é considerado um pró-inseticida que é bioativado pelas enzimas esterase e amidase dentro do inseto para um metabólito mais ativo, N-descarbometoxilado do indoxacarb (DRYDEN *et al.*, 2013).

É usado no controle de pulgas em cães e gatos na forma de “spot on”. Pode ser encontrado também associado a permetrina para controle de carapatos (BEUGNET; FRANC, 2012).

### **2.3.6 Spinosinas**

As spinosinas são macrolídeos de ocorrência natural derivados da fermentação da bactéria *Saccharopolyspora spinosa* (YANO *et al.*, 2002). Elas representam classe de inseticidas denominada Naturalyte (ZARDO *et al.*, 2019). Os componentes mais ativos da família de compostos das espinosinas são as espinosinas A e D que se diferem estruturalmente e, quando combinadas, formando o Spinosad (MADDURI *et al.*, 2001; YANO *et al.*, 2002).

A ação das spinosinas é baseada na ativação de receptores de acetilcolina, induzindo o impulso nervoso continuamente e, de maneira secundária, age nos receptores do GABA, interrompendo sua função e prolongando o tempo do impulso, o que leva a hiperexcitação e morte do inseto (HEIRTLEN *et al.*, 2011; SPARKS, *et al.*, 2012).

O Spinosad é encontrado disponível em comprimidos mastigáveis para cães e gatos, confere proteção contra pulgas (*C. felis*) por pelo menos 30 dias, produz efeito adulticida e reduz a produção de ovos, ideal no tratamento e controle da DAPE (Dermatite Alérgica a Picada de Ectoparasitas) (ZARDO *et al.*, 2019).

Desde o seu lançamento, em 1997, vários casos de resistência ao spinosad em espécies de insetos, que resultaram em eficácia reduzida, vêm sendo investigados SPARKS, *et al.*, 2012).

### **2.3.7 Reguladores de Crescimento**

Os reguladores de crescimento de insetos (IGRs), também chamados de inseticidas de terceira geração, são moléculas que interferem sistemas fisiológicos específicos de insetos que não existem em vertebrados, inibindo a reprodução em

adultos de insetos ou bloqueando a organogênese de estágios imaturos (BEUGNET; FRANC, 2012; GAD *et al.*, 2021).

Os IGRs usados em cães e gatos podem ser classificados em dois grupos: análogos de hormônios juvenis e inibidores da síntese de quitina (BEUGNET; FRANC, 2012).

Os análogos do hormônio juvenil são absorvidos pela cutícula do inseto e previnem a ativação de sequências genéticas que determinam o desenvolvimento de órgãos e tecidos dos insetos imaturos. E os inibidores da síntese de quitina, também conhecidos como inibidores do desenvolvimento de insetos, atuam interferindo no desenvolvimento normal da cutícula e outras estruturas quitinosas (SCOTT *et al.*, 2002).

A maioria dos inibidores da síntese de quitina são derivados de benzoilfenilureia. Dentre as principais substâncias pertencentes a esse grupo podemos destacar: diflubenzuron, fluaruzon, flufenoxuron, triflumuron e lufenuron. E as principais substâncias pertencentes ao grupo dos análogos do hormônio juvenil: hidroprene, metoprene, piriproxifen e fenoxicarb (GRAF, 1993, OLIVEIRA *et al.*, 2012; RUST; HEMSARTH, 2016; GAD *et al.*, 2021).

### **2.3.8 Neonicotinóides**

Os neonicotinóides constituem um grupo de inseticidas desenvolvidos a partir da molécula de (S)-(-)-nicotina isolada como um alcaloide de espécies do gênero *Nicotiana* sp. Foram desenvolvidos e registrados no início da década de 1990, sendo a imidacloprida o primeiro composto neonicotinóide comercializado em 1991. Devido ao sucesso comercial da imidacloprida, outros pesticidas desenvolvidos a partir da molécula de (S)-(-)-nicotina foram criados, como: nitempiram, acetamiprida, tiametoxam, tiaclopride, clotianidina e dinotefuran (QUEIROZ; SILVA, 2021).

Os neonicotinóides atuam através da ligação, seletivamente, aos receptores nicotínicos de acetilcolina no SNC do inseto, levando à inibição da transmissão resultando em paralisia e morte (TAYLOR, 2001).

A imidacloprida é encontrada disponível para comercialização como pipeta na forma de “spot on” para aplicação mensal em cães e gatos, de forma isolada ou associada à moxidectina. Ainda, pode ser encontrado na forma de coleiras em associação com flumetrina com durabilidade de 8 meses (ZARDO *et al.*, 2019).

O nitempiram, assim como a imidacloprida, atua nos receptores nicotínicos da acetilcolina dos insetos, sendo encontrado disponível na forma de comprimidos que são rapidamente absorvidos, eliminando pelo menos 95% das pulgas 6 horas após a ingestão (ZARDO *et al.*, 2019).

Estudos envolvendo os neonicotinóides demonstraram que efeitos negativos sobre o comportamento, reprodução e o sucesso das colônias de abelhas. Além disso, outros estudos têm apontado a presença de neonicotinóides em corpos hídricos que tem como consequência à redução da biodiversidade destes ambientes, afetando espécies e populações de animais não-alvo em águas superficiais contaminadas determinando assim a preocupação quanto ao seu uso (QUEIROZ; SILVA, 2021).

### **2.3.9 Isoxazolinas**

As isoxazolinas são uma família de substâncias químicas utilizadas desde 2013 como antiparasitários no controle de pulgas e carrapatos em cães e também como antiparasitários contra outros artrópodes que afetam a pecuária e a agricultura. (OTRANTO, 2014).

As isoxazolinas atuam bloqueando os canais de cloro dependentes de ligante tanto dos receptores de GABA como de glutamato dos insetos (PFISTER; ARMSTRONG, 2016).

As principais substâncias que compõem essa classe terapêutica, são: fluralaner, afoxolaner, sarolaner e lotilaner (BURGIO *et al.*, 2016; RODRÍGUEZ-VIVAS *et al.*, 2020).

Essas substâncias são administradas por via oral em comprimidos mastigáveis, e também através de formulações tópicas para cães e gatos, sendo absorvidas no trato digestivo e atingindo níveis terapêuticos no sangue que são distribuídos por todo o corpo do animal, proporcionando excelente eficácia contra pulgas e carrapatos (RODRÍGUEZ-VIVAS *et al.*, 2020).

## 2.4 O uso de plantas medicinais na medicina veterinária

A associação de humanos e animais com plantas se originou com o início da vida na Terra, quando as plantas forneceram grande parte do abrigo, oxigênio, alimento e remédios necessários às formas de vida superiores. Com o passar do tempo e com o surgimento das sociedades, o ser humano aprendeu a reconhecer e categorizar os materiais vegetais para uso no atendimento das necessidades da vida. Dessas necessidades, o uso de ervas e extratos de ervas por seus poderes de cura pode ser atribuído aos mais antigos mitos, tradições e escritos usados para codificar as plantas que podem aliviar a dor e tratar doenças (MAMEDOV, 2012).

Na agricultura, os óleos essenciais e extratos vegetais vêm sendo empregados como um método alternativo para o controle de inseto-praga e de doenças causadas por fungos, nematóides, vírus ou bactérias. As medidas atuais de controle de insetos envolvem o uso de defensivos de origem sintética. Estes, além de apresentarem um elevado custo, persistem no meio ambiente de maneira deletéria e o seu tempo de uso contínuo e prolongado vem induzindo à formação de espécies resistentes (LIMA; CARDOSO, 2007).

As terapias de medicina alternativa, incluindo produtos herbáceos naturais ou derivados de plantas para cuidados com a saúde animal ganharam destaque recentemente. (GENOVESSE, 2012).

Isso, devido a origem dos recursos serem de fontes renováveis, e portanto, menos danoso ao meio ambiente, ao homem e por apresentarem efeitos mais específicos nos pacientes animais com menos danos colaterais para espécies não-alvo (SU *et al.*, 2014) e são considerados como uma nova classe de produtos ecológicos para o controle de insetos para uso industrial e doméstico.

### 2.4.1 Técnica de extração do óleo essencial: Hidrodestilação

As plantas aromáticas possuem tricomas glandulares, local de onde são extraídos os óleos essenciais. O método de extração é escolhido conforme a necessidade de características específicas do produto final desejado e as particularidades de cada óleo essencial. Os métodos de extração mais utilizados são: hidrodestilação, extração por solventes orgânicos, destilação a vapor, extração por fluido supercrítico, enfloração, prensagem a frio, dentre outros (NAVARRETE *et al.*, 2011).

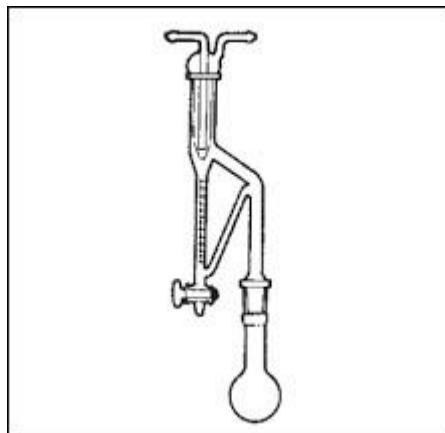
O termo hidrodestilação pode ser empregado para diferentes métodos: hidrodestilação com água, hidrodestilação com água e vapor e hidrodestilação por vapor. Atualmente estes termos foram substituídos por hidrodestilação, no caso de utilização de água, e arraste a vapor para extrações utilizando água e vapor ou apenas vapor (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Devido os óleos essenciais serem muito voláteis, eles vaporizam de acordo com o aumento da temperatura, por isso, a extração por destilação é a técnica de escolha quando o óleo é extraído das folhas (PINHEIRO, 2003).

A destilação nada mais é que a separação de componentes de uma mistura devido à diferença da pressão de vapor. Toda substância com determinado ponto de ebulição é volátil e possui um determinado valor de pressão de vapor, que por sua vez é dependente da temperatura. Portanto, os constituintes do óleo essencial do material vegetal, em contato com a água aquecida, receberão pressão das moléculas de vapor d'água entrando em ebulição. No estado volátil, estes constituintes serão condensados e separados da água (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

A hidrodestilação é um método no qual o material vegetal permanece em contato com a água em ebulição, o vapor força a abertura das paredes celulares e ocorre a evaporação do óleo que está entre as células da planta. O vapor, que consiste na mistura de óleo e água, passa por um condensador, onde ocorre seu resfriamento (SILVA, 2011) e, como os componentes voláteis e a água são imiscíveis, ocorre a formação de duas fases líquidas que podem ser separadas (SATOR, 2009).

O método de hidrodestilação é empregado com o uso de aparelho tipo Clevenger (BIASI; DESCHAMPS, 2009). A importância desse método reside no fato que as informações coletadas na extração servem de base para o desenvolvimento do processo industrial. Porém, essa metodologia pode gerar degradação de componentes presentes nos óleos essenciais, uma vez que a matéria-prima permanece em contato direto com a água quente por longos períodos de tempo (SERAFINI et al., 2002).



**Figura 4** – Aparelho de Clevenger utilizado para extração por hidrodestilação  
(Fonte: Adaptado de BOONE, 2011).

## 2.5 O uso de óleos essenciais como ectoparasiticidas

Os óleos essenciais são líquidos voláteis e apolares que podem ser extraídos de todos os órgãos da planta, através de técnicas por arraste a vapor na maioria das vezes e sua composição é baseada principalmente em terpenos (mono e sesquiterpenos) e / ou fenilpropanóides, que são metabólitos que conferem suas características organolépticas (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Óleos essenciais extraídos de plantas receberam atenção especial para o controle de ectoparasitas veterinários, pois apresentaram alta eficácia, múltiplos mecanismos de ação e baixa toxicidade em vertebrados não-alvo, incluindo aquáticos. (ELLSE; WALL, 2014)

O uso de óleos essenciais no controle de ectoparasitos veterinários já foi revisado por Ellse e Wall (2014). Óleos essenciais, como de *Cinnamomum* sp., *Mentha* sp., *Laurus* sp., *Cymbopogon* sp. e *Ocimum* sp. já são conhecidos por suas inúmeras propriedades de controle de pragas. A ação acaricida foi descrita usando o óleo essencial, como o *Cinnamomum* spp. (NA *et al.*, 2011;), *Mentha* sp., *Laurus* sp. (MACCHIONI *et al.*, 2006) e *Cymbopogon* sp. (MAGI *et al.*, 2006). O controle de carrapatos usando o óleo essencial de *Mentha* sp. (KOC *et al.*, 2012) e *Ocimum* sp. (MARTINEZ-VELASQUEZ *et al.*, 2011) também foi descrito. A *Mentha* sp. tem sido utilizada para o controle de moscas (MOREY; KANDAGLE, 2012) e o óleo essencial de *Cymbopogon nardus* tem sido utilizada por muitos anos como repelente de insetos (ZARIDAH *et al.*, 2003).

Nosso grupo vem trabalhando com otimização e padronização de métodos de ensaios *in vitro* para avaliação de atividade pulicida e carrapaticida com diversos óleos essenciais frente a pulga *C. felis felis* e os carapatos *R. sanguineus*, *Rhipicephalus microplus* e *A. sculptum*. A atividade pulicida dos extratos e óleos essenciais de *Schinus molle* L. (BATISTA et al., 2016) que avaliou a atividade contra ovos e adultos da pulga *C. felis felis*, além de determinar a composição química de extratos e óleos essenciais de *S. molle* L.. Foram avaliados os óleos de *Ocimum gratissimum*, *Cinnamomum* spp. *Mentha* sp., *Cybopogon nardus*, *Laurus nobilis* nos estágios de ovo, larva e pupa e adulto contra a *C. felis felis* (DOS SANTOS et al, 2020), *Syzygium aromaticum* que avaliou a atividade contra pulgas adultas e sua ação na maturação de ovos de *C. felis felis*. (LAMBERT et al., 2020), *Cinnamomum* spp., *Thymus vulgaris* L. e *Origanum vulgare* (CONCEIÇÃO et al., 2020) e *Illicium verum* e *Pelargonium graveolens* (FREITAS et al., 2021) onde em geral, as amostras apresentaram atividade inseticida tanto para os estágios de pulgas imaturas quanto para pulgas adultas. Além disso, a atividade acaricida dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* em teleóginas dos carapatos *R. sanguineus* e *Rhipicephalus microplus* (BATISTA et al., 2013), *Schinus molle* L. frente diferentes formas evolutivas de *Rhipicephalus microplus* (AVELAR et al., 2016), *O. gratissimum* foi avaliado contra as larvas dos carapatos *Amblyomma sculptum*, *Rhipicephalus microplus* e *R. sanguineus* (FERREIRA et al., 2019) e *S. aromaticum* contra contra larvas de *R. sanguineus* (LAMBERT, 2021) também já foram evidenciadas.

O óleo esencial de *Ocimum gratissimum* L. já foi relatado como fonte de eugenol (NAKAMURA et al., 1999). A mortalidade e repelência de eugenol por inseticidas tem sido descrita contra *Sitophilus zeamais* (HUANG et al., 2002), *Ixodes ricinus* (BISSINGER; ROE, 2010), *C. maculatus* (AJAYI et al., 2014) e é listado pelo FDA (Food and Drug Administration) como “seguro” quando consumido por via oral (THOMPSON et al., 1998). Vale ressaltar, que o método de bioensaio é necessário para realizar uma pré-triagem de vários óleos essenciais, contribuindo de modo, para a seleção de óleos essenciais potenciais para o desenvolvimento de produtos para o controle de ectoparasitas, inclusive, porque é a partir dele que se é possível determinar a CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> que são cruciais para determinação das dosagens das futuras formulações.

## 2.6 Família Lamiaceae

As plantas da família Lamiaceae pertencem à ordem Tubiflorae Lamiales, abrangem pelo menos 236 gêneros e mais de 7.173 espécies, distribuídas em todo o mundo (LIMA; CARDOSO, 2007; MARTÍNEZ-GORDILLO, *et al.*, 2017).

Dentre algumas espécies podemos destacar a *Thymus vulgaris* (tomilho), *Ocimum basilicum* (manjericão), *Mentha* spp. (menta), *Lavandula* spp. (lavanda) e *Origanum vulgare* (orégano) (LUO *et al.*, 2019). Além de a *Leonurus sibiricus* L. (macaé), *Hyptis suaveolens* L. (alfavacão), *Melissa officinalis* L. (cidreira), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Salvia officinalis* L. (sálvia), entre outras (LIMA; CARDOSO, 2007).

Em todas as plantas podem ser encontrados princípios ativos importantes, sintetizados pelo metabolismo secundário, que dão origem a uma série de substâncias conhecidas como alcalóides, flavonóides, cumarinas, saponinas, taninos, óleos essenciais entre outras (LIMA; CARDOSO, 2007).

Estas plantas vêm sendo muito exploradas para extração de óleos essenciais devido à sua composição rica em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e terpenóides voláteis. Os principais compostos encontrados nos óleos essenciais destas plantas são cariofileno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mentol, limoneno, timol e carvacrol. (HORST, 2020).

### 2.6.1 *Ocimum gratissimum*

O *Ocimum gratissimum* é da família Lamiaceae, originário da Ásia e comumente encontrado em regiões de temperaturas tropicais e quentes, Oriente e países tropicais. É subespontânea em todo o Brasil, sendo principalmente encontrada na região Nordeste, e conhecido popularmente como alfavaca, alfavacão, alfavaca-cravo, favacão e quiocio-cravo (MINISTÉRIO DA SAÚDE BR, 2015).

As folhas de *O. gratissimum* L. possuem em média de 4 a 8 cm de comprimento, 3 a 5 cm de largura curtamente pecioladas, limbo óvalo-elíptico, base simétrica e atenuada, ápice acuminado, margem denteada, nervação peninérvia e pecíolo lateral. As flores são brancas, pequenas, irregulares, agrupadas em espigas de 10 a 15 cm de comprimento, situada na extremidade dos ramos. Os frutos possuem um formato de pequenas cápsulas abertas na extremidade apical com sementes marrons

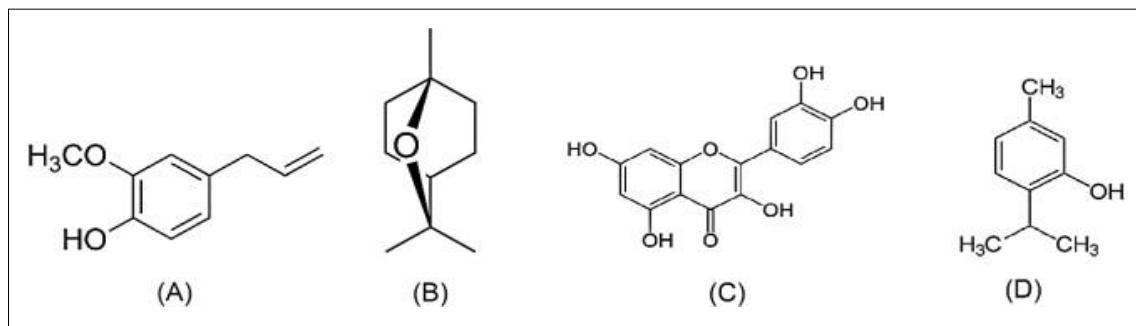
(FÉLIX-SILVA et al, 2012). Na Figura 5, observa-se o *Ocimum gratissimum* L. por partes da planta.



**Figura 5** – *Ocimum gratissimum* L. (A) Fruto; (B) Planta inteira; (C) Flores; (D) Flores; (E) Ilustração.

- (A):[http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/image-display.php?species\\_id=150360&image\\_id=1](http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/image-display.php?species_id=150360&image_id=1);
- (B):[http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=ocgr\\_001\\_avp.tif](http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=ocgr_001_avp.tif);
- (C):[http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=ocgr\\_002\\_avp.tif](http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=ocgr_002_avp.tif);
- (D):[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ocimum\\_gratissimum#/mediaviewer/File:Manjericao\\_Ocimum\\_gratissimum.JPG](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ocimum_gratissimum#/mediaviewer/File:Manjericao_Ocimum_gratissimum.JPG);
- (E): [Ocimum gratissimum L. \(plantgenera.org\)](http://Ocimum_gratissimum_L._(plantgenera.org))

Na Figura 6, encontram-se as estruturas químicas de alguns constituintes majoritários do *O. gratissimum* L..



**Figura 6** - Estruturas químicas de alguns constituintes principais do *O. gratissimum*.  
 (A)Eugenol; (B) 1,8-Cineol; (C) Quercetina (D) Timol.

No Brasil, a espécie é amplamente utilizada em todo território nacional tanto para fins culinários quanto na medicina popular objetivando o tratamento dos mais diversos problemas, como: afecções respiratórias, tosse, paralisia, nervosismo, vômitos, tuberculose, diabetes, antisséptico bucal e antigripal (MARTINS *et al.*, 2010). Em doenças como de pele, reumatismo, doenças venéreas, tumores, úlcera do útero, diarreia e artrite (COUTINHO *et al.*, 2011). Sua infusão é utilizada no tratamento de pneumonia, contra malária, dor de estômago e repelente de mosquitos (GAKUYA *et al.*, 2013). É usado como antisséptico pulmonar, antitussígeno e antiespasmódico (NGASSOUM *et al.*, 2003). Compressas são realizadas para as narinas obstruídas, febre, dores abdominais, dor nos olhos, infecções de ouvido, esterilidade, convulsões e gargarejo para os dentes, regulação da menstruação, prolapsos retais, conjuntivite e epilepsia (MATASYOH *et al.*, 2008). A decocção das folhas ou da planta toda é utilizada como antitérmico, diaforético, problemas estomacais, laxantes e até como antihelmíntico (MINISTÉRIO DA SAÚDE BR, 2015).

Foi demonstrado que o vapor do óleo de *Ocimum gratissimum* possui ação antiprotozoária. (PEREIRA; MAIA, 2007) Também há registro de seu uso em casos de gripe, insônia, calmante, (ALBERTASSE *et al.*, 2010; COSTA; MAYWORM, 2011) para frio e dor no corpo, (CUNHA; RODRIGUES; ALVES, 2012) pressão alta, bronquite, colesterol alto, cólica menstrual, problemas digestivos, expectorante, lavar feridas, flatulência, gonorreia, influenza, problemas no sistema nervoso, diarreia, (DJEUSSI; NOUMEDEM; SEUKEP, 2013; DE MEDEIROS; LADIO; ALBUQUERQUE, 2013) como diurético (DUARTE *et al.*, 2005) e para doenças associadas ao trato digestório (DUARTE *et al.*, 2007).

Seu óleo essencial é comumente utilizado para tratamento de muitas doenças, infecções respiratórias, diarreia, dor de cabeça, febre, problemas nos olhos, doenças de pele, e pneumonia, potente agente antidiabético e agente antimicrobiano (NGUEFACK; BUDDE; JAKOBSEN, 2007).

Na área na medicina veterinária, temos estudos no controle dos carrapatos *Amblyomma sculptum*, *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* com o óleo essencial de *Ocimum sp* que exibem uma gama de atividades biológicas como inseticida, acaricida e repelência de insetos (FERREIRA *et al.*, 2019). Nesse estudo, foi avaliada a atividade *in vitro* do estágio larval dos carrapatos e estabelecida a CL50 do óleo essencial do *Ocimum gratissimum*, que apresentou grande atividade acaricida

contra todas as larvas testadas na faixa de concentração avaliada. A atividade larvicida foi mais pronunciada para *R. microplus* (FERREIRA *et al.*, 2019).

Estudos envolvendo o controle de pulgas *Ctenocephalides felis felis* avaliou-se a atividade *in vitro* dos óleos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R. M. Sm, *Cinnamomum spp*, *Laurus nobilis* L., *Mentha spicata* L., *Ocimum gratissimum* L. E *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle contra os estágios de ovo, larva e adulto. Nesse estudo de triagem, o *Ocimum gratissimum* foi o mais eficaz frente os estágios testados obtendo CL50 mais baixas, ressaltando que o estágio de pupa de *C. felis felis* não foi avaliado nesse estudo (DOS SANTOS *et al.*, 2020).

## **2.7 A importância da avaliação *in vitro***

Técnicas *in vitro* são frequentemente usadas nas descobertas pré-clínicas do desenvolvimento de potenciais produtos inseticidas e/ou acaricidas (MARCHIONDO, 2013). O método de bioensaio é necessário para realizar uma pré-triagem de vários óleos essenciais, contribuindo para a seleção de óleos essenciais potenciais para o desenvolvimento de produtos para o controle de parasitos, inclusive, porque é a partir dele que se é possível determinar a CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> que são cruciais para determinação das dosagens das futuras formulações assim como suas possíveis associações para efeitos sinérgicos. Além disso, também é utilizado para avaliação da eficácia e efeito residual das formulações (MARCHIONDO, 2013).

Os testes *in vitro*, que são reconhecidos e utilizados no meio científico são estudos realizados com base em protocolos padronizados e controlados em laboratório. Desse modo, consequentemente, esses estudos devem possuir reprodutibilidade em qualquer laboratório e analista (ASSUNÇÃO *et al.*, 2020). As utilizações desses métodos permitem que esses testes sejam realizados sem o uso direto em animais, o que garante uma série de benefícios como menor tempo, custo e variabilidade (CERQUEIRA, 2008).

Entretanto estudos *in vitro* possuem limitações e está sujeito a diversos tipos de interferências, porém, são de extrema importância para estudos preliminares a fim de direcionar futuros testes *in vivo* (ASSUNÇÃO *et al.*, 2020).

### 2.7.1 Teste de pacote de larvas (LPT)

O teste LPT (“Larval packet test”) é o teste padrão pela FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura) para avaliação de diversos ativos acaricidas e da resistência desses, frente a populações de carrapatos (FAO, 2004).

Em 1962, Stone e Haydock desenvolveu esse método que ainda é amplamente utilizado, apenas com algumas modificações, por autores como Novato et al. (2018) e Shakya et al. (2020).

Esse teste é realizado com papel filtro com o tamanho de 850 mm x 750 mm impregnado com o volume de 670 µL da solução que irá ser analisada, diluída na proporção de 1:2 de azeite extra virgem e tricloroetileno (ASSUNÇÃO et al., 2020). O tempo de secagem e evaporação do diluente no papel filtro pode variar de 2 a 24 horas dependendo dos pesquisadores (CASTRO-JANER et al., 2009; RECK et al., 2014). Após a secagem, o papel filtro é dobrado e fechado com clipe em cada lado, dando origem ao um pacote onde as larvas são colocadas. A mortalidade das larvas é analisada após um período de 24 horas, sendo consideradas vivas aquelas que apresentem qualquer movimento mínimo (ASSUNÇÃO et al., 2020).

O diluente utilizado no bioensaio, também deve ser o mesmo utilizado para o controle negativo, e de acordo com a FAO (2004), se no grupo controle a mortalidade for superior a 10%, os resultados devem ser descartados por possuir possíveis erros na realização do bioensaio. Nos testes com carrapatos, a mortalidade de 0 a 10% no grupo controle são consideráveis normais, e entre 5 e 10% deve-se utilizar a fórmula descrita por Abbott (1925) a partir do número de vivos na testemunha (T) e no tratamento (Tr), descrita a seguir para a mortalidade corrigida:

$$E \% = (T - Tr) / T \times 100$$

A fórmula de mortalidade descrita por Chagas et al. (2002), deve ser usada para casos com percentuais de mortalidade até 5%:

Mortalidade (%): larvas mortas x 100 / larvas totais.

Modificações desse teste foram realizadas por Monteiro et al. (2012) para analisar a atividade acaricida do eugenol contra as larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus*. O tamanho do papel filtro foi alterado para 6 x 6 cm, e o número de larvas de aproximadamente 100 unidades, impregnando o volume de 90 µL e realizando 10 repetições para cada grupo testado. Os grupos foram acondicionados em câmara

climatizada a 27° C e umidade de aproximadamente de 80%, sendo a mortalidade calculada após 24 horas.

### **2.7.2 Avaliação por contato para pulgas**

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com a padronização de métodos de ensaios *in vitro* para avaliação da atividade pulicida frente a pulga *C. felis felis* em todos os estágios de desenvolvimento do ciclo (ovo, larva, pupa e adulto). Essa avaliação é chamada “por contato”, pois a pulga *C. felis felis* em seus diversos estágios evolutivos entra em contato direto com a superfície do papel filtro onde se adiciona o ativo a ser avaliado. Estudos como (BATISTA *et al.*, 2016), (DOS SANTOS *et al.*, 2020), (LAMBERT *et al.*, 2020), (CONCEIÇÃO *et al.*, 2020) e (FREITAS *et al.*, 2021) demonstram esse método de avaliação para os estágios imaturos e adultos frente a pulga *C. felis felis*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Localização do Estudo**

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), pertencente ao Departamento de Parasitologia Animal (DPA) do Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em parceria com o Laboratório de Química de Bioativos Naturais (LQBioN) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da mesma universidade.

#### **3.2 Obtenção do material vegetal**

O material vegetal foi adquirido através do cultivo da planta de *O. gratissimum* L. de um produtor rural, localizado no CEP 26373-190, Rua Conquista - no bairro Campo Alegre, do município de Queimados, estado do Rio de Janeiro, região Sudeste do Brasil com as respectivas coordenadas geográficas: latitude - 22.7106685 e longitude -43.5522256. O material vegetal foi colhido durante o Inverno no mês de Agosto de 2019, cuja temperatura média geral em Queimados varia entre 23°C e 34°C.

#### **3.3 Obtenção óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* L.**

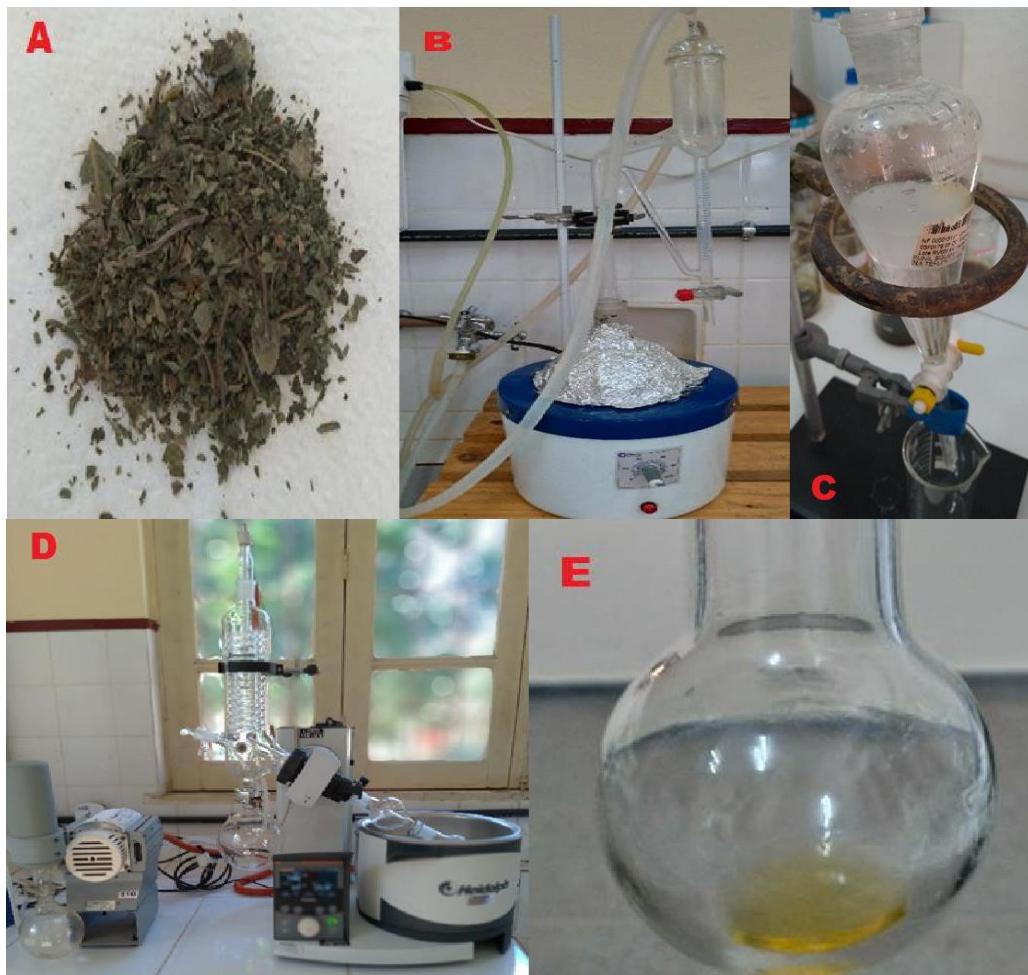
Foi realizado o beneficiamento da planta separando as folhas, flores e sementes para adquirir somente as folhas, cuja parte é de interesse para posterior secagem. As folhas foram secas em uma estufa com recirculação de ar, e temperatura entre 40 °C a 45 °C durante o período de 72 horas.



**Figura 7** – Processo de beneficiamento do *Ocimum gratissimum* L. Para obtenção do óleo essencial. A – Planta de *Ocimum gratissimum* L.. B – Separação das folhas e sementes. C – Acondicionamento das folhas para secagem. D – Processo de secagem finalizado. (Arquivo Pessoal)

O óleo essencial foi extraído a partir 50 gramas de material vegetal para 500 mL de água destilada por hidrodestilação em aparelho de Clevenger (adaptado) por aproximadamente 2 horas com a temperatura de 50°C.

Com o volume recolhido da extração, foi realizada a partição da água utilizando o solvente orgânico Clorofórmio na proporção de 1:2 em relação ao volume da amostra. A secagem foi realizada no evaporador rotativo com a pressão de 200 mBar, rotação de 72 rpm e com a temperatura do banho de 27°C. O tempo de secagem foi de aproximadamente 40 min e o rendimento de 1,9 mL de óleo essencial de óleo essencial.



**Figura 8** – Processo de extração do óleo essencial do *Ocimum gratissimum* L. A – Folhas secas e trituradas *Ocimum gratissimum* L.. B – Hidrodestilação em aparelho de Clevenger adaptado. C – Processo de separação do óleo/água com solvente orgânico. D – Secagem do solvente orgânico no evaporador rotativo. E – Obtenção do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L.. (Arquivo Pessoal)

### 3.4 Caracterização química do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* L.

A análise foi realizada Cromatografia Gasosa (CG) equipado com detector de ionização por chama (FID), e um injector split / split-less para separar e detectar os constituintes do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. (OEOG).

As substâncias foram separadas em uma coluna capilar de sílica fundida HP- (30 m x 0,25 mm d.i., espessura do filme 0,25 m, Agilent J & W). As temperaturas do forno, injetor e detector foram programadas conforme relatado por Adams (2007). O gás transportador utilizado será He (1 mL / min). O volume injetado foi de 1  $\mu$ l numa razão de divisão de 1:20. A percentagem dos compostos do óleo essencial foi calculada a partir da área relativa de cada pico analisado por GC-FID. O óleo essencial também foi

analisado em um GC / MS QP-2010 Plus (Shimadzu, JPN). O fluxo de gás de arraste, a coluna capilar e as condições de temperatura para a análise de GC / MS foram os mesmos descritos para GC / FID e relatados por Adams (2007). As condições de operação do espectrômetro de massa foram a tensão de ionização a 70 eV e a faixa de massa 40-400 m / z e 0,5 scan / s. O índice de retenção de compostos foi calculado com base na co-injeção de amostras com uma mistura de hidrocarbonetos C8-C20, conforme relatado por Van Den Dool e Dec. Kratz (1963). Os constituintes foram identificados por comparação de seus espectros de massa com a biblioteca NIST (2008) e com aqueles relatados por Adams (2007).

### **3.5 Origem dos ectoparasitas**

Os experimentos seguiram os padrões estabelecidos pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Instituto de Veterinária (CEUA/IV). As pulgas (CEUA / IV nº 4313110419) e os carapatos *R. sanguineus* (CEUA/IV nº 4667181218) utilizados no experimento foram obtidos nas colônias mantidas no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LQEPV/UFRRJ).

### **3.6 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* contra formas imaturas (ovo, larva e pupa) e adultos de *Ctenocephalides felis felis***

Os bioensaios foram realizados por meio de diluições diretas do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OEOG) tendo a acetona como diluente e controle negativo, e como controle positivo uma solução de fipronil 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Com isso, obteve-se 10 soluções com concentrações variadas para OEOG, de acordo com o estágio da pulga a ser analisado. Fase ovo concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ): 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,00; 12,00; 16,00; 20,00; 24,00; 30,00. Fases larva, pupa e adulto concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ): 1,0; 3,00; 5,0; 10,00; 20,00; 30,00; 50,00; 100,00; 150,00; 200,00.

O experimento seguiu a técnica de impregnação de papel filtro, sendo realizado em sextuplicata, com fitas de 10  $\text{cm}^2$  para adultos e discos de papel de filtro com 23,76  $\text{cm}^2$  para as fases imaturas. As tiras foram impregnadas com 200 $\mu\text{L}$  e os discos com 475 $\mu\text{L}$  de suas respectivas diluições, obtendo-se concentrações finais para OEOG na

faixa de 0,5 a 200  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Após impregnação, as fitas e os discos são secos à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora.

Foram utilizados adultos de *C. felis felis* não alimentados obtidos na colônia do laboratório. As tiras impregnadas e secas são inseridas em tubos de vidro contendo 10 pulgas adultas, sendo cinco machos e cinco fêmeas, que são posteriormente lacrados com gaze e elásticos e mantidos em câmara climatizada a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $75 \pm 10\%$  de umidade relativa. Avaliou-se a motilidade das pulgas, em que estas são consideradas vivas ao apresentarem um mínimo movimento, contabilizando o número médio de pulgas adultas vivas por concentração no período de 24 e 48 horas utilizando-se microscópio estereoscópico.



**Figura 9** – Bioensaio com as pulgas adultas de *Ctenocephalides felis felis*. A – Tubos de ensaio com as tiras e pulgas adultas. B – Parte superior do tubo fechado com gaze. (Arquivo Pessoal)

Foram utilizados ovos, pupas e larvas de *C. felis felis* obtidas na colônia do laboratório, analisando-se também a inibição do desenvolvimento das pulgas, todos em sextuplicata. Os discos impregnados e secos foram inseridos em placas de petri contendo 10 ovos, larvas ou pupas (sem dieta) de *C. felis felis*. Após lacradas, as placas de petri são mantidas em uma câmara climatizada a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $75 \pm 10\%$  de umidade relativa.



**Figura 10** – Bioensaio com ovos, larvas e pupas de *Ctenocephalides felis felis* A – Impregnação dos discos de papel filtro. B,C e D – Eppendorf com ovos, larvas e pupas respectivamente. E – Placas de petri com os discos secos e com ovos, larvas e pupas. (Arquivo Pessoal)

A avaliação da atividade ovicida, larvicida e pupicida foi realizada com base na eclosão dos ovos, a motilidade e a emergência de pulgas adultas, respectivamente. Na avaliação da inibição do desenvolvimento, 10 ovos recém-coletados são incubados em uma placa de petri juntamente com o disco impregnado e com o substrato necessário para o desenvolvimento destes, consistindo em areia, farelo de trigo e material fecal de pulgas adultas, avaliando-se a emergência de pulgas adultas. Os resultados do teste ovicida foram avaliados após 72 horas, assim como o teste de inibição do desenvolvimento; enquanto o teste pupicida é avaliado após 15 dias e o larvicida após 24 e 48 horas.

### 3.7 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* contra formas imaturas (larva e ninfa) e adultos de *Rhipicephalus sanguineus*

Os bioensaios foram realizados a partir de uma solução estoque do OEOG na concentração de  $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , utilizando uma mistura de azeite: tricloroetileno (2:1)

como diluente e controle negativo. Fipronil a 400 mg·mL<sup>-1</sup> foi usado como controle positivo para garantir a viabilidade da colônia. Diluições diretas foram realizadas a partir de soluções estoque, permitindo dez soluções em uma faixa de concentração variando de 13,1 a 1051,0 µg·cm<sup>-2</sup>. Os testes de bioensaios foram realizados através do pacote de larva (FAO, 2004). Os papéis de filtro no tamanho de 7,5 cm x 8,5 cm foram impregnados com 0,67 mL da solução em teste. Após a secagem e evaporação do tricloroetileno foram adicionadas as respectivas quantidades de acordo com cada estágio evolutivo: aproximadamente 100 larvas não alimentadas do carapato com 21 dias de idade, 70 ninhas e 10 adultos (5 machos e 5 fêmeas) foram depositados dentro de um envelope de papel filtro devidamente vedado com grampos.



**Figura 11** – Bioensaio com larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* A - Larvas e ninfas para realização do teste. B – Pacotes de larvas e ninfas já impregnados com a solução e vedados. C – Pacotes acondicionados em câmara climatizada para posterior avaliação. (Arquivo Pessoal)

Os pacotes foram mantidos em câmara climatizada a 27 ± 1 °C e umidade relativa de 80 ± 10% por 24 h para posterior avaliação da mortalidade. O critério para avaliação foi a motilidade, qualquer larva, ninfa e adulto que apresentassem movimento mínimo foram considerados vivos. Os números médios de larvas, ninhas e adultos por concentração foram avaliados no período de 24 horas com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Os testes foram realizados em triplicata para cada concentração e a mortalidade foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de mortalidade} = \frac{\text{ectoparasitas mortos}}{\text{total de ectoparasitas}} \cdot 100$$

### 3.8 Avaliação da eficácia e determinação da CL<sub>50</sub> e a CL<sub>90</sub> do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum L.* através da análise de probito

A eficácia foi calculada usando a fórmula de Abbott (1987):

Porcentagem de eficácia

$$= \frac{n^{\circ} \text{ ectoparasitas}_{\text{controle}} - n^{\circ} \text{ ectoparasitas}_{\text{tratados}}}{n^{\circ} \text{ ectoparasitas}_{\text{controle}}} \cdot 100$$

A estimativa da CL<sub>50</sub> (concentração letal que matou 50% da população tratada) e da CL<sub>90</sub> (concentração letal que matou 90% da população tratada), para a pulga *C. felis felis* (ovo, larva, pupa e adultos) e para o carrapato *R. sanguineus* (larva, ninfa e adultos), foram realizadas por análises de probit usando o RStudio Team (2020, RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA), com significância estatística de 5% (P < 0,05).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

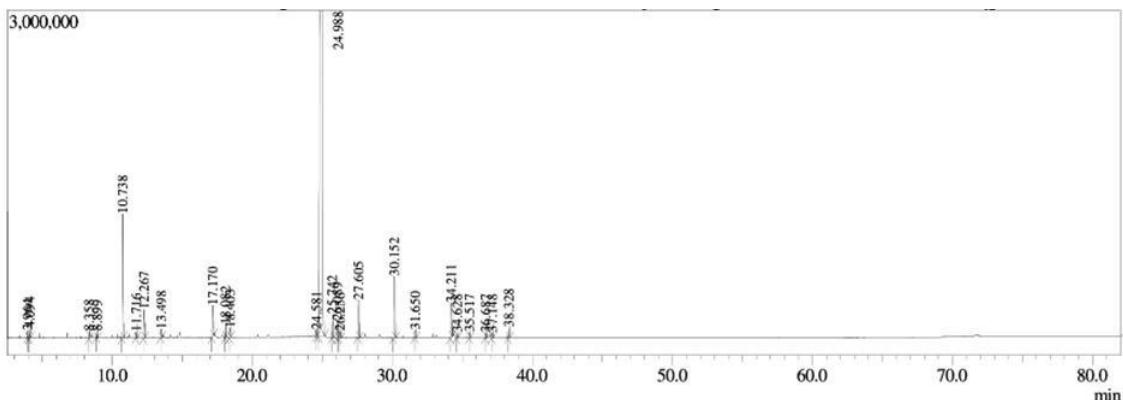
### 4.1 Obtenção, rendimento e caracterização química do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* L.

O rendimento da extração foi calculado em uma relação de peso de material vegetal pelo volume de óleo recolhido na extração. Por isso, na extração que utilizamos 50 g de material vegetal e obtivemos 1,9 mL de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. recolhido, calculamos o rendimento da seguinte maneira:

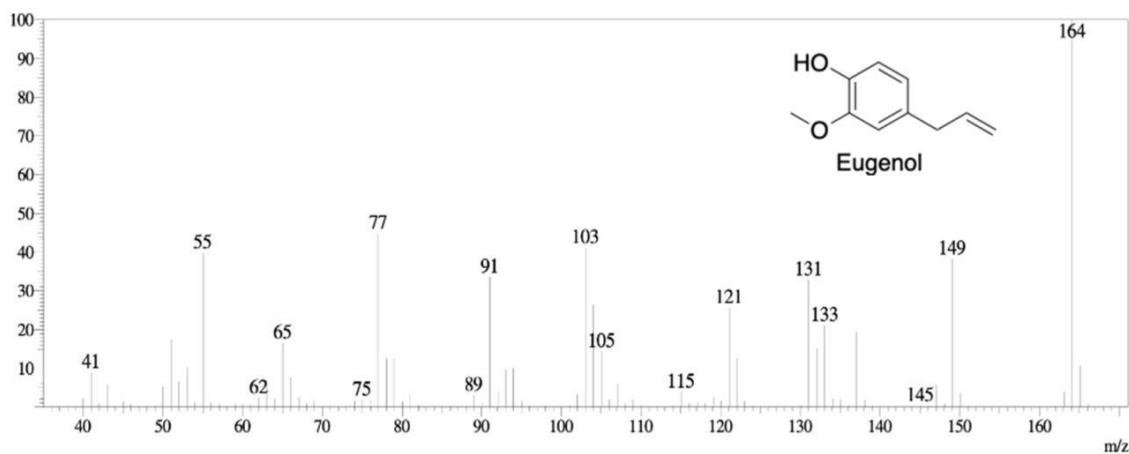
$$1,9 \text{ mL}/50 \text{ g} \times 100 = 3,8\%$$

Sabemos que o gênero *Ocimum* apresenta composições químicas muito variadas, produzindo óleos essenciais com composições diferentes. São conhecidos três quimiótipos do *O. gratissimum*, sendo eles: timol, geraniol e o eugenol (FERREIRA *et al.*, 2019).

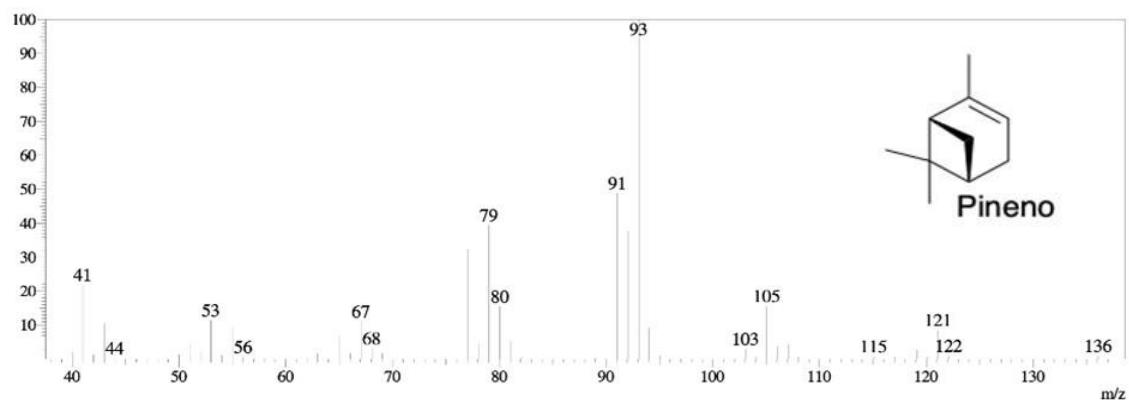
A análise da composição química do óleo essencial de *O. gratissimum* mostrou que os principais compostos encontrados foram Eugenol (77,7%) e Pineno (5,26%), ou seja, possui o quimiótipo eugenol que é composto majoritário. Assim como o OEOG relatado por FERREIRA *et al.*, 2019, que identificou o eugenol como o composto majoritário (74,5%), exceto pelo segundo composto encontrado cujo foi o eucaliptol (1,8-cineol).



**Figura 12** – Cromatograma do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L..



**Figura 13** – Espectro de massas e estrutura química do constituinte majoritário Eugenol, do óleo essencial de *Ocimumum gratissimum* L..



**Figura 14** – Espectro de massas e estrutura química do constituinte Pineno, do óleo essencial de *Ocimumum gratissimum* L..

#### 4.2 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* contra formas imaturas (ovo, larva e pupa) e adultos de *Ctenocephalides felis felis*

**Tabela 1**– Mortalidade (%) nas fases de larva, pupa e adulto da pulga *Ctenocephalides felis felis*.

Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	Mortalidade (%)				
	Larva 24 horas	Larva 48 horas	Pupa 15 dias	Adulto 24 horas	Adulto 48 horas
<b>1,00</b>	0,00	1,67	9,26	10,00	10,00
<b>3,00</b>	0,00	3,33	14,81	6,67	8,33
<b>5,00</b>	6,67	10,00	24,07	3,33	3,33
<b>10,00</b>	10,00	28,33	38,89	8,33	18,33
<b>20,00</b>	53,33	78,33	42,59	41,67	50,00
<b>30,00</b>	68,33	83,33	57,41	63,33	81,67
<b>50,00</b>	88,33	95,00	85,19	100,00	100,00
<b>100,00</b>	95,00	98,33	100,00	100,00	100,00
<b>150,00</b>	98,33	100,00	100,00	100,00	100,00
<b>200,00</b>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Analizando os resultados apresentados, pode-se observar que o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. apresentou 100% de mortalidade nas concentrações testadas em todos os estágios analisados de acordo com a tabela 1. Em 50 ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) foi a menor concentração que obtivemos 100% de mortalidade, essa na fase adulta. E na concentração de 200 ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) foi onde obtivemos 100% de mortalidade, tanto em 24 horas como em 48 horas, para todas as fases testadas (tabela 1). O perfil de susceptibilidade na fase adulta, geralmente é menor, em relação as fases imaturas. Mas nesse caso, observamos que os adultos foram mais susceptíveis, seguido pela pupa e larva nas mesmas concentrações testadas. Dos Santos *et al.* (2020), analisou o OEOG frente as formas (ovo, larva e adulto) e obteve um perfil de susceptibilidade diferente, no qual o estágio mais suscetível foi o de larva, seguido do ovo e adulto. Podemos correlacionar essas diferenças do perfil de susceptibilidade encontrado do OEOG, a fatores como diferentes origens do material vegetal, técnicas de extração e condições de análises diferentes.

**Tabela 2**– Mortalidade (%) na fase ovo e avaliação da inibição de crescimento da pulga *Ctenocephalides felis felis*.

Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	Mortalidade (%)	
	Ovo (72 horas)	IGR (72 horas)
<b>0,50</b>	12,50	0,0
<b>1,00</b>	6,25	28,6
<b>2,00</b>	27,08	36,7
<b>4,00</b>	29,17	87,8
<b>8,00</b>	37,50	95,9
<b>12,00</b>	50,00	98,0
<b>16,00</b>	79,17	100,0
<b>20,00</b>	85,42	100,0
<b>24,00</b>	91,67	100,0
<b>30,00</b>	100,00	100,0

Na tabela 2, observa-se que as concentrações testadas são muito menores em relação as da tabela 1, pois a fase ovo e avaliação da inibição de crescimento (IGR) são muito mais susceptíveis que as demais (larva, pupa e adulto). Observamos que na fase de ovo, a mortalidade de 100% só foi alcançada na maior concentração testada de 30 ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Enquanto o teste para avaliação da inibição de crescimento, a eficácia máxima foi atingida na concentração de 16 ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), ou seja, quase a metade da concentração necessária para atingir 100% de mortalidade no ovo, sendo a avaliação da inibição de crescimento mais susceptível que o ovo. Lambert *et al.* (2020), avaliou a atividade do OE do cravo-da-índia e do eugenol frente ao estágio adulto e quanto ao IGR, os resultados corroboram com o perfil de susceptibilidade encontrado nesse estudo, sendo o adulto menos suscetível que a avaliação do IGR.

#### 4.3 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* contra formas imaturas (larva e ninfa) e adultos de *Rhipicephalus sanguineus*

**Tabela 3** – Mortalidade (%) nas fases de larva e ninfa e adulto do carapato de *Rhipicephalus sanguineus*.

Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	Mortalidade (%)		
	Larva	Ninfa	Adulto
<b>13,0</b>	1,7	0	0
<b>26,0</b>	0,9	1,0	0
<b>52,5</b>	1,4	1,1	0
<b>105,0</b>	2,1	1,3	0
<b>210,0</b>	39,6	3,6	0
<b>420,0</b>	72,5	29,4	0
<b>631,0</b>	93,8	56,6	0
<b>841,0</b>	100,0	75,0	0
<b>946,0</b>	100,0	77,1	0
<b>1051,0</b>	100,0	80,8	0

Com os resultados apresentados na tabela 3, podemos observar que na fase de larva atingimos 100% de mortalidade a partir da concentração de 841 ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), enquanto que na maior concentração de 1051 ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), o máximo atingido de mortalidade para ninfas foi de 80,8%, enquanto que na fase adulta não atingimos mortalidade na faixa de concentração testada (13 a 1051,0  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Já para os estágios testados do carapato *R. sanguineus*, o perfil de susceptibilidade que encontramos foi larva mais susceptível que a ninfa. Ferreira *et al.* (2019), analisou o OEOG no estágio larval do *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma sculptum*, o qual o menos suscetível foi o *R. sanguineus* seguido pelo *A. sculptum* e *R. microplus*. Lambert, *et al.* (2021), testou as larvas de *R. sanguineus* com o óleo essencial de cravo-da-índia e eugenol e encontrou mortalidade acima de 90% para o OE de cravo-da-índia e o eugenol nas concentrações superiores a 5 e 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente.

#### 4.4 Avaliação da eficácia e determinação da CL<sub>50</sub> e a CL<sub>90</sub> do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum L.* através da análise de probito

**Tabela 4** - Análise de probit dos dados de mortalidade obtidos a partir dos bioensaios do óleo essencial de *Ocimum gratissimum L.*..

Óleo essencial	Fase	95% CI CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2$ )	95% CI CL <sub>90</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2$ )	Slope (SE)	r <sup>2</sup>	X <sup>2</sup> (p-valor)
<i>Ocimum gratissimum</i>	Adulto (24h)	20.24 (15.81 - 25.49)	55.90 (40.73 - 100.46)	29.046	0.9898	1,0000
	Adulto (48h)	15.72 (11.97 - 19.82)	44.72 (33.17 - 74.57)	28.283	0.9707	1,0000
	Ovo	10.54 (8.18 - 12.48)	22.00 (18.22 - 30.30)	40.099	0.9767	0.8653
	PULGA Larva (24h)	21.06 (18.03 - 24.49)	59.79 (48.99 - 77.33)	28.283	0.8131	0.5145
	Larva (48h)	13.20 (11.17 - 15.51)	38.56 (31.24 - 50.74)	27.538	0.7562	0.9944
	Pupa	18.69 (12.73 - 24.46)	69.26 (48.24 - 141.41)	22.529	0.9473	0.9947
	ID	2.00 (1.67 - 2.39)	5.18 (4.15 - 7.03)	31.094	0.8235	0.9792
	CARRAPATO Ninfa (24h)	584.01 (539.19 - 628.94)	1294.89 (1151.27 - 1510.29)	3.7059 (0.14)	0.9809	0.2281
	Larva (24h)	151.11 (101.20 - 192.12)	492.20 (423.75 - 599.64)	2.4988 (0.81)	0.9902	1,0000

De acordo com a tabela 4, para adultos em 24 e 48 horas, e larvas 24 e 48 horas valores encontrados nas CLs 50 e CLs 90 não possuem diferença de potência, visto que a razão das CLs é menor que 2. Não possuir diferença de potência entre as fases é desejável, para uma possível formulação futura.

Dos Santos *et al.* (2020), apresentou para adulto de *C. felis felis* em 24 horas CL<sub>50</sub> de 5,85, em 48 horas CL<sub>50</sub> de 4,49, para ovo CL<sub>50</sub> de 1,79 e larva CL<sub>50</sub> de 1,21. Todos os valores abaixo das CLs 50 encontradas nesse presente trabalho. Lambert *et al.* (2020), observou as CLs 50 e CLs 90 para o óleo essencial de cravo-da-índia e eugenol frente aos adultos e IGR do *C. felis felis*, concluindo que a potência do eugenol é maior que a do cravo-da-índia. Resultando nas seguintes CLs com o eugenol: adulto 24h CL<sub>50</sub> 2,40 e CL<sub>90</sub> 8,10, adulto 48 h CL<sub>50</sub> 1,40 e CL<sub>90</sub> 3,70. Quanto ao IGR, CL<sub>50</sub> 0,10 e CL<sub>90</sub> 0,68. Todos os valores bem menores que os encontrados com o OEOG.

Ferreira *et al.* (2019), encontrou a CL<sub>50</sub> de 6,2 mg.mL<sup>-1</sup> para o OEOG frente a larva de *R. sanguineus*. E Lambert *et al.* (2021), avaliou a potência do OE de cravo-da-índia e eugenol frente as larvas do *R. sanguineus*. Concluindo-se em CLs 50 e 90 menores para o eugenol, CL<sub>50</sub> 1,4 e CL<sub>90</sub> 6,4 mg.mL<sup>-1</sup>.

## 5. CONCLUSÃO

Foi possível realizar a obtenção e caracterização química do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* L.

Foi avaliada a atividade *in vitro* do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* L. em todas as fases do ciclo da pulga *Ctenocephalides felis felis* (ovo, larva, pupa e adultos) e do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (larva, ninfa e adultos).

Foi possível determinar através da análise de probito a CL<sub>50</sub> e a CL<sub>90</sub> do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* L. em todas as fases do ciclo da pulga *C. felis felis* (ovo, larva, pupa e adultos) e do carrapato *R. sanguineus* (larva, ninfa e adultos).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho avaliou o potencial do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. no controle de formas imaturas e adultos da pulga *Ctenocephalides felis felis* e do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*.

Apesar do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. ter apresentado resultados promissores contra as todas as fases do ciclo da pulga *C. felis felis* (ovo, larva, pupa e adultos) e do carrapato *R. sanguineus* (larva e ninfa), desenvolver formulações farmacêuticas a partir do OEOG possa ter inconvenientes. Como por exemplo, o fato de não ter até o momento produto comercial do OEOG, sendo assim necessária a extração do OE a partir do processo inicial desde o beneficiamento da planta, desse modo ficando sujeito a vários lotes e quimiótipos diferentes já relatados no gênero *Ocimum sp.*

Por isso, o nosso grupo de pesquisa tem como foco desenvolver possíveis formulações com ações inseticidas e acaricidas, a partir do constituinte majoritário do OEOG encontrado nesse trabalho que é o eugenol, e buscar possíveis efeitos sinérgicos do eugenol com outros ativos, a fim de determinar CLs menores do que as relatadas atualmente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, S., IQBAL, R., HALEEM, S., NIAZ, S., ULLAH, R., ABDELAATY, A. S., BARI, A. Teratological Effect of Indoxacarb on Chick Embryos (*Gallus gallus domesticus*). **Indian Journal of Animal Research**, v. 54, n. 6, p. 744-748, 2020.
- ABBOTT W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal American Mosquito Control Association's**, 3(2): 302-303, 1987.
- ABBOTT, W. S. The value of the dry substitutes for liquid lime. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 18, p. 265–267, 1925.
- ABINPET, Brasil. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site-cmfv/>> Acesso em: 16/abril/2019.
- ABINPET. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Disponível em: [Abinpet.org.br | Mercado](http://Abinpet.org.br | Mercado) Acessado em: 08/02/2022.
- ADAMS R.P. **Identification of essencial oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream: Allured. 4 th. ed. 2007.
- AJAYI, E. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Data showing chemical compositions of the essential oils of the leaves of *Cymbopogon citratus* obtained by varying pH of the extraction medium. **Data in Brief**, v. 8, p. 599, 2016.
- ALBERTASSE, P. D.; THOMAZ, L. D.; ANDRADE, M. A. Medicinal plants and their uses in Barra do Jucu community, Vila Velha Municipality, Espírito Santo State, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, p. 250-260, 2010.
- ALMEIDA, G. P. S., CAMPOS, D. R., AVELAR, B. R. D., SILVA, T. X. D. A. D., LAMBERT, M. M., ALVES, M. S. R., CORREIA, T. R. Development of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in different substrates for maintenance under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 2, p. 1–5, 2020.
- ALMEIDA, M. L., ALMEIDA, L. P., BRAGA, P. F. S. Aspectos psicológicos na interação homem-animal de estimação. **IX Encontro Interno & XIII Seminário de Iniciação Científica**, 2009.
- ALVES, F. M., BERNARDO, C. C., PAIXÃO, F. R., BARRETO, L. P., LUZ, C., HUMBER, R. A., & FERNANDES, É. K. Heat-stressed *Metarhizium anisopliae*:

viability (*in vitro*) and virulence (*in vivo*) assessments against the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology Research**, v. 116, n. 1, p. 111-121, 2017.

APPA. American Pet Products Association. The 2017 – 2018 APPA National Pet Owners Survey. Disponível em: [Slide 1 \(mceldrewyoung.com\)](http://Slide 1 (mceldrewyoung.com)). Acessado em 08/02/2022.

ARMSTRONG, R. D., LIEBENBERG, J. E., HEANEY, K., GUERINO, F. Flea (*Ctenocephalides felis*) control efficacy of topical indoxacarb on dogs subsequently bathed with a chlorhexidine-ketoconazole shampoo. **Australian Veterinary Journal**, v. 93, n. 8, p. 293–294, 2015.

ASSUNÇÃO, G.R. Técnicas *in vitro* e *in vivo* utilizadas para avaliar o efeito de produtos naturais no controle de carrapatos. In: PAULUCIO, V.A, AVELAR, B.R., NUNES, E.T, COSTA, A.V., QUEIROZ, V.T. Tópicos especiais em ciência animal IX. Alegre. CAUFES, 2020. P. (302) – (319).

AVELAR, B. R., LAMBERT, M.M, SIQUEIRA, R.C.S., CID, Y.P., CHAVES, D.S.A., & COUMENDOUROS K. [In vitro activity of essential oils and extracts from *Schinus molle* L. against *Rhipicephalus microplus*]. Atividade *in vitro* de óleos essenciais e extratos de *Schinus molle* L. frente a *Rhipicephalus microplus*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(supl. 3):218 - 228, 2016.

AZRIZAL-WAHID, N., SOFIAN-AZIRUN, M., LOW, V. L. Flea-borne pathogens in the cat flea *Ctenocephalides felis* and their association with mtDNA diversity of the flea host. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 75, p. 101621, 2021.

BARRETO, M. M. Amitraz: pharmacological and toxicological aspects in animals. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v.11, n.3, p.185-191, 2017.

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

BAUER, E. C., OGG, C.L., STONE D. L. Protecting Your Cats and Dogs from Pesticide Poisoning. **NebGuide**, 2015.

BENELLI G., PAVELA R. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks—A systematic review. **Acta Tropica**, v. 179, p. 47-54, 2018.

BEUGNET, F.; FRANC, M. Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 267-279, 2012.

BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda. 2009.

BISSIGER B.W, ROE R.M. Tick repellents: Past, present, and future, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96:2, p. 63-79, 2010.

BIZZO, H. R., HOVELL, A.M.C. e REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 588-594. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005>.

BOONE, C. V. Estudo químico do óleo essencial das raízes de *Piper amalago*. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2011.

BOONE, C. V. **Estudo químico do óleo essencial das raízes de *Piper amalago***. 2011. 13f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2011.

BOUHSIRA, E., YOON, S. S., ROQUES, M., MANAVELLA, C., VERMOT, S., CRAMER, L. G. Efficacy of fipronil, amitraz and (S)-methoprene combination spot-on for dogs against adult dog fleas (*Ctenocephalides canis*, Curtis, 1826). **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 4, p. 351-353, 2011.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

BRITO, L. G., da SILVA NETO, F. G., OLIVEIRA, M. D. S., BARBIERI, F. D. S. Bio ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Embrapa Rondônia-Documents (INFOTECA-E)**, 2006.

BURGIO, F.; MEYER, L.; ARMSTRONG, R. A comparative laboratory trial evaluating the immediate efficacy of fluralaner, afoxolaner, sarolaner and imidacloprid+ permethrin against adult *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks attached to dogs. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 626, 2016.

CASTRO-JANER, E. et al. *In vitro* tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:

Ixodidae) and their standardization. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1–2, p. 120–128, 2009.

CAVANAUGH, L. A., LEONARD, H. A. SCAMMON, D. L. A tail of two personalities: How canine companions shape relationships and well-being. **Journal of Business Research**, v. 61, n. 5, p. 469-479, 2008.

CERQUEIRA, N. Métodos alternativos ainda são poucos e não substituem totalmente o uso de animais. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 47–49, 2008.

CHAGAS, A. C. de S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 39, n. 5, p. 247–253, 2002.

CONCEICAO, C. L.; DE MORAIS, L. A.; CAMPOS, D. R.; JÉSSICA, K. D. O.; DOS SANTOS, G. C.; CID, Y. P.; DE SOUSA, M. A. A.; SCOTT, F. B.; COUMENDOUROS, K. Evaluation of insecticidal activity of thyme, oregano, and cassia volatile oils on cat flea. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 6, p. 774-779, 2020.

COSTA, V. P.; MAYWORM, M. A. S. Medicinal plants used by the community of Tenentes District-Extrema Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 3, p. 282-292, 2011.

COUTINHO H.D.M, MATIAS E.F.F, SANTOS K.K.A, SANTOS F.A.V, MORAIS-BRAGA M.F.B, SOUZA T.M. Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Croton campestris* A. and *Ocimum gratissimum* L. **Biomédica**, v. 31, n. 4, p. 608-612, 2011.

CUNHA LIMA S.T, RODRIGUES E.D, ALVES C., MERRIGAN T.L, MELO T, GUEDES M.L.S. The use of medicinal plants by an indigenous Pataxó community in NE Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 84-91, 2012.

CVEJIĆ, D. SCHNEIDER, C., NEETHLING, W., HELLMANN, K., LIEBENBERG, J., NAVARRO, C. The sustained speed of kill of ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) and fleas (*Ctenocephalides felis felis*) on dogs by a spot-on combination of fipronil and permethrin (Effitix®) compared with oral afoxolaner (NexGard®). **Veterinary Parasitology**, v. 243, n. June, p. 52–57, 2017.

DAHM, J. R., BAILEY, J. B., KELLY, R. F., CHIKUNGWA, P., CHULU, J., JUNIOR, L. C., SARGISON, N. D. Risk factors associated with *Ctenocephalides felis*

flea infestation of peri-urban goats: a neglected parasite in an under-appreciated host. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 1, p. 1-11, 2021.

DANTAS-TORRES F. The brown dog tick, *R. sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, 152 (3-4): 173–185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2010.

DANTAS-TORRES, F. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* from the New and Old Worlds. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2013.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3, p. 173- 185, 2008.

DANTAS-TORRES, F., LATROFA, M. S., RAMOS, R. A. N., LIA, R. P., CAPELLI, G., PARISI, A. Biological compatibility between two temperate lineages of brown dog ticks, *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato). **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

DE MEDEIROS PM, LADIO AH, ALBUQUERQUE UP. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. **Journal of Ethnopharmacology**, 150(2):729-46, 2013.

DE MONTEIRO, C. M., MATORANO, R., DAEMON, E., CATUNDA-JUNIOR, F. E. A., CALMON, F., DE SOUZA SENRA, T., CARVALHO, M.G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v. 111, n. 3, p. 1295–1300, 2012.

DE OLIVEIRA, P. R., CALLIGARIS, I. B., ROMA, G. C., BECHARA, G. H., PIZANO, M. A., & MATHIAS, M. I. C. Potential of the insect growth regulator, fluazuron, in the control of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae): Determination of the LD95 and LD50. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 35-39, 2012.

DJEUSSI DE, NOUMEDEM JAK, SEUKEP JA, FANKAM AG, VOUKENG IK, TANKEO SB, Antibacterial activities of selected edible plants extracts against

multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 13, 2013.

DOS SANTOS, G. C. M., ROSADO, L. H. G., ALVES, M. C. C., DE PAULA LIMA, I., FERREIRA, T. P., BORGES, D. A., CID, Y. P. Fipronil Tablets: Development and Pharmacokinetic Profile in Beagle Dogs. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 1, 2020.

DOS SANTOS, J. V. B., DE ALMEIDA CHAVES, D. S., DE SOUZA, M. A. A., RIGER, C. J., LAMBERT, M. M., CAMPOS, D. R., CID, Y. P. *In vitro* activity of essential oils against adult and immature stages of *Ctenocephalides felis felis*. **Parasitology**, v. 147, n. 3, p. 340-347, 2020.

DRUMMOND R.O., ERNST S.E., TREVINO J.L., GLADNEY W.J. & GRAHAM O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory tests of insecticides. **Jounal of Economic Entomology**, 66:130-133, 1973.

DRYDEN, M. W., PAYNE, P. A., SMITH, V., HEANEY, K., & SUN, F. Efficacy of indoxacarb applied to cats against the adult cat flea, *Ctenocephalides felis*, flea eggs and adult flea emergence. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2013.

DUARTE MCT, FIGUEIRA GM, SARTORATTO A, REHDER VLG, DELARMELINA C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 97(2):305-11, 2005.

DUARTE MCT, LEME EE, DELARMELINA C, SOARES AA, FIGUEIRA GM, SARTORATTO A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, 111(2):197-201, 2007.

ELLSE L., WALL R, The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. **Medical and veterinary Entomology**, v, 28:3, p. 233-243, 2014.

EMA – Prac-tic - Piriprol - Anexo I - Resumo das Características do Medicamento. Disponível em: [Prac-tic, INN-Piriprol \(europa.eu\)](https://practic.europa.eu/inn/piriprol/). Acessado em: 23/02/2022.

**ESCCAP Guideline 03 - Control of Ectoparasites in Dogs and Cats.** European Scientific Counsel Companion Animal Parasites, Sixth edition, 2022. Disponível em: [Guidelines | GL3: Control of Ectoparasites in Dogs and Cats | ESCCAP](https://www.esccap.org/guidelines/gl3-control-of-ectoparasites-in-dogs-and-cats/). Acessado em: 07/02/2022.

**ESCCAP Guideline 05 - Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats.** European Scientific Counsel Companion Animal Parasites, Third edition, 2019.

Disponível em: [Guidelines | GL5: Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats | ESCCAP](#). Acessado em: 07/02/2022.

**FAO. Resistance management and integrated parasite control in ruminants – guidelines, module 1 – Ticks: acaricide resistance: diagnosis, management and prevention.** Rome: Food and Agriculture Organization Animal Production and Health Division, 2004.

FÉLIX-SILVA, J., TOMAZ, I. M., SILVA, M. G., SANTOS, K. S. C. R., SILVA-JÚNIOR, A. A., CARVALHO, M. C. R. D., FERNANDES-PEDROSA, M. F.

Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, p. 548-555, 2012.

FERREIRA, T. P., CID, Y. P., CARDILO, M. A., DOS SANTOS, G. C. M., AVELAR, B. R., FREITAS, J. P., CHAVES, D. In vitro acaricidal activity of *Ocimum gratissimum* essential oil on *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma sculptum* and larvae. **Revista Virtual De Química**, 11, 1604-1613, 2019.

FICHI G., FLAMINI G., ZARALLI L.J, PERRUCCI S. Efficacy of an essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* against *Psoroptes cuniculi*. **Phytomedicine**, v. 14, Issues 2–3 , Pages 227-231, 2007.

FREITAS JP, JESUS ILR, CHAVES JKO, GISEN IS, CAMPOS DR, BAPTISTA DP, et al. Efficacy and residual effect of *Illicium verum* (star anise) and *Pelargonium graveolens* (rose geranium) essential oil on cat fleas *Ctenocephalides felis felis*. *Braz J Vet Parasitol* 2021; 30(4): e009321. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021088>.

GAD, M., AREF, S., ABDELHAMID, A., ELWASSIMY, M., & ABDEL-RAHEEM, S. (2021). Biologically active organic compounds as insect growth regulators (IGRs): introduction, mode of action, and some synthetic methods. **Current Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 393-412, 2021.

GAKUYA D.W, ITONGA S.M, MBARIA J.M, MUTHEE J.K, MUSAU J.K. Ethnobotanical survey of biopesticides and other medicinal plants traditionally used in Meru central district of Kenya. **Journal of Ethnopharmacol**, 145(2):547-53, 2013.

GENOVESE A. G., MCLEAN M. K., KHAN S.A. Adverse reactions from essential oil-containing natural flea products exempted from environmental protection agency regulations in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 22, p.470–475, 2012.

GRAF, J.F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today**, v. 9, n. 12, p. 471-474, 1993.

GRAY, J., DANTAS-TORRES, F., ESTRADA-PEÑA, A., LEVIN, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 171–180, 2013.

GUPTA, R. C.; ANADÓN, A. **Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles**. Academic press. Third Edition, p. 533–538, 2018.

HALOS, L; BEUGNET, F; CARDOSO, L; FARKAS, R; FRANC, M; GUILLOT, J; PFISTER, K; WALL, R. Flea control failure? Myths and realities. **Trends in Parasitology**, 30 (5), 228–233, 2014. doi:10.1016/j.pt.2014.02.007.

HORST, M. V. **Óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae no controle de *Colletotrichum Gloeosporioides*, *Elsinoë ampelina* e *Phytophthora infestans***. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Centro-Oeste. 2020.

HUANG, Y., HO, S. H., LEE, H. C., & YAP, Y. L. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch.(Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, 38(5), 403-412, 2002.

INSTITUTO PET BRASIL. REGULATÓRIO - PET. 2022. Disponível em: [Regulatório | Pet – Instituto Pet Brasil](http://www.pet.br/regulatorio/). Acessado em: 07/02/2022.

ISLAM, R.; LYNCH, J. W. Mechanism of action of the insecticides, lindane and fipronil, on glycine receptor chloride channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 8, p. 2707–2720, 2012.

JUNIOR, O. L. F., SAMPAIO, P. H., TEIXEIRA, P. P. M., ANDRÉ, M. R., & CADOLI, F. A. Resistência do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carapaticidas: revisão de literatura. **Nucleus Animalium**, v. 6, n. 1, p. 1, 2014.

KLAFKE, G. M., DE ALBUQUERQUE, T. A., MILLER, R. J., & SCHUMAKER, T. T. S. Selection of an ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 168, n. 1-2, p. 97-104, 2010.

KOC, S., OZ, E., AYDIN, L. & CETIN, H., Acaricidal activity of the essential oils from three Lamiaceae plant species on *Rhipicephalus turanicus* Pom. (Acari: Ixodidae), **Parasitology Research**, v.111, p.1863–1865, 2012.

LAMBERT, M. M., CHAVES, D. S. A., AVELAR, B. R., CAMPOS, D. R., BORGES, D. A., MOREIRA, L. O., PEREIRA, G. A., CID, Y. P., SCOTT, F. B., & COUMENDOUROS, K. (2021). *In vitro* evaluation of the acaricidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) essential oil and eugenol against non-fed larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 43, e002620. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm002620>.

LAMBERT, M. M.; CAMPOS, D. R.; BORGES, D. A.; DE AVELAR, B. R.; FERREIRA, T. P.; CID, Y. P.; BOYLAN, F.; SCOTT, F. B.; CHAVES, D.S.A; COUMENDOUROS, 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, p. 109126, 2020.

LIMA, R. K., CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. Farmanguinhos - **Revista Fitos** – v. 3, n. 3, 2007.

LINARDI, P. M.; SANTOS, J. L. C. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 345–354, 2012.

LITTLE, S. E. Lotilaner-a novel systemic tick and flea control product for dogs. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-3, 2017.

LUO, W.; DU, Z.; ZHENG, Y.; LIANG, X.; HUANG, G.; ZHANG, Q.; LIU, Z.; ZHANG, K.; ZHENG, X.; LIN, L.; ZHANG, L. Phytochemical composition and bioactivities of essential oils from six Lamiaceae species. **Industrial Crops and Products**, v. 133, p. 357-364, 2019.

MACCHIONI, F., PERRUCCI, S., CIONI, P., MORELLI, L., CASTILHO, P. & CECCHI, F., Composition and acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* essential oils against *Psoroptes cuniculi*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 111–114, 2006.

MADDURI, K., WALDRON, C., MATSUSHIMA, P., BROUGHTON, M. C., CRAWFORD, K., MERLO, D. J., BALTZ, R. H. Genes for the biosynthesis of spinosyns: applications for yield improvement in *Saccharopolyspora spinosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 399-402, 2001.

MAGALHÃES, J. Z., SANDINI, T. M., UDO, M. S. B., FUKUSHIMA, A. R., DE SOUZA SPINOSA, H. Fipronil: usos, características farmacológicas e toxicológicas.

**Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 11, n. 1, p. 67–83, 2018.

MAGI, E., JARVIS, T. & MILLER, I., Effects of different plant products against pig mange mites. **Acta Veterinaria Brno**, v.75, p.283–287, 2006.

MALEKI-RAVASAN, N., SOLHJOUY-FARD, S., BEAUCOURNU, J. C., LAUDISOIT, A., MOSTAFAVI, E. The Fleas (Siphonaptera) in Iran: Diversity, Host Range, and Medical Importance. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1–24, 2017.

MAMEDOV, N. Medicinal plants studies: history, challenges and prospective. **Medicinal Aromatic Plants**, v. 1, n. 8, p. e133, 2012.

MARCHIONDO, A. A., HOLDSWORTH, P. A., FOURIE, L. J., RUGG, D., HELLMANN, K., SNYDER, D. E., DRYDEN, M. W. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition: Guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestations on dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v. 194, n. 1, p. 84–97, 2013.

MARTÍNEZ-GORDILLO, M., BEDOLLA-GARCÍA, B., CORNEJO-TENORIO, G., FRAGOSO-MARTÍNEZ, I., GARCÍA-PEÑA, M. D. R., GONZÁLEZ-GALLEGOS, J. G., ZAMUDIO, S. Lamiaceae de México. **Botanical Sciences**, v. 95, n. 4, p. 780-806, 2017.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M., CASTILLO-HERRERA, G.A., ROSARIO-CRUZ, R., FLORES-FERNANDEZ, J.M., LOPEZ-RAMIREZ, J., HERNANDEZ-GUTIERREZ, R. & LUGO-CERVANTES, E.D., Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.108, p.481–487, 2011.

MARTINS, J. R., ALVARENGA, A. A. D., CASTRO, E. M. D., SILVA, A. P. O. D., & ALVES, E. Teores de pigmentos fotossintéticos e estrutura de cloroplastos de Alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, 40(1), 64-69, 2010.

MATASYOH L.G, MATASYOH J.C, WACHIRA F.N, KINYUA M.G, THAIRU MUIGAI A.W, MUKIAMA T.K. Antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum*

gratissimum L. from different populations of Kenya. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 5(2):187-93, 2008.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monografia da espécie *Ocimum gratissimum* L. (ALFAVACA)**. Brasília, 2015.

MOREY R.A, KHANDAGLE A.J. **Parasitol Res**, 111: 1799, 2012.

NA, Y.E., KIM, S.I., BANG, H.S., KIM, B.S. & AHN, Y.J. Fumigant toxicity of *cassia* and *cinnamon* oils and *cinnamaldehyde* and structurally related compounds to *Dermanyssus gallinae* (Acari: *Dermanyssidae*), **Veterinary Parasitology**, v.178, p. 324–329, 2011.

NAKAMURA, Celso Vataru et al. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 5, p. 675 678, 1999.

NAPOLI, E. BRIANTI, E., FALSONE, L., GAGLIO, G., FOIT, S., ABRAMO, F., OTRANTO, D. Development of *Acanthocheilonema reconditum* (Spirurida, Onchocercidae) in the cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera, Pulicidae). **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1718-1725, 2014.

NAVA, S., BEATI, L., VENZAL, J. M., LABRUNA, M. B., SZABÓ, M. P., PETNEY, T., ESTRADA-PEÑA, A. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1573-1585, 2018.

NAVA, S.; ESTRADA-PEÑA, A.; PETNEY, T.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J.; VENZAL, J.M.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONEA, A.A. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1- 2, p. 2-8, 2015.

NAVARRETE, A.; WALLRAF, S.; MATO, R. B.; COCERO, M. J. Improvement of Essential Oil Steam Distillation by Microwave Pretreatment. **I&EC Research**, v. 50, p. 4667-4671, 2011.

NGASSOUM M.B., ESSIA-NGANG J.J., TATSADJIEU L.N., JIROVETZ L., BUCHBAUER G., ADJOUDJI O. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. **Fitoterapia**, 74(3):284-7, 2003.

NGUEFACK J, BUDDE B.B, JAKOBSEN M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology** 4;39(5):395-400, 2004.

NICHOLSON, W. L., SONENSHINE, D. E., NODEN, B. H., & BROWN, R. N. Ticks (Ixodida). **Medical and veterinary entomology**, Academic Press, p. 603-672, 2019.

NOVATO, T.; GOMES, G. A.; ZERINGÓTA, V.; FRANCO, C. T.; DE OLIVEIRA, D. R.; MELO, D.; DE CARVALHO, M. G.; DAEMON, E.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M. In vitro assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 260, p. 1-4, 2018.

OLIVEIRA, I. M. S., DO CARMO, I. B., CRUZ, J. H. S., DOS SANTOS, M. J., DE FARIAS. A importância dos endoparasiticidas e ectoparasiticidas em animais domésticos - Revisão. **Revista Pubvet**, v. 11, n. 3, p. 281–284, 2017.

OLIVEIRA, J. C. P., OLIVEIRA, W. S. M., BRITO, R. S., LIMA, T. A. R. F., GIANNELLI, A., CARVALHO, G. A., RAMOS, R. A. N. Ectoparasites infesting animals living in close contact with human beings: a real trouble for One Health perspective? **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, p. 55-61, 2021.

OTRANTO, D., DANTAS-TORRES, F., TARALLO, V. D., DO NASCIMENTO RAMOS, R. A., STANNECK, D., BANETH, G. DE CAPRARIIS, D. Apparent tick paralysis by *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3–4, p. 325–329, 2012.

OTRANTO, Domenico. NEXGARD®. Afoxolaner, a new oral insecticide-acaricide to control fleas and ticks in dogs. Editorial. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 3-4, p. 177-178, 2014.

PAROLA, P. *Rickettsia felis*: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in sub-Saharan Africa. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 7, p. 996–1000, 2011.

PEREIRA C.A.M, MAIA J.F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum L.*). **Food Science and Technology**, v. 27, n. 3, p. 624-632, 2007.

PFISTER, K. ARMSTRONG, R. Systemically and cutaneously distributed ectoparasiticides: a review of the efficacy against ticks and fleas on dogs. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2016.

PINHEIRO, A. L. Produção de óleos Essenciais, Viçosa: CPT, 2003.

QUEIROZ, L. G.; SILVA, D. C.V.R. Inseticidas Neonicotinóides: uma ameaça aos corpos hídricos brasileiros. **RECURSO ÁGUA**, p. 11. 2021. doi.org/10.4322/978-65-86819-07-6-01.

RECK, J., KLAFFE, G. M., WEBSTER, A., DALL'AGNOL, B., SCHEFFER, R., SOUZA, U. A., DE SOUZA MARTINS, J. R First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1–2, p. 128–136, 2014.

REMNANT, E. J., MORTON, C. J., DABORN, P. J., LUMB, C., YANG, Y. T., NG, H. L., BATTERHAM, P. The role of Rdl in resistance to phenylpyrazoles in *Drosophila melanogaster*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 54, p. 11-21, 2014.

RENNOLL, S. A., RENNOLL-BANKERT, K. E., GUILLOTTE, M. L., LEHMAN, S. S., DRISCOLL, T. P., BEIER-SEXTON, M., AZAD, A. F. The cat flea (*Ctenocephalides felis*) immune deficiency signaling pathway regulates *Rickettsia typhi* infection. **Infection and immunity**, v. 86, n. 1, p. e00562-17, 2018.

*Rev. Virtual Quim.*, 2019, 11 (5), 1604-1613. Data de publicação na Web: 29 de outubro de 2019.

RODRIGUES, L. E. A. Reflexões sobre o metabolismo biossintético das piretrinas I e II - Revisão e sugestões. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 20, 2010.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I., BOLIO-GONZÁLEZ, M. E., ROSADO-AGUILAR, J. A., GUITÉRREZ-RUÍZ, E., TORRES-ACOSTA, F., ORTEGA-PACHECO, A.,

AGUILAR-CABALLERO, A. Uso de isoxazolinas: alternativa para control de pulgas, ácaros y garrapatas en perros y gatos. **Bioagrociências**, v. 12, n. 2, 2020.

ROMERO, A., RAMOS, E., ARES, I., CASTELLANO, V., MARTÍNEZ, M., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R., MARTÍNEZ, M. A. Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. **Toxicology Letters**, v. 252, p. 42–49, 2016.

RUST, M. K. The biology and ecology of cat fleas and advancements in their pest management: a review. **Insects**, v. 8, n. 4, p. 118, 2017.

RUST, M. K.; LANCE, W.; HEMSARTH, H. Synergism of the IGRs methoprene and pyriproxyfen against larval cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 3, p. 629-633, 2016.

RUST, Michael K. Recent advancements in the control of cat fleas. **Insects**, v. 11, n. 10, p. 668, 2020. <https://doi.org/10.3390/insects11100668>.

SÁNCHEZ-MONTES, S., SALCEDA-SÁNCHEZ, B., BERMÚDEZ, S. E., AGUILAR-TIPACAMÚ, G., BALLADOS-GONZÁLEZ, G. G., HUERTA, H., COLUNGA-SALAS, P. *Rhipicephalus sanguineus* Complex in the Americas: Systematic, Genetic Diversity, and Geographic Insights. **Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1118, 2021.

SARTOR, R. B. Modelagem, Simulação e Otimização de uma Unidade Industrial de Extração de Óleos Essenciais por Arraste a Vapor. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos). Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

SCOTT, F. B.; MARTINS, I. V. F.; SOUZA, C. P.; CORREIA, T. R. Aspectos gerais do controle da pulga *Ctenocephalides felis felis* em cães. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.13-18, 2002.

SERAFINI, L.A.; SANTOS, A.C.A.; TOUGUINHA, L.A.; AGOSTINI, G.; DALFOVO, V. Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. **Caxias do Sul: EDUCS**, 2002.

SHAKYA, M., SIKRODIA, R., PARTHASARATHI, B. C., JAYRAW, A. K., SINGH, M., DEEPAK UPADHAYA, F. A., KUMAR, S. Cat flea (*Ctenocephalides felis felis*) and Oriental cat flea (*Ctenocephalides orientis*) infestation as emerging nuisance to

human population. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 7, n. 2, p. 190-192, 2019.

SILVA, M. G. F.; Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjericão (*Ocimum basilicum* L.). Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Química – Bacharelado em Química Industrial/Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

SINDAN. Sindicato Nacional da Industria de Produtos para Saúde Animal. Mercado Veterinário por Espécie Animal e Classe Terapêuticas. Disponível em: [Apresentação do PowerPoint \(sindan.org.br\)](https://apresentacao.sindan.org.br/). Acessado em: 08/02/2022.

SPARKS, T. C., DRIPPS, J. E., WATSON, G. B., PAROONAGIAN, D. Resistance and cross-resistance to the spinosyns—a review and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 1, p. 1-10, 2012.

STATISTA. Number of dogs and cats kept as pets worldwide in 2018. The Statistics Portal, 2022. Disponível em: [• Dog and cat pet population worldwide 2018 | Statista](https://www.statista.com/statistics/272903/global-number-of-dogs-and-cats-kept-as-pets/). Acessado em: 08/02/2022. (a)

STATISTA. Number of pet animals in Europe in 2020, by animal type. The Statistics Portal, 2022. Disponível em: [• European pet population 2020, by animal | Statista](https://www.statista.com/statistics/272903/european-pet-population-2020-by-animal/). Acessado em: 08/02/2022. (b)

STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 53, n. 3, p. 563–578, 1962.

SU, LI-CHONG; HUANG, CHIN-GI; CHANG, SHANG-TZEN; YANG, SHU-HUI; HSU, SHAN-HUI; WUA, WEN-JER; HUANG, RONG-NAN, An improved bioassay facilitates the screening of repellents against cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae), **Pest Management Science**, v.70, p. 264–270, 2014.

TATIBANA, L. S., COSTA-VAL, A. P. Relação homem-animal de companhia e o papel do médico veterinário. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**, n. 103. 2009.

TAVARES, R. B., DE ALMEIDA, G. P. S., CHAVES, J. K. O., CAMPOS, D. R., CORREIA, T. R. Influence of the age of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera, Pulicidae) adults on the response to fipronil in in vitro testing. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 42 p. 1–5, 2020.

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

THOMPSON, David C.; BARHOUMI, Rola; BURGHARDT, Robert C. Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 149, n. 1, p. 55-63, 1998.

VAN DEN DOOL, H. AND DEC. KRATZ, P. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas—Liquid Partition Chromatography. **Journal of Chromatography A**, 11, 463-471, 1963.

VIEGAS-JÚNIO, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, 26 (3): 390-400, 2003.

WANG, K., VASYLIEVA, N., WAN, D., EADS, D. A., YANG, J., TRETTON, T., XU, T. Quantitative Detection of Fipronil and Fipronil-Sulfone in Sera of Black-Tailed Prairie Dogs and Rats after Oral Exposure to Fipronil by Camel Single-Domain Antibody-Based Immunoassays. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 2, p. 1532–1540, 2019.

YANO, B. L., BOND, D. M., NOVILLA, M. N., MCFADDEN, L. G., REASOR, M. J. Spinosad insecticide: subchronic and chronic toxicity and lack of carcinogenicity in Fischer 344 rats. **Toxicological Sciences**, v. 65, n. 2, p. 288-298, 2002.

ZARDO, V.I.L., PEREIRA, M.L. Segurança, eficácia e praticidade dos ectoparasiticidas para pulgas e carrapatos de cães e gatos. Revisão em clínica médica de pequenos animais, **Investigaçāo**, v. 18, n. 4, p. 22–31, 2019.

ZARIDAH, M.Z., NOR AZAH, M.A., ABU SAID, A. AND MOHD. FARIDZ, Z.P. Larvicidal properties of *citronellal* and *Cymbopogon nardus* essential oils from two different localities. **Tropical Biomedicine**, 20,169–174, 2003.

ZHANG, Y., NIE, Y., DENG, Y. P., LIU, G. H., FU, Y. T. The complete mitochondrial genome sequences of the cat flea *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) support the hypothesis that *C. felis* isolates from China and USA were the same *C. f. felis* subspecies. **Acta Tropica**, v. 217, 2021.

ZHAO, X., YEH, J. Z., SALGADO, V. L., NARAHASHI, T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach

neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.