

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Atividade do Triflumuron, Diflubenzuron, e sua Associação no Controle de  
*Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera, Pulicidae)**

**Ramon da Luz Bezerra**

**2023**



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

**ATIVIDADE DO TRIFLUMURON, DIFLUBENZURON, E SUA  
ASSOCIAÇÃO NO CONTROLE DE *Ctenocephalides felis felis*  
(SIPHONAPTERA, PULICIDAE)**

**RAMON DA LUZ BEZERRA**

*sob a orientação da Professora*  
**Thaís Ribeiro Correia Azevedo**

*sob a coorientação de*  
**Diefrey Ribeiro Campos**

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

Seropédica, RJ  
Setembro de 2023

## Ficha catalografica

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

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

574a Bezerra, Ramon da Luz, 1995-  
Atividade do Triflumuron, Diflubenzuron, e sua  
Associação no Controle de Ctenocephalides felis felis  
(Siphonaptera, Pulicidae) / Ramon da Luz Bezerra. -  
Rio de Janeiro, 2023.  
31 f.: il.

Orientadora: Thais Ribeiro Correia Azevedo.  
Coorientador: Diefrey Ribeiro Campos.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em  
Ciências Veterinárias, 2023.

1. Controle. 2. Ectoparasita. 3. Pulga. 4.  
Parasitologia. 5. Reguladores de Crescimento. I.  
Ribeiro Correia Azevedo, Thais , 1978-, orient. II.  
Ribeiro Campos, Diefrey , -, coorient. III  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. IV.  
Título.



ATA Nº 4128 / 2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.065992/2023-48

Seropédica-RJ, 29 de setembro de 2023.

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

**RAMON DA LUZ BEZERRA**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/09/2023

*(Assinado digitalmente em 29/09/2023 21:04 )*

THAIS RIBEIRO CORREIA AZEVEDO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matrícula: 2929889

*(Assinado digitalmente em 29/09/2023 16:58 )*

YARA PELUSO CID  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)  
Matrícula: 1700427

*(Assinado digitalmente em 18/10/2023 11:22 )*

ISABELLA VILHENA FREIRE MARTINS  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 069.394.547-80

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp>  
informando seu número: **4128**, ano: **2023**, tipo: **ATA**, data de emissão: **29/09/2023** e o código  
de verificação: **c0c8410fd6**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e saúde para trilhar esse caminho todo. Por toda sua proteção e cuidados. Também agradeço a minha Mãe, que sempre priorizou minha educação, não medindo esforços. Sempre me apoiando e fazendo de tudo para o meu bem. A senhora sempre foi um grande porto seguro para mim.

Ao meu irmão, que sempre esteve disposto a me ajudar, com ações e com palavras. Sempre foi uma expiração profissional e pessoal para mim.

A minha orientadora Thaís Ribeiro Correia Azevedo, por ter aceitado me orientar e aberto essa porta para realização de um sonho. Sempre tão solícita e presente. Uma pessoa abençoada, de braço amigo, amparo e amizade. A ti desejo todo o sucesso e carinho.

Ao meu coorientador Diefrey Ribeiro Campos, pelos ensinamentos e ajuda no meu trabalho e na minha vida no laboratório.

Também agradeço a todos do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), que sempre tornaram a minha jornada mais feliz e tranquila. Agradeço a Clara Dutra, Anna Julia Bessa, Guilherme Barros, Gustavo Álvaro, Eduardo Melo, Vinicius Monteiro, Ingrid e Carlos Augusto. E ao professor Fábio Scott que sempre luta por todos nós, fazendo do nosso laboratório uma grande equipe.

Agradeço a Fundação de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (FAPUR) pelo fomento.

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

## **BIOGRAFIA**

Ramon da Luz Bezerra nasceu em Paracambi, Rio de Janeiro, no dia 13 de julho de 1995, filho de Maristela da Luz Bezerra. Em 2021, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estácio de Sá. Neste mesmo ano, trabalhou em clínicas veterinárias no Rio de Janeiro. Durante a graduação, foi monitor na disciplina de Histologia e participou da fundação da Liga de Pequenos Animais. Em outubro de 2021, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em nível de Mestrado.

## RESUMO

BEZERRA, Ramon da Luz. **Atividade do Triflumuron, Diflubenzuron, e sua Associação no Controle de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera, Pulicidae)**. 2023. 48p. Dissertação (Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2023.

A pulga do gato, conhecida como *Ctenocephalides felis felis*, representa o principal ectoparasito encontrado em cães e gatos domésticos em todo o mundo. Esses insetos desempenham um papel fundamental como vetores de importantes agentes patogênicos, e a saliva deles pode desencadear dermatite alérgica por picada de pulga. Os reguladores de crescimento de insetos, são amplamente empregados em estratégias de controle e suas combinações demonstram ser promissoras para o desenvolvimento de novas formulações. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade do diflubenzuron e triflumuron, estimar as concentrações letais (CL) e avaliar a associação destes dois reguladores para as formas imaturas de *C. felis felis*. No presente estudo foram testadas *in vitro*, larvas de *C. felis felis* de primeiro instar em dois gramas de dieta larval impregnada com diflubenzuron e triflumuron em diferentes concentrações de para ambos os compostos. Após a impregnação, avaliou-se tanto a evolução do ciclo e como a emergência dos adultos desafiados no dia 28 após a impregnação. Observou-se uma atividade reguladora de 97,9% na concentração 5 ppm (5 µg/g) de diflubenzuron em larvas de 1º instar e de 100 % na concentração 10 ppm (10 µg/g) de triflumuron. As concentrações letais 50 para larvas foram de 0,370 ppm (0,370 µg/g) para diflubenzuron e de 3,45 ppm (3,45 µg/g) para triflumuron. Com bases nesses resultados, pôde se afirmar que essas benzoilfenilureias obtiveram atividade sobre as larvas de *C. felis felis* interferindo em seu ciclo de desenvolvimento, apresentando um efeito inibidor de emergência de adultos. Contudo, esses reguladores de crescimento não apresentaram o efeito sinérgico no controle de *C. felis felis*.

**Palavras-chave:** larvas; controle; disruptores de desenvolvimento; benzoilfenilureias.

## ABSTRACT

BEZERRA, Ramon da Luz. **Activity of triflumuron, diflubenzuron and association in the control of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera, Pulicidae).** 2023. 48p. Dissertation (Veterinary Science). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2023.

The cat flea, known as *Ctenocephalides felis felis*, is the main ectoparasite found on domestic dogs and cats worldwide. These insects play a key role as vectors for important pathogens, and their saliva can trigger flea-bite allergic dermatitis. Insect growth regulators are widely used in control strategies and their combinations show promise for the development of new formulations. The aim of this study was to evaluate the activity of diflubenzuron and triflumuron, to calculate the estimated lethal concentrations (LC) and to evaluate the combination of these two regulators for immature forms of *C. felis felis*. In this study, first-stage *C. felis felis* larvae were tested in vitro on two grams of larval diet impregnated with diflubenzuron and triflumuron. After impregnation, the cycle was evaluated and the emergence of the challenged adults on day 28. A regulatory activity of 97.9% was observed at a concentration of 5 ppm (5 µg/g) of diflubenzuron in 1st instar larvae and 100 % at a concentration of 10 ppm (10 µg/g) of triflumuron. The lethal concentrations 50 for 1st instar larvae were 0.370 ppm (0.370 µg/g) for diflubenzuron and 3.45 ppm (3.45 µg/g) for Triflumuron. Based on these results, it can be said that these benzoylphenylureas were active on *C. felis felis* larvae, interfering in their development cycle and inhibiting the emergence of adults. However, these growth regulators did not have a synergistic effect on the control of *C. felis felis*.

**Keyword:** larvae; control; developmental disruptors; benzoylphenylureas.



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Estrutura química do Diflubenzuron.....                                                                                                                                                               | 14 |
| <b>Figura 2:</b> Estrutura química do Triflumuron.....                                                                                                                                                                 | 14 |
| <b>Figura 3:</b> A) Coleta das larvas de 1º instar B) Placas com meio impregnado com ativo que serão incubadas C) Recipientes usados para a impregnação do meio D) Lupa e luminária utilizada para a contagem dos..... | 17 |
| <b>Figura 4:</b> Larvas (A) e pupa (B) de <i>Ctenocephalides felis</i> no meio impregnado por diflubenzuron na concentração 1 ppm.....                                                                                 | 20 |
| <b>Figura 5:</b> Adulto recuperado após a exposição ao diflubenzuron na concentração 1 ppm.....                                                                                                                        | 21 |
| <b>Figura 6:</b> Pupário de <i>Ctenocephalides felis felis</i> visualizado no dia 14 pós exposição ao triflumuron 5 ppm.....                                                                                           | 24 |
| <b>Figura 7:</b> Adultos recuperados após a exposição de larvas de primeiro instar de <i>Ctenocephalides felis</i> ao sinergismo do triflumuron com o diflubenzuron.....                                               | 28 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |                                               |
|---------|-----------------------------------------------|
| 16SrDNA | -SEQUÊNCIA                                    |
| AHJ     | -ANÁLOGOS DO HORMÔNIO JUVENIL DE ARTRÓPODES   |
| BHC     | -HEXACLORETO DE BENZENO                       |
| BOD     | -CÂMARA INCUBADORA B.O.D                      |
| BPU     | -BENZOFENIL UREIA                             |
| cox1    | -SEQUÊNCIA DE CITOCROMO E OXYDASE             |
| cox2    | -SEQUÊNCIA DE CITOCROMO E OXYDASE             |
| DCJW    | -METABOLITO                                   |
| DDT     | -DICLORODIETILTRICLOROETANO                   |
| DMSO    | -DIMETILSULFÓXIDO                             |
| GABA    | -ÁCIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO                    |
| IGRs    | -REGULADOR DE CRESCIMENTO DE INSETOS          |
| ISQ     | -INIBIDORES DA SINTESE DE QUITINA             |
| ITS1    | -NUCLEOTÍDEO REGIÃO RIBOSSOMAL 18 S E 5.8S    |
| ITS2    | -NUCLEOTÍDEO DA REGIÃO RIBOSSOMAL 18 S E 5.8S |
| kkv     | -GENE                                         |
| MPI     | -MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS                   |
| Ppm     | -Parte por milhão                             |
| RH      | -Umidade Relativa                             |
| SSR     | -MICROSSÁTELITES                              |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Dados de recuperação de <i>Ctenocephalides felis felis</i> após submissão de larvas de primeiro ínstar à diferentes concentrações de Diflubenzuron, e posterior cálculo de eficácia, média de pulgas mortas e taxa de mortalidade..... | 21 |
| <b>Tabela 2.</b> Concentrações letais do diflubenzuron a partir do desafio de larvas de primeiro ínstar de <i>Ctenocephalides felis</i> .....                                                                                                           | 23 |
| <b>Tabela 3.</b> Larvas de primeiro ínstar de <i>Ctenocephalides felis felis</i> submetidas e diferentes concentrações de Triflumuron e recuperação de formas adultas.....                                                                              | 25 |
| <b>Tabela 4.</b> Estimativa das concentrações letais de triflumuron para <i>Ctenocephalides felis felis</i> .....                                                                                                                                       | 26 |
| <b>Tabela 5.</b> Larvas de primeiro ínstar de <i>Ctenocephalides felis felis</i> submetidas e diferentes concentrações de Triflumuron e Diflubenzuron de forma isolada e também de forma associada.....                                                 | 27 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                                                       | 1  |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>                                                                            | 3  |
| 2.1 Biologia e Importância de <i>Ctenocephalides felis</i>                                                | 3  |
| 2.2 Controle de <i>Ctenocephalides felis felis</i>                                                        | 6  |
| 2.3 Organoclorados, Carbamatos e Organofosforados                                                         | 7  |
| 2.4 Fenilpirazoles                                                                                        | 8  |
| 2.5 Piretrinas e Piretroides                                                                              | 8  |
| 2.6 Semicarbazona                                                                                         | 9  |
| 2.7 Oxadiazinas                                                                                           | 9  |
| 2.8 Espinosinas                                                                                           | 10 |
| 2.9 Neonicotinóides                                                                                       | 10 |
| 2.10 Isoxazolinás                                                                                         | 11 |
| 2.11 Reguladores de crescimento de insetos/disruptores de desenvolvimento de insetos                      | 11 |
| 2.12 Benzoilfenilureias                                                                                   | 13 |
| <b>4METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE PULICIDA EM PULGAS em pulgas</b>                             | 24 |
| 4.2 Efeitos ovicidas em pulgas                                                                            | 25 |
| 4.3 Efeitos larvídias em pulgas                                                                           | 26 |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                               | 16 |
| 4.1 Local de Experimentação                                                                               | 27 |
| 4.2 Obtenção de <i>Ctenocephalides felis felis</i>                                                        | 27 |
| 4.3 Ativos                                                                                                | 27 |
| 4.4 Determinação de Concentração Letal 50 e 90 para Formas Imaturas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> | 27 |
| 4.5 Avaliação do Desenvolvimento das Larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i>                         | 28 |
| 4.6 Avaliação da Atividade Sinérgica entre Diflubenzuron e Triflumuron                                    | 28 |
| 4.7 Análise de Dados                                                                                      | 28 |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                           | 30 |
| 5.1 Avaliação do Diflubenzuron sobre Larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i>                         | 33 |
| 5.2 Atividade do Triflumuron sobre Larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i>                           | 33 |
| 5.3 Atividade da sinérgico entre Diflubenzuron e Triflumuron sobre <i>Ctenocephalides felis felis</i>     | 34 |
| <b>6 CONCLUSÃO</b>                                                                                        | 37 |
| <b>7CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>                                                                              | 38 |
| <b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                       | 39 |

## 1 INTRODUÇÃO

A estreita relação entre seres humanos e animais de estimação, como cães e gatos, que muitas vezes são considerados parte da família. Essa proximidade entre humanos e animais de estimação torna crucial cuidar da saúde desses animais, já que várias doenças podem ser transmitidas entre eles e os humanos. Muitas dessas doenças são propagadas por vetores artrópodes, sendo as pulgas os principais ectoparasitos de cães, gatos e outros animais em todo o mundo.

A espécie *Ctenocephalides felis felis*, conhecida como a pulga do gato, é um ectoparasito comum e relevante nesse contexto. No ciclo de vida das pulgas, apenas os adultos parasitam os hospedeiros e as formas imaturas se desenvolvem no ambiente.

Muitas espécies de pulgas atuam como vetores de doenças, incluindo aquelas que causam a peste, o tifo murino, a doença da arranhadura do gato e outras. As pulgas também são responsáveis por causar dermatite alérgica, uma doença imunológica desencadeada pela sensibilidade do hospedeiro às substâncias salivares das pulgas durante a alimentação.

Nos Estados Unidos, são gastos 15 bilhões de dólares anualmente para proteger animais de estimação contra pulgas, e os produtos para controle de pulgas representam uma parte significativa do mercado de medicamentos para animais de estimação em todo o mundo (Rust, 2017).

Nos últimos anos, houve uma mudança no foco da pesquisa e desenvolvimento de produtos para o tratamento das pulgas. Atualmente os fármacos utilizados para o controle são majoritariamente formulações tópicas e orais. Agora, o objetivo é tratar os animais com produtos que atuem nos estágios adultos das pulgas e interrompam seu ciclo de vida, eliminando a necessidade de tratamentos ambientais com inseticidas. Porém entende-se que o uso de mais de uma medida melhora o controle das populações globais e limita o risco da emergência de resistência.

Os reguladores de crescimento de insetos (IGRs) desempenham um papel importante nesse novo enfoque, pois interrompem o desenvolvimento das pulgas em seus estágios imaturos, impedindo assim a reprodução desses parasitas. A sensibilidade vista dos estágios imaturos frente a atividade residual dos reguladores de crescimento nos permite tratar lugares onde o desenvolvimento larval ocorre, e com isso interromper o ciclo biológico da pulga.

A atividade das benzoilfeniluréias (BPUs) no desenvolvimento dos artrópodes e o potencial controle em numerosas pragas foi descoberto nos anos 1970. O diflubenzuron foi o primeiro composto desenvolvido e subsequentemente outros foram descobertos e introduzidos no controle de diversos artrópodes, tais quais o triflumuron, o fluazuron e o novaluron. Elas apresentaram uma interessante atividade na interferência do ciclo biológico de diversos insetos.

Ultimamente têm se observado a resistência das pulgas a certos inseticidas como piretroides, organoclorados e carbamatos, o que justifica buscar nas combinações de produtos a prevenção dessa resistência, e o aumento da eficácia do controle de pulgas. O sinergismo tem se mostrado uma ferramenta útil, porém não há informações acerca da interação dos inseticidas supracitados em *Ctenocephalides felis felis*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* do triflumuron, do diflubenzuron e de sua associação sobre *Ctenocephalides felis felis* na interrupção do desenvolvimento de seu ciclo biológico de larva a adulto, estimar as concentrações letais e avaliar se há sinergismo quando associados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Biologia e Importância de *Ctenocephalides felis*

Pulgas são um dos principais ectoparasitos de cães, gatos, aves e roedores ao redor do mundo. Aproximadamente, 2525 espécies foram identificadas, 96% infestando mamíferos e 4% infestando aves (Rust, 2016), podendo também infestar humanos (Halos *et al.*, 2014). Pulgas são os principais insetos ectoparasitos em cães e gatos domésticos, com diferentes espécies sendo regularmente coletadas. Diversas espécies são importantes pelas doenças das quais transmitem especialmente algumas pertencentes ao gênero *Ctenocephalides*, *Pulex* e *Xenopylla*. A pulga do gato, *C. felis felis*, é a mais comum e importante subespécie (Rust, 2016). Em sua fase adulta, são parasitos hematófagos obrigatórios.

As pulgas que pertencem a Família Pulicidae são vetores competentes de diversos patógenos sendo algumas delas zoonóticas como *Yersinia pestis* (Peste), *Rickettsia typhi* (tifo murino), *Bartonella henselae* (doença da arranhadura do gato), *Rickettsia felis* (riquettsiose felina) e *Dipylidium caninum* (dilepidiose) (Beugnet ;Marié, 2009) . Também são responsáveis pela produção de dermatite alérgica, uma doença imunológica deflagrada pela hipersensibilidade produzida no hospedeiro devido a injeção de material antigênico das glândulas salivares das pulgas (Dryden; Rust, 1994).

Mais de 15 milhões de dólares são gastos anualmente na proteção dos animais de companhia contra as pulgas. Os parasitos representam 46% do mercado da saúde animal de companhia a nível mundial, sendo os ectoparasitoides o maior segmento. Nos EUA, cerca de 65% de todas as famílias têm animais de companhia, majoritariamente gatos e cães. As pulgas e carrapatos representam uma preocupação e um investimento considerável por parte do público no bem-estar dos seus animais de estimação. Em 2011, estima-se que foram gastos 2,4 mil milhões de dólares em antiparasitários para animais de companhia. Este mercado continua a crescer a uma taxa de crescimento anual composta de 5%. No entanto, os custos de desenvolver novos parasitoides são enormes e este será certamente um fator nos esforços contínuos esforços para desenvolver e registar parasitoides para pequenos animais (Rust, 2017).

Muitas revisões gerais sobre a biologia e características epidemiológicas de *C. felis* foram publicadas desde 1997. A espécie *C. felis* é uma praga global e o aquecimento global provavelmente não afetará a sua distribuição. Fatores como a baixa persistência da pulga do gato em ambientes externos, sua presença de criadouros internos, assim como ter um ciclo totalmente especializado com condições de humidade e temperatura específicas para seu desenvolvimento, sugerem que a distribuição da pulga do gato não mudará de forma drástica. No entanto, com o aumento da temperatura e o grande número de gerações por ano, a densidade populacional pode aumentar drasticamente (Rust, 2017).

Em uma perspectiva sistemática, por seis décadas permaneceram quatro subespécies de pulga, nomeadamente *C.felis damarensis*, *C.felis felis*, *C.felis orientis* e *C. felis strongylus*. As sequências de nucleotídeos ITS1 e ITS2 e a sequência de 16SrDNA permaneceram constante em populações em todo o mundo e os resultados não sustentaram uma subespécie de *C. felis*. Diversos microssatélites (SSR) foram identificados e podem ajudar a determinar se cepas específicas de *C. felis* existentes, a existência de subespécies e estudos epidemiológicos de *Rickettsia felis*. Sequências de citocromo C oxidase subunidade cox1 e cox2 indicaram que *C. felis felis* e *C. felis strongylus* são parafiléticos e *C. felis orientis* são monofiléticos. Três ramos distintos de *C. felis felis* foram encontrados. Estudos similares com subunidades cox1 e cox2 revelou que *C. felis felis* da Nova Zelândia pertencia ao ramo 1 como as da Austrália e da

Europa. Nenhuma variação intraespecífica foi encontrada no marcador ITS1 para 52 espécimes de *C. felis felis* analisadas de 17 localidades diferentes no sul dos EUA, sugerindo que um gargalo genético ou foram introduzidos recentemente. Populações de *C. felis felis* e *C. canis* da Espanha, Irã e África do Sul foram examinados e as sequências ITS1 conduzidas. Ambas as espécies foram claramente separadas (Rust, 2017).

Recentes esforços sistemáticos, incluindo técnicas moleculares, elevaram duas das subespécies a espécies completas, *C. damarensis* e *C. orientis*. *C. felis felis* foi encontrada apenas em gatos e cães enquanto *C. felis strongylus* foi encontrada em grandes animais em fazendas. Na África do Sul, *C. felis strongylus* foi coletada em gato selvagem e em cães domésticos em áreas rurais. Possivelmente, *C. felis strongylus* também será elevado ao status de espécie no futuro (Rust, 2017).

A relação de ectoparasito da pulga adulta para com seus hospedeiros varia largamente. Algumas espécies de pulgas permanecem em seus hospedeiros apenas tempo suficiente para se alimentar, algumas no seu estágio larval e algumas completam sua vida inteira no hospedeiro. Adultos aparentemente desenvolvem uma relação persistente com seus hospedeiros (Dryden; Rust, 1997).

A pulga *C. felis* é a espécie mais encontrada em infestações por todo o mundo. A sobrevivência de *C. felis* durante invernos em temperaturas climáticas do Norte é intrigante porque há uma aparente inabilidade de qualquer estágio de sobreviver a exposição a temperaturas abaixo de -1°C por mais de cinco dias. A sobrevivência e manutenção das populações de *C. felis* é provável que ocorra através de alguns mecanismos como a presença de adultos em cães e gatos domésticos e selvagens, presença de adultos em animais urbanos selvagens, desenvolvimento retardado dos estágios imaturos no subsolo protegido contra congelamento e o desenvolvimento retardado da pupa e adultos emergindo no ambiente doméstico. A larga gama de hospedeiros e habilidade *C. felis* em estabelecer população em logradouros humanos. Esses mecanismos permitiram que as pulgas se espalhassem com sucesso por todo o globo (Dryden; Rust, 1997).

Adultos de *C. felis* apresentam um ritmo circadiano com atividade máxima ocorrendo cerca de 9 horas na fase mais clara do dia. O acasalamento nunca ocorre fora do hospedeiro. As pulgas necessitam se alimentar continuamente para que o acasalamento e a inseminação ocorra.. Machos com dietas isentas de proteínas e alimentados com soluções salinas foram incapazes de inseminar fêmeas. Também a exposição das pulgas a temperatura corporal do hospedeiro e a quantidade de sangue ingerido foram dois fatores que influenciaram a inseminação. Apenas machos alimentados tentaram acasalar com fêmeas não alimentadas ou alimentadas. A maioria dos acasalamentos ocorreu a 38°C que é a temperatura corporal de gatos e cachorros. Interessantemente, um extrato de clorofórmio:metanol de fêmeas virgens parece conter um feromônio sexual. Uma fêmea de *C. felis* acasala com muitos machos (Rust, 2017).

Uma vez que o hospedeiro é adquirido *C. felis* inicia sua alimentação e o acasalamento ocorre entre 8-24 horas. Majoritariamente as fêmeas acasalam com 34 horas. A fêmea de *C. felis* inicia a postura de ovos entre 24-36 horas depois da sua primeira ingestão de sangue. Durante o pico da reprodução, na qual ocorre entre 4-9 dias do início da alimentação, as fêmeas aumentam em 140% o seu peso. Pulgas que iniciaram sua reprodução usualmente morrem entre 24-48 se removidas do hospedeiro. Quando o asseio do hospedeiro é restrito, *C. felis* pode soltar entre 40 e 50 ovos por dia durante o pico da reprodução, e 85 % das fêmeas e 58% dos machos permanecem no hospedeiro por pelo menos 50 dias. A reprodução pode continuar em um ritmo devagar por cerca de 100 dias (Rust, 1997).

A preparação do próprio hospedeiro desempenha um papel significativo na relação do ectoparasita com o hospedeiro. Gatos alojados em gaiolas metabólicas e que são permitidos a se escovarem, ingerem números substanciais de ovos em poucos dias. Sendo assim, a produção pode reduzir consideravelmente. Um estudo investigou a movimentação da pulga entre os

gatos. Quando dois gatos vivem juntos em uma gaiola com 0,4 m por sete dias, eles transferem apenas 8-15% da sua população de pulga para o outro. Apesar da possibilidade de uma transferência direta da pulga de um hospedeiro para o outro existir, é mais provável que em maior parte da causa de infestação seja adquirindo novas pulgas emergidas no ambiente (Rust, 1997).

## **2.2 Controle de *Ctenocephalides felis felis***

Diferentes métodos de controles podem ser utilizados para o controle da pulga do gato, podendo ser métodos físicos, que incluem a aspiração de formas involutivas no ambiente, biológicos, que inclui a utilização de esporos de fungos, e os métodos químicos (Rust, 2020). Os produtos químicos são os mais amplamente utilizados principalmente quando aplicados no próprio hospedeiro. Muitos compostos naturais e sintéticos são conhecidos para o controle de pulga. Incluindo formulações como sprays, coleiras, produtos pour-on, coleiras, shampoos e pós. A escolha do produto, é baseada em fatores como a espécie do animal, tipo do ambiente, se o animal vive no interior ou em ambiente exterior e frequência de banho do animal. Os principais objetivos do controle de pulgas são proporcionar um alívio do animal infestado de pulgas e evitar a reinfestação, interrompendo o ciclo biológico do artrópode (Marsella, 1999).

Tradicionalmente o controle de pulgas consiste em aplicar o produto no animal (onde os adultos residem) e produtos para utilizar no ambiente (onde ovos, larvas e pupas residem). Com as novas formulações, que agem mais rapidamente e são mais persistentes, tratar apenas o animal pode ser suficiente para controlar a infestação por pulgas. Porém isso é mais eficaz em um animal domiciliado se comparado a um animal que tenha acesso ao ambiente externo, que terá uma maior exposição às fases de vida das pulgas presentes no ambiente (Siak; Burrows, 2012). Diversos são os grupos químicos que podem ser utilizados no controle da pulga do gato, entre eles estão os organoclorados, carbamatos e organofosforados.

## **2.3 Organoclorados, Carbamatos e Organofosforados**

Os organoclorados são inseticidas à base de hidrocarboneto clorados que podem ser divididos, de acordo com a sua estrutura química, nos seguintes grupos: isômeros do hexacloreto de benzeno (BHC) como o lindane; ciclodienos, como aldrina, dieldrin, endrina, clordano, heptacloro e endosulfan; diclorodietiltricloroetano (DDT) e análogos como o metoxicloro, o dicofol e o clorobenzilato (sendo os dois últimos são utilizados principalmente como acaricidas até os tempos atuais) (Tordoir; Sittert, 1994). O mecanismo de ação do diclorodietiltricloroetano é causar uma inibição da condução de sódio ao longo das fibras nervosas sensoriais e motoras, mantendo os canais de sódio abertos, resultando em um atraso na repolarização da membrana axonal. Isso resulta em um nervo vulnerável a descargas repetitivas de pequenos estímulos que normalmente causam um potencial de ação em um neurônio totalmente repolarizado. Os ciclodienos agem inibindo o ácido gama -aminobutírico (GABA), estimulando o fluxo de íons cloro e interferindo no fluxo dos íons cálcio, resultando em uma despolarização parcial da membrana pós-sináptica e uma vulnerabilidade a descargas repetitivas (Taylor, 2001).

Os organofosforados e carbamatos partilham uma propriedade comum, ou seja, a inativação da acetilcolinesterase. Os organofosforados mimetizam a estrutura da acetilcolina e quando se liga a colinesterase, provocam a fosforilação da enzima. Com a colinesterase transforilada há uma incapacidade de degradação da acetilcolinesterase acumulada na membrana pós sináptica, levando a paralisia neuromuscular. Os carbamatos são anticolinesterásicos e causam um bloqueio espontaneamente reversível da enzima



acetilcolinesterase sem a possibilidade de alteração (Taylor, 2001). Coumafós e Propoxur são exemplos de organofosforado e carbamato ainda utilizados atualmente no controle de pulgas.

Os carbamatos, como o carbaril, e os organofosforados se mostraram pouco eficazes quando usados no controle de *C. felis*, devido a resistência encontrada (Rust, 2016).

## 2.4 Fenilpirazoles

O fipronil é um fenilpirazole inseticida/acaricida que atualmente é comercializado como spray a base de álcool 0,29% e como solução spot-on a 9,7% para o uso em cães e gatos (Dryden, 2009). Quimicamente, é um (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-[(trifluorometil)sulfinil]-1H-pirazol), amplamente utilizado na agricultura para o tratamento de solo e em revestimento de semente e no controle de ectoparasitos de animais de companhia e bovinos. Seu mecanismo de ação é a inibição de forma não competitiva o influxo de íons cloreto induzido pelo receptor GABA (Gupta; Anadón, 2018). A ativação deste receptor GABA, aumenta a concentração intraneuronal de íons cloreto hiperpolarizando o neurônio (Matus-Medel, 2011). Consequentemente, a ligação do fipronil bloqueia a ação inibitória dos GABA, conduzindo a hiperexcitação neural e em concentrações suficientes, paralisia e morte. O fipronil apresenta a mesma toxicidade em artrópodes e mamíferos pelo mesmo mecanismo, porém devido a ação seletiva, a toxicidade é muito maior em artrópodes se comparada a mamíferos (Gupta; Anadón, 2018).

Diferentes com formulações em spot-on demonstraram uma redução acima de 95% na contagem de pulgas vivas no animal, assim como também podendo prevenir novas infestações em até 8 semanas após o tratamento. (Dryden *et al.*, 2000; Dryden *et al.*, 2011; Kuzner *et al.*, 2013).

## 2.5 Piretrinas e Piretroides

Os piretroides sintéticos são mímicos dos piretros, compostos extraídos de flores de crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), sendo amplamente utilizados no controle químico para o combate de agentes biológicos que prejudicam a saúde pública e agropecuária. Quando contrastado a outras moléculas naturais, as estruturas químicas das piretrinas são mais simplórias e, ainda, por suas moléculas serem constituídas por duas subunidades estruturais, uma alcoólica e outra ácida, há a possibilidade de elaborações de sínteses menos abstrusa do que aquelas envolvendo moléculas complexas (Hirata, 1995). São biodegradáveis, não cumulativos e por sua estabilidade, causam menos frequentemente intoxicação em mamíferos comparado a outros inseticidas presentes no mercado, embora possam causar hipersensibilização e irritação das mucosas nesses animais (Palchick, 1996).

O mecanismo de ação dos piretróides em ectoparasitos, é o mesmo que nos mamíferos (Casaretti; Doull, 2008). Os piretroides mantém os canais de sódio abertos nas membranas dos neurônios, afetando o sistema nervoso periférico e central do inseto, estimulando a produção de descargas repetitivas pelas células nervosas, eventualmente, causando paralisia (Vale, 2007).

A deltametrina é utilizada em pó e em colares impregnados para controle de pulgas (Botelho, 2014; Eads; Biggings, 2019). O fluvalinato, ciflutrina, e a cipermetrina já foram testadas para o controle de pulgas adultas, sendo a ciflutrina a mais eficaz destas (Lemke, 1989).

A utilização de piretroides para controlar as pulgas de gato acabou por gerar resistência nesses insetos. Diversos fatores incluindo genéticos, biológicos e operacionais do uso desses produtos contribuíram para o surgimento dessa resistência (Rust, 2016). Porém, devido a sua ação repelente, os piretroides continuam no mercado ao serem associados a outros princípios ativos (Blagburn; Dryden, 2009).

## 2.6 Semicarbazonas

A metaflumizona tem atividade sobre insetos das ordens Siphonaptera, Diptera, Isopetera, Coleoptera, Hemiptera e Hymenoptera. Seu controle é duradouro em pulgas com uma única aplicação spot on. São derivados quimicamente dos bloqueadores dos canais de sódio do inseticida pirazolina, paralisando os insetos e bloqueando a atividade nervosa, interferindo nos canais de sódio dependentes de voltagem. Isso resulta em uma maior sensibilidade do nervo e também causam convulsões (Salgado; Hayashi, 2007).

No controle de *C. felis felis* a metaflumizona demonstrou eficácia maior que 95% para o controle de pulgas, porém sem ação repelente (Rugg; Hair, 2007).

## 2.7 Oxadiazinas

O indoxacarbe é um inseticida pertencente ao grupo das oxadiazinas com excelente atividade, contra uma vasta gama de pragas. Em insetos, ele é descarbometoxilado para o N-decarbometoxilado de Indoxacarbe (Shono *et al.*, 2004) e possui o indoxacarbe tem uma grande toxicidade em insetos e baixa mamíferos. Seu metabólito bloqueia os canais de sódio nos complexos neurais e em nervos isolados. Porém o mecanismo do indoxacarbe não é muito bem conhecido (Song *et al.*, 2006). Também apresentam uma boa atividade contra Lepidoptera, Homoptera e Coleoptera (Wing *et al.*, 2000).

O uso de indoxacarbe na formulação “spot on” foi eficiente no controle de *C. felis felis*. Reduzindo também a emergência dos adultos e a contagem dos ovos (Dryden *et al.*, 2013). Cães tratados com indoxacarbe tópico apresentam melhora significativa dos sinais clínicos observados na dermatite alérgica (Fisara *et al.*, 2014).

## 2.8 Espinosinas

As espinosinas são oriundas de um actinomiceto denominado *Saccharopolyspora spinosa*. As moléculas responsáveis pela atividade inseticida são identificadas como lactonas macrocíclicas. O spinosad foi o primeiro inseticida desta família a ser comercializado. São vantajosos pois são altamente seletivos para insetos quando comparados a de mamíferos (Moreira *et al.*, 2012). O spinosad é uma mistura de espinosinas A e D, compostos tetracíclicos-macrolídeos, derivados do fungo actinomiceto (Cisneros, 2002).

O spinosad é particularmente tóxico para Diptera e Lepidoptera (Cisneros, 2002). O mecanismo de ação deste ativo é o estímulo do receptor colinérgico, induzindo persistente ativação alostérica dos receptores nicotínicos de acetilcolina, resultando na morte dos insetos (Moreira *et al.*, 2012). O spinosad também age sobre os receptores GABA.

Comprimidos a base de spinosad têm sido usados no tratamento de pulgas em cães e gatos, reduzindo com eficácia as contagens nas populações de pulgas (Dryden *et al.*, 2017). O spinosad também diminui a contagem de ovos de pulgas (Blagburn *et al.*, 2010).

## 2.9 Neonicotinóides

A descoberta dos inseticidas neonicotinóides pode ser considerada um marco na pesquisa de agroquímicos. Atualmente os neonicotinóides representam a classe de inseticidas de crescimento mais rápido, desde a introdução e comercialização dos piretróides (Jeschke; Nauen, 2008). Os neonicotinóides têm uma vasta gama de aplicações em medicina veterinária e de proteção de culturas. Seus alvos moleculares são os receptores nicotínicos para acetilcolina em insetos, que medeiam a neurotransmissão colinérgica rápida. Neste grupo, estão inseridos nitenpiram, imidacloprida, dinotefuran, acetamiprida e tiametoxam (Matsuda *et al.*, 2020). A imidacloprida apresenta boa eficácia contra adultos e outras formas imaturas (Rust *et al.*, 2014). Ela vem sendo utilizada em colares e “spot on”, associada com outros ativos (Stanneck *et al.*, 2012).

## 2.10 Isoxazolinás

As isoxazolinás são uma nova classe de ectoparasiticidas com uma potente atividade inibitória sobre os canais de cloro ativados por glutamato e GABA localizados no sistema nervoso dos invertebrados. Nos últimos anos, vários estudos foram utilizados para avaliar a eficácia e a segurança das isoxazolinás contra pulgas, carrapatos e ácaros. Afoxolaner, fluralaner, sarolaner e lotilaner são membros das isoxazolinás, com potente ação inibitória envolvendo o GABA e canais de cloro de invertebrados e com grande margem de segurança para vertebrados. São comercializados em comprimidos orais (Tust, 2020; Zhou *et al.*, 2022).

Desta classe, o sarolaner se mostrou eficaz em cessar completamente na postura de ovos, e em ambientes infestados houve redução da contagem de pulgas adultas de 96% (Breitschwerdt *et al.*, 2016). As isoxazolinás foram comprovadamente atestadas como seguras para vertebrados (Palmieri *et al.*, 2020).

## 2.11 Reguladores de Crescimento de Insetos/Disruptores de Desenvolvimento de Insetos

Os reguladores de crescimento de insetos interferem no crescimento e desenvolvimento das pulgas, mas não possuem efeito nas pulgas adultas. Reduzem a infestação das pulgas, eliminando as fases de vida ambiental e assim, impedindo a reinfestação. São administrados com adulticidas no início do tratamento, pois há uma necessidade de controlar estes, antes do controle das fases ambientais. Os reguladores de crescimento podem ser divididos em duas categorias: inibidores da síntese de quitina (ISQ) e análogos do hormônio juvenil de artrópodes (AHJ) (Rust; Hemsath, 2016; Shipstone; Mason, 1995; Siak; Burrows, 2012).

Os reguladores de crescimento abrangem as benzofenilureias que tem como o lufenuron como seu principal representante. Ele inibe a síntese, polimerização e a deposição de quitina durante o desenvolvimento da pulga. As fêmeas que ingerem o lufenuron geram ovos inférteis (Siak; Burrows, 2012).

Os AHJ são representados pelo metoprene e piriproxifen. Com a descoberta da capacidade destes compostos em penetrar a cutícula dos insetos, inspiraram a ideia de usá-los como meios de controle. São amplamente utilizados como tratamentos tópicos para animais

domésticos e também utilizados no ambiente para controle de *Ctenocephalides felis*. São atrativos por possuírem uma pequena toxicidade em mamíferos, um mínimo impacto ambiental e fácil uso. A combinação destes, reduz em pelo menos um terço da quantidade exigida para proporcionar uma mortalidade eficaz do metopreno sozinho (Jindra; Bittova, 2019; Rust; Hemsarh, 2016).

O metopreno apresenta uma boa atividade ovicida, evitando assim a eclosão dos ovos de pulga, e possui excelente efeito larvicida (Palma *et al.*, 1993). Quando associado com o adulticida fipronil, apresenta um controle eficiente tanto no animal como no ambiente para diferentes formas evolutivas da pulga (Dryden *et al.*, 2011).

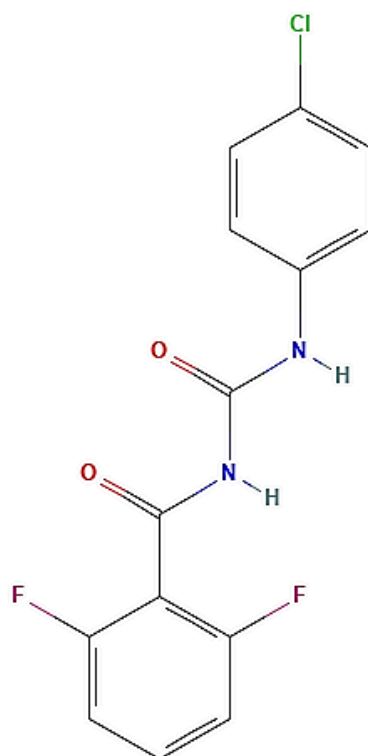
O piriproxifen apresenta uma ótima ação ovicida e larvicida. Larvas de primeiro estágio, quando expostas em um meio tratado com piriproxifen são bastantes susceptíveis E as pulgas adultas que se alimentam de sangue contendo esta regulador de crescimento morrem rapidamente (Meola *et al.*, 2000; Rust; Lance; Hemsarh, 2016). Apresenta uma boa eficácia quando associado com dinotefuran, permetrina, d-fenotrina e ciflutrina (Batista, 2013; Dryden *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2012).

O efeito disruptor das benzoilfenilureias (BFU) no desenvolvimento dos artrópodes e seu potencial para controlar diversas pragas foi descoberto no início da década de 1970. O diflubenzuron foi o primeiro composto desenvolvido e subsequentemente, foram descobertos e introduzidos numerosos análogos do diflubenzuron para o controle de pragas na agricultura, silvicultura, saúde pública e na saúde animal. Pouco tempo após sua descoberta, o mecanismo de ação molecular comum que age na síntese de quitina dos artrópodes foi amplamente investigado e progressivamente revelado. E isto resultou na sua alocação no grupo dos chamados inibidores da síntese de quitina (Chen *et al.*, 2013).

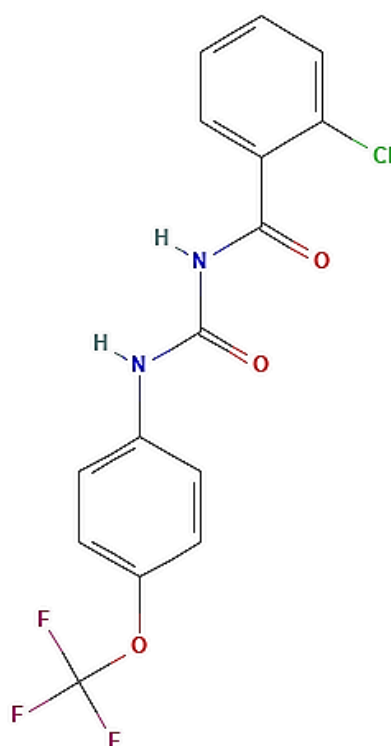
Antes da descoberta das BFU, já eram conhecidos outros disruptores de crescimento de insetos, principalmente os análogos da ecdisona e do hormônio juvenil, que não interferem com a síntese de quitina. Se comparado com outros praguicidas, as BFU, têm a vantagem significativa de atuarem sobre mecanismos fisiológicos e bioquímicos específicos dos artrópodes, que não existem nos vertebrados, que os tornam praticamente não tóxicos para mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes. Em contrapartida, a maior parte dos outros pesticidas atuam sobre o sistema nervoso e são, portanto, mais tóxicos para os parasitos artrópodes, hospedeiros vertebrados e operadores. Sua principal desvantagem, é que não são eficazes contra estágios adultos que, na maioria dos casos, são as formas evolutivas que causam danos diretamente ao hospedeiro e, por isso, são geralmente inadequadas para o uso terapêutico contra infestações estabelecidas. Numerosos estudos mostraram que as BFU infligem sobre a formação da cutícula em diferentes níveis, que resultam em defeitos na muda e eclosão defeituosa. Estudos com larvas de *Drosophila* mostraram que o fenótipo cuticular induzido pelo tratamento com BFU assemelha-se ao observado em mutantes embrionários defeituosos na codificação do gene *kkv* quitina sintase (Chen *et al.*, 2013; Junquera *et al.*, 2019)

## 2.12 Benzoilfenilureias (BFU)

Foram introduzidas seis diferentes BFU para o controle de parasitos em interesse veterinário, ou seja, aprovadas pelas autoridades reguladoras nos principais mercados de saúde animal: fluazuron, lufenuron, novaluron, teflubenzuron, diflubenzuron e triflumuron como mostra a Figura 1 e 2.



**Figura 1.** Estrutura química do Diflubenzuron.  
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37123#section=2D-Structure>)



**Figura 2.** Estrutura química do Triflumuron.  
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/47445#section=2D-Structure>)

O diflubenzuron (1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) foi responsável por diversos derivados com atividade inseticida. Foi o primeiro composto deste grupo a estar comercialmente disponível e foi registrado comercialmente como Dimilin e foi usado primeiramente para controle de Diptera, Lepidoptera e Coleoptera (Grosscurt; Jongsma, 1980). Em algumas espécies, ovos, larvas e adultos são suscetíveis pela atividade de contato do diflubenzuron a exemplo de *Musca domestica*. O diflubenzuron utilizado topicamente em larvas de *Spodoptera littoralis* sugeriu que sua ação é mais tóxica no contato se comparada a ingestão (Ascher; Nemny, 1976).

O diflubenzuron é resistente à degradação metabólica por insetos e permanece ativo por longos períodos e em certos ambientes é degradado pela água e microorganismos (Ivie; Wrigth, 1978; Seufferer *et al.*, 1978).

Em *C. felis*, o diflubenzuron foi testado em locais que simulavam casas e jardins. Mostrou-se eficaz no controle de ovos e primeiros ínstares durante um ano em ambientes nos quais simulavam casas e seis meses nos jardins. Aspiração dos carpetes não interferiu no efeito residual do diflubenzuron. E em doses maiores (127 ng/cm<sup>2</sup>), o diflubenzuron não teve ação sobre todos os ínstares durante o processo de muda (Henderson; Foil, 1993; Moser *et al.*, 1992).

O triflumuron foi primeiramente desenvolvido para proteção de plantios e posteriormente utilizado na veterinária. O triflumuron também foi desenvolvido para o uso em Saúde pública (Baycidal®, Bayer), bem como para utilização fora do animal e nos arredores de onde o animal está (Starycide®, Bayer) contra moscas domésticas, pulgas, mosquitos, baratas e etc.

O triflumuron em ambientes em condições de laboratoriais, foi testado em três espécies *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e concluiu se efetivo contra estes que apresentam resistência quando expostas a organofosforados e piretróides. Em *A. aegypti* houve uma grande mortalidade larvar, sendo bastante promissor como um tratamento alternativo. Pupas deformadas e incompletas foram encontradas em ensaios com *Musca domestica* expostas ao triflumuron. Tratamentos orais e tópicos em *R. prolixus* apresentaram efeitos na reprodução, longevidade, viabilidade e eclosão dos ovos. O triflumuron, ultimamente vem sendo associado a outros IGRs para controle de diferentes artrópodes (Alzahrani, 2021; Belinato *et al.*, 2013; Fukase *et al.*, 1987; Henriques *et al.*, 2016;).

### **3 METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE PULICIDA IN VITRO**

Essas metodologias buscam auxiliar no planejamento ,bem como na execução de estudos laboratoriais e clinicos para avaliar a eficácia de ativos usados em cães e gatos como o objetivo de tratar,prevenir e controlar infestações de pulgas . O termo ectoparasiticida inclui compostos inseticidas e acaricidas ,além de reguladores de crescimento de insetos . A variedade de atividades biologicas que resultam do tratamentos dos animais ,inclui:repelência , efeitos anti-alimentares ,rapidez de ação ,efeitos letais imediatos e duradouros ,e também na interferência na fertilidade dos ovos e no desenvolvimentos das fases do ciclo de vida fora do hospedeiro (Moser et al., 2007;Moser et al.,2012).

Elas apresentam padrões e características amplamente reconhecidas pela comunidade científica como adequadas e essenciais para a coleta de dados cientificos . Espera-se que sirvam como referências para os reguladores responsáveis por estabelecer requisitos significativos de registro em seus países , auxiliem os pesquisadores na criação de propostas básicas para a definição eficaz de um novo material em investigação e reduzam a quantidade de animais utilizados em estudos,considerando tanto a redução de custos quanto o bem estar animal. O bem-estar é especialmente relevante ,pois ,com certas

exceções ,como estudos *in vitro* de repelência de carrapatos ,a avaliação do controle de ectoparasitas dificilmente pode ser realizada de forma mais fidedigna sem o uso de animais hospedeiros (Moser et al., 2007; Moser et al.,2012).

Técnicas *in vitro* são comumente empregadas nas etapas de descoberta e pré-clínicas do desenvolvimento de potenciais inseticidas ou acaricidas. Existem métodos que permitem determinar valores de LC50 (Finney, 1971), expondo, por exemplo, certos estágios do ciclo de vida de pulgas ou carrapatos a diferentes concentrações do composto químico ativo em meios líquidos ou sólidos, como sangue total ou papéis de filtro impregnados (Drummond et al., 1973; ; Rust e Reiersen, 1989)."

### **3.1 Efeitos ovicidas em pulga**

Estudos sobre ovos de pulgas podem ser necessários, por exemplo, para demonstrar que os ovos de pulgas produzidos após a exposição a um IGR são inférteis ou que a produção de ovos de pulga é interrompida por um tratamento pulicida residual (matar as pulgas recém-adquiridas antes que possam botar ovos). Os dados devem incluir observações feitas quando o período de persistência chegou ao fim, pois a atividade residual provavelmente diminuirá com o tempo. Devido ao fato de que fatores externos podem afetar a produção e a fertilidade dos ovos, comparações estatísticas devem ser feitas com controles não tratados (Moser et al., 2007; Moser et al.,2012).

Os ovos recolhidos de um animal infestado podem fornecer informações sobre a eficácia de substâncias contra pulgas após aproximadamente 24 a 96 horas. Após 72 horas da infestação, os animais são colocados individualmente em gaiolas com um fundo de tela para coleta de ovos e detritos, que se acumulam em uma bandeja revestida com papel. É fundamental evitar a contaminação da bandeja com alimentos, água e urina. Os ovos são coletados por um período de 16 a 24 horas e contados com auxílio de uma agulha ou pincel fino. A taxa de eclosão pode ser estimada colocando uma quantidade conhecida de ovos em meio de cultivo de larvas de pulga em placas de vidro, incubando conforme necessário e contando as larvas resultantes. Se houver uma grande quantidade de ovos, devem ser preparadas múltiplas placas para replicação, devido à sensibilidade desses processos biológicos às condições do ambiente. Para melhorar a precisão, os ovos não eclodidos podem ser fixados na tampa da placa de Petri, fora do alcance das larvas que eclodem e se alimentam. Essa técnica possibilita a contagem dos ovos eclodidos e não eclodidos por meio de observação direta (Moser et al., 2007; Moser et al.,2012) .

### **3.2Efeitos larvicidas em pulgas**

A eficácia in vitro obtida não fornece necessariamente uma indicação quantitativa do desempenho no campo, pois isso pode ser influenciado por fatores externos. Detritos de pelos, por exemplo, podem se dispersar em áreas variáveis, impactando a quantidade de material ativo que chega aos habitats das pulgas (Moser et al., 2007; Moser et al., 2012).

O método de criação de larvas de pulga é usado para colocar quantidades iguais de ovos recém-coletados (normalmente entre 20 e 100 se disponíveis) em placas de Petri de vidro replicadas. Animais não tratados e tratados terão detritos pesados misturados ao meio nas placas de controle e teste. Mesmo pequenas quantidades de material ativo podem ter um impacto significativo no desenvolvimento das larvas; portanto, é imperativo tomar precauções rigorosas para evitar que o material ativo seja transferido para as placas de controle, superfícies de trabalho, instrumentos ou equipamentos. Os recipientes são incubados a 70 a 90% de umidade relativa e a 21 a 29 graus Celsius. Após 72 horas, as placas são colocadas e o número de larvas eclodidas é registrado e as placas são colocadas novamente na incubadora. Após mais nove dias, as pupas são separadas do meio de criação por meio da passagem do conteúdo de cada placa por uma peneira de malha 40 (425  $\mu\text{m}$ ). As pupas são contadas e transferidas para recipientes novos com tampas seladas para que as pulgas adultas que estão emergindo não possam escapar. Aproximadamente 35 dias após a coleta dos ovos, os recipientes são retirados dos incubadores e agitados. Antes de serem contadas, as pulgas adultas são imobilizadas com CO<sub>2</sub> por congelamento ou imersão em água quente. Após a dissecação das pupas restantes, quaisquer adultos normalmente desenvolvidos são adicionados à quantidade total de pulgas (Moser et al., 1991; Moser et al., 2007; Moser et al., 2012; Richman et al., 1999).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local da Experimentação

Todo o estudo foi realizado no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) no Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (IV/UFRRJ).

### 4.2 Obtenção de *Ctenocephalides felis felis*

As pulgas *Ctenocephalides felis felis* foram obtidas de uma colônia laboratorial mantida nas dependências do LQEPV desde 1998 aprovada pela CEUA-IV-UFRRJ sob o número 9094180418 e cadastrada no SisGen sob o número A85009C.

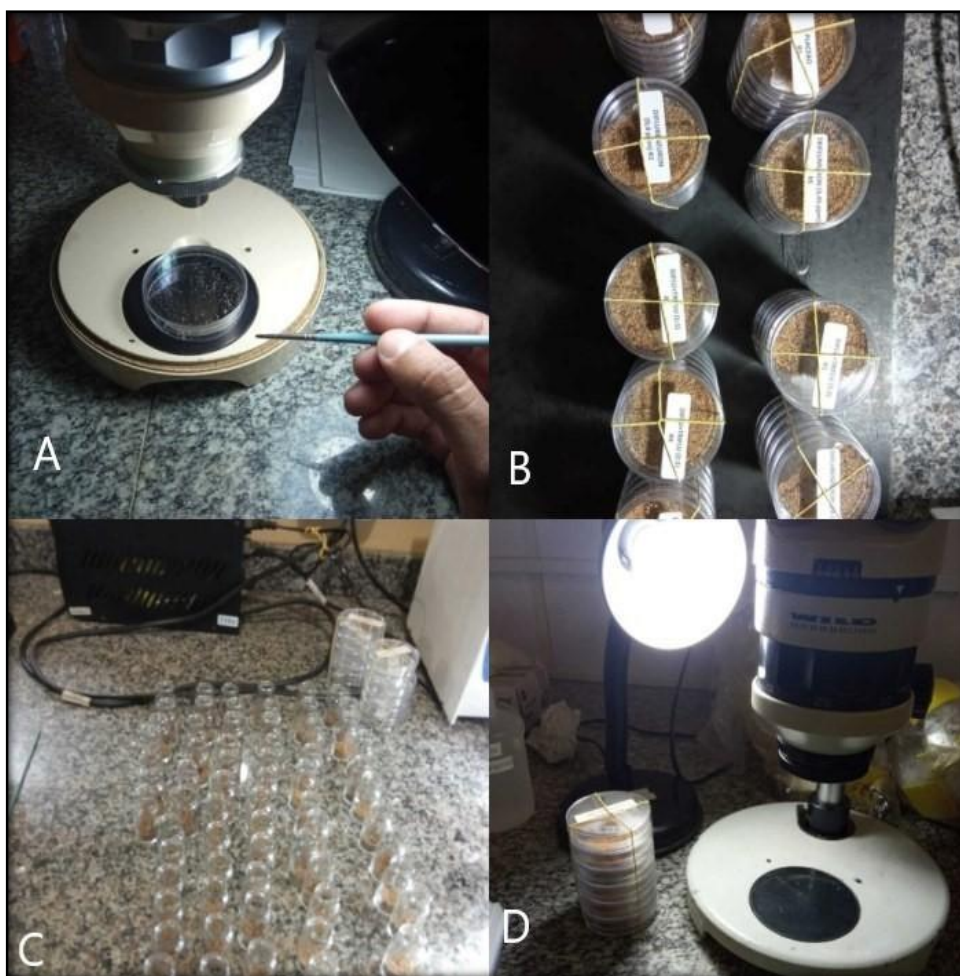
### 4.3 Ativos

Foram testados reguladores de desenvolvimento de insetos, sendo duas benzoilfenilureias o diflubenzuron e o triflumuron (Grau de pureza de 48,0%)

### 4.4 Determinação da Concentração Letal 50 e 90 para formas imaturas de *Ctenocephalides felis felis*

Todos os fármacos foram solubilizados em acetona (Rust *et al.*, 2002). Para cada ativo, foi preparada uma solução estoque de 500 ppm, e a partir dela foram preparadas 10 concentrações decrescentes, 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10; 50 e 100 ppm. Para cada concentração foram realizadas seis réplicas. Para cada repetição foram desafiadas 10 larvas. Para efeito de comparação, foram mantidos dois grupos controle, um não contendo o solvente e outro com acetona. Em todos os testes foram utilizadas placas de Petri descartáveis 60x15mm. O método utilizado para avaliação dos reguladores foi através da impregnação do substrato larval (Rust *et al.*, 2002; Rust, 2016). Para cada repetição foram utilizados dois gramas de substrato larval proposto por Correia *et al.* (2003). O substrato larval foi impregnado com um volume de 200µL de solução e mantido para secar em capela de exaustão de gases por um período de duas horas. Passado esse tempo o substrato larval foi incorporado a placa contendo as respectivas formas evolutivas. Todo material foi identificado com a concentração, o ativo e as larvas. Todo o experimento foi mantido em câmara climatizada com demanda bioquímica de oxigênio (BOD) com temperatura de  $27 \pm 1^\circ \text{C}$  e umidade relativa de 80%.

Uma primeira avaliação foi realizada aos 14 dias para acompanhamento do desenvolvimento das larvas. Já a avaliação e quantificação de adultos emergidos foi realizada após 28 dias. Os conjuntos de placas foram retiradas da BOD, após a remoção do elástico, as placas contendo os substratos foram abertas de forma individual e examinadas com auxílio de um estereoscópio, luminária e pinças. Durante todo o processo, foram tomadas precauções para evitar manipulações excessivas que pudessem interferir de alguma maneira no ciclo das larvas. Os procedimentos desde a coleta das larvas até a contagem das formas adultas podem ser visualizados na Figura 3.



**Figura 3-**A) Coleta das larvas de 1º instar B) Placas com meio impregnado com ativo que serão incubadas C) Recipientes usados para a impregnação do meio D) Lupa e luminária utilizada para a contagem dos adultos. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

#### 4.5 Avaliação do Desenvolvimento das Larvas de *Ctenocephalides felis felis*

Os resultados das diferentes avaliações foram apresentados de forma quantitativa. As observações do estudo foram conduzidas em relação à frequência de adultos emergentes e ao desenvolvimento no ciclo evolutivo de *C. felis felis*. As avaliações realizadas no ciclo incluíram o tempo de pupação de quando as pulgas foram expostas ao composto ativo e a evolução das larvas durante o ciclo evolutivo. Os adultos recém-emergidos foram observados quanto à sua presença ou ausência de atividade após serem incubados na câmara climatizada por 14 e 28 dias.

Para avaliar a mortalidade de *C. felis felis* no presente estudo, foram observadas alterações nos aspectos morfológicos e também no ciclo evolutivo da pulga, os critérios foram adaptados do trabalho de Rust e Hemsarth (2016). Foram consideradas como pulgas vivas aquelas que conseguiram emergir da pupa e/ou que foram encontradas dentro do pupário de com sua estrutura bem formadas e com suas as pernas livres de seu corpo. Para a contabilização de pulgas mortas foram consideradas as larvas que não conseguiram passar para o estágio de pupa e aquelas que apresentaram má formações quando retiradas do pupário, possuindo aspecto desidratado e pernas comprimidas ao corpo.

#### 4.6 Avaliação da Atividade Sinérgica entre Diflubenzuron e Triflumuron

Após a obtenção das concentrações letais 50 do diflubenzuron e do triflumuron, estas foram associadas nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1, respectivamente. Foi empregado o mesmo delineamento experimental para execução do teste e avaliação descritos no item 3.4 para larvas de *C. felis felis*. Todo o experimento foi mantido em câmara climatizada com demanda bioquímica de oxigênio (BOD) com temperatura de  $27 \pm 1^\circ \text{C}$  e umidade relativa de 80%.

#### 4.7 Análise dos Dados

Os dados obtidos foram submetidos ao programa computacional RStudio, analisados com o pacote “Ecotoxicology” para obtenção da estimativa das concentrações letais 50 (CL50) e 90 (CL90). Foi calculado o percentual de inibição de desenvolvimento para todas as concentrações testadas.

O sinergismo foi avaliado através do programa computacional CompuSyn Inc. (Chou; Martin, 2005). Foi calculado o índice de combinação proposto por Chou (2006) para avaliar a atividade sinérgica, entretanto foi seguida a categorização simplificada proposta por Novato *et al.* (2015) adaptada de Chou (2006), conforme o Quadro 1, que categoriza qualitativamente a interação entre as substâncias associadas.

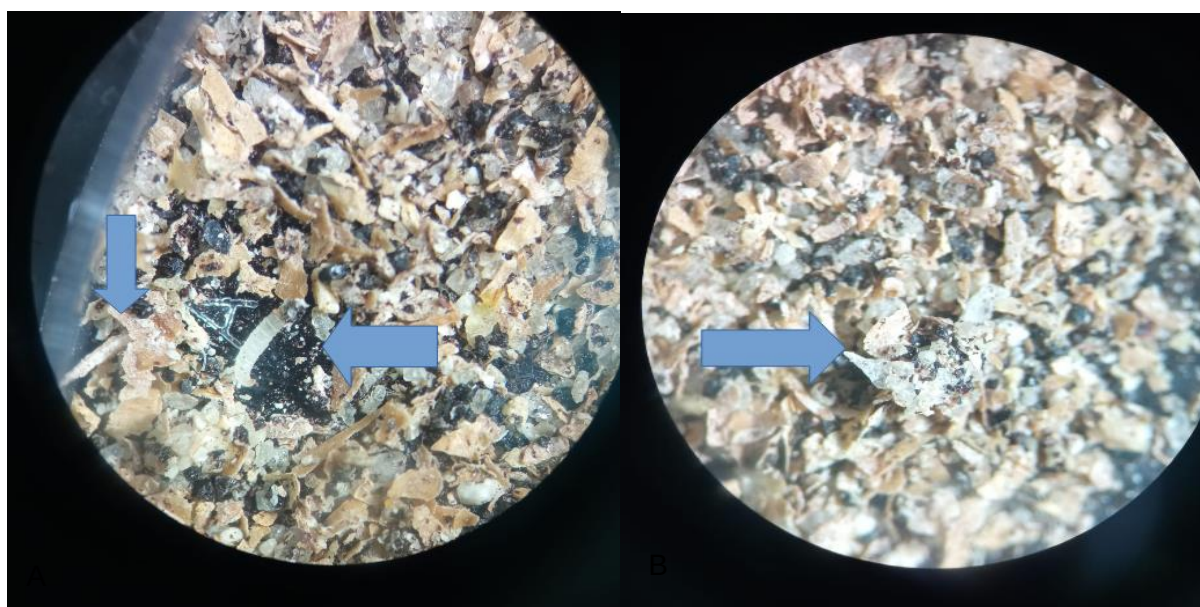
**Quadro 1.** Índice de combinação proposto por Novato *et al.* (2015) com a categorização qualitativa do efeito da combinação de ativos.

| Valor do índice de combinação | Descrição do efeito  |
|-------------------------------|----------------------|
| <0,7                          | Sinergismo           |
| 0,7-0,9                       | Sinergismo moderado  |
| 0,9-1,0                       | Efeito aditivo       |
| 1,10-1,45                     | Antagonismo moderado |
| >1,45                         | Antagonismo          |

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade do Diflubenzuron sobre Larvas de *Ctenocephalides felis felis*

Na primeira observação, com 14 dias após o início do experimento no momento da incubação na BOD, as larvas nas concentrações abaixo de 1 ppm (0,005 ppm; 0,01 ppm; 0,05 ppm; 0,1 ppm e 0,5 ppm) já tinham feito a pupação. Na concentração 1 ppm algumas larvas ainda não tinham passado pelo processo de pupação, algumas larvas foram encontradas sem atividade e de tamanho menores (Figura 4). Nas concentrações de 5ppm, 10 ppm, 50 ppm e 100 ppm, já não haviam resquícios de larvas ou pupação. No grupo controle e placebo já haviam pupas formadas.



**Figura 4.** Larvas (A) e pupa (B) de *Ctenocephalides felis felis* no meio impregnado por diflubenzuron na concentração 1 ppm. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Com 28 dias pós incubação, os grupos com as concentrações abaixo de 1 ppm foram observadas pulgas adultas que emergiram normalmente e apresentavam comportamento ativo com eficácia abaixo de 26% para todas as réplicas. Por outro lado, grupos com concentrações acima de 1 ppm (5 ppm, 10 ppm, 50 ppm e 100 ppm) causaram um grande efeito interrompendo o ciclo evolutivo das pulgas em uma eficácia a partir de 98%. Apenas na concentração 1 ppm, a taxa de eficácia foi de 46-80% entre as réplicas, os resultados estão detalhados na Tabela 1.

Os adultos emergidos no grupo placebo, controle, 0,005 ppm, 0,01ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm e 0,5 ppm não apresentaram mudanças notáveis em sua morfologia esperada em uma pulga adulta normal. Já as concentrações, acima de 1 ppm, particularmente a concentração 5 ppm, os adultos que emergiram não apresentaram anormalidade.

Nas duas duplicadas também foi contabilizado o número de fêmeas e machos emergidos. Essa análise foi feita nos dias 28 pós incubação. Não foram notadas diferenças percentuais entre as todas as repetições do teste.

Em algumas espécies, os ovos, larvas e adultos são susceptíveis a atividade de contato do diflubenzuron como por exemplo a *Musca domestica*. O diflubenzuron também possui um efeito na ingestão, porém provou-se que o efeito por contato é mais tóxico após o uso tópico em larvas de *Spodoptera littoralis* (Ascher; Nemny, 1976).

**Tabela 1.** Dados de recuperação de *Ctenocephalides felis felis* após submissão de larvas de primeiro ínstar à diferentes concentrações de Diflubenzuron, e posterior cálculo de eficácia, média de pulgas mortas e taxa de mortalidade.

| Tratamento | Média pulgas vivas |     | Desvio |     | Eficácia (%) |     | Média de mortos |      | Mortalidade (%) |       |
|------------|--------------------|-----|--------|-----|--------------|-----|-----------------|------|-----------------|-------|
|            | II                 | III | II     | III | II           | III | II              | III  | II              | III   |
| Controle   | 9,3                | 9,2 | 0,8    | 0,8 |              |     | 0,7             | 0,8  | 6,67            | 8,3   |
| Placebo    | 9,2                | 8,2 | 1,0    | 1,2 |              |     | 0,8             | 1,8  | 8,33            | 18,3  |
| 0,005      | 9,3                | 8,2 | 0,5    | 1,7 | 0            | 0   | 0,7             | 1,8  | 6,67            | 18,3  |
| 0,01       | 8,5                | 7,8 | 0,8    | 1,6 | 7            | 4   | 1,5             | 2,2  | 15,00           | 21,7  |
| 0,05       | 9,0                | 8,0 | 1,3    | 1,4 | 2            | 2   | 1,0             | 2,0  | 10,00           | 20,0  |
| 0,1        | 9,5                | 8,2 | 0,8    | 0,8 | 0            | 0   | 0,5             | 1,8  | 5,00            | 18,3  |
| 0,5        | 5,7                | 7,0 | 1,2    | 0,0 | 38           | 14  | 4,3             | 3,0  | 43,33           | 30,0  |
| 1          | 1,8                | 6,0 | 1,3    | 1,3 | 80           | 27  | 8,2             | 4,0  | 81,67           | 40,0  |
| 5          | 0,2                | 0,2 | 0,4    | 0,4 | 98           | 98  | 9,8             | 9,8  | 98,33           | 98,3  |
| 10         | 0,0                | 0,0 | 0,0    | 0,0 | 100          | 100 | 10,0            | 10,0 | 100,00          | 100,0 |
| 50         | 0,0                | 0,0 | 0,0    | 0,0 | 100          | 100 | 10,0            | 10,0 | 100,0           | 100,0 |
| 100        | 0,0                | 0,0 | 0,0    | 0,0 | 100          | 100 | 10,0            | 10,0 | 100,00          | 100,0 |

Na concentração 1 ppm, alguns adultos apresentaram certas deformidades (menores e maculadas) e mortas dentro do pupário (visualizadas macroscopicamente) como apresentado na Figura 5.



**Figura 5.** Adulto recuperado após a exposição ao diflubenzuron na concentração de 1 ppm.  
Fonte: Arquivo pessoal, 2023.



Segundo Henderson e Foil (1993), o diflubenzuron com seu mecanismo de interferir no metabolismo de quitina vem sendo considerado uma excelente alternativa para o controle de diversas pragas incluindo *C. feli felis*. Em doses maiores (127 ng/cm<sup>2</sup>), o diflubenzuron consegue inibir todo os estágios durante o processo de muda. A cutícula rígida que cobre o corpo inteiro do artrópode, uma vez produzida, não cresce mais. Para poder fazer a muda uma nova cutícula precisa ser produzida. Essas metamorfoses são reguladas por hormônios secretados por órgãos endócrinos. Esse sistema fisiológico não é compartilhado pelos vertebrados, mas sim nos invertebrados. Sendo assim, esse mecanismo é alvo para os IGRs que em sua maioria são utilizados no intuito de interferir na formação da nova cutícula ou na metamorfose (Bendjazia; Morakchi, Aribi, 2016; Gad *et al.*, 2021). Em análises estruturais, revelou-se uma deposição anormal de camadas procuticulares em resposta a exposição das benzoilfenulureias (Merzendorfer, 2012). Visualizando o decorrer do ciclo, as larvas estendiam-se no mesmo estágio larval ou morriam sem realizar a ecdise para o instar seguinte, demonstrando assim a interferência do diflubenzuron no ciclo evolutivo. Em adultos, na concentração 1 ppm, foi observada uma deposição errônea, causando deformações nos adultos emergidos.

O diflubenzuron demonstrou um efeito regulador sobre as L1 de *C. felis felis* submetidas a dietas impregnadas de soluções acima de 1 ppm, como mostrado na Tabela 1. Este efeito também foi descrito por Moser (2012) em um estudo com formas imaturas de *Haematobia irritans*, expostas ao ativo impregnado no ambiente.

Para as larvas de 1º instar de *C. felis felis*, o valor obtido da CL<sub>50</sub> foi de 0,241 ppm (µg/g) com valores mínimo de 0,157 ppm e máximo de 0,360 ppm com o intervalo de confiança de 95%. Com coeficiente de regressão de 0,6539 sugerindo uma linearidade dos resultados, mais detalhes sobre as concentrações letais podem ser visualizadas na Tabela 2. No trabalho de Silva (2007) com estágios imaturos de *A. aegypti* em um ensaio em frascos de plásticos, o diflubenzuron foi mais eficaz se comparados a larvas de *C. felis felis*, obtendo uma CL<sub>50</sub> de 0,00519 ppm (µg/g). Neste trabalho, a eficácia foi superior na metamorfose de larva para pupa.

**Tabela 2.** Concentrações letais do Diflubenzuron a partir do desafio de larvas de primeiro instar de *Ctenocephalides felis*.

| Teste        | CL <sub>50</sub> (IC 95%) ppm | CL <sub>90</sub> (IC 95%) ppm | Qui-quadrado | Slope | p    | R <sup>2</sup> |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|-------|------|----------------|
| I            | 0,103<br>(0,033 - 0,25)       | 10,078<br>(3,46 - 70,096)     | 22,90        | 0,63  | 0,99 | 0,65           |
| II           | 0,269<br>(0,140 - 0,478)      | 3,035<br>(1,474 - 9,285)      | 39,01        | 1,21  | 1,00 | 0,57           |
| III          | 0,424<br>(0,204 - 0,853)      | 13,881<br>(5,507 - 57,175)    | 39,93        | 0,84  | 1,00 | 0,69           |
| I + II + III | 0,241<br>(0,157 - 0,360)      | 8,079 (2,489 - 7,749)         | 74,74        | 0,84  | 1,00 | 0,65           |
| II + III     | 1,217<br>(0,695 - 2,234)      | 126,545 (48,115 - 500,301)    | 30,15        | 0,63  | 1,00 | 0,64           |
| I + III      | 1,758<br>(0,883 - 3,614)      | 474,892 (133,834 - 3221,742)  | 60,83        | 0,52  | 1,00 | 0,94           |

|        |                          |                               |       |      |      |      |
|--------|--------------------------|-------------------------------|-------|------|------|------|
| I + II | 1,391<br>(0,787 - 2,488) | 109,214 (44,069 -<br>390,162) | 51,45 | 0,67 | 1,00 | 0,86 |
|--------|--------------------------|-------------------------------|-------|------|------|------|

## 5.2 Atividade do Triflumuron sobre Larvas de *Ctenocephalides felis felis*

Após o período de 14 dias, foi realizada a primeira avaliação, sendo observado que as larvas de *C. felis felis* presentes nos grupos de concentrações abaixo de 10 ppm (Controle; placebo; 0,005 ppm; 0,01 ppm; 0,05 ppm; 0,1 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm e 5 ppm) já haviam realizado a pupação (Figura 6). Porém nas concentrações de 10 ppm, 50 ppm e 100 ppm, não foram encontradas formas evolutivas da espécie.



**Figura 6.** Pupário de *Ctenocephalides felis felis* visualizado no dia 14 pós exposição ao triflumuron de 5 ppm. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Com 28 dias após a incubação, foi recuperada uma grande quantidade de pulgas adultas de grupos com concentração de até de 5 ppm, sendo este último, havendo uma média de seis pulgas vivas recuperadas nas repetições desse tratamento citado. Porém na concentração 5 ppm, foi notada uma eficácia de 36% na atividade do Triflumuron. As pulgas adultas que emergiram em concentrações abaixo de 10 ppm foram contabilizadas e analisadas macroscopicamente. Nenhuma alteração relevante foi encontrada. As concentrações 10 ppm, 50 ppm e 100 ppm inibiram todo o ciclo evolutivo das pulgas, possuindo eficácia de 100%, os resultados detalhados estão descritos na Tabela 3.

Nas duas repetições, nenhum adulto emergido apresentou alteração. Na análise dos sexos, também não foram notadas diferenças percentuais entre as repetições do teste. Porém conforme aumentava a concentração de Triflumuron a partir de 10ppm,

O triflumuron foi testado em condições laboratoriais e notou-se uma interessante eficácia em *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e mostrou-se eficaz contra estas espécies que apresentam resistência a outros ativos. Em *A.aegypti* houve uma

grande mortalidade, onde nenhum adulto emergiu em concentrações acima de 3.0 µg/L, sendo bastante conveniente como um tratamento alternativo (Belinato *et al.*, 2013).

Sugere-se nesse trabalho que o triflumuron, nas concentrações empregadas, apresenta também uma atividade em estágios imaturos de *C. felis*. Segundo Fukase *et al.* (1987), foi observado em *Musca domestica*, pupas deformadas e incompletas quando expostas ao triflumuron. Porém, nesses ensaios com 1º instar de larvas de *C. felis*, este efeito não foi observado dentro das concentrações utilizadas.

**Tabela 3.** Larvas de primeiro instar de *Ctenocephalides felis felis* submetidas a diferentes concentrações de Triflumuron e recuperação de formas adultas.

| Grupo       | Concentração (ppm) | Total de larvas | Total de pulgas vivas | Média de pulgas vivas | Desvio | Eficácia (%) | Total de mortos | Média de mortos | Mortalidade (%) |
|-------------|--------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|--------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Controle    |                    | 60              | 52                    | 8,7                   | 0,8    | #            | 8               | 1,3             | 13,3            |
| Placebo     |                    | 60              | 56                    | 9,3                   | 0,8    | #            | 4               | 0,7             | 6,7             |
| Triflumuron | 0,005              | 60              | 48                    | 8,0                   | 0,6    | 14           | 12              | 2,0             | 20,0            |
|             | 0,01               | 60              | 48                    | 8,0                   | 1,5    | 14           | 12              | 2,0             | 20,0            |
|             | 0,05               | 60              | 51                    | 8,5                   | 1,2    | 9            | 9               | 1,5             | 15,0            |
|             | 0,1                | 60              | 56                    | 9,3                   | 0,5    | 0            | 4               | 0,7             | 6,7             |
|             | 0,5                | 60              | 48                    | 8,0                   | 1,7    | 14           | 12              | 2,0             | 20,0            |
|             | 1                  | 60              | 50                    | 8,3                   | 1,4    | 11           | 10              | 1,7             | 16,7            |
|             | 5                  | 60              | 36                    | 6,0                   | 2,1    | 36           | 24              | 4,0             | 40,0            |
|             | 10                 | 60              | 0                     | 0,0                   | 0,0    | 100          | 60              | 10,0            | 100             |
|             | 50                 | 60              | 0                     | 0,0                   | 0,0    | 100          | 60              | 10,0            | 100             |
|             | 100                | 60              | 0                     | 0,0                   | 0,0    | 100          | 60              | 10,0            | 100             |

Para as larvas de 1º instar de *Ctenocephalides felis felis*, o valor obtido da CL<sub>50</sub> foi de 3,45 ppm (µg/g) com valores mínimo de 2,36 ppm e máximo de 5,30 ppm com o intervalo de confiança de 95%. Com coeficiente de regressão de 0,98 sugerindo também uma linearidade dos resultados (Tabela 4). Alzahrani (2021) com cepas de *Musca domestica*, obteve uma CL<sub>50</sub> que possuía o valor mínimo de 2,6 ppm e máxima de 5,5 ppm, esta faixa se assemelha ao do presente estudo com estágios larvares de *C. felis felis*. Porém, este mesmo autor observou algumas alterações morfológicas no ciclo, o que não foi observado no uso do triflumuron contra larvas de 1º instar de *C. felis felis*.

**Tabela 4.** Estimativa das concentrações letais de triflumuron para *Ctenocephalides felis felis*.

| Repetição | CL <sub>50</sub> (IC 95%) ppm | CL <sub>90</sub> (IC 95%) ppm | Intercepto | Slope | X <sup>2</sup> | p     | R <sup>2</sup> |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|------------|-------|----------------|-------|----------------|
| I         | 3,45<br>(2,36-5,30)           | 16,8<br>(9,69-44,41)          | 3,996      | 1,865 | 40,73          | 1,000 | 0,98           |
| II        | 4,94<br>(3,06-8,88)           | 32,19<br>(15,91-197,55)       | 3,906      | 1,575 | 17,17          | 0,999 | 0,97           |
| III       | 5,66<br>(3,33-11,31)          | 43,08<br>(19,15-180,23)       | 3,90       | 1,45  | 12,53          | 0,994 | 0,959          |



### 5.3 Atividade do sinergismo entre Diflubenzuron e Triflumuron sobre *Ctenocephalides felis felis*

Depois da determinação das concentrações letais (CL), o diflubenzuron (D) e o triflumuron (T) foram associados nas proporções DX1; DX2; TX1 e TX2; 1:1 ; 2:1 e 1:2 . Seguindo a mesma linha de avaliação dos testes supracitados de contagem de adultos, os grupos controle e placebo foram analisados e demonstraram não haver diferença significativa na recuperação dos adultos.

As avaliações para determinação da viabilidade das larvas e foram feitas no dia 14 após a incubação. As larvas já tinham pupado e nenhuma larva foi visualizada nos campos analisados. Porém, notou-se uma diferença entre as duas duplicadas, na segunda havia menos pupas se comparada a primeira.

No dia 28 foi feita uma avaliação quantitativa da taxa de emergência dos adultos. Nos grupos placebo e controle a emergência, os adultos emergiram ativos e macroscopicamente normais. Nas duas proporções de diflubenzuron (DX1 E DX2), nas duas do triflumuron (TX1 E TX2) e na associação D+T (1:1), D+T (2:1), D+T(1:2) os adultos emergiram ativos e macroscopicamente sem alterações (Figura 7).

A taxa de inibição da emergência dos adultos na avaliação do sinergismo sugeriu uma boa ação destes IGRs no desenvolvimento, sendo a proporção D+T 1:1 a mais eficaz dentre todas elas. Comparando as concentrações D+T 1:2 e D+T 2:1, a D+T 2:1 houve um resultado mais expressivo, sugerindo um maior desempenho do diflubenzuron na inibição, como visualizado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Larvas de primeiro ínstar de *Ctenocephalides felis felis* submetidas e diferentes concentrações de Triflumuron e Diflubenzuron de forma isolada e também de forma associada.

|                              | Repetição    | Controle | Placebo | Diflubenzuron |            | Triflumuron |            | D+T 1:1          | D+T 1:2          | D+T 2:1           |
|------------------------------|--------------|----------|---------|---------------|------------|-------------|------------|------------------|------------------|-------------------|
| <b>Concentrações</b>         |              |          |         | <b>0,4</b>    | <b>0,8</b> | <b>3,45</b> | <b>6,9</b> | <b>0,4: 3,45</b> | <b>0,4: 6,90</b> | <b>0,80: 3,45</b> |
| <b>Média de pulgas vivas</b> | 1            | 8,7      | 8,8     | 8,2           | 7,5        | 7,2         | 5,5        | 6,0              | 3,8              | 5,8               |
|                              | 2            | 8,8      | 8,0     | 8,3           | 6,0        | 6,7         | 3,8        | 1,8              | 4,7              | 2,5               |
|                              | <b>Total</b> | 17,5     | 16,8    | 16,5          | 13,5       | 13,8        | 9,3        | 7,8              | 8,5              | 8,3               |
| <b>Desvio</b>                |              | 0,8      | 1,0     | 1,6           | 2,1        | 2,1         | 2,3        | 2,9              | 3,5              | 2,6               |
| <b>Eficácia (%)</b>          |              |          |         | 1,8           | 19,6       | 17,7        | 44,4       | 53,4             | 49,4             | 50,4              |
| <b>Média de mortos</b>       |              | 2,5      | 3,2     | 3,5           | 6,5        | 6,2         | 10,7       | 12,2             | 11,5             | 11,7              |
| <b>Mortalidade (%)</b>       |              | 12,5     | 15,8    | 17,5          | 32,5       | 30,8        | 53,3       | 60,8             | 57,5             | 58,3              |

As duas duplicadas também contabilizaram o número de fêmeas e machos emergentes. Essa análise ocorreu nos dias 28 após a incubação. Não foram observadas diferenças percentuais entre todas as repetições do teste.

O índice de correlação analisado entre os dois ativos, diflubenzuron e triflumuron foi de 11,431. O que indica que a combinação entre eles não apresenta um efeito sinérgico, pois CI é maior que 1,45. Mais uma vez, isso sugere que a combinação das duas drogas tem um efeito menor do que se espera com base nos efeitos individuais das drogas. O modo de ação das benzoilfeniluréias ainda não é elucidado (Merzendorfer, 2012). O triflumuron e o diflubenzuron vem sendo associados a outros IGRs para controle de diferentes artrópodes e se mostraram eficazes (Alzahrani, 2021; Bellinato *et al.*, 2016). Sabe-se que alguns IGRs se envolvem nas mesmas interações moleculares e alcançam uma resposta comum. Em um estudo *in vitro*, metoprene e o piriproxifen competiram pela ligação do mesmo receptor com JH III (homônio juvenil radiomarcado) em *Tribolium* e *Drosophila*. Em ambos os casos o

piriproxifen. A afinidade de ligação do metoprene foi inferior à do piriproxifen, refletindo uma menor potência do metoprene em relação ao piriproxifen em *Tribolium*. Esta discrepância sugere que o desempenho de diferentes ensaios tem razões ainda desconhecidas (Jindra; Bittova, 2019). Sugere-se neste presente trabalho, que esta falta de sinergismo seja resultado da competição dos mesmos receptores.



**Figura 7.** Adultos recuperados após a exposição de larvas de primeiro instar de *Ctenocephalides felis felis* ao sinergismo do triflumuron com o diflubenzuron. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

## 6 CONCLUSÃO

O diflubenzuron demonstrou atividade na inibição do desenvolvimento de *Ctenocephalides felis felis*.

O diflubenzuron mostrou ter uma atividade na morfologia em fases imaturas de *Ctenocephalides felis felis*.

O triflumuron demonstrou atividade na inibição do desenvolvimento de *Ctenocephalides felis felis*.

O triflumuron nestes testes não apresentou nenhuma atividade em alterar a morfologia em fases imaturas de *Ctenocephalides felis felis*.

As concentrações letais 50 de diflubenzuron foram menores se comparadas a do triflumuron em formas imaturas de *Ctenocephalides felis felis*.

O diflubenzuron e o triflumuron, quando associados, demonstraram um efeito antagônico.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pulga *Ctenocephalides felis felis* é um importante ectoparasito de cães e gatos, sendo vetor de importantes patógenos nos impulsiona a procurar diversas alternativas de controle. Novos tratamentos tópicos, orais e ambientais são constantemente pesquisados a fim de afetar seu ciclo . Atualmente, ferramentas que controlam sua reprodução são uma aposta adotada para ampliar o arsenal contra este parasito.

Tratamentos com organofosforados e carbamatos entre outros ativos apresentam toxicidade para o meio ambiente e para os animais tratados com estes .

Mesmo não possuindo ação sinérgica as benzoilfenilureias como o diflubenzuron e triflumuron, são alternativas mais seguras para o meio ambiente e aos animais, já que estes não os afetam. Neste estudo as duas moléculas se mostraram eficazes contra larvas de primeiro ínstar de *C. felis felis*, não permitindo a emergência de adultos.

Sendo assim, novos estudos precisam ser conduzidos com o diflubenzuron e triflumuron associados a outros IGRs e até mesmo com algum adulticida, na tentativa de cessar todas as formas evolutivas da pulga. E com isso planejar formulações para esmiuçar a eficácia deste tratamento. Pois eliminando todas as fases do parasito em um manejo integrado, otimiza o controle da pulga . Este manejo ,mesmo que tenha uma difícil implementação ,é amplamente aceito. O uso destas medidas visa melhorar o controle das populações globais e limitar o risco do aparecimento de resistência.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZHRANI, S. M. Evaluation of triflumuron and pyriproxyfen as alternative candidates to control house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), in Riyadh city, Saudi Arabia. **Plos One**, v. 16, p. 1-11, 2021.
- BALDIM, J.; ALCANTARA, B.; DOMINGOS, O.; SOARES, M.; CALDAS, I.; NOVAES, R.; OLIVEIRA, T.; LAGO, J.; CHAGAS-PAULA, D. The Correlation between Chemical Structures and Antioxidant, Prooxidant, and Antitrypanosomatid Properties of Flavonoids. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-12, 2017.
- BELINATO, T.; MARTINS, A.; BENTO, J.; LIMA, P.; VALLE, D. Effect of triflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* under laboratory conditions. **Parasites & Vectors**, v. 6, n.83, 2013.
- BEUGNET, F.; MARIÉ, J. L. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 298-305, 2009.
- BEZZAR-B, R.; KILANI-M, S.; ARIBI, N. Larval exposure to azadirachtin affects fitness and oviposition site preference of *Drosophila melanogaster*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.133, p. 85-90, 2016.
- BLAGBURN, B.; DRYDEN, M. Biology, Treatment, and Control of Flea and Tick Infestations. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 39, n.6, p.1173-1200, 2009.
- BLAGBURN B.; YOUNG, D.; MORAN, C.; MEYER, J.; LEIGH-HEFRON, A.; PAARLBERG, T.; ZIMMERMANN, A.; MOWREY, D.; WISEMAN, S.; SYNDER, D.. Effects of orally administered spinosad (Comfortis®) in dogs on adult and immature stages of the cat flea (*Ctenocephalides felis*). **Veterinary Parasitology**, v.168, n. 3-4, p. 312-317, 2010.
- BREITSCHWERDT, E.; LITTLE, S.; RUGG, D. Sarolaner-a novel isoxazoline-addresses the need for enhanced flea and tick control, **Veterinary Parasitology**, v.222, n.1-2, 2016.
- CHAPMAN, R.; TU, C.; HARRIS, C.; HARRIS, C. Persistence Of Diflubenzuron And Bay Sir 8514 In Natural And Sterile Sandy Loam And Organic Soils. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v. 20, n. 5, p. 489-497, 1985.
- CISNEROS, J.; GOULSON, D.; DERWENT, L.; PENAGOS, D.; HERNÁNDEZ, O.; WILLIAMS, T. Toxic effects of spinosad on predatory insects. **Biological Control**, v. 23 n. 2, p. 156-163, 2002.
- CRISTINA L.; OLIVEIRA B S. UFRRJ INSTITUTO DE VETERINÁRIA CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS DISSERTAÇÃO Eficácia In Vitro de uma Formulação Aerossol de Piriproxifen e Ciflutrina no Controle de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae), 2013.

DOURIS, V.; STEINBACH, D.; PANTELERI, R.; LIVADARAS, I.; PICKETT, J. A.; VAN LEEWEN, T.; NAUEN, R.; VONTAS, J. Resistance mutation conserved between insects and mites unravels the benzoylurea insecticide mode of action on chitin biosynthesis.

DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/66.1.130>.  
**Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 51, p. 14692–14697, 2016. doi:10.1073/pnas.1618258113.

DRYDEN, M.; CANFIELD, M.; NIEDFELDT, E.; KINNON, A.; KALOSY, K.; SMITH, A.; FOLEY, K.; SMITH, V.; BRESS, T.; SMITH, N.; ENDRIZZI, M.; LOGIN, J. Evaluation of sarolaner and spinosad oral treatments to eliminate fleas, reduce dermatologic lesions and minimize pruritus in naturally infested dogs in west Central Florida, USA. **Parasites & Vectors**, v.10, n. 1, 2017.

Dryden MM, Magid-Denenberg T, Bunch S: Control of fleas on naturally infested dogs and cats and in private residences with topical spot applications of fipronil or imidacloprid. *Vet Parasitol.* 2000, 93: 69-75. 10.1016/S0304-4017(00)00318-6.

Dryden M, Carithers D, McBride A, Riggs B, Smith L, Davenport J, Smith V, Payne P, Gross S: A comparison of flea control measurement methods for tracking flea populations in highly infested private residences in Tampa FL, following topical treatment of pets with FRONTLINE® Plus (fipronil/(S)-methoprene). *Intern J Appl Res Vet Med.* 2011, 9 (4): 356-567.

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. 126, p.1-6, 2013.

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

FERREIRA, M. M.; FIGUEIRA, M. J.; FIGUEIRA, M. J. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos, **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**, Capítulo 15, 2012.

FIGUEIREDO, A. C. P. Monografia para grau de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusofona de Humanidades e Tecnologias, p. 1-33, 2014.

FISARA, P.; SARGENT, R.; SHIPSTONE, M.; VON BERKY, A.; VON BERKY, J. An open, self-controlled study on the efficacy of topical indoxacarb for eliminating fleas and clinical signs of flea-allergy dermatitis in client-owned dogs in Queensland, Australia, **Veterinary Dermatology**, v.25, n.3, 2014.

FUKASE, T.; KAMON, M.; ITAGAKI, H. A Simulated Field Experiment with Triflumuron, a Benzoylphenylurea, Larvae of the House Fly *Musca domestica* in Chicken Feces, **NII Eletronic Library Service**, p. 93-97, 1987.

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

GORDON, J. An itch to scratch. **AKC Gazette** v. 112, p. 52–57, 1995.

GROSSCURT, A. Diflubenzuron: Some Aspects of its Ovicidal and Larvicidal Mode of Action and an Evaluation of its Practical Possibilities, **Pesticide Science**, v. 9, p. 373-386, 1978.

GROSSCURT, A. C.; JONGSMA, B. Mode of action and insecticidal properties of diflu benzuron, **Chitin and Benzoylphenyl Ureas** , p. 75-99, 1986.

GUPTA, R.; ANÁDON, A. Fipronil, **Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles**: Third Edition, p. 533-538, 2018.

GUPTA, R.; MILLER MUKHERJEE, I.; DOSS, R.; MALIK, J.; MILATOVIK, D. Organophosphates and carbamates, **Reproductive and Developmental Toxicology**, p. 609-631, 2017.

HALOS, L.; LEON, W.; CHAVET-MONFRAY, K.; LARSEN, D.; BEUGNET, F. Immediate efficacy and persistent speed of kill of a novel oral formulation of afoxolaner (NexGard™) against induced infestations with *Ixodes ricinus* ticks. **Parasites & Vectors** v. 7, p. 452, 2014.

HENDERSON, G.; FOIL, L. Efficacy of Diflubenzuron in Simulated Household and Yard Conditions Against the Cat Flea *Ctenocephalides felis* (Bouche) (Siphonoptera: Pulicidae), **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 3, 619- 621, 1993.

HENRIQUES, B.; GENTA, F.; MELLO, C.; SILVA, L.; CODOGNO, T.; OLIVEIRA, A.; MARINHO, L.; VALLE, D.; LIMA, J.; FEDER, D.; GONZALEZ, M.; AZAMBUJA. Triflumuron Effects on the Physiology and Reproduction of *Rhodnius prolixus* Adult Females, **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1- 12, 2016.

HINK, W. F.; DROUGHT, D. C.; BARNETT, S. Effect of an experimental systemic compound, CGA-184699, on life stages of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v.28, p.424–427, 1991.

HINK, W. F.; ZAKSON, M.; BARNETT, S. Evaluation of a single oral dose of lufenuron to control flea infestations in dogs. **American Journal of Veterinary Research**,s. 55, 822–824, 1994.

KUZNER, J.; TURK, S.; GRACE, S. Confirmation of the efficacy of a novel fipronil spot-on for the treatment and control of fleas, ticks and chewing lice on dogs, **Veterinary Parasitology**, v.193, n.1-3, p. 245-251, 2013.

LEMKE, L.; KOHLE, P.; PATTERSON, R. Susceptibility of the Cat Flea (Siphonaptera: Pulicidae) to Pyrethroids, **Journal of Economic Entomology**, v. 82, n. 3,1989.

LOPES, R.; ALVES, S. Effect of *Gregarina* sp. parasitism on the susceptibility of *Blattella germanica* to some control agents, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, n.3, p. 261-264, 2005.

MARSELLA, R. Advances in flea control, *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v. 29, n. 6, p.1407-1424, 1999.

MASETTI, A.; DEPALO, L.; PASQUALINI, E. Impact of triflumuron on *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae): Laboratory and field studies, **Journal of Economic Entomology**, v.114, n. 4, p.1709-1715, 2021.

MEOLA, R.; MEIER, K.; DEAN, S.; BHASKARAN, G. Effect of pyriproxyfen in the blood diet of cat fleas on adult survival, egg viability, and larval development, **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 4, p. 503-506, 2000.

MOSER, B. A.; KOEHLER, P. G.; PATTERSON, R. S. Effect of larval diet on cat flea (*Siphonaptera: Pulicidae*) developmental times and adult emergence. **Journal of Economic Entomology**, v. 84, n. 4, p. 1257-1261, 1991. DOI: 10.1093/jee/84.4.1257.

MOSER, B.; KOEHLER PATTERSON, R. Effect of Methoprene and DiHubenzuron on Larval Development of the Cat Flea (*Siphonaptera: Pulicidae*), **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n. 1,p.112-116, 1992.

Palchick S. Chemical control of vectors in: *The Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado, 1996.

PALMAR, K.; MEOLA, S.; MEOLA, R. Mode of Action of Pyriproxyfen and Methoprene on Eggs of *Ctenocephalides felis* (*Siphonaptera: Pulicidae*), **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 421-426, 1993.

PALMIERI, V.; DODDS, W.; MORGAN, J.; CARMEY, E.; FRITSCH, H.; JEFFREY, J.; BULLOCK, R KIMBALL, J. Survey of canine use and safety of isoxazoline parasiticides, **Veterinary Medicine and Science**, v. 6, n.4, p. 933-945, 2020.

RAMOS-MORALES, F. Receptor GABA A : implicaciones farmacológicas a nivel central, **Archivos de Neurociencia (Mex)**, v. 16, n. 1, p. 40-45, 2011.

RIDDIFORD, L. M.; TRUMAN, J. W. Biochemistry of Insect Hormones and Insect Growth Regulators. **Biochemistry of Insects**, p. 307–357, 1978. doi:10.1016/b978-0-12-591640-0.50012-1

RUGG, D.; HAIR, J. Dose determination of a novel formulation of metaflumizone plus amitraz for control of cat fleas (*Ctenocephalides felis felis*) and brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) on dogs, **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 3, p. 203-208, 2007.

RUST, M. K. Recent advancements in the control of cat fleas, **Insects**, v. 11, n. 668, 2020.

RUST, M. K.; REIERSON, D. A. Activity of insecticides against the preemerged adult cat flea in the cocoon (*Siphonaptera: Pulicidae*). *Journal of Medical Entomology*, v. 26, n. 4, p. 301-305, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1093/jmedent/26.4.301>.



RUST, M.; VETTER, R.; DENHOLM, I.; BLAGBURN, B.; WILLIAMSON, M.; KOPP, S.; COLEMAN, G.; HOSTETLER, J.; DAVIS, W.; MENCKE, N.; REES, R.; FOIT, S.; TETZNER, K. Susceptibility of cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) to Fipronil and Imidacloprid using adult and larval bioassays, **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 3, p. 638-643, 2014.

RUST, M.; LANCE HEMSARTH, W. Synergism of adulticides and insect growth regulators against larval cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae), **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 3, p. 790-795, 2019.

RUST, M.; HEMSARTH, W. 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, M. Insecticide resistance in fleas, **Insects**, v. 7, n. 1, 2016.

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

SALGADO, V.; HAYASHI, J. Metaflumizone is a novel sodium channel blocker insecticide, **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 3, p. 182-189, 2007.

SEUFERER, S.; BRAYMER, H.; DUNN, J. Metabolism of Diflubenzuron by Soil Microorganisms and Mutagenicity of the Metabolites, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 10, p. 174 – 180, 1979.

SHIPSTONE, M. A.; MASON, K.V. The use of Insect Development Inhibitors as an Oral Medication for the Control of the Fleas *Ctenocephalides felis*, *Ct. canis* in the Dog and Cat, **Veterinary Dermatology**, v. 6, n. 3, p. 131-137, 1995.

SHONO, T.; ZHANG, L.; SCOTT, J. Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 80, n. 2, 2004.

SIMON ASCHER, K.; NEMMY, N. Contact Activity of Diflubenzuron Against *Spodoptera littoralis* Larvae, **Pesticide Science**, v. 7, p. 447-452, 1976.

SONG, W.; LIU, Z.; DONG, K. Molecular basis of differential sensitivity of insect sodium channels to DCJW, a bioactive metabolite of the oxadiazine insecticide indoxacarb, **NeuroToxicology**, v. 27, n. 2, p. 237-244, 2006.

SOUZA, C. P.; VEROCAI, G. G.; SOARES, L. B.; VIEIRA, V. P. C.; TAVARES, P. V.; NUNES, T. A. P.; MAGALHÃES, V. S.; SCOTT, F. B. Eficácia da associação de d-fenotrina e piriproxifen no controle de *Lynxacarus radovskyi* em felinos domésticos, **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 31, p. 28-30, 2012.

SU, N.; SCHEFFRAHN, R. Laboratory Evaluation of Two Chitin Synthesis Inhibitors, Hexaflumuron and Diflubenzuron, as Bait Toxicants Against Formosan and Eastern Subterranean Termites (Isoptera: Rhinotermitidae), **Journal of Economic Entomology**, v. 86, n. 5, p. 1453-1457, 1993.

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

TORDOIR, W.; VAN SITTERT, N. Chapter 7 Organochlorines, **Toxicology**. v. 91, p. 51-57, 1994.

WATSON, G. Actions of insecticidal spinosyns on  $\gamma$ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 71, n. 1, p. 20-28, 2001.

WAYNE YVIE, W.; WRIGHT, J. Fate of Diflubenzuron in the Stable Fly and House Fly, J. Agric, **Food Chemistry**, v. 26, n. 1, 1978.

ZHOU, X.; HOSHMANN, A.; HSU, W. Current review of isoxazoline ectoparasiticides used in veterinary medicine, **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 45, n. 1, p. 1-15, 2022.