

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Eficácia Pulicida e Residual *In Vitro* do Óleo
Essencial de *Illicium verum* Contra
***Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835)**
(Siphonaptera: Pulicidae)

Juliana Pereira de Freitas

2022



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

**EFICÁCIA PULICIDA E RESIDUAL *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *ILLICIUM VERUM* CONTRA *Ctenocephalides felis felis* (BOUCHÉ,
1835) (SIPHONAPTERA: PULICIDAE)**

JULIANA PEREIRA DE FREITAS

Sob a Orientação do Professor
Douglas Siqueira de Almeida Chaves

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2022

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

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

F862e Freitas, Juliana Pereira de, 1991-
Eficácia pulicida e residual *in vitro* do óleo essencial
de *Illicium verum* contra *Ctenocephalides felis felis*
(BOUCHÉ, 1835) (SIPHONAPTERA: PULICIDAE) /
Juliana Pereira de Freitas. - Seropédica-RJ, 2022.
80 f.: il.

Orientador: Douglas Siqueira de Almeida Chaves.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2022.

1. Óleo essencial. 2. Pulgas. 3. Controle. 4.
Ectoparasitas. I. Chaves, Douglas Siqueira de Almeida
, 1981-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta dissertação, desde que seja citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 464/2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.012102/2022-14

Seropédica-RJ, 23 de fevereiro de 2022.

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

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2022

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

(Assinado digitalmente em 24/02/2022 11:01)
DOUGLAS SIQUEIRA DE ALMEIDA CHAVES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
ICBS (12.28.01.22)
Matricula: 1705075

(Assinado digitalmente em 24/02/2022 11:00)
YARA PELUSO CID
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptºCF (12.28.01.00.00.47)
Matricula: 1700427

(Assinado digitalmente em 24/02/2022 14:08)

DENISE COUTINHO ENDRINGER

ASSINANTE EXTERNO CPF: 052.132.957-46

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **464**, ano: **2022**, tipo: **ATA**, data de emissão: **23/02/2022** e o código de verificação: **261bf7ffa5**

“Cada tic tac é um segundo da vida que passa, foge, e não se repete.
E há nele tanta intensidade, tanto interesse, que o problema é só sabê-lo viver.
Que cada um o resolva como puder.”

Frida Kahlo

“O aspecto mais triste da vida de hoje é que a ciência ganha em conhecimento mais
rapidamente que a sociedade em sabedoria.”

Isaac Asimov

DEDICATÓRIAS

Ao meu pai, Paulo (*in memoriam*), que mesmo tendo completado o ensino médio aos 68 anos, não mediu esforços e empenhou todos seus recursos na educação de nossa família.

À todas as vítimas do negacionismo que assola nossa sociedade e ceifou vidas, sobretudo durante a pandemia.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Às forças da natureza por me inspirarem e fazerem acreditar que há algo mais que dita um propósito a nossa existência.

À minha mãe Angélica, por todas as vezes que repetiu que “o saber não ocupa espaço” e por me incentivar a perseverar e chegar até aqui, mesmo diante de momentos tão duros.

Ao meu Pai (*in memoriam*) que com tanta sabedoria pode me ensinar a ter caráter, humildade e fé.

Ao meu companheiro Felipe, por todo apoio irrestrito ao longo de 10 anos e por enriquecer e colorir meus dias com carinho, afeto, leveza e amor.

À minha filha Isis, que mesmo tão pequena, é o combustível que me permite superar todos obstáculos.

Às minhas sete tias, por serem exemplo de luta, superação e união.

À minha tia Marilda, por tanto amor e cuidado que sempre me dedicou.

Às minhas primas e primos por todo carinho, pelos bons momentos compartilhados e pelo companheirismo nos maus momentos

Aos meus avós Cazuza e Maura (*in memoriam*) por me servirem de inspiração e exemplo de vida.

À minha amiga Débora, por me incentivar e acreditar no meu potencial mais do que eu mesma, por ser uma verdadeira irmã.

Ao Professor Fabio Scott pela amizade construída, pelos conselhos e conversas que sempre abriram horizontes.

Ao Professor Carlos Wilson pelo apoio e saber compartilhado.

À Professora Thaís, pelo apoio, atenção e carinho que sempre teve comigo.

À Professora Yara, pelo tempo dedicado em conversas sempre tão ricas e inspiradoras.

Aos amigos que conquistei no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, pela atuação profissional que permite o desenvolvimento deste e de tantos outros trabalhos e por terem se tornado para mim, uma família.

A todos meus amigos, por darem sentido a vida.

Ao meu orientador, pela confiança em aceitar me orientar, pelo conhecimento compartilhado, pela compreensão e empatia, por ser verdadeiramente humano em tempos tão “estranhos” como os atuais, minha eterna gratidão.

Aos meus animais de estimação e todos os outros que em algum momento passaram pela minha vida, por terem me ensinado a ser solidária, ter empatia e reconhecer olhares.

Aos animais da colônia, sem os quais este trabalho não seria possível, portanto, merecem todo reconhecimento e carinho.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, por me abrir portas e ao mesmo tempo tirar a palavra interdisciplinaridade do papel, obrigada.

Ao Arthur e toda secretaria do programa por todo auxílio e disponibilidade.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela minha formação profissional e enriquecimento humano.

Ao Laboratório de Química de Bioativos Naturais, por ser mais do que um espaço de trabalho, mas uma casa acolhedora e fértil para o desenvolvimento de idéias.

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.

RESUMO

FREITAS, Juliana Pereira de. **Eficácia pulicida e residual *in vitro* do óleo essencial de *Illicium verum* contra *Ctenocephalides felis felis* (BOUCHÉ, 1835) (SIPHONAPTERA: PULICIDAE).** 2022. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

A pulga *Ctenocephalides felis felis* é o principal ectoparasita de cães e gatos, com relevância mundial. Em torno de 50% das patologias dermatológicas observadas nestes animais, estão relacionadas a presença de *C. felis felis*. Por conta de sua biologia, grandes infestações são frequentes, sendo muito comum o uso de inseticidas químicos para o controle das infestações. No entanto estes produtos apresentam algumas desvantagens relacionadas a degradação ambiental e resistência por parte dos organismos alvo. Este panorama tem sustentado as pesquisas em busca de compostos com atividade inseticida com potencial para o desenvolvimento de produtos que possam representar alternativas aos utilizados atualmente, tornando crescente os estudos com inseticidas botânicos. O *Illicium verum* é uma planta medicinal da família *Schisandraceae*, com frutos ricos em óleo essencial e com bioatividade contra vários insetos. O presente estudo teve como objetivo determinar a composição química do óleo essencial dos frutos de *Illicium verum*, avaliar sua atividade pulicida *in vitro* sobre pulgas adultas de *Ctenocephalides felis felis* bem como sua eficácia residual. Foi utilizado óleo essencial comercial. A análise química por cromatografia gasosa, permitiu identificar 16 compostos sendo que o (*E*)-anetol foi o constituinte majoritário representando 79,96% da composição. Utilizou-se o método de impregnação em tiras de papel filtro para a realização do teste *in vitro*. O óleo essencial de *Illicium verum* apresentou atividade inseticida contra adultos de *Ctenocephalides felis felis*, com 100% de eficácia na concentração de 800 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Para a realização do teste de eficácia residual foi utilizado o método de papel filtro com a concentração que apresentou 100% de mortalidade, avaliou-se a mortalidade das pulgas a cada 24h, após cada avaliação as pulgas eram substituídas por pulgas novas advindas da mesma colônia, manteve-se as fitas impregnadas inicialmente, este procedimento foi repetido a cada 24 horas até não ser verificada mais eficácia pulicida. Foi observada bioatividade ao longo 18 dias.

Palavras-Chave: Óleo essencial. Pulgas. Controle. Ectoparasitas.

ABSTRACT

FREITAS, Juliana Pereira de. **Pulicidal efficacy and in vitro residue of the essential oil of *Illicium verum* against *Ctenocephalides felis felis* (BOUCHÉ, 1835) (SIPHONAPTERA: PULICIDAE).** 2022. 67p. Dissertation (Masters in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

The *Ctenocephalides felis felis* flea is the main ectoparasite of dogs and cats, transported worldwide. Around 50% of the dermatological pathologies observed in animals are related to the presence of *C. felis felis*. Due to its biology, large infestations are frequent, and the use of chemical insecticides to control infestations is very common. However, these products have disadvantages related to environmental degradation and resistance by target organisms. This panorama has supported research in search of compounds with insecticidal activity with potential for the development of products that may represent alternatives to those currently used, increasing studies with botanical insecticides. *Illicium verum* is a medicinal plant of the Schisandracea family, with fruits rich in essential oil and with bioactivity against several insects. The present study aimed to determine the chemical composition of the essential oil of *Illicium verum* fruits, evaluate its in vitro pulicidal activity on adult *Ctenocephalides felis felis* fleas as well as its residual efficacy. Commercial essential oil was used. Chemical analysis by gas chromatography identified 16 compounds, with (*E*)-anethole being the major constituent representing 79.96% of the composition. Use the paper filter strip impregnation method to perform the in vitro test. The essential oil of *Illicium verum* showed insecticidal activities against adults of *Ctenocephalides felis felis*, with 100% efficacy at a concentration of 800µg • cm⁻². To carry out the residual efficacy test, the filter paper method was used with the concentration that presents 100% mortality, the mortality of the fleas was evaluated every 24 hours, after each evaluation how fleas were replaced by new fleas from the colony, kept as impregnated bulletin tapes, this procedure was repeated every 24 hours until no further purifying efficacy was verified. Bioactivity was observed over 18 days.

Keywords: Essential oil. Fleas. Control. Ectoparasites.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida da pulga *Ctenocephalides spp.*. 1: Pulgas adultas emergem das pupas e procuram hospedeiros para a primeira refeição de sangue; 2: Pulgas fêmeas adultas colocam uma média de 20 ovos por dia no hospedeiro que caem no meio ambiente; 3: As larvas se desenvolvem ao longo de 3 estágios larvais; 4: larvas formam casulos e depois tornam-se pupas. 3
- Figura 2.** Estimativa da população de animais de estimação no Brasil no ano de 2019. 4
- Figura 3.** Estrutura química do Fipronil. 7
- Figura 4.** Estruturas químicas do Nitempiram (A) e Imidacloprida (B). 8
- Figura 5.** Flores de *Nicotiana tabacum* L. 8
- Figura 6.** Flores de *Chrysanthemum cinerifolius*. 9
- Figura 7.** Estruturas químicas da *aletrina* (A) e *resmetrina* (B). 10
- Figura 8.** Número de publicações anuais no período entre os anos 2000 e 2021 na base *ScienceDirect*. Palavras-chave “*Ctenocephalides felis and natural products*” 14
- Figura 9.** Número de publicações anuais no período entre os anos 2000 e 2021 na base *Sciencedirect*. Palavras-chave “*Ctenocephalides felis felis and essential oils*” 15
- Figura 10.** Estrutura química da *Azadiractina*. 16
- Figura 11.** Diferenças morfológicas entre frutos de *Illicium verum* e *Illicium lanceolatum*. ... 18
- Figura 12.** Estruturas químicas *limoneno* (A), *linalool* (B), *α-pineno* (C). 19
- Figura 13.** Estrutura química do (*E*)-*anetol*, constituinte majoritário do óleo essencial de *Illicium verum*. 19
- Figura 14.** Cromatografia Gasosa. Cromatógrafo a Gás Hewlett-Packard 5890 II. Coluna: HP – 30 m x 0,25 mm (AGILENT). Temp.: Coluna: 50°C (0 min), 3°C /min a 200°C. Injetor: 220°C Split: 1/50. Detector FID: 220 °C. Vol. de injeção: 1 ul (conc 1.0 % em diclorometano). 25
- Figura 15.** Estruturas químicas da moléculade (*E*) - *anetol* (A), *β-terpinol* (B) e *estragol* (C). 26
- Figura 16.** Eficácia residual do óleo essencial de *Illicium verum*, na concentração de 800 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, avaliada a cada 24h, ao longo de 18 dias, contra adultos de *C. felis felis*. .. 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil químico do óleo essencial dos frutos de <i>Illicium verum</i>	26
Tabela 2. Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Illicium verum</i> , mortalidade de adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> após 24 e 48 horas.	27
Tabela 3. Mortalidade em fase adulta de <i>Ctenocephalides felis felis</i> , frente ao óleo essencial de <i>Illicium verum</i> (ajuste de concentração).	28
Tabela 4. CL ₅₀ e CL ₉₀ da fase adulta de <i>Ctenocephalides felis felis</i> em 24 e 48h horas, frente ao O.E. de <i>Illicium verum</i> , obtidas através dos dados de mortalidade dos testes <i>in vitro</i> e do <i>probit</i>	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Biologia de <i>Ctenocephalides felis felis</i> (Bouché,1835).....	2
2.2 Importância Veterinária e em Saúde Pública de Pulgas	4
2.3 Controle Ambiental e Animal	5
2.3.1 Controle mecânico.....	6
2.3.2 Controle químico.....	6
2.4 Resistência a Inseticidas	12
2.5 Controle Biológico	13
2.6 Produtos Naturais / Bioinseticidas.....	14
2.7 <i>Illicium verum</i> Hook. f.....	17
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Obtenção do óleo essencial de <i>Illicium verum</i>	22
4.2 Origem das Pulgas.....	22
4.3 Caracterização Química do Óleo Essencial de <i>Illicium verum</i>	22
4.3.1 Análise por cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chamas e massas (CG/DIC/EM)	22
4.4 Eficácia <i>in vitro</i> do Óleo Essencial de <i>Illicium verum</i> no Controle de Adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	23
4.4.1 Preparo das fitas impregnadas	23
4.4.2 Preparo do teste <i>in vitro</i>	23
4.5 Ajuste da Concentração do Óleo Essencial de <i>Illicium verum</i> para Estimativa da CL ₅₀ e CL ₉₀	24
4.6 Eficácia Residual	24
4.7 Análise Estatística	24
5 RESULTADOS	25
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO.....	36
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	57
A – Artigo científico publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.....	57

1 INTRODUÇÃO

As pulgas são insetos ectoparasitas de grande importância veterinária, sendo que a *Ctenocephalides felis felis* conhecida popularmente como “pulga do gato”, é considerada o ectoparasita de cães e gatos de maior relevância mundial (DRYDEN, 1993).

Aproximadamente 50% dos casos de patologias dermatológicas em cães e gato estão relacionadas a presença de *C. felis felis*, animais infestados costumam apresentar sintomas bastante característicos como coceiras, pruridos, irritabilidade e inflamações, sendo estes os principais sintomas da DAPP (Dermatite Alérgica a Picada de Pulga), uma reação alérgica específica diretamente relacionada a presença de *C. felis felis*, além disso há a possibilidade de doenças e endoparasitas para os animais bem como o risco de transmissão de zoonoses como a dipilidiose (YOUSSEFI *et al.*, 2014; GOPINATH *et al.*, 2018)

Por conta da sua biologia, que compreende um ciclo curto e alta fertilidade, infestações expressivas e persistentes não são eventos incomuns, impulsionando cada vez mais gastos com produtos para controles de ectoparasitas, de forma que estes representem uma parcela importante do segmento de produtos farmacêutico – veterinários. Estes produtos são geralmente a base de compostos químicos organossintéticos que tem baixa degradabilidade, causam desequilíbrio ambiental, doenças em animais e seres humanos e favorecem o desenvolvimento da resistência a inseticidas por parte dos organismos alvo, acarretando graves processos de desequilíbrio ecológico (PISA *et al.*, 2015).

Como consequência há uma crescente demanda mundial por novas alternativas de controle de ectoparasitas, com práticas que se alinhem com um ideal ecologicamente correto, este panorama tem sustentado de maneira notável as pesquisas com inseticidas botânicos, sendo os óleos essenciais os compostos mais discutidos e com resultados muito promissores (ISMAN, 2020).

Os óleos essenciais são misturas complexas constituídos de múltiplos componentes em diferentes concentrações na sua formação, esta característica representa um atributo importante pois dificulta o desenvolvimento de mecanismos de resistência inseticida por parte dos organismos alvo, além de geralmente serem compostos com boa degradabilidade no ambiente (AUNGTIKUN; SOONWERA; SITTICHOK, 2021).

É crescente a necessidade de se elucidar melhor a atuação inseticida destes compostos, sua eficácia, aplicabilidade e viabilidade, o que motiva cada vez mais estudos com diferentes espécies de plantas promissoras, como é o caso do anis estrelado (*Illicium verum*) da família *Schisandraceae*, conhecido na medicina tradicional como fonte para obtenção do ácido chiquímico, utilizado para produzir o fosfato de oseltamivir, um antiviral com nome comercial de Tamiflu[®], utilizado no tratamento de gripe aviária H5N1, além de bastante difundido na medicina popular por suas propriedades antifúngicas, antibacterianas, anti-inflamatórias, anticâncer e inseticidas (WANG *et al.*, 2011).

Neste sentido, o presente trabalho buscou avaliar a bioatividade do óleo essencial de *Illicium verum* sobre insetos de interesse veterinário, intencionando contribuir na busca por compostos que apresentam potencial no controle da forma madura (adulto) da pulga, através da determinação da composição química do óleo essencial de *Illicium verum*, avaliação da atividade pulicida *in vitro* sobre adultos de *Ctenocephalides felis felis* e determinação da sua eficácia residual.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché,1835)

A ordem *Siphonaptera* é representada basicamente pelas pulgas, sendo descritas mais de 3.000 espécies no mundo (RASZL; CABRAL; LINARDI, 1999) das quais 63 espécies e/ou subespécies, já foram relatadas no Brasil (LINARDI; GUIMARÃES, 2000). Entre estas, evidenciando-se às famílias Pulicidae: *Pulex irritans*, *Xenopsylla cheopis*, *Ctenocephalides felis felis* e *Ctenocephalides canis* e Tungidae: *Tunga penetrans* (L.).

De maneira geral se trata de insetos, ectoparasitas, não alados, hematófagos na fase adulta, com grande destaque para a *Ctenocephalididade felis felis* e *Ctenocephalides canis* por serem espécies de ampla distribuição global (LINARDI; GUIMARÃES, 2000; VAN DER MESCHT; MATTHEE; MATTHEE, 2021).

A *C. felis felis* se estabeleceu de forma mais abrangente, do que a *C. canis canis* devido a sua maior adaptação e capacidade de infestar mais espécies de hospedeiros (ROTHSCHILD *et al.*, 1953). Estudos e revisões mais completos presentes na literatura, sobre a biologia e o controle destes insetos, datam de aproximadamente 20 anos atrás (RUST, 2017). No entanto, a *C. felis felis* é considerada o ectoparasita de maior relevância mundial, parasitando respectivamente cães e gatos (LINARDI; GUIMARÃES, 2000; RUST, 2017).

Estima-se que em uma infestação, apenas 5% de toda população de pulgas estejam no hospedeiro, enquanto o ambiente é responsável por alocar 95% da população, o que favorece a persistência das infestações e da continuidade do ciclo (LINARDI; GUIMARÃES, 2000).

O ciclo das pulgas é composto por 4 estágios bem definidos: Ovo, larva (L1, L2 e L3), pupa e adulto (KRASNOV, 2008) (Figura 1), podendo demorar de 12 até 174 dias para se concluir (dependendo das condições ambientais) no entanto, geralmente o ciclo é completo em um período de três a oito semanas levando em consideração as condições comuns a ambientes habitados pelos seus principais hospedeiros (DRYDEN, 2009).



Figura 1. Ciclo de vida da pulga *Ctenocephalides spp.* 1: Pulgas adultas emergem das pupas e procuram hospedeiros para a primeira refeição de sangue; 2: Pulgas fêmeas adultas colocam uma média de 20 ovos por dia no hospedeiro que caem no meio ambiente; 3: As larvas se desenvolvem ao longo de 3 estágios larvais; 4: larvas formam casulos e depois tornam-se pupas.

Fonte: Adaptado de European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP, 2015).

Os ovos normalmente eclodem entre 24h e 10 dias após a oviposição pelas fêmeas adultas (SILVERMAN; RUST; REIERSON, 1981), liberando as larvas que possuem geotropismo positivo, e necessitam de escuro e umidade para permanecerem viáveis, desta forma, carpetes, tapetes, mantas ou o próprio solo, onde estanciam seus hospedeiros são locais propícios ao desenvolvimento (BLAGBURN; DRYDEN, 2009).

Na fase larval se alimentam principalmente de matéria fecal proveniente dos indivíduos adultos, no entanto também podem ingerir matéria orgânica presente no ambiente (RUST, 2017) quando chegam ao terceiro instar, as larvas iniciam a fase de pupa, ficando revestidas por uma espécie de casulo que permanece no meio ambiente, constituído de material tecido pela própria larva, bem como poeira e matéria orgânica, que as protege na fase de metamorfose, sendo rompido após um período que pode variar de 5 a 9 dias, liberando a pulga adulta, através de estímulos como pressão física, dióxido de carbono e calor (SILVERMAN; RUST, 1985).

As pulgas na fase adulta são insetos visíveis a olho nu, achatados lateralmente, com cor castanha, ápteros, no entanto possuem o terceiro par de pernas bem desenvolvido, permitindo

que saltem (OLIVEIRA *et al.*, 2008) podem chegar a altura de 33cm e saltar 600 vezes em uma única hora. Desta forma, assim que desempupam, passam do ambiente para o hospedeiro buscando se alimentar de sangue, podendo inclusive picar humanos (ROTHSCHILD *et al.*, 1973), iniciam o acasalamento em um período curto, em torno de 24 horas após a primeira refeição já podem iniciar a pôr ovos, passando a maior parte da vida em parasitismo (DRYDEN; BROCE, 2002).

Também podem sobreviver por vários dias no ambiente até serem capazes de realizar a primeira refeição (DRYDEN *et al.*, 2018). Este período de sobrevivência é influenciado diretamente pelas condições ambientais de umidade e temperatura (SILVERMAN; RUST; REIERSON, 1981).

2.2 Importância Veterinária e em Saúde Pública de Pulgas

As pulgas são ectoparasitas de importância veterinária e em saúde pública, sobretudo no que diz respeito seu impacto sobre populações de áreas pobres onde existem grandes lacunas em relação ao saneamento básico e acesso a informação, (HEUKELBACH *et al.*, 2003).

No Brasil, mais da metade da população de áreas carentes já foi acometida de alguma ectoparasitose, como é o caso da tungíase (conhecida popularmente como bicho de pé), causada pela pulga *Tunga penetrans* (WILCKE *et al.*, 2002).

Existe uma série de doenças sejam virais como a mixomatose (*Myxoma*), bacterianas como a tifo murino (*Rickettsia typhi* e *Rickettsia felis*), bartonelose (*Rickettsia prowazekii*), tularemia (*Francisella tularensis*) e peste bubônica (*Yersinia pestis*) e helmintoses como a dipilidiose (*Dipylidium caninum*) que podem ser transmitidas para o homem e animais através das pulgas (LINARDI, 2011).

A capacidade de transmitir estas doenças é potencializada pelo estreitamento do convívio entre o homem e animais nos últimos anos, de forma que animais de companhia vem sendo cada vez mais entendidos e tratados como membros da família (CARVALHO; PESSANHA, 2013).

Segundo dados da ABINPET (Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação) o Brasil tem a segunda maior população de cães e gatos do mundo (Figura 2) (ABINPET, 2020), sendo estes, considerados os principais hospedeiros de *C. felis felis* (DRYDEN, 1993).

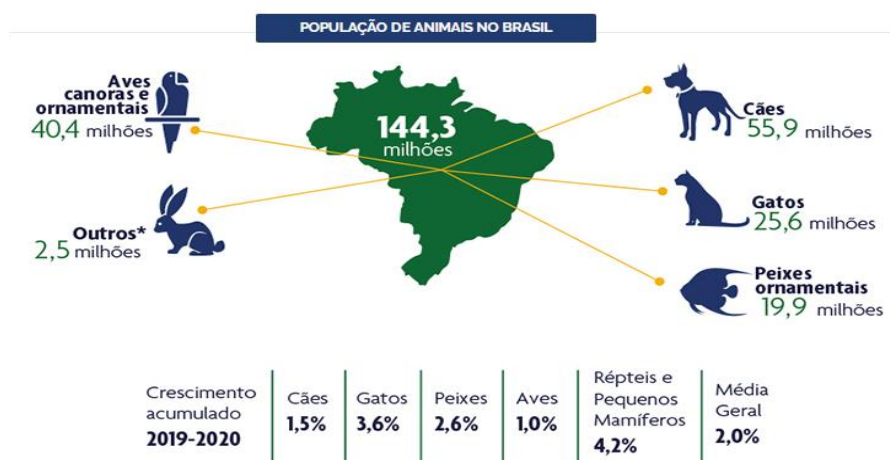


Figura 2. Estimativa da população de animais de estimação no Brasil no ano de 2019.

Fonte: Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, 2021).

As pulgas *C. felis felis* são artrópodes hematófagos, portanto atuam como importantes vetores de patógenos principalmente para cães e gatos (principais hospedeiros) bem como para seres humanos (DRYDEN, 1993). Ao se alimentarem perfuram a pele destes animais até alcançarem os vasos sanguíneos (DRYDEN; RUST, 1994), provocando coceira, alopecia, pruridos e reação alérgica específica, denominada Dermatite Alérgica a Picada de Pulga -DAAP (NOLI; COLOMBO, 2020; RUST; DRYDEN, 1997).

Aproximadamente 50% dos casos de patologias dermatológicas em cães e gato estão relacionadas a presença de *C. felis felis*. (BRANDÃO, 2004; LAWRENCE *et al.*, 2015) causando irritações, pruridos, eritemas, pápulas e alopecia, além disso, em infestações expressivas, sobretudo em animais de pequeno porte ou filhotes, podem provocar anemia por deficiência de ferro (LINARDI; SANTOS, 2012).

A *C. felis felis*, também atua como hospedeira intermediária da fase larval de cestoides como *Hymenolepis diminuta*, que parasita principalmente roedores e acidentalmente humanos e por ser muitas vezes assintomática, acaba sendo subnotificada (PANTI-MAY *et al.*, 2020) e *Dipylidium caninum*, popularmente conhecido como “tênia do cão” (RUST, 2017).

O contágio acontece quando cães e gatos ao se coçarem ou lamberem, acabam ingerindo as pulgas infectadas com larvas cisticercóides (ESCCAP, 2018), e desenvolvem a dipilidiose que se caracteriza por problemas digestivos, perda de peso e desconforto (RUST, 2017), bem como irritação anal e eliminação de segmentos (NELSON; COUTO, 2015).

A transmissão para humanos se dá sobretudo em crianças, através da ingestão acidental da pulga contaminada, ocasionada pela proximidade com cães e gatos, tanto quanto a ambientes infestados, podendo causar desconforto intestinal e anal, consistindo assim em uma importante zoonose (LITTLE, 2017).

Alguns estudos têm sido conduzidos no sentido de investigar o potencial de transmissão da Leishmaniose por *C. felis felis*, no entanto os resultados não foram conclusivos quanto a capacidade de transmissão oral através de pulgas (COUTINHO; LINARDI, 2007).

Nesta perspectiva o controle eficaz das pulgas é essencial para aliviar sintomas mais rigorosos sobretudo em cães e gatos e para reduzir a chance de transmissão de doenças tanto para estes animais como seres humanos (DRYDEN *et al.*, 2018).

2.3 Controle Ambiental e Animal

As medidas de controle de ectoparasitas devem ser realizadas de maneira holística, compreendendo estratégias de controle mecânico, biológico e químico, englobando o tratamento de todos os animais que compartilham o mesmo local ou que tem algum tipo de contato entre si e do ambiente em questão (DRYDEN; NEAL; BENNETT, 1989).

O Brasil é o segundo maior país no mercado de pets, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e os custos anuais para controle de ectoparasitas tem se tornado cada vez mais altos (MIRANDA, 2020) e a maioria dos proprietários de animais dispensa mais recursos no controle de ectoparasitas diretamente nos animais do que no ambiente propriamente dito (MATOS *et al.*, 2015).

Existe uma variedade de produtos para controle de ectoparasitas com formulações de uso diretamente em pets, disponíveis no mercado, como coleiras repelentes, pipetas do tipo “spot-ons”, sprays, shampoos (ABINPET, 2014), bem como comprimidos com compostos de ação inseticida e acaricida, na forma de petiscos, como exemplo das isoxazolinias que apresentam ação rápida contra pulgas e carrapatos (DRYDEN *et al.*, 2018).

No entanto, mesmo em domicílios onde os animais não têm acesso as ruas ou a outros animais, deve-se enfatizar o controle ambiental, visto que, não só a matéria orgânica, mas também carpetes, estofados, reentrâncias de pisos de madeira, tacos, almofadas e mantas,

fornecem condições ideais para o desenvolvimento das pulgas, não devendo ser negligenciados (WARREN, 1986; HINK; NEEDHAM, 2007).

2.3.1 Controle mecânico

Para uma estratégia de controle de pulgas eficaz, é fundamental que haja um aconselhamento adequado dos tutores, permitindo que estes tenham entendimento das diferentes fases do ciclo do ectoparasita e a importância do cumprimento correto das etapas (PERIBÁÑEZ; CALVETE; GRACIA, 2018).

O controle mecânico é uma etapa importante, principalmente no manejo ambiental pois 95% da infestação se encontra no ambiente em formas imaturas (DRYDEN, 1994), compreendendo o terceiro estágio larval, quando há a transformação em pupa, que é a fase menos suscetível ao controle químico a base de inseticidas, devido a proteção fornecida pela própria estrutura do casulo até a emergência da pulga adulta (BEUGNET, 2013).

Segundo Rust (2005), o desenvolvimento das 3 fases larvais de *C. felis felis* se inicia com 50% de umidade, alertando a importância de que se certifique da não existência de pontos de acúmulo de umidade, como por exemplo locais de depósito de matéria orgânica nos quintais, para que o controle mecânico seja efetivo.

Portanto, a higiene é a forma mais efetiva de controle mecânico e deve incluir todos possíveis focos de infestação, realizando a varredura ou lavagem de canis, mantas, cobertores, estofados, bem como caixas de transportes e veículos, mesmo que a presença dos animais de estimação não seja constante nestes últimos pontos, eles não devem ser ignorados, pois podem servir como focos de futuras reinfestações (LINARDI; GUIMARÃES, 2000).

Além da varredura, retirada de material orgânico e substratos que possam servir de abrigo a estes ectoparasitas, a aspiração de carpetes e superfícies é considerada uma das formas mais eficientes de controle mecânico no ambiente, por remover as formas adultas e imaturas das superfícies (OSBRINK; RUST; REIERSON, 1986; MILLER *et al.*, 2000), bem como demonstrar ter um efeito de letalidade sobre elas (HINK; NEEDHAM, 2007).

A higiene do ambiente deve estar aliada a catação manual nos animais como fase inicial do controle mecânico, que deve ser realizado antes do controle químico (LINARDI; GUIMARÃES, 2000; BLAGBURN; DRYDEN, 2009).

No entanto, principalmente em relação ao controle animal, percebe-se uma predileção pelo uso de formulações químicas, em relação ao controle mecânico, o que motiva gastos com produtos para o controle destes ectoparasitas, que superam um bilhão de dólares por ano nos Estados Unidos (LAWRENCE *et al.*, 2015), além de impulsionar novos estudos em busca por ingredientes ativos cada vez mais eficazes (PERIBÁÑEZ; CALVETE; GRACIA, 2018).

2.3.2 Controle químico

Produtos para controle químico ectoparasiticida representam uma parcela expressiva da indústria pet, nos EUA representam quase metade da movimentação do setor de produtos para animais de companhia (RUST, 2017; BOBEY, 2015; NISBET; HUNTLEY, 2006). Entre a gama de produtos disponíveis no mercado, existe uma variedade de ingredientes ativos, como os fenilpirazóis, neonicotinóides, piretrinas, piretróides, carbamatos, organofosforados, isoxazolininas e lactonas macrocíclicas (VARLOUD; HODGKINS, 2015).

Os neonicotinóides e os fenilpirazóis, são os mais utilizados mundialmente, justificado pela alta toxicidade que apresentam para os insetos bem como a sua persistência (PISA *et al.*, 2015; GODINHO *et al.*, 2016).

Os fenilpirazóis agem no sítio de ligação dos receptores GABA (ácido gama-aminobutírico) individuais, induzindo uma rápida modificação na conformação do canal para o estado dessensibilizado, em consequência disso o fluxo de Cl⁻ para dentro da membrana é suprimido o que leva a morte dos insetos por hiperexcitação (GUEDES *et al.*, 2008; PISA *et al.*, 2015).

O fipronil (Figura 3) foi o primeiro fenilpirazol utilizado para controle de pragas e uma das suas principais vantagens está relacionada na segurança, visto que apresenta alta seletividade para insetos em detrimento de mamíferos, sendo considerado um dos mais seletivos entre os demais inseticidas que atuam no canal de cloreto (COLLIOT *et al.*, 1992; HAINZL; CASIDA, 1996; BONMATIN *et al.*, 2015; CASTRO JANER *et al.*, 2019).



Figura 3. Estrutura química do Fipronil.

Fonte: PubChem (2022a).

O fipronil também pode ter apresentações em associação com outros componentes em formulações e reguladores de crescimento a exemplo das benzoilureias, piriproxifeno e metopreno, o que permite um melhor efeito no controle de infestações, já que provoca efeito mais assertivo sobre as formas imaturas dos ectoparasitas (MELO *et al.*, 2012; VARLOUD; HODGKINS, 2015; PERIBÁÑEZ; CALVETE; GRACIA, 2018).

Os neonicotinóides também apresentam letalidade através da atividade neurotóxica, atuando como agonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) que são responsáveis pela neurotransmissão pós sinápticas (SHEETS *et al.*, 2016).

Apresentam alta seletividade, tendo alta toxicidade para invertebrados, reduzindo o risco de efeitos indesejados nos mamíferos (TOMIZAWA; CASIDA, 2005; BONMATIN *et al.*, 2015). Por isso são muito utilizados na medicina veterinária para controle de pulgas e demais ectoparasitas (PISA *et al.*, 2015).

Os principais representantes desta classe são o nitempiram (Figura 4 - A), imidacloprida (Figura 4 - B) e dinotenfuran, sendo que o imidacloprida foi o primeiro composto neonicotinóide comercializado em 1991 (JESCHKE; NAUEN, 2008). Sua atividade contra as pulgas pode ser via contato ou ingestão, sendo que existem diversas formulações disponíveis para pets no mercado, inclusive de uso tópico que chegam a matar 95% das pulgas parasitando cães e gatos mantendo este efeito por até 37 dias (RUST, 2005).

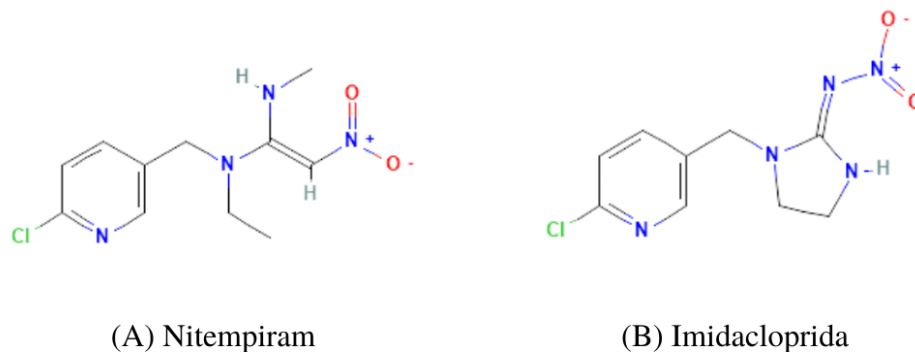


Figura 4. Estruturas químicas do Nitenpiram (A) e Imidacloprida (B).
Fonte: PubChem (2022b, 2022c).

O nitenpiram administrado oralmente, é encontrado na corrente sanguínea no intervalo de 90 minutos, ocasiona a morte de 100% das pulgas em parasitismo em 8 horas, sendo que em 30 minutos provoca a queda de 95% das pulgas alojadas no animal (MAHONEY; TINEMBART; SCHENKER, 2001; SCHENKER *et al.*, 2003).

Os neonicotinóides também apresentam efeito na redução das infestações através da redução significativa de níveis populacionais das pulgas na fase larval o que colabora com o controle no ambiente (RUST, 2005; DRYDEN *et al.*, 2011).

Estes compostos, assim como os piretróides, são inseticidas sintéticos derivados de inseticidas naturais, no caso dos neonicotinóides, sua síntese se deu a partir do alcaloide nicotina, presente em plantas como a *Nicotiana tabacum L.* (Figura 5), conhecida popularmente como tabaco ou fumo (MOREIRA *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2018).



Figura 5. Flores de *Nicotiana tabacum L.*
Fonte: Banco de imagens WordPress (2022).

A nicotina natural apresenta desvantagem pois é um inseticida que também pode intoxicar mamíferos, por isso foram realizadas alterações estruturais que resultaram na classe de inseticidas sintéticos dos neonicotinóides e seus derivados, compostos de moléculas mais

estáveis e que apresentam baixa toxidez para mamíferos (JESCHKE *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2018).

Os piretróides também são uma classe de inseticidas sintéticos derivados de plantas, neste caso, das piretrinas encontradas nas flores do *Chrysanthemum cinerifolius* (Figura 6) ou *Chrysanthemum coccineum*, também conhecidas como crisântemo ou piretro pertencentes a família Asteraceae (PULMAN, 2011; YANG *et al.*, 2018).



Figura 6. Flores de *Chrysanthemum cinerifolius*.

Fonte: Banco de imagens WordPress (2022).

Estima-se que o crisântemo era usado pelos chineses 1000 anos a.C. como inseticida, sendo que o registro mais antigo data de 1300 anos d. C., por Marco Polo relatando o uso do óleo proveniente desta planta para controle, em camelos, do que se acredita-se ser sarna (KHARE *et al.*, 2019).

Os piretróides resultam de vários estudos em prol da modificação da estrutura química das piretrinas, no sentido de reduzir o espectro oxidação e inativação da capacidade inseticida como consequência da exposição a luz solar destes compostos naturais (PULMAN, 2011).

A aletrina (Figura 7 - A) e a resmetrina (Figura 7 - B) foram os primeiros piretróides sintetizados nos anos de 1949 e 1957, no entanto ainda apresentavam fotoinstabilidade, os primeiros piretróides fotoestáveis foram obtidos na década de 70 (ELLIOTT *et al.*, 1978; GUEDES *et al.*, 2008; PULMAN, 2011).

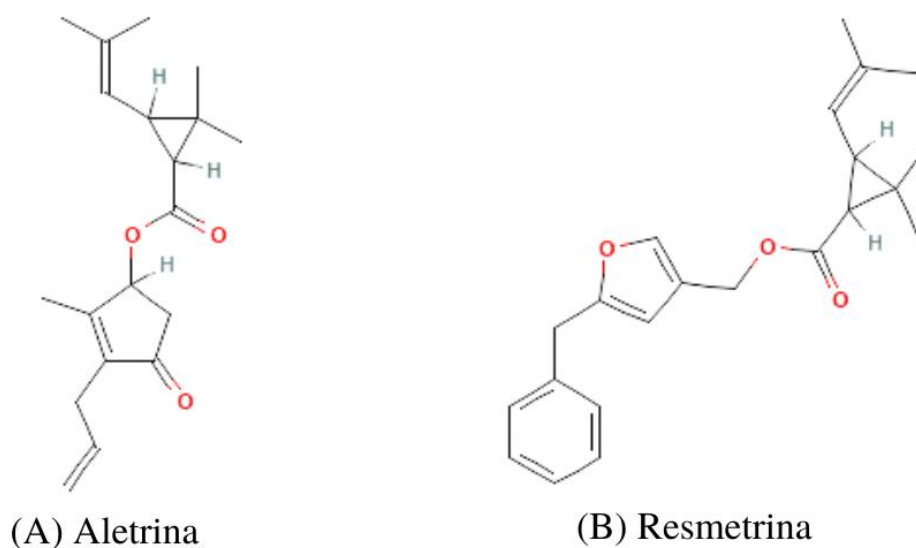


Figura 7. Estruturas químicas da *aletrina* (A) e *resmetrina* (B).
 Fonte: PubChem (2022a, 2022b).

Estes inseticidas são moduladores dos canais de sódio, tem efeito neurotóxico modificando os canais de sódio de maneira que eles permaneçam abertos por mais tempo e consequentemente permitindo uma entrada maior de sódio nas membranas o que provoca hiperexcitação e morte dos insetos (SANTOS; AREAS; REYES, 2007; GUEDES *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2018).

São divididos em piretróides tipo I e tipo II de acordo com seu mecanismo de ação na abertura dos canais de sódio, os tipo II provocam um atraso no fechamento destes canais por período maior dos que os de tipo I, de modo que os de tipo II são capazes de agir no neurotransmissor ácido - aminobutírico (GABA) (BURNS *et al.*, 2013; DU *et al.*, 2013).

Alguns exemplos de piretróides bastante conhecidos são a permetrina, flumetrina, cipermetrina e a deltametrina, sendo a associação dos dois primeiros a mais utilizada para o controle ectoparasitas de cães e gatos. No entanto tem se observado uma redução na eficácia inseticida dos piretróides no controle de ectoparasitas comuns nestes animais (RODRIGUEZ-VIVAS *et al.*, 2017).

Outras classes de inseticidas como os carbamatos e os organofosforados provocam alta letalidade e também apresentam atividade neurotóxica, são muito utilizados na agricultura e na medicina veterinária, neste caso, ambos provocam acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas através da inativação da acetilcolinesterase (AChE) (GUPTA *et al.*, 2017).

A principal diferença está na forma como acontece a inibição da enzima. Casos de intoxicação por organofosforados são mais comuns pois a inibição tem efeito irreversível, já sobre os carbamatos observa-se que a reativação acontece em até 48 horas (MARRERO *et al.*, 2017).

Mesmo com alta toxidez observada, parece que a *C. felis felis* apresenta uma elevada aptidão em desenvolver resistência a estes inseticidas, por alguns indivíduos da população apresentarem a capacidade de apresentarem receptores AChE com a estrutura modificada, fazendo com que estes produtos não tenham efeito letal sobre eles (COLES; DRYDEN, 2014).

Além disso, carbamatos e organofosforados apresentam baixa seletividade para invertebrados o que faz com que provoquem a intoxicação de mamíferos / organismos não alvo, incluindo seres humanos, chegando ao ponto das intoxicações se tornarem caso de saúde

pública na Venezuela (MARRERO *et al.*, 2017). No Brasil a OMS já considerou estas classes como as maiores causadoras de mortes por intoxicação (BRASIL, 1996).

Cada vez, a busca por agentes menos nocivos e mais seguros, vem sendo impulsionada sobretudo em formulações direcionadas para animais de companhia, dando lugar a novos produtos (BLAGBURN; DRYDEN, 2009).

As isoxazolininas são substâncias químicas que apresentam maior seletividade para bloquear receptores de artrópodes, resultando em baixa toxicidade em mamíferos (WRIGHT, 2018). Atuam nos receptores de ácido gama-amino butírico (GABA), inibindo a GABA e bloqueando os canais de cloreto, o que afeta o sistema nervoso e provoca a morte dos ectoparasitas (GASSEL *et al.*, 2014; BREITSCHWERDT; LITTLE; RUGG, 2016).

Desde 2013 tem sido utilizadas principalmente no controle de pulgas e carrapatos de animais de companhia, em formulações tanto para uso oral quanto de uso tópico (OTRANTO, 2014).

Alguns exemplos de isoxazolininas presentes no mercado são fluralaner, afoxolaner, sarolaner e lotilaner (RODRIGUEZ-VIVAS *et al.*, 2020). A indicação principal é para o controle de ectoparasitas, principalmente as pulgas e carrapatos, no entanto, também tem atividade acaricida comprovada, sobre *Otodectes cynotis*, *Sarcoptes scabiei* e *Demodex* (OTRANTO, 2014; HAMPEL *et al.*, 2018; ROMERO-NÚÑEZ *et al.*, 2019).

Estes compostos têm alta eficácia, com rápida absorção e excelente perfil de segurança, estudos demonstraram ausência de efeitos patológicos relacionados ao tratamento com lotilaner mesmo com doses elevadas administradas por vários meses. Impulsionando que estes, substituam o uso de compostos tóxicos tradicionais como os organofosforados, organoclorados e carbmatos (KUNTZ; KAMMANADIMINTI, 2017; LITTLE, 2017; TOUTAIN; SEEWALD; JUNG, 2017).

Além disso, as formulações, podem estar disponíveis em associação com outras substâncias como é o caso do sarolaner + selamectina (avermectina), disponível no mercado para uso tópico, na forma de “spot on”, com alta eficácia no controle dos principais ectoparasitas de felinos (RODRIGUEZ-VIVAS *et al.*, 2020).

A selamectina é uma avermectina, ou seja, um derivado macrocíclico das lactonas, assim como as milbemicinas. As avermectinas são produzidas pela fermentação do fungo *Streptomyces avermitilis* e as milbemicinas provem do *Streptomyces cyanogriseus* (PRICHARD; MÉNEZ; LESPINE, 2012; J. NOLAN; B. LOK, 2012).

Estes compostos também atuam nos receptores de ácido gama-amino butírico (GABA) provocando a inibição da transmissão nervosa, no entanto seu alto peso molecular impede que ultrapassem a barreira hematoencefálica da maior parte dos mamíferos (SARTOR; BICUDO, 2002).

No entanto a ivermectina e milbemicina não são consideradas seguras para cães das raças pastor australiano, pastor de shetland, collie e old English Sheepdog, pois apresentam sintomas de intoxicação quando tratados com estes compostos, podendo evoluir para óbito (AYRES; ALMEIDA, 1999; BILWAL *et al.*, 2020).

A ivermectina é uma lactona macrocíclica que não tem boa eficácia no controle de *C. felis felis*, já a selamectina é uma lactona macrocíclica que apresenta bons resultados no controle destes ectoparasitas (ZAKSON-AIKEN *et al.*, 2001; FRANC; YAO, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2016).

Além dos inseticidas que apresentam atividade neurotóxica, existem compostos químicos que agem através da interferência no crescimento e desenvolvimento dos artrópodes, sendo assim classificados como reguladores de crescimento de insetos (RCIs) ou reguladores de crescimento de artrópodes (RCAs), estes compostos podem ser utilizados em associação com outras classes de inseticidas ou sozinhos (ESTRADA; MULLA, 1986; RUST, 2017).

O metopreno foi o primeiro RCA registrado comercialmente, sendo indicado para controle de mosquitos, atualmente é encontrado para controle de ectoparasitas de cães e gatos, em formulações de uso tópico, na forma de pipetas “spot-on” (PENER; DHADIALLA, 2012). Estas substâncias atuam principalmente nas fases imaturas dos insetos, provocando crescimentos anormais e impedindo a perfeita metamorfose, podendo resultar em morte direta das fases larvais (JIANG *et al.*, 2020).

Os inseticidas neurotóxicos tem uma eficiência melhor no controle de insetos adultos, no caso das infestações por pulgas, é muito comum lançar mão do uso dos RCAs, em conjunto com inseticidas neurotóxicos, para um controle mais eficaz, visto que os reguladores atuam nos ovos e na fase larval, desta forma a desinfestação atua de maneira mais completa, pela maior probabilidade alcançar as diferentes fases do ciclo (SILVERMAN; RUST, 1985; DRYDEN; GAAFAR, 1991; RUST, 2005; MARTINS; GUARNIERI; PEREIRA, 2008).

Os principais RCAs utilizados para ectoparasitas de interesse veterinários podem funcionar tanto inibindo a síntese de quitina, essencial para a fase adulta ou como análogos do hormônio juvenil, ao inibir a expressão de genes fundamentais para a completa metamorfose, os indivíduos não formam suas estruturas adultas e, portanto, não se desenvolvem, as pupas não se tornam adultas e os ovos não eclodem, essa estagnação leva a morte (TAKEO *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2020).

Desta forma esses produtos não têm efeito em adultos, o que principalmente em relação a infestações de *C. felis felis* o ideal são estratégias que combinem o uso de RCAs com inseticidas neurotóxicos permitindo controlar as pulgas adultas em parasitismo e a fase juvenil que predomina no ambiente, impedindo que ovos eclodam e que pupas se desenvolvam.

No entanto tem-se observado que insetos como a *C. felis felis* apresentam alta capacidade de desenvolver resistência a inseticidas, especialmente carbamatos, organofosforados e piretróides (RUST, 2005).

2.4 Resistencia a Inseticidas

A resistência é um fenômeno com diferentes definições na literatura (COLES; DRYDEN, 2014) no entanto pode ser entendida como um recurso de sobrevivência através da adaptação, impulsionado pela pressão de seleção, este processo tem seus efeitos ampliados sobretudo em espécies de ciclo de vida curto e reprodução rápida (DUSFOUR *et al.*, 2019).

Os insetos desenvolveram vários mecanismos altamente eficazes para se adaptarem, no sentido de neutralizar os efeitos fatais e garantirem a sobrevivência, como por exemplo a proteção de suas membranas contra a ação nociva de componentes químicos (SHAHRIARI *et al.*, 2018).

O uso desenfreado de inseticidas intensifica a pressão de seleção, ocasionando o que conhecemos como resistência a inseticidas e reflete numa menor eficácia destes ao longo do tempo, principalmente por ser considerada uma condição que é transmitida para as gerações futuras (ALAK *et al.*, 2020; DUSFOUR *et al.*, 2019; RUST, 2017).

Segundo Dryden, em uma população onde existam indivíduos com características genéticas que possibilitem a sua sobrevivência mesmo quando expostos a inseticidas/acaricidas, esta característica genética será passada para a geração seguinte, aumentando cada vez mais a população sobrevivente a próximas exposições (COLES; DRYDEN, 2014; DRYDEN, 2010).

O primeiro relato de resistência em população de pulgas foi feito em 1949, em pulgas da espécie *Pulex irritans*, resistentes ao diclodifeniltricloetano (DDT) (COLES; DRYDEN, 2014), em *C. felis felis* este fenômeno foi observado pela primeira vez em 1952, primeiramente em relação ao DDT e depois com relatos de resistência ao hexaclorobenzeno (BHC) e ao dieldrin (BUSVINE, 1963; EL-GAZZAR *et al.*, 1986; COLES; DRYDEN, 2014).

A *C. felis felis* é considerada uma das principais pragas domésticas no mundo e o controle destes insetos é particularmente dificultado pelo efeito da resistência causado pelo uso indiscriminado de produtos químicos por parte dos tutores, evidenciando a necessidade de conscientização de consumidores sobre o uso de produtos regulamentados para cães e gatos (RUST, 2005).

Além disso, cada vez mais estudos corroboram que o uso abundante de inseticidas organo-sintéticos pode causar desequilíbrio ambiental, doenças em animais e seres humanos e intensificar o desenvolvimento de mecanismos de resistência dos insetos (MOSSA, 2016; SOARES *et al.*, 2019).

Portanto observa-se um aumento na busca por novos meios de controle de insetos, que tenham menos efeitos nocivos ao meio ambiente visto que o fenômeno está intimamente atrelado a crescente aplicação global de pesticidas, desencadeando danos ambientais e desequilíbrio ecológico (CYCOÑ; MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2017; CAMPOS *et al.*, 2019; FRIEDLI *et al.*, 2020).

2.5 Controle Biológico

Diante do contexto exposto, o controle biológico é considerado uma alternativa para o manejo de insetos/ pragas em que se utiliza inimigos naturais para esta finalidade (BARRATT *et al.*, 2018).

As principais vantagens estão relacionadas ao alinhamento com práticas mais próximas de um ideal ecologicamente correto, principalmente por se tratar de recursos normalmente biodegradáveis (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2017).

Estratégias baseadas no controle de insetos através de agentes abióticos vem sendo difundidas mundialmente desde 1888, levando ao controle parcial ou total de pelo menos 226 insetos invasores em todo o mundo desde então (FOLLETT; DUAN, 2012) e fundamentando cada vez mais estudos que apontam como uma vertente para o controle de pulgas (RUST, 2017).

Tem sido demonstrada a alta virulência do fungo entomopatogênico *Metarhizium* sobre *C. felis felis* adultas (SAMISH *et al.*, 2020) bem como seu efeito na inibição da eclosão de ovos da pulga do gato (MELO; SILVA; DIAS, 2008). Trabalhos desenvolvidos com conídeos de *Beauveria bassiana* causaram a mortalidade de adultos de *C. felis felis* em até 100% após 36 horas (PITTARATE *et al.*, 2018).

A biologia molecular tem sido uma aliada no avanço da tecnologia de materiais genéticos associados a agentes de controle biológico. (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2017), contudo embora seja uma alternativa importante e vantajosa no manejo de insetos, não deve ser considerada isenta de riscos, em meados dos anos 1990, por volta de uma dezena de inserções de agentes de controle biológico provocaram efeitos negativos acidentalmente, o que impulsionou um aumento de estudos com enfoque nos riscos deste tipo de manejo, além disso o desenvolvimento de resistência ainda é um acontecimento provável (FOLLETT; DUAN, 2012; HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2017).

Neste sentido, é possível verificar empenho de estudos em prol do desenvolvimento de técnicas que permitam avaliar e quantificar e prever possíveis impactos, na busca por um manejo adequado e com redução de riscos a biodiversidade, a qualidade ambiental e a saúde humana (NARANJO; ELLSWORTH; FRISVOLD, 2015). Estas mudanças permitiram o aperfeiçoamento na segurança da implantação de métodos de controle biológico através de protocolos de avaliação riscos e benefícios através de modelos conceituais (HEIMPEL; COCK, 2018).

Além disso, embora resultados laboratoriais sejam frequentemente positivos, alguns entraves devem ser superados para que se alcance uma alta taxa de viabilidade das aplicações

em campo, como por exemplo a necessidade de contato entre o agente biológico (inimigo natural) e o organismo alvo (VEGA *et al.*, 2000; HICKEL; MILANEZ; HINZ, 2015).

A baixa eficiência da aplicação de fungos para controle de ectoparasitas a campo quando comparada a produtos químicos, é frequentemente associada as condições ambientais para manter a viabilidade dos fungos (temperatura, umidade, radiação UV) (TURETA *et al.*, 2020; GHAZANFAR *et al.*, 2018).

Existe um grande apelo na validação de novos métodos para controle de pragas tanto da agricultura quanto de interesse veterinário, com uma melhor adequação ecológica, neste sentido intensificam-se trabalhos que buscam a associação de métodos diferentes, como por exemplo a criação de formulações que utilizem óleos vegetais compatíveis com organismos entomopatogênicos atingindo uma ação conjunta que auxilie na proteção dos microorganismos contra fatores ambientais bem como na intensificação da adesão esporo/hospedeiro, além da potencialização da atividade inseticida (TURETA *et al.*, 2020; SOUZA; RIBEIRO; SILVA, 2019; CELESTINO *et al.*, 2018).

2.6 Produtos Naturais / Bioinseticidas

Nos últimos 20 anos as pesquisas com produtos naturais com propriedades inseticidas, provenientes de plantas, vem se intensificando (Figura 8), com destaque para os óleos essenciais (Figura 9) (ISMAN, 2020). Este movimento pode ser visto como consequência do aumento mundial na comercialização e uso de agroquímicos, atendendo principalmente as demandas de produtividade do setor agropecuário (CAMPOS *et al.*, 2019).

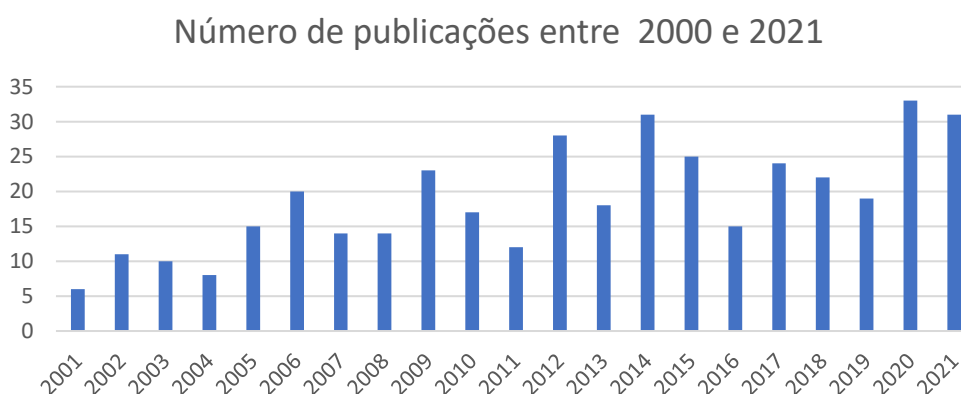


Figura 8. Número de publicações anuais no período entre os anos 2000 e 2021 na base *ScienceDirect*. Palavras-chave “*Ctenocephalides felis* and natural products”.

Fonte: ScienceDirect (2021).

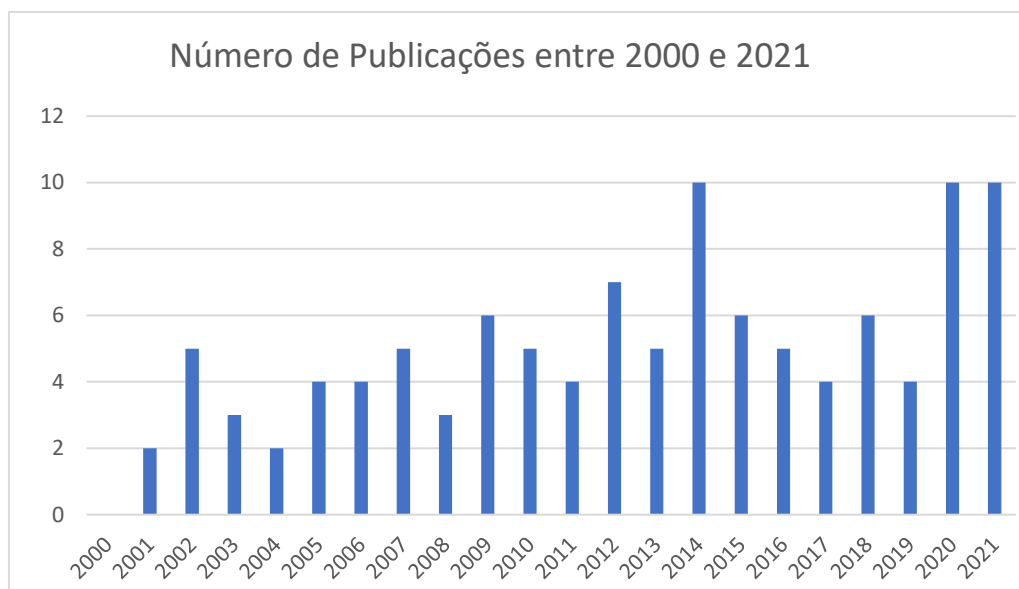


Figura 9. Número de publicações anuais no período entre os anos 2000 e 2021 na base *Sciencedirect*. Palavras-chave “*Ctenocephalides felis felis* and essential oils”.
Fonte: ScienceDirect (2021).

Embora as doenças transmitidas por insetos causem danos a economia e ameacem a saúde e bem estar de seres humanos e animais, o aumento no uso destas substâncias tem acarretado diversos danos ambientais, como o acúmulo de resíduos tóxicos no solo, ar e água, perda de qualidade do solo, desenvolvimento resistência dos organismos alvo e consequentemente infestações cada vez mais massivas, além de prejuízos a organismos não alvo, como exemplo o fenômeno conhecido como síndrome do colapso das abelhas (Colony Collapse Disorder – CCD) (ADETUNJI *et al.*, 2020; KHARE *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2019; PRADO *et al.*, 2019; CAMPOS *et al.*, 2019; TONG *et al.*, 2018; VILLAVERDE *et al.*, 2016).

Tal conjuntura repercute com a maximização dos esforços na busca por novas substâncias que sejam alternativas naturais e com baixo impacto, resultado disso são a quantidade crescente de novos estudos com este tema e a redução na introdução de novos pesticidas ao longo dos anos (ADETUNJI *et al.*, 2020; ISMAN, 2020; MOREIRA *et al.*, 2006).

Entre os produtos naturais mais pesquisados, estão os bioinseticidas, que são baseados na eficácia inseticida dos metabólitos secundários de plantas, verificando-se aumento expressivo de trabalhos publicados sobre estes compostos nos últimos 30 anos (ISMAN, 2020; BENELLI *et al.*, 2016), diversos resultados têm demonstrado que os IBs podem ter múltiplos mecanismos de ação e apresentarem alta eficácia além de boa seletividade (CAMPOS *et al.*, 2019; NDOLO *et al.*, 2019).

O emprego de inseticidas fitoterápicos e acaricidas já é conhecido mundialmente, principalmente através do uso popular, com relatos de povos antigos sobretudo para controle de infestações por ectoparasitas (KHARE *et al.*, 2019; ADETUNJI *et al.*, 2020), atualmente o campo científico tem voltado cada vez mais esforços em pesquisas neste tema, sendo os óleos essenciais os compostos mais discutidos e com resultados mais promissores entre os inseticidas botânicos, com taxas crescentes de citações e artigos científicos (IKBAL; PAVELA, 2019; BATISTA *et al.*, 2016; LAMBERT *et al.*, 2020).

Normalmente os óleos essenciais são líquidos, voláteis, límpidos, raramente coloridos, solúveis em solventes orgânicos e lipídios, menos densos que a água, podendo ser encontrados

em diversos órgãos das plantas e armazenados em células secretoras especializadas, geralmente os tricomas secretores (MANCINI *et al.*, 2015; MAURYA *et al.*, 2019).

Estes compostos são misturas complexas que podem ter em torno de 20 á 60 componentes em quantidades diferentes na sua formação, geralmente com três deles apresentando-se em concentrações superiores aos demais, sendo estes denominados de “componentes majoritários” (BAKKALI *et al.*, 2008), a composição química dos óleos essenciais é determinada principalmente por fatores genéticos no entanto pode sofrer influência da interação com outros organismos, plantas, período de desenvolvimento, sazonalidade e diversos fatores abióticos, sendo capazes inclusive modificar rotas metabólicas (ZHANG *et al.*, 2019; MOTA *et al.*, 2020).

Nas plantas, exercem papel importante na sobrevivência, seja como mecanismo de defesa contra herbivoria, estresse hídrico, radiação ou atraindo polinizadores, também são responsáveis por conferir aroma e sabor em plantas aromáticas), são comumente extraídos através da técnica de hidrodestilação e muito utilizados pelo homem desde a idade média, por suas propriedades bactericida, fungicida, analgésica, sedativa, anti-inflamatória, repelente e inseticida (BAKKALI *et al.*, 2008; AITBOULAHSEN *et al.*, 2018).

Pode-se citar o exemplo do neem (*Azadirachta indica*), sendo conhecido como um dos óleos com maior importância entre os que apresentam atividade inseticida, existem diversos trabalhos com resultados promissores sobre seu óleo essencial bem como a azadiractina (AZA) (Figura 10), seu principal composto bioativo amplamente utilizado como base para a produção de inseticidas (FERNANDES *et al.*, 2019; ISMAN, 2020).

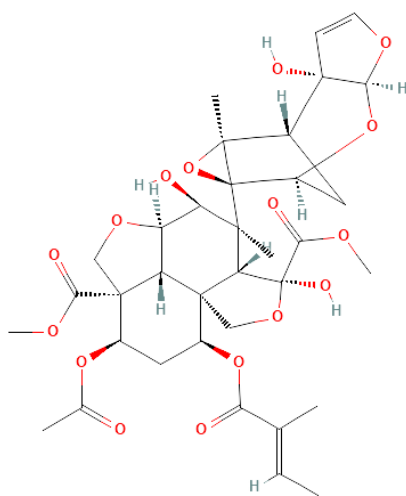


Figura 10. Estrutura química da *Azadiractina*.

Fonte: PubChem (2022f).

Na Medicina Veterinária estes compostos representam uma importante alternativa, por se tratar de um campo que enfrenta grandes problemáticas relacionadas a infestações de insetos, carrapatos e ácaros que comumente desenvolvem resistência aos métodos de controle tradicionais (KHARE *et al.*, 2019; LAMBERT *et al.*, 2020).

Por outro lado, os óleos essenciais apresentam algumas limitações, geralmente ligadas a sua baixa estabilidade e baixa viabilidade de utilização em larga escala (CAMPOS *et al.*, 2019; ISMAN, 2020), se por um ponto de vista a rápida biodegradação, comum à maioria dos

ativos botânicos pode ser muito vantajosa e inclusive desejável, principalmente em relação ao ponto de vista ambiental, em outra vertente pode ser vista como um entrave, visto que à campo, esta característica confere uma baixa persistência destes produtos (ISMAN, 2020), a natureza volátil e a fotodegradabilidade acaba por exigir maior quantidade de aplicações (KFOURY *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2018).

Contudo, o alto potencial reconhecido destas substâncias, impulsiona cada vez mais estudos em busca de formulações que propiciem um maior desempenho nas condições à campo, focando principalmente na melhoria da eficácia e persistência dos compostos (ISMAN, 2020), além disso por apresentarem alta complexidade em sua constituição, tendo compostos com diferentes mecanismos de ação, o fenômeno da resistência por parte dos organismos alvo é dificultado, sendo considerada uma característica desejável a inseticidas (BAKKALI *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2019).

Os óleos essenciais de *Schinus molle*, *Syzygium aromaticum*, *Ocimum gratissimum*, *Cinnamomum cassia*, tem resultados promissores com eficácia comprovada contra adultos e estágios imaturos de *C. felis felis* em diversos trabalhos presentes na literatura, o que reitera a importância e a relevância de estudos com óleos essenciais sobre ectoparasitas de interesse veterinário (BATISTA *et al.*, 2016; LAMBERT *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020; CONCEIÇÃO *et al.*, 2020).

Desta forma, estudos com plantas com alto potencial e que levem em consideração aspectos relacionados ao que se entende como desafios a serem superados, vem sendo cada dia mais demandados, a qualidade e a eficácia dos compostos deve ser avaliada considerando-se padrões de uniformidade (KHARE *et al.*, 2019).

2.7 *Illicium verum* Hook. f.

A espécie *Illicium verum* que é conhecida popularmente como “anis estrelado”, anis da China, anis da Sibéria, badiana ou funcho, faz parte da família *Schisandraceae* e tem como centro de origem a China e o Vietnã sendo considerada uma planta medicinal com utilização também na culinária, é considerada uma especiaria (WANG *et al.*, 2011; ROCHA; TIETBOHL, 2016; PATRA *et al.*, 2020).

A planta é uma árvore perene, aromática e sua altura pode chegar em torno de 10m, com folhas simples e flores hermafroditas (CHOUKSEY; SHARMA; PAWAR, 2010; PATRA *et al.*, 2020), apresenta como característica notável seus frutos em formato de estrela, bem com o aroma marcante (WANG *et al.*, 2011), com coloração ferruginosa e aproximadamente 3cm, onde ficam suas sementes da mesma cor, envoltas pelo pericarpo, que apresenta alto conteúdo de óleo essencial (FRITZ, 2008).

Os frutos do *I. verum* normalmente apresentam oito folículos o que o diferencia do *Illicium lanceolatum*, que possui entre dez e treze folículos (Figura 11), (conhecido também como Anis estrelado japonês) que é potencialmente tóxico (ZHOU *et al.*, 2008).

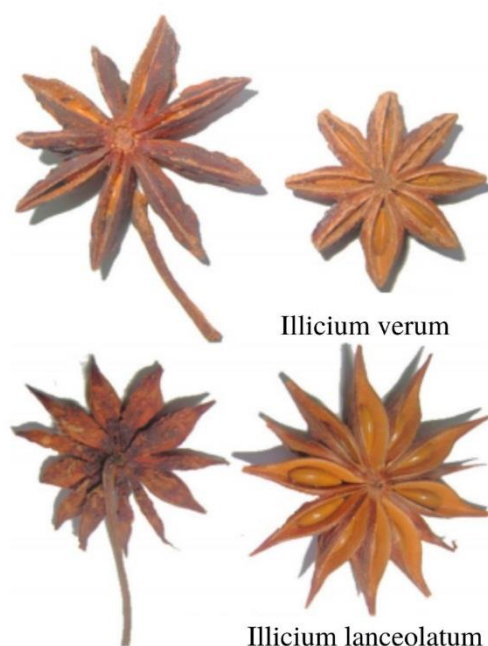


Figura 11. Diferenças morfológicas entre frutos de *Illicium verum* e *Illicium lanceolatum*.
Fonte: WANG et al. (2014).

Os frutos são bastante utilizados na culinária em doces de frutas e licores (MORTON, 2004), graças a seu aroma oriundo basicamente de seu óleo essencial (WANG *et al.*, 2011), bem como na medicina popular chinesa, estando o *I. verum* incluso na Farmacopeia chinesa de 2010 (ITOIGAWA *et al.*, 2004).

Na medicina ayuverdica é utilizado para tosse, asma, diarreia e má digestão (CHOUKSEY; SHARMA; PAWAR, 2010). Já na medicina tradicional, o anis estrelado é utilizado para se obter o ácido chiquímico, utilizado para produzir o fosfato de oseltamivir, um antiviral com nome comercial de Tamiflu[®], utilizado no tratamento de gripe aviária H5N1 (SHAHRAJABIAN; SUN; CHENG, 2020; WANG *et al.*, 2011).

O óleo essencial é obtido a partir de seus frutos, que quando frescos apresentam aproximadamente 3% (m/m) de óleo volátil e quando secos esse teor pode chegar a 9% (m/m) (WANG; JIANG; WEN, 2006), assim é tradicionalmente empregado na forma tópica como antisséptico e no tratamento de dores reumáticas (VERGHESE, 1997).

Na literatura existem relatos de suas propriedades antifúngicas, antibacterianas, anti-inflamatórias, anticâncer e inseticidas (YANG *et al.*, 2010; PARK; SHIN; KIM, 2016; ITOIGAWA *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2014), sendo o uso do óleo mais popular do que dos frutos propriamente ditos (STARY, 1996), se tratando do assunto mais estudado na pesquisa química de espécies de *Illicium* (WANG *et al.*, 2011).

A extração do óleo essencial de anis estrelado pode ser feita a partir dos métodos de arraste por CO₂ supercrítico, extração por solvente (WANG; JIANG; WEN, 2006) por microondas (ZHAI *et al.*, 2009), no entanto a forma mais disseminada é através da hidrodestilação (arraste a vapor para larga escala) (BHADRA *et al.*, 2011; CHENG; SUN, 2020).

O óleo essencial de anis estrelado é composto principalmente por terpenos, sendo o (*E*)-anetol geralmente o constituinte majoritário, tendo ainda altos teores de limoneno (Figura 12 – A), linalool (Figura 12 – B) e alfa-pineno (Figura 12 - C) (CU; PERINEAU; GOEPFERT, 1990).

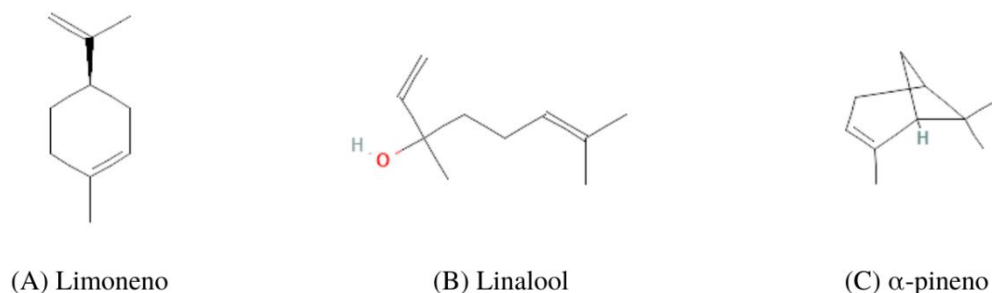


Figura 12. Estruturas químicas *limoneno* (A), *linalool* (B), *α-pineno* (C).
 Fonte: PubChem (2022g, 2022h, 2022i).

O (*E*)-anetol (Figura 13) é um fenilpropanoide ao qual se atribui a doçura dos frutos e também um elevado potencial inseticida (MIYAZAWA *et al.*, 1993; HO; MA; HUANG, 1997), uma pesquisa realizada por JAE-YEON em 2011 (JAE-YEON; JAE-IK LEE, 2011) resultou na patente sul coreana de uma substância antisséptica e inseticida a base de anis estrelado.

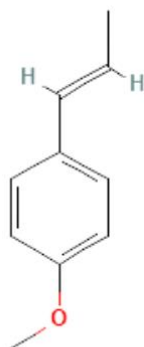


Figura 13. Estrutura química do (*E*)-anetol, constituinte majoritário do óleo essencial de *Illicium verum*.
 Fonte: PubChem (2022j).

É comum que o (*E*)-anetol corresponda a mais de 70% da composição dos óleos de anis estrelado, (CHOUKSEY; SHARMA; PAWAR, 2010; MATOS *et al.*, 2020) podendo chegar a concentrações superiores a 90% da composição (GOMES DA ROCHA VORIS *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020) sendo o composto predominantemente quantificado (ASIF *et al.*, 2016), é atribuído a este constituinte, o efeito inseticida do *I. verum*. (CHANG; AHN, 2002).

Em uma pesquisa sobre o efeito inseticida de óleos essenciais de diferentes espécies vegetais, sob coleópteros adultos da espécie *Lasioderma serricorne* (Caruncho do fumo), Kim *et al.* (2003) observaram mortalidade de 100% para o óleo de anis estrelado já no primeiro dia de tratamento, foi observado efeito inseticida do óleo em adultos e larvas de *Callosobruchus chinensis* (caruncho do feijão) (CHAUBEY, 2008), atuando como larvicida sobre larvas de

Aedes aegypti (GOMES DA ROCHA VORIS *et al.*, 2018) e redução de números de ovos e insetos emergidos de *Callosobruchus maculatus* (MATOS *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a composição química do óleo essencial de *Illicium verum* e avaliar a atividade pulicida *in vitro* do óleo essencial no controle de pulgas da espécie *Ctenocephalides felis felis* na fase adulta, bem como sua eficácia residual.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas e a espectrometria de massas, os constituintes químicos do óleo essencial de *I. verum*.
- Avaliar a atividade *in vitro* do óleo essencial de *I. verum* sobre adultos de *Ctenocephalides felis felis*.
- Determinar a CL₅₀ e CL₉₀ do óleo essencial de *I. verum* por meio da análise de *probit* utilizando o programa computacional IBM SPSS Statistics.
- Determinar a eficácia residual do óleo essencial de *I. verum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do óleo essencial de *Illicium verum*

Para a realização deste trabalho, foi utilizado o óleo dos frutos de anis estrelado, comercializado pela empresa Via aroma[®] inserida no setor de óleos essenciais e produtos afins.

4.2 Origem das Pulgas

As pulgas adultas utilizadas nos testes relativos a este projeto foram provenientes da colônia de *C. felis felis*, mantida desde 1998 em felinos domésticos no biotério do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LQEPV/UFRRJ). A colônia é aprovada pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

4.3 Caracterização Química do Óleo Essencial de *Illicium verum*

4.3.1 Análise por cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chamas e massas (CG/DIC/EM)

A fim de separar e elucidar os constituintes do óleo essencial dos frutos de *Illicium verum*, foi realizada a análise de cromatografia gasosa, através do aparelho Hewlett-Packard 5890 II (Palo Alto, USA) implementado com um detector por ionização de chama (DIC) e injetor do tipo *split-splitless*. Para o ajuste das temperaturas tanto do forno, quanto do injetor e detector, baseou-se na metodologia proposta por Adams para identificação de óleos essenciais por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (ADAMS, 2007).

A amostra foi introduzida no injetor (volume de 1 µL em uma razão de 1:20), os analitos foram carregados pelo gás de arraste Hélio, na velocidade de 1 mL/min para a coluna capilar do tipo HP – 30 m x 0,25 mm i.d., espessura do filme 0,25 µm (Agilent J&W), constituída por sílica fundida, que fica acondicionada no forno resistivo programável. As substâncias foram separadas e cada uma apresenta um tempo diferente de retenção (T_R), chegando ao fim da coluna segue para o detector e a porcentagem dos componentes do óleo essencial foi calculada de acordo com a área relativa de cada pico analisado pela CG-DIC.

Para efetuar a caracterização química do óleo essencial, também foi realizada a análise por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas, utilizando o aparelho da marca Shimadzu JPN, modelo QP2010 Plus. O aparelho foi regulado para operar com energia de ionização a 70 eV e com alcance de massa de 40-400 m/z e 0,5 scan/s.

Para o ajuste das condições de temperatura, corrente do gás de arraste e coluna capilar, também se baseou na metodologia proposta por Adams (2007), portanto foram utilizadas para CG/EM as mesmas regulagens descritas na metodologia de CG/DIC. Foi empregada uma série homóloga de *n-alcanos* C₈-C₂₀ a fim de verificar o desempenho do sistema e calcular o índice de retenção linear de cada composto presente na amostra, tendo como premissa a equação de VAN DEN DOOL E KRATZ.

A identificação dos componentes do óleo essencial, detectados através da CG/EM, foi efetuada através dos respectivos valores dos índices de retenção linear frente aos dados da biblioteca de espectro NIST, como proposto por Adams (1995).

4.4 Eficácia *in vitro* do Óleo Essencial de *Illicium verum* no Controle de Adultos de *Ctenocephalides felis felis*

Para avaliar a eficácia *in vitro* do óleo essencial frente a pulgas adultas de *C. felis felis*, foi utilizada a técnica de impregnação em papel filtro.

4.4.1 Preparo das fitas impregnadas

Inicialmente foram realizadas as diluições do óleo essencial de *I. verum*, utilizando acetona a 20% como diluente, as diluições foram seriadas na proporção de 1:2, resultando em 10 soluções com as seguintes concentrações de O.E.: 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, e 1,56 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Para o controle negativo utilizou-se a acetona a 20%, de forma a demonstrar que o solvente utilizado não interfere nos resultados encontrados, visto que evapora por completo e não promove morte das pulgas, garantindo que a mortalidade observada é realmente fruto da bioatividade do óleo essencial.

Com a finalidade demonstrar a sensibilidade das pulgas provenientes da colônia, foi disposto também um controle positivo, constituído de uma solução de Fipronil 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, igualmente diluído em acetona.

Em seguida foram preparadas as fitas de papel filtro, com dimensão de 10 cm^2 (1x10cm), sendo estas identificadas e impregnadas cada uma com 0,2 mL de sua respectiva concentração de óleo essencial de *I. verum*, controle negativo e controle positivo supracitados. Foram utilizadas duas repetições (R1 e R2) para cada concentração.

4.4.2 Preparo do teste *in vitro*

As fitas permaneceram secando durante 1 hora em temperatura ambiente e após este período foram inseridas cada uma em um tubo de ensaio de vidro contendo 10 pulgas adultas da subespécie *C. felis felis*, não alimentadas, com idade de 14 dias. Em seguida vedou-se os tubos com tecido não tecido (TNT) que foi preso por elástico de borracha, os mesmos foram acondicionados em BOD com temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $75 \pm 10\%$.

Para avaliar a mortalidade das pulgas, utilizou-se o critério de motilidade, de forma que cada tubo de ensaio foi avaliado nos tempos de 24 e 48 horas após a montagem dos testes, a fim de monitorar a atividade das pulgas.

Os tubos foram levemente agitados de forma manual para estimular a movimentação de pulgas vivas, sob o critério de motilidade, todo inseto que apresentou qualquer mínima movimentação foi considerado vivo mesmo em intensidades fracas de motilidade, que os impediria de parasitar um hospedeiro, foram contabilizados como vivos, apenas as pulgas completamente imóveis após o estímulo foram consideradas mortas. Para esta etapa dispôs-se de um microscópio estereoscópico.

Em cada avaliação registrou-se o número de insetos vivos e mortos, o que possibilitou o cálculo do percentual de mortalidade, que foi feito através da seguinte fórmula, proposta por Abbott (1987): Percentual de eficácia = [(média de pulgas adultas do grupo controle – média de pulgas adultas do grupo tratado) / (média de pulgas adultas do grupo controle)] $\times 100$.

4.5 Ajuste da Concentração do Óleo Essencial de *Illicium verum* para Estimativa da CL₅₀ e CL₉₀

Após constatar a bioatividade do óleo essencial de *Illicium verum*, foi necessário realizar o ajuste das concentrações, de forma a permitir uma análise de regressão mais adequada, que permitiu realizar a determinação da dose letal capaz de matar pelo menos 50% da população (L50) e da dose letal para matar pelo menos 90% da população (CL90) de *Ctenocephalides felis felis* adultas.

Foi preparado um novo teste *in vitro* seguindo a técnica de impregnação em papel filtro elucidada no item 4.4.2, no entanto foram alteradas as concentrações, que passaram a ser de 100, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 340, 400 e 800 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, controles positivo e negativo, e o número de repetições nesta nova etapa foi de seis (R1, R2, R3, R4, R5 e R6) para cada concentração.

4.6 Eficácia Residual

A eficácia residual é um parâmetro importante a ser considerado e avaliado, principalmente em estudos relacionado a atividade de óleos essenciais, pois a alta biodegradabilidade e a baixa persistência à campo são entendidos como entraves que precisam ser superados para garantir a eficácia e o controle de qualidade principalmente quando voltados para atividade inseticida, permitindo assim o estabelecimento de diretrizes apropriadas (ISMAN, 2020; KHARE *et al.*, 2019).

Com o objetivo de elucidar o tempo de persistência da atividade pulicida do óleo essencial de *Illicium verum* contra adultos de *C. felis felis*, foi realizado o teste de eficácia residual composto por 6 repetições.

Foi utilizada a técnica de impregnação em papel filtro como descrita no item 6.4, no entanto, neste caso foi utilizada apenas a concentração que apresentou 100% de mortalidade no ensaio de ajuste de concentração da etapa anterior,

A mortalidade das pulgas foi avaliada a cada 24 horas, as pulgas mortas foram contabilizadas através do mesmo critério de motilidade descrito no subtópico 6.4.2 e os dados registrados. Em seguida todas as pulgas eram substituídas por 10 pulgas novas provenientes da mesma colônia, sendo mantidas as mesmas fitas impregnadas inicialmente, este procedimento foi repetido a cada 24 horas até não ser verificada mais eficácia pulicida.

O percentual de mortalidade foi calculado em cada dia, utilizando o mesmo método que se empregou no subitem 6.4.2, os dados dos dias foram comparados e desta forma foi possível avaliar a durabilidade do efeito inseticida de uma única aplicação do óleo de *Illicium verum*.

4.7 Análise Estatística

Para determinar a CL₅₀ e CL₉₀ bem como limites inferiores e superiores, valor de R *Slope*, os dados foram computados e realizou-se a avaliação estatística, através da análise em probit, empregando o programa computacional RStudio Team[®] (2020) ao nível de significância $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

A análise química do óleo essencial através da técnica cromatografia gasosa, permitiu identificar 16 compostos (Figura 14, Tabela 1) presentes no material, esta técnica é eficiente sobretudo na identificação dos compostos majoritários, e serve como ferramenta para elucidar a relação da constituição química do óleo com a bioatividade.

A cromatografia gasosa representa uma técnica de baixo custo e fácil domínio, o que faz desta, a metodologia mais adotada na caracterização de compostos voláteis e semi-voláteis derivados de plantas (MARRIOTT; MASSIL; HÜGEL, 2004).

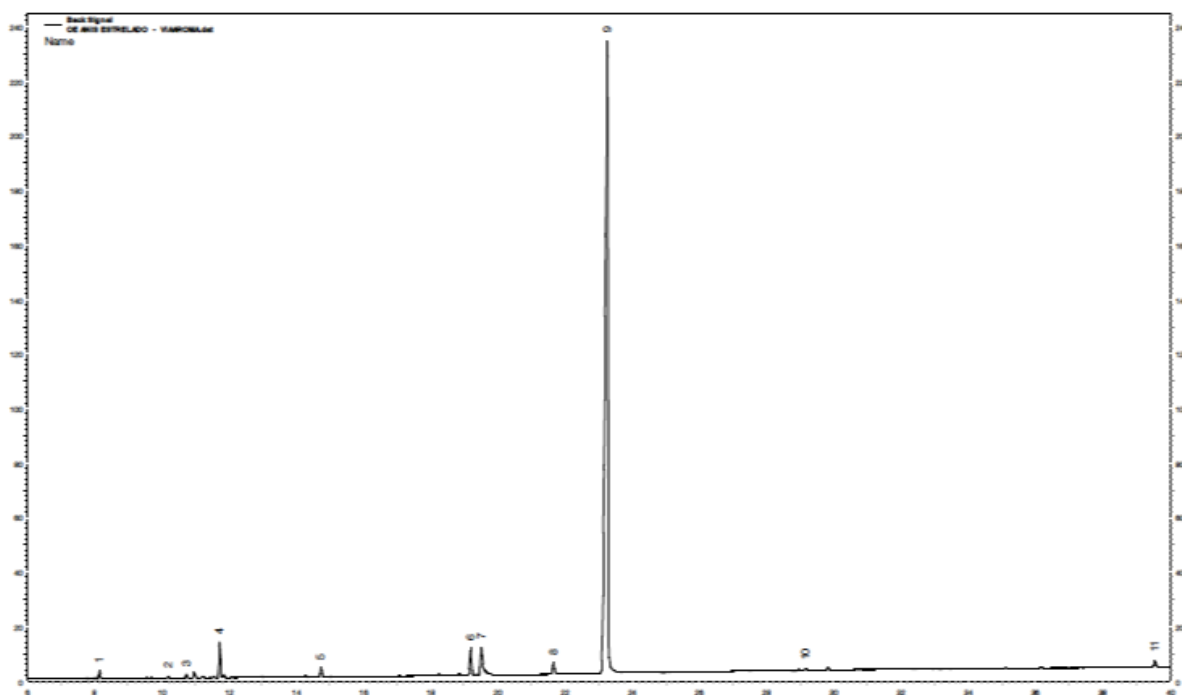


Figura 14. Cromatografia Gasosa. Cromatógrafo a Gás Hewlett-Packard 5890 II. Coluna: HP – 30 m x 0,25 mm (AGILENT). Temp.: Coluna: 50°C (0 min), 3°C /min a 200°C. Injetor: 220°C Split: 1/50. Detector FID: 220 °C. Vol. de injeção: 1 ul (conc 1.0 % em diclorometano)

Já os principais compostos identificados estão representados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1. Perfil químico do óleo essencial dos frutos de *Illicium verum*.

Ordem de eluição	Componentes	IAc	OEIV
1	α -pineno	932	0,97
2	α -felandreno	1002	0,57
3	Careno	1008	0,36
4	Limoneno	1024	2,05
5	β -felandreno	1025	0,43
6	1,8-cineol	1026	0,42
7	β -terpineol	1140	3,58
8	4-terpineol	1174	0,29
9	Estragol	1195	5,75
10	Anis aldeído	1247	2,49
11	(<i>Z</i>)-anetol	1249	0,63
12	(<i>E</i>)-anetol	1282	79,96
13	Ylangene	1373	0,31
14	anisil metilcetona	1380	0,60
15	β -thujalpicina	1475	0,39
16	γ -himachaleno	1481	1,20
Hidrocarbonetos monoterpênicos			4,38
Monoterpenos oxigenados			4,29
Hidrocarbonetos sesquiterpenicos			1,51
Fenilpropanoides			86,34
Total			96,52

OEIV (Óleo Essencial de *Illicium verum*). A Ordem de eluição e o índice aritmético (IA_c) foram calculados com uma série de alcanos.

Fonte: da autora.

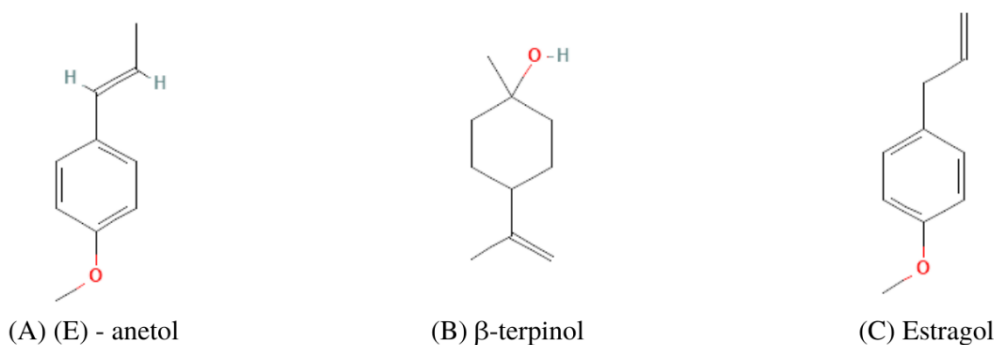


Figura 15. Estruturas químicas da moléculade (*E*) - anetol (A), β -terpinol (B) e estragol (C).
Fonte: PubChem (2022j, 2022k, 2022l).

O (*E*)-anetol (Figura 15 - A) foi o constituinte majoritário e consistiu em 79,96% da composição do óleo essencial extraído dos frutos de *Illicium verum*, junto ao β -terpineol (Figura 15 - B) e estragol (Figura 15 - C), anis aldeído, limoneno e γ -himachaleno, representando parcelas importantes.

A capacidade do óleo essencial de anis estrelado, controlar adultos de pulgas da espécie *Ctenocephalides felis felis* foi avaliada através da sua eficácia *in vitro* em 24 e 48h, com os seguintes resultados demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Illicium verum*, mortalidade de adultos de *Ctenocephalides felis felis* após 24 e 48 horas.

Concentração do óleo essencial ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Tempo (h)	
	24h	48h
1,56	0	0
3,13	0	0
6,25	0	0
12,5	5	5
25	0	0
50	0	0
100	5	5
200	30	30
400	95	95
800	100	100

Resultado expresso em % de mortalidade, h= tempo em horas.

Não foi observada atividade pulicida para as concentrações de 1,56, 3,31, 6,25 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, tanto para os tempos de 24 quanto 48 h, nas concentrações de 12,5 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ observou-se baixa mortalidade, representando eficácia de 5% em 24 e 48 h para ambas as concentrações. Foi constatada ampliação na taxa de mortalidade acompanhando o aumento nas concentrações superiores a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, das amostras subsequentes chegando a 100% de eficácia pulicida com 800 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

O mesmo padrão não foi verificado nas amostras mais concentradas imediatamente superiores a 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, sendo as concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ sem eficácia para o controle de adultos de *Ctenocephalides felis felis*.

A partir de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ houve eficácia de 5% com aumento da mortalidade, observando-se aumento significativo entre as concentrações seguintes, com resultados de mortalidade de 30% com 200 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, 95% com 400 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ alcançando 100% com 800 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ tanto para 24 quanto para 48h.

Estes resultados esclarecem a necessidade do ajuste de concentrações, a fim de elucidar melhor a bioatividade do óleo essencial, para isso foi realizado o ajuste com 10 novas concentrações em uma faixa entre 100 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e 800 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, que correspondem ao ponto onde a eficácia e o aumento das taxas de mortalidade foram observados no primeiro teste.

Foi realizado um novo teste *in vitro* (Tabela 3) com as seguintes concentrações, 100, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 340, 400 e 800 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, ajustadas ao perfil apresentado inicialmente, com as avaliações realizadas igualmente no tempo de 24 e 48 horas, seguindo a metodologia de montagem e avaliações do teste descrito anteriormente.

No controle negativo não foi observada nenhuma pulga morta, o que confirma a não interferência do diluente utilizado (acetona 20%) nos resultados, isso se justifica pela

particularidade do próprio solvente que evapora de maneira rápida e completa, não provocando a mortalidade dos insetos. Já no controle positivo, onde foi utilizado o fipronil, foi observada a mortalidade de 100% das pulgas de acordo com o padrão esperado, por este produto possuir eficácia comprovada.

Estes dados são importantes pois permitem confirmar a confiabilidade dos resultados encontrados relativos ao óleo essencial testado, ao ponto que conferem a correta aplicação da metodologia e desenvolvimento dos testes *in vitro*.

Tabela 3. Mortalidade em fase adulta de *Ctenocephalides felis felis*, frente ao óleo essencial de *Illicium verum* (ajuste de concentração).

Concentração do óleo essencial ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Tempo (h)	
	24h	48h
100	40	42
200	75	75
220	82	82
240	85	85
260	97	97
280	83	78
300	90	93
340	93	97
400	97	97
800	100	100

Resultado expresso em % de mortalidade, h= tempo em horas.

Houve tendência de aumento da mortalidade condizente com o aumento das concentrações do óleo essencial, tanto nas leituras em 24h como após 48h, a concentração de $800 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ foi responsável por resultar em 100% da mortalidade das pulgas nas leituras de ambos os intervalos de tempo, no entanto o tempo de exposição de 24 horas é satisfatório já que resultados encontrados para ambas as faixas de tempo foram próximos em todas as concentrações.

Nas avaliações *in vitro* de efeito antiparasitário, a CL_{50} e a CL_{90} consistem nas concentrações de um composto bioativo em contato com o parasito (formas adultas ou imaturas) que acarretam, respectivamente, na morte de 50% (metade) e 90% de um grupo de indivíduos em contato com o composto.

A concentração letal do óleo essencial de *Illicium verum* responsável pela mortalidade de 50% dos indivíduos (CL_{50}) de *Ctenocephalides felis felis* foi de $122,27 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($93,44 - 145,19 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) para 24h e $120,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($92,27 - 143,69 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) em 48h, já a correspondente a mortalidade de 90% (CL_{90}) foi de $300,77 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($261,27 - 366,17 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) para 24h e $295,19 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($256,69 - 358,29 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) em 48h.

Os resultados obtidos na determinação da CL_{50} e CL_{90} estão listados na Tabela 4, junto aos dados de IC (Intervalo de Confiança), slope, X^2 (p-valor) e r^2 (regressão linear).

Tabela 4. CL₅₀ e CL₉₀ da fase adulta de *Ctenocephalides felis felis* em 24 e 48h horas, frente ao O.E. de *Illicium verum*, obtidas através dos dados de mortalidade dos testes *in vitro* e do *probit*.

Concentração Letal	Óleo essencial de <i>Illicium verum</i>	
	24 h	48 h
CL ₅₀ (95% IC) (µg·cm ⁻²)	122,27 (93,44 – 145,19)	120,92 (92,27 – 143,69)
CL ₉₀ (95% IC) (µg·cm ⁻²)	300,77 (261,27 – 366,17)	295,19 (256,69 – 358,29)
Slope	3,2784	3,3064
X ² (p-valor)	0,0759	0,8058
r ²	0,7072	0,6972

Com a finalidade de avaliar o tempo em que o óleo essencial de *Illicium verum* permaneceu agindo sobre os organismos alvo, foi realizado o teste de eficácia residual. Esta avaliação é importante sobretudo quando se trata de óleos essenciais, devido a sua volatilidade.

Para tal foi realizado teste *in vitro* utilizando a concentração de 800 µg·cm⁻² que foi a concentração que apresentou resultado de 100% de mortalidade na etapa anterior. As avaliações foram realizadas a cada 24 h, até que não fossem mais observados resultados de eficácia, os resultados encontrados estão demonstrados no gráfico abaixo.

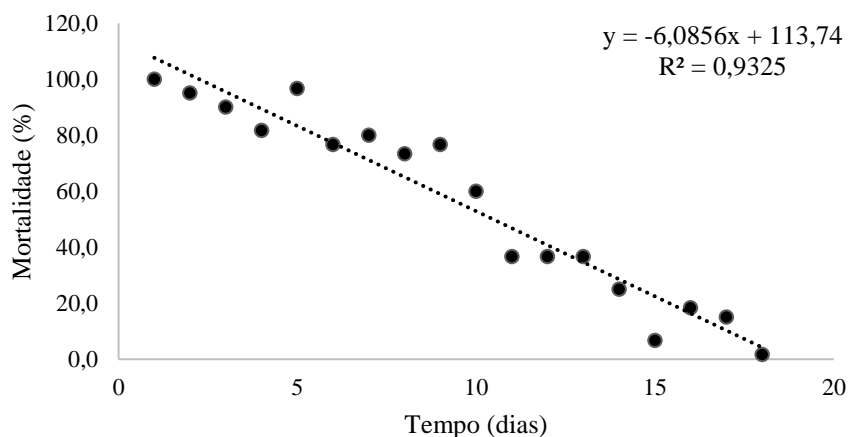


Figura 16. Eficácia residual do óleo essencial de *Illicium verum*, na concentração de 800 µg·cm⁻², avaliada a cada 24h, ao longo de 18 dias, contra adultos de *C. felis felis*.

Foi observada bioatividade inseticida do óleo essencial de *Illicium verum* ao longo 18 dias, sendo que no 7º dia ainda apresentou mortalidade de 80% das pulgas, com redução para 50% no 10º dia, 36,7% no 13º dia, e 1,7% no 18º dia de avaliação. O r² calculado foi de 0,9325, representando uma queda contínua da eficácia pulgicida, de forma linear.

O óleo essencial de *Illicium verum* na concentração avaliada apresentou rápido início de atividade em 24 h, a bioatividade foi sustentada pelo período de 22 dias com resultado promissor que perdurou ao longo de 7 dias (80%) de eficácia com queda linear de sua ação.

6 DISCUSSÃO

Os óleos essenciais são formados a partir do metabolismo secundário das plantas e apresentam em sua composição, a combinação de diferentes compostos orgânicos voláteis (LORENZI; MATOS, 2008).

A análise revelou o (*E*)-anetol como o constituinte majoritário, com destaque significativo, representando 79,96% da composição do óleo essencial extraído dos frutos de *Illicium verum*, além do (*E*)-anetol foram identificados estragol, β -terpineol, anis aldeído, limoneno e γ -himachaleno, representando parcelas importantes.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Park, Shin e Kin (2016), que identificaram 18 compostos a partir do óleo de anis estrelado, sendo o (*E*)-anetol o composto mais abundante (91%) seguido do limoneno (4,1%), os demais compostos correspondiam a parcelas menores que 1% da amostra.

Tu *et al.* (2018) realizaram a caracterização química do óleo essencial extraído dos de frutos de *Illicium verum* por cromatografia em fase gasosa com espectrômetro de massas (CG/EM), e identificaram o (*E*) - anetol correspondendo a 85,245% da composição e estragol, 6,479%. O estragol encontrado (5,75%) na amostra analisada também reflete similaridade com em outros estudos (WONG; LEE; NURDIYANA, 2014; CAI *et al.*, 2013).

Ainda que se trate de plantas da mesma espécie, pode haver variações, tanto nos teores, quanto na constituição química dos óleos. Estas alterações podem ser associadas a diferentes fatores, como tipo de cultivo, fornecimento de nutrientes, fotoperíodo, fornecimento de água, umidade relativa, ventos (SIMÕES *et al.*, 2017).

O óleo utilizado neste estudo foi extraído dos frutos secos do anis estrelado, por destilação a vapor, não sendo discriminado se foram utilizados frutos inteiros sem a separação das sementes, ou se utilizou-se apenas o pericarpo, este dado é importante para esclarecer a congruência do resultado, visto que a maior parcela do óleo essencial rico em (*E*)-anetol se encontra no pericarpo dos frutos (WANG *et al.*, 2011; ASIF *et al.*, 2016), sendo as sementes a principal fonte de outro composto, o ácido chiquímico, que é utilizado para a produção do fosfato de oseltamivir, antiviral utilizado contra a gripe aviária (H5N1) (WANG *et al.*, 2011).

A bioatividade dos óleos essenciais está relacionada a sua composição, seja por efeito de seu constituinte majoritário ou da sinergia resultante dos diferentes compostos presentes, no caso do anis estrelado, o terpeno (*E*)-anetol representa o constituinte majoritário identificado com relevante destaque, em concordância com achados na literatura (CHOUKSEY; SHARMA; PAWAR, 2010; PARK; SHIN; KIM, 2016).

O (*E*)-anetol é um constituinte muito explorado pela indústria farmacêutica, em decorrência de suas diversas propriedades medicinais como melhora na resposta imune adquirida, potencial antioxidante, propriedades anticancerígenas e como recurso terapêutico contra o Alzheimer (PENG *et al.*, 2016; WONG; LEE; NURDIYANA, 2014; ASIF *et al.*, 2016; BHADRA *et al.*, 2011).

Além disso, muitos trabalhos têm atribuído a bioatividade inseticida e a ação fumigante do óleo do anis estrelado ao (*E*)-anetol (PARK; SHIN; KIM, 2016), demonstrando efeito contra diversos insetos, entre eles a *Blattella germânica* (baratinha), *Lasioderma serricorne* (besouro do fumo) e *Callosobruchus chinensis* (caruncho) (CHANG; AHN, 2002; CHAUBEY, 2008; KIM *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2020). O (*E*)-anetol também pode ser encontrado em outras espécies vegetais com atividade inseticida comprovada, como no caso da *Piper marginatum*, conhecida popularmente como pimenta do mato (SANTANA *et al.*, 2015). Assim como o anis estrelado, outras espécies tem se destacado por apresentarem bioatividade e possuírem produtos do

metabolismo secundário ricos em fenilpropanóides, como é o caso das *Piper aduncum*, *P. callosum* e *P. marginatum* (SANTANA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016).

A bioatividade do óleo essencial de *Illicium verum* sobre adultos de *Ctenocephalides felis felis* foi observada nos testes *in vitro*, de forma que também foi possível evidenciar uma tendência de aumento da mortalidade condizente com o aumento das concentrações do óleo essencial, tanto nas leituras em 24h como após 48h.

O tempo de exposição de 24 horas é satisfatório já que resultados encontrados para ambas as faixas de tempo foram próximos em todas as concentrações.

As propriedades inseticidas dos metabólitos secundários de *Illicium verum* tem sido amplamente avaliadas em diversas espécies de artrópodes com resultados promissores contra vários insetos como *Callosobruchus chinensis*, *Callosobruchus maculatus*, *Blatella germânica*, *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais*, *Myzus persicae*, *Lasioderma serricorne* e *Aedes aegypti* (KIM *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2014; PARK; SHIN; KIM, 2016; MATOS *et al.*, 2020; CHANG; AHN, 2002; GOMES DA ROCHA VORIS *et al.*, 2018), no entanto, são escassos trabalhos com ectoparasitas de importância veterinária. Os resultados encontrados demonstram o potencial deste inseticida botânico para esta finalidade.

(KIM *et al.*, 2003) avaliaram a bioatividade de metabólitos secundários de 30 espécies de plantas medicinais e aromáticas, sobre adultos de *Sitophilus oryzae* e *Callosobruchus chinensis* através do método de impregnação de papel filtro nas concentrações de 3,5 e 0,7 mg·cm⁻². O extrato de *Illicium verum* apresentou eficácia inseticida contra as duas espécies.

Em 24h não foi observada eficácia para *S. oryzae* em nenhuma dos tratamentos, no entanto a mortalidade aumentou com o tempo de exposição em ambas as concentrações, sendo que após 96h a mortalidade foi de 63% na menor concentração e 100% na maior.

No mesmo trabalho, com *C. chinensis* a mortalidade foi de 97% em 24h na menor concentração e atingiu 100% no período de 48h. Este trabalho destacou a superioridade da atividade inseticida do *Illicium verum* em comparação com grande parte das espécies botânicas avaliadas, bem como demonstrou os diferentes resultados de bioatividade do mesmo composto em espécies de insetos diversas.

O bioensaio com papel filtro é considerado um facilitador na triagem de inseticidas botânicos, sendo também adotado para testes de eficácia com *Ctenocephalides felis felis*, por ser considerado uma técnica econômica, de fácil repetibilidade e que permite a pré-triagem de diferentes tipos de compostos para controle de pulgas, de forma simplificada e eficiente (SU *et al.*, 2014).

A toxicidade do extrato de *Illicium verum* foi observada contra o pulgão verde do pessegueiro (*Myzus persicae*), sendo maior conforme o aumento das concentrações, neste estudo também foi realizada a caracterização química dos extratos, que apresentaram altas taxas de (*E*)-anetol, assim como na maioria dos estudos com óleos essenciais desta espécie, sendo atribuído a abundância deste composto os resultados de bioatividade encontrados (ZHOU *et al.*, 2016).

Na literatura, encontram-se resultados da toxicidade por contato, do extrato de *Illicium verum*, através do emprego do teste de papel filtro, sobre adultos *Sitophilus zeamais*, constatando aumento da bioatividade conforme o aumento das concentrações a que foram submetidos os insetos, sendo que em doses mais baixas observou-se maior eficácia quanto maior o tempo de exposição, chegando a 76,46% de mortalidade em 24 horas, 89,89% em 48h e 94% em 72 horas com a concentração de 125,79 µg·cm⁻² (WEI *et al.*, 2014).

No trabalho atual, com óleo essencial, encontrou-se mortalidade de 93% de indivíduos de *C. felis felis*, em 24h na concentração de 340 g·cm⁻² e 100% na concentração de 800 g·cm⁻². A necessidade de maiores concentrações do óleo essencial para o controle de *C. felis felis* pode ser relacionada à características da interação composto x organismo, no entanto é válido destacar que o efeito inseticida foi alcançado em intervalo de tempo inferior ao encontrado no

trabalho conduzido por Wei *et al.* (2014), propriedade oportuna no que diz respeito, sobretudo, ao controle de infestações por *C. felis felis*, o que pode sugerir vantagem do óleo essencial neste sentido.

O óleo essencial de *Illicium verum* diluído em acetona foi eficaz contra fêmeas adultas de mosquitos *Aedes aegypti*, com aumento da mortalidade correspondente ao aumento das concentrações, chegando a 90% de mortalidade em 24 horas na concentração de 53,0 µg mL⁻¹ (GOMES DA ROCHA VORIS *et al.*, 2018), neste estudo também foi possível ver o aumento da mortalidade das pulgas *C. felis felis* de acordo com o aumento da concentração do óleo essencial, a mortalidade de 90% foi observada em 24h na concentração de 300,00 µg·cm⁻².

É válido ressaltar que a caracterização química do óleo utilizado pelo autor, revelou 90,1% de (*E*)-anetol em sua composição, enquanto que o óleo utilizado para *C. felis felis* este constituinte representou 79,96% da composição, além disso o óleo utilizado pelo autor apresentou quantidades similares de limoneno (2,2%), o que reforça a discussão acerca do efeito sinérgico destes compostos na bioatividade observada, possibilitando elucidar diferenças de desempenho, já que se atribui o maior efeito inseticida a maiores concentrações bem com a atividade sinérgica destes dois compostos.

A concentração de 0.16 mL/cm² de óleo essencial de *I. verum* diluído em acetona foi suficiente para alcançar uma mortalidade de 100% *Liposcelis bostrychophila* (piolho do livro) em 24h (ZHAO *et al.*, 2012). Estes insetos parecem ter sido mais susceptíveis a toxidez por óleo essencial de *Illicium verum* do que *Ctenocephalides felis felis*, no entanto, este estudo não realizou a caracterização química do óleo.

Pangnakorn e Chuenchooklin (2018) avaliaram a atividade inseticida de 3 óleos essenciais (*Ocimum basilicum*, *Illicium verum* e *Acacia farnesiana*) sobre *Sitophilus zeamais*, e obtiveram resultados promissores com *Illicium verum* sendo o único que alcançou 100% de mortalidade em 12h na concentração de 7,5 µL, diluído em acetona através do método do papel filtro em placa de petri,

A atividade do óleo essencial de anis estrelado testado contra adultos de *Callosobruchus chinensis*, através do método de papel filtro impregnado, utilizando acetona como diluente demonstrou 70% de mortalidade em 24 horas na concentração de 11,76 mg/L (PARK; SHIN; KIM, 2016) em outro trabalho contra adultos de *Calosobruchus maculatus*, também através de ensaio com papel filtro, o óleo essencial apresentou 95% de mortalidade após 48h na concentração de 180.06 µL/L (MATOS *et al.*, 2020).

O óleo essencial utilizado por Park, Shin e Kim (2016), apresentou 91% de (*E*)-anetol em sua composição, 4,1% de limoneno e mais 16 compostos que representavam parcelas inferiores a 0,9% da composição do óleo, corroborando com (ANDRADE-OCHOA *et al.*, 2018) que ao pesquisarem a relação entre o efeito inseticida e o sinergismo do (*E*)-anetol com demais compostos, encontraram o efeito sinérgico mais promissor entre este constituinte e o limoneno. Já Matos *et al.* (2020) embora tenham encontrado 88,85% de (*E*)-anetol na composição do óleo, não detectaram a presença de limoneno.

Em estudo comparativo, entre a bioatividade do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* e cinamaldeído (seu constituinte majoritário), contra adultos de *C. felis felis*, foi observada superioridade da bioatividade do óleo essencial frente ao cinamaldeído, o que sugere o efeito sinérgico entre o constituinte majoritário e demais constituintes no óleo essencial, potencializando sua ação a inseticida (CONCEIÇÃO *et al.*, 2020).

Os resultados de ação frente *C. felis felis* encontrados no presente trabalho corroboram com os achados na literatura e mostram que o óleo essencial do anis estrelado tem propriedades inseticidas que podem ser exploradas também no campo de controle de ectoparasitas de interesse veterinário.

Atualmente entre os principais óleos essenciais pesquisados *in vitro* para controle de pulgas adultas estão os extraídos de *Schinus molle*, *Ocimum gratissimum*, *Cinnamomum cassia*

e *Zygiium aromaticum* (BATISTA *et al.*, 2016; RUST, 2020; LAMBERT *et al.*, 2020; CONCEIÇÃO *et al.*, 2020). O óleo de *Ocimum gratissimum* é rico em eugenol e apresentou boa eficácia quando comparado a óleos provenientes de outras espécies, com 100% de mortalidade para o controle de pulgas adultas, na concentração de $25 \mu\text{g cm}^{-2}$ (SANTOS *et al.*, 2020). Este composto tem ampla atividade inseticida verificada, é um monolignol, do grupo dos fenilpropanóides, assim como o (*E*)-anetol que é o composto majoritário do óleo essencial do *Illicium verum*, e que representa 79,96% da composição do óleo utilizado neste trabalho (VALE, 2018; SOUZA; RIBEIRO; SILVA, 2019; CHENG; SUN, 2020).

Os resultados de ação inseticida do anis estrelado, sobre diversas espécies de artrópodes, encontrados na literatura, impulsionam a avaliação de sua bioatividade através dos testes de eficácia com *Ctenocephalides felis felis*, e são consonantes com os resultados de eficácia pulicida encontrados no presente trabalho. Existem diversas formas de ação dos metabólitos secundários das plantas no corpo dos insetos, estas interações podem estar relacionadas a mecanismos como inibição de atividades enzimáticas e ações sobre neuromoduladores presentes nos invertebrados (GUSMÃO *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2016). As diferenças de taxas de mortalidade, concentrações e eficácia relacionada ao período de exposição são característicos de estudos conduzidos com produtos provenientes do metabolismo secundário de plantas.

Analisando os resultados expostos tanto para CL₅₀ quanto para CL₉₀ observou-se que não são significativas as diferenças encontradas nas atividades apresentadas pelo óleo essencial em 24 e 48 h de exposição.

Embora existam muitos trabalhos na literatura relacionados a atividade inseticida do óleo essencial de *Illicium verum*, carecem estudos relativos à sua eficácia sobre ectoparasitas de importância veterinária como *Ctenocephalides felis felis*.

Matos *et al.* (2020) avaliaram a composição química bem como atividade inseticida do óleo essencial proveniente dos frutos e sementes de *Illicium verum* sobre o gorgulho do feijão, *Callosobruchus maculatus*, e atestaram o efeito fumegante do composto atuando como alternativa de inseticida botânico no controle desde inseto que acarreta prejuízos sobretudo no armazenamento de grãos, neste estudo a CL₅₀ e CL₉₀ foram respectivamente 9,62 e 32,78 $\mu\text{L/L}$, demonstrando o aumento da mortalidade relacionado ao aumento das concentrações, o mesmo foi observado neste trabalho, esta característica é desejável na busca por compostos com propriedades inseticidas.

Um estudo conduzido por Lima (2014), onde avaliou –se a toxicidade de diferentes óleos essenciais para *Schizaphis graminum* (pulgão verde), mostrou que dependentemente do tipo da superfície contaminada, elevadas taxas de mortalidade são encontradas quando os pulgões *S. graminum* entram em contato com o óleo essencial de *I. verum*, caracterizando-o como promissor inseticida. Em tal estudo, o óleo essencial de *I. verum* demonstrou ser tóxico em concentrações mais elevadas, com CL₅₀ de 51,80 e 40,50 $\mu\text{L óleo/cm}^2$ (24 e 48 h) quando a superfície utilizada foi composta de folhas de sorgo, e de 51,80 $\mu\text{g óleo/cm}^2$ (24 h), com a utilização de discos de papel-filtro como superfície, no mesmo estudo a CL₉₀ foi de 110,00 e 109,00 $\mu\text{L óleo/cm}^2$ (24 e 48h) em folha de sorgo e 109,00 $\mu\text{L óleo/cm}^2$ (24h) em papel filtro, a toxicidade foi atribuída ao composto majoritário (*E*)-anetol. Os resultados encontrados pelo autor corroboram com os obtidos no presente trabalho.

Matos *et al.* (2020) observaram tanto o efeito fumegante quanto toxicidade por contato, do óleo essencial de *Illicium verum*, contra adultos de *Callosobruchus maculatus*, conhecido popularmente como gorgulho do feijão caupi. Neste estudo o efeito letal do óleo, por fumegação foi obtido em concentrações consideradas baixas, tendo sido alcançada a CL₅₀ e CL₉₅ nas concentrações de 23,36 e 180,06 $\mu\text{L/L}$ de óleo essencial respectivamente. Também foi avaliada a toxicidade por contato, as CL₅₀ e CL₉₅ obtidas foram respectivamente nas concentrações 9,62 e 32,78 $\mu\text{L/L}$ de óleo essencial, a toxicidade de contato também foi através dos resultados

encontrados no presente estudo com *C. felis felis*. Além disso, o resultado observado através das análises de Matos *et al.* (2020) ampliam o entendimento relativo ao modo de ação do óleo de anis estrelado e explicitam a versatilidade do óleo como inseticida, demonstrando que a mesma substância atuou de formas diferentes sobre os insetos.

A atividade fumegante do óleo essencial de *Illicium verum* contra insetos adultos de *Callosobruchus chinensis* foi relatada por Park, Shin e Kin (2016), que encontraram a CL₅₀ na concentração de 6,68 mg/L de óleo essencial, para este estudo, inicialmente foi testada a atividade inseticida de óleos essenciais de 20 espécies vegetais, o *Illicium verum* se destacou frente a maioria e sua eficácia foi atribuída a concentração do composto majoritário (*E*)-anetol, que representou 91% da composição do óleo.

O óleo essencial de *Illicium verum* também atuou como larvicida e inibidor da alimentação de larvas de *Spodoptera exigua* (lagarta do cartucho da beterraba), como larvicida a CL₅₀ encontrada foi na concentração de 0,438 v/v, considerada baixa, sendo que a na concentração de 0,750v/v foi observada 100% de mortalidade em apenas 24h (PASSARA; INSUNG, 2021). Estes resultados apontam o potencial da utilização deste composto atuando sobre insetos em diferentes estágios evolutivos, o que é desejável para o desenvolvimento de produtos que visam o controle de infestações, principalmente se tratando do controle de pulgas *Ctenocephalides felis felis*, visto que em infestações estima-se que 95% da população esteja no ambiente, sendo a maior parte em fases larvais (1^o, 2^o e 3^o instar) (DRYDEN, 2009; KRASNOV, 2008; RUST, 2017).

Não foram encontrados estudos sobre a atuação do óleo essencial de *Illicium verum* na interrupção do ciclo de *Ctenocephalides felis felis* ou contra indivíduos adultos, no entanto Santos *et al.* (2020), testaram a bioatividade de diferentes óleos essenciais sobre adultos e formas imaturas de *Ctenocephalides felis felis*, a CL₅₀ em 24 e 48h observada no presente estudo foi mais promissora do que a maioria dos óleos essenciais testados pelos autores.

Batista *et al.* (2016) testaram os óleos essenciais provenientes de frutos e folhas da espécie *Schinus molle* contra ovos e adultos de *Ctenocephalides felis felis*, neste estudo o óleo essencial proveniente das folhas apresentou resultados relevantes com CL₅₀ de 12,02 e 9,10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ em 24 e 48h respectivamente. No entanto a CL₅₀ do óleo essencial de frutos de *Illicium verum* mostrou efeito mais tóxico contra as pulgas, quando comparada a avaliação do óleo de frutos de *Schinus molle*, que obteve CL₅₀ nas concentrações de 353,95 e 138,22 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ em 24 e 48h respectivamente. *Schinus molle* não apresentou bioatividade sobre ovos de pulgas.

Os resultados da ação inseticida do óleo essencial de *Illicium verum* contra diferentes espécies de artrópodes encontrados na literatura coincidem com a atividade observada contra adultos de *Ctenocephalides felis felis*.

As concentrações de CL₅₀ e CL₉₀ reveladas no presente estudo indicam o potencial deste composto e a competência do óleo essencial de *Illicium verum* em eliminar as pulgas adultas, foi observada ainda a bioatividade inseticida do óleo essencial de *Illicium verum* ao longo 18 dias, refletindo bons resultados de eficácia residual, já que no 7^o dia foi observada mortalidade de 80% das pulgas.

O óleo essencial de *Illicium verum* na concentração de 800,00 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, apresentou rápido início de atividade, tendo resultado de eficácia em 24 h, a bioatividade foi sustentada pelo período de 22 dias com resultado satisfatório que perdurou ao longo de 7 dias. A queda linear de sua ação, é um resultado interessante para o estudo de substâncias que permitam a prevenção de reinfestações de pulgas.

Dentre as características dos principais inseticidas utilizados mundialmente está a persistência e a longevidade de sua eficácia é o caso dos neonicotinóides e fenilpirazóis (PISA *et al.*, 2015). No entanto esta propriedade vem acompanhada da baixa degradabilidade, que no ponto de vista ambiental e ecológico representa uma desvantagem e aumenta a necessidade de busca por compostos naturais que tenham continuação de sua ação contra os insetos alvo por

um período considerável após o momento da aplicação (RUKESH PRAMOD; ACHARYA; RODE, 2019; YEWHALAW *et al.*, 2017; PISA *et al.*, 2015; ISMAN, 2020).

A baixa persistência é normalmente uma característica atribuída aos inseticidas botânicos (ISMAN, 2020), no entanto Silva *et al.* (2020) avaliaram a bioatividade e o efeito residual do óleo essencial de *Croton blanchetianus* sobre *Callosobruchus maculatus* no armazenamento de feijão caupi, neste estudo constatou-se a persistência do efeito inseticida do óleo essencial por 60 dias com redução de sua eficiência ao longo do tempo, no presente trabalho a eficácia residual foi observada em taxas satisfatórias, com mortalidade de 80% das pulgas no 7º dia, assim como Silva, observou-se a redução da eficiência ao longo do tempo.

Nove diferentes inseticidas sintéticos tiveram seu efeito residual avaliado, contra *Liriomyza trifolii*, uma importante praga agrícola, as concentrações utilizadas basearam-se na recomendação de cada produto, no sétimo dia todos os inseticidas apresentaram taxas de mortalidade inferiores a 70% (RUKESH PRAMOD; ACHARYA; RODE, 2019), a eficácia residual do óleo essencial de *Illicium verum* sobre pulgas *C. felis felis* no sétimo dia foi superior aos inseticidas sintéticos avaliados neste estudo.

Mekhlif (2017), testou nove extratos vegetais contra larvas do mosquito *Culex pipiens molestus*, ao avaliar a eficácia residual identificou boa persistência na maioria dos extratos, com destaque para *Achelia fragrantissima* e *Tanacetum cantolinoides* que apresentaram 100% de mortalidade até o 12º dia de avaliação. Embora sejam escassos, estudos de eficácia residual de inseticidas botânicos sobre ectoparasitas de importância veterinária, estes dados reforçam a importância destes produtos como boas alternativas do controle de insetos alvo.

A combinação entre inseticidas orgânicos e sintéticos é uma discussão antiga e foi proposta por Murphy (1940) como uma alternativa para compensar a curta ação residual dos inseticidas botânicos em comparação aos sintéticos, atualmente inseticidas desenvolvidos a partir de produtos botânicos tem sido cada vez mais vistos como soluções de controle químico, com perspectivas no desenvolvimento de formulações que podem ser em formas gasosas, líquidas, em gel, espumas ou sólidas que possam promover vantagens da atuação destes compostos em condições ambientais (STEJSKAL *et al.*, 2021).

Além disso, a predileção pelo uso de compostos químicos sintéticos no controle de ectoparasitas de importância veterinária gera consequências indesejadas já que se tratam de princípios ativos classificados como agrotóxicos ou pesticidas, (de acordo com a definição dada pela legislação seguindo o registro de cada produto) com efeitos nocivos não só para o ambiente como também para a saúde humana (LAWRENCE *et al.*, 2015; CYCOÑ; MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2017) já que a maior parte dos agrotóxicos utilizados pode ser encontrados depositados em diferentes profundidades de amostras de solos, causando prejuízos para a fauna edáfica, além de terem grande potencial de lixiviação, acarretando na contaminação de águas subterrâneas (BHANDARI *et al.*, 2020).

Os óleos essenciais mesmo quando tem bons resultados de efeito de contato, como foi o caso do presente estudo, podem apresentar rápida biodegradação em condições ambientais, no entanto esta característica, geralmente considerada como entrave, pode ser superada através do desenvolvimento de formulações que aumentem a persistência no ambiente, como encapsulamento, nanoemulsões e biofilmes, permitindo estabilidade e proteção dos compostos de forma que sua bioatividade possa ser sustentada por períodos maiores (PAVONI *et al.*, 2019; FENG *et al.*, 2020).

Neste sentido, os resultados de bioatividade e eficácia residual do óleo essencial de *Illicium verum* sobre pulgas *Ctenocephalides felis felis* permitem prospectar o desenvolvimento de produtos que tenham como características a maior segurança, seletividade e biodegradabilidade com viabilidade econômica e menor impacto ambiental e que atendam os requisitos de eficácia, segurança e seletividade.

7 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Illicium verum* teve sua ação inseticida comprovada contra pulgas *Ctenocephalides felis felis* com boa persistência de sua ação *in vitro* no controle das pulgas adultas, este estudo é pioneiro na investigação desta espécie vegetal atuando sobre ectoparasitas de importância veterinária, e os resultados obtidos fundamentam a condução de novos estudos com formas imaturas da pulga do gato.

A alta taxa de mortalidade observada em 24h, aliada a persistência, são propriedades que indicam este composto como promissor para o controle de *C. felis felis*, contribuindo também no tratamento e prevenção de outras patologias relacionadas a presença das pulgas, como a DAPP (Dermatite Alérgica a Picada de Pulga) e a Dermatite por Hipersensibilidade a Pulga.

A baixa persistência observada na maioria dos inseticidas botânicos é muitas vezes considerada um fator limitante da sua utilização *in vivo* sobretudo por ser atributo que sofre alterações de acordo com as condições ambientais, portanto, compostos que apresentam resultados satisfatórios de eficácia residual podem ser promissores para o futuro desenvolvimento de formulações que possibilitem a melhoria de seu desempenho a campo.

O (*E*) – anetol é descrito como composto majoritário do óleo essencial de *Illicium verum* em diversos trabalhos encontrados na literatura, sendo encontrado sempre em altas taxas frente os demais constituintes, no entanto em concentrações que podem variar, o que é esperado se tratando de compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas. Estas variações podem ser resultantes de influências ambientais e de cultivo (época e horário de colheita, tipo de solo, adubação, sazonalidade, herbivoria, stress hídrico), bem como podem estar relacionadas a metodologia utilizada para a obtenção do óleo, o que reforça a necessidade e de estudos que elucidem melhor estas dinâmicas e permitam a padronização das etapas, visando o estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade e constância dos teores de princípio ativo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 3, n. 2, p. 302–303, 1987.
- ABINPET. **História**. [s. l.], 2014. Disponível em: <http://abinpet.org.br/historia/>. Acesso em: 11 dez. 2021.
- ABINPET. **Mercado Pet Brasil**. São Paulo: [s. n.], 2021. Disponível em: http://www.abinpet.org.br/download/abinpet_folder_2021.pdf. Acesso em: 11 jan. 2022.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy**. 2. ed. [S. l.]: Allured Publishing Corporation, 1995. v. 16
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4ª edição ed. Carol Stream, Ill: Allured Pub Corp, 2007.
- ADETUNJI, C. O.; EGBUNA, C.; TIJJANI, H.; ADOM, D.; TAWFEEQ AL-ANI, L. K.; PATRICK-IWUANYANWU, K. C. Homemade Preparations of Natural Biopesticides and Applications. In: **Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control**. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 179–185. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00015-4>. Acesso em: 14 dez. 2021.
- AITBOULAHSEN, M.; ZANTAR, S.; AMIN, L.; MOHAMMED, E.; ABDELHAY, A.; CHAIRI, H.; BAKKALI, M.; HASSANI ZERROUK, M. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Against Pathogens Isolated from Food, Crops and Hospitals in Morocco. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 6, p. 1450–1459, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1570348>
- ALAK, S. E.; KÖSEOĞLU, A. E.; KANDEMİR, Ç.; TAŞKIN, T.; DEMİR, S.; DÖŞKAYA, M.; ÜN, C.; CAN, H. High frequency of knockdown resistance mutations in the para gene of cat flea (*Ctenocephalides felis*) samples collected from goats. **Parasitology Research**, v. 119, n. 7, p. 2067–2073, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06714-3>
- ANDRADE-OCHOA, S.; SÁNCHEZ-ALDANA, D.; CHACÓN-VARGAS, K. F.; RIVERA-CHAVIRA, B. E.; SÁNCHEZ-TORRES, L. E.; CAMACHO, A. D.; NOGUEDA-TORRES, B.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V. Oviposition Deterrent and Larvicidal and Pupaecidal Activity of Seven Essential Oils and their Major Components against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): Synergism–antagonism Effects. **Insects**, v. 9, n. 1, p. 25, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects9010025>
- ASIF, M.; YEHYA, A. H. S.; AL-MANSOUB, M. A.; REVADIGAR, V.; EZZAT, M. O.; KHADEER AHAMED, M. B.; OON, C. E.; MURUGAIYAH, V.; ABDUL MAJID, A. S.; ABDUL MAJID, A. M. S. Anticancer attributes of *Illicium verum* essential oils against colon cancer. **South African Journal of Botany**, v. 103, p. 156–161, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.08.017>

AUNGTIKUN, J.; SOONWERA, M.; SITTICHOK, S. Insecticidal synergy of essential oils from *Cymbopogon citratus* (Stapf.), *Myristica fragrans* (Houtt.), and *Illicium verum* Hook. f. and their major active constituents. **Industrial Crops and Products**, v. 164, p. 113386, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113386>

AYRES, M. C. C.; ALMEIDA, M. A. Agentes Antinematódeos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (ed.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 453–465.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

BARRATT, B. I. P.; MORAN, V. C.; BIGLER, F.; VAN LENTEREN, J. C. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 155–167, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9831-y>

BATISTA, L. C. S. O.; CID, Y. P.; ALMEIDA, A. P.; PRUDÊNCIO, E. R.; RIGER, C. J.; SOUZA, M. A. A.; COUMENDOUROS, K.; CHAVES, D. S. A. In vitro efficacy of essential oils and extracts of *Schinus molle* L. against *Ctenocephalides felis felis*. **Parasitology**, v. 143, n. 5, p. 627–638, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182016000081>

BENELLI, G.; PAVELA, R.; CANALE, A.; MEHLHORN, H. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? | SpringerLink. **Parasitology Research**, v. 115, p. 2545–2560, 2016.

BEUGNET, F. **Guide to vector borne diseases of pets**. Lyon, France: Merial, 2013.

BHADRA, S.; MUKHERJEE, P. K.; KUMAR, N. S.; BANDYOPADHYAY, A. Anticholinesterase activity of standardized extract of *Illicium verum* Hook. f. fruits. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 342–346, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.11.003>

BHANDARI, G.; ATREYA, K.; SCHEEPERS, P. T. J.; GEISSEN, V. Concentration and distribution of pesticide residues in soil: Non-dietary human health risk assessment. **Chemosphere**, v. 253, p. 126594, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126594>

BILWAL, D. A.; PARAMAR, D. V.; BRAHMBHATT, D. N.; VAGH, D. A.; VASAVA, D. A. Clinical presentation and therapeutic management of ivermectin toxicity in German Spitz dog. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 8, n. 1, p. 1155–1157, 2020.

BLAGBURN, B. L.; DRYDEN, M. W. 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.07.001>

BOBEY, M. C. Harmonization of regulatory guidelines on efficacy of ectoparasiticides for companion animals: Status and missing points. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 48–55, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.020>

BONMATIN, J.-M. *et al.* Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 35–67, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>

BRANDÃO, L. P. Pulicidas empregados na medicina de pequenos animais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 107–2004, 2004.

BRASIL. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 1996.

BREITSCHWERDT, E.; LITTLE, S.; RUGG, D. Sarolaner—a novel isoxazoline—addresses the need for enhanced flea and tick control. **Veterinary Parasitology**, v. 222, p. 1–2, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.033>

BURNS, C. J.; MCINTOSH, L. J.; MINK, P. J.; JUREK, A. M.; LI, A. A. Pesticide Exposure and Neurodevelopmental Outcomes: Review of the Epidemiologic and Animal Studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 16, n. 3–4, p. 127–283, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10937404.2013.783383>

BUSVINE, J. R. The present status of insecticide resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 29, n. Suppl, p. 31–40, 1963.

CAI, M.; GUO, X.; LIANG, H.; SUN, P. Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of star anise oil from *Illicium verum Hook.f.* **International Journal of Food Science & Technology**, p. n/a-n/a, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.12221>

CAMPOS, E. V. R.; PROENÇA, P. L. F.; OLIVEIRA, J. L.; BAKSHI, M.; ABHILASH, P. C.; FRACETO, L. F. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. **Ecological Indicators**, v. 105, p. 483, 2019.

CARVALHO, R. L. S.; PESSANHA, L. D. R. Relação entre famílias, animais de estimação, afetividade e consumo: Estudo realizado em bairros do Rio de Janeiro. **Sociais e Humanas**, v. 26, n. 3, p. 622–637, 2013.

CASTRO JANER, E.; KLAFKE, G. M.; FONTES, F.; CAPURRO, M. L.; SCHUMAKER, T. S. S. Mutations in *Rhipicephalus microplus* GABA gated chloride channel gene associated with fipronil resistance. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 4, p. 761–765, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.009>

CELESTINO, F. N.; PRATISSOLI, D.; SANTOS JUNIOR, H. J. G.; COSTA, A. V.; BESTETE, L. R.; BORGES FILHO, R. C. Compatibilidade in vitro entre *Beauveria bassiana* e o óleo de mamona. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, n. 4, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5039/agraria.v13i4a5595>

CHANG, K.-S.; AHN, Y.-J. Fumigant activity of (E)-anethole identified in *Illicium verum* fruit against *Blattella germanica*. **Pest Management Science**, v. 58, n. 2, p. 161–166, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.435>

CHAUBEY, M. K. Fumigant Toxicity of Essential Oils from Some Common Spices against Pulse Beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Oleo Science**, v. 57, n. 3, p. 171–179, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.5650/jos.57.171>

- CHENG, H.; SUN, T. Study on the Different Method of Extraction of Star Anise Oil. **E3S Web of Conferences**, v. 213, p. 03035, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202021303035>
- CHOUKSEY, D.; SHARMA, P.; PAWAR, R. S. Biological activities and chemical constituents of *Illicium verum* hook fruits (Chinese star anise). **Pelagia Research Library**, v. 1, n. 3, p. 1–10, 2010.
- COLES, T. B.; DRYDEN, M. W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 8, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-8>
- COLLIOT, F.; KUKOROWSKI, K. A.; HAWKINS, D. W.; ROBERTS, D. A. (org.). Fipronil: a new soil and foliar broad spectrum insecticide. *In: Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases*. Farnham: British Crop Protection Council, 1992. p. 29–34.
- CONCEIÇÃO, C. L.; GIJSEN, I. S.; LIMA, E. A. S.; CHAVES, J. K. O.; CAMPOS, D. R.; JESUS, I. L. R.; CID, Y. P.; COUMENDOUROS, K. ATIVIDADE PULICIDA COMPARATIVO in vitro DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cinnamomum cassia* E DO CINAMALDEÍDO CONTRA *Ctenocephalides felis*. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5380/avs.v15i5.76868>. Acesso em: 14 dez. 2021.
- COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3–4, p. 320–325, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.008>
- CU, J.-Q.; PERINEAU, F.; GOEPFERT, G. Analysis of Star Anise Oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 2, n. 2, p. 91–92, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10412905.1990.9697830>
- CYCON, M.; MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. **Chemosphere**, v. 172, p. 52–71, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.129>
- DRYDEN, M. Biology of fleas of dogs and cats. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v. 15, p. 569–579, 1993.
- DRYDEN, M. V. Resistance to a flea product. **NAVC Clinician's Brief**, v. 8, p. 19–21, 2010.
- DRYDEN, M. W. Flea and tick control in the 21st century: challenges and opportunities: Flea tick control measures. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5–6, p. 435–440, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00838.x>
- DRYDEN, M. W. *et al.* In-home assessment of either topical fluralaner or topical selamectin for flea control in naturally infested cats in West Central Florida, USA. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 422, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2995-1>
- DRYDEN, M. W.; BROCE, A. B. Integrated flea control for the 21st Century. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 24, n. 1, p. 36–40, 2002.

DRYDEN, M. W.; GAAFAR, S. M. Blood Consumption by the Cat Flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 28, n. 3, p. 394–400, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/28.3.394>

DRYDEN, M. W.; NEAL, J. J.; BENNETT, G. W. Concepts of flea control. **Companion Animal Practice - Parasitology/Dermatology**, v. 19, n. 4–5, p. 11–20, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/28.3.394>

DRYDEN, M. W.; PAYNE, P. A.; VICKI, S.; RIGGS, B.; DAVENPORT, J.; KOBUSZEWSKI, D. Efficacy of dinotefuran–pyriproxyfen, dinotefuran–pyriproxyfen–permethrin and fipronil–(S)-methoprene topical spot-on formulations to control flea populations in naturally infested pets and private residences in Tampa, FL. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2–4, p. 281–286, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.054>

DRYDEN, M. W.; RUST, M. K. The cat flea: biology, ecology and control. **Veterinary Parasitology**, v. 52, n. 1–2, p. 1–19, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)90031-0)

DU, Y.; NOMURA, Y.; SATAR, G.; HU, Z.; NAUEN, R.; HE, S. Y.; ZHOROV, B. S.; DONG, K. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 29, p. 11785–11790, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1305118110>

DUSFOUR, I.; VONTAS, J.; DAVID, J.-P.; WEETMAN, D.; FONSECA, D. M.; CORBEL, V.; RAGHAVENDRA, K.; COULIBALY, M. B.; MARTINS, A. J.; KASAI, S.; CHANDRE, F. Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: Advances and challenges. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 10, p. e0007615, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007615>

EL-GAZZAR, L. M.; MILIO, J.; KOEHLER, P. G.; PATTERSON, R. S. Insecticide resistance in the cat flea (*Siphonaptera: Pulicidae*). **Journal of Economic Entomology**, v. 79, p. 132–134, 1986.

ELLIOTT, M.; FARNHAM, A. W.; JANES, N. F.; SODERLUND, D. M. Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds. Part XI. Relative potencies of isomeric cyano-substituted 3-phenoxybenzyl esters. **Pesticide Science**, v. 9, n. 2, p. 112–116, 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.2780090204>

ESCCAP. **Flea life cycle**. [s. l.], 2015. Disponível em: https://www.esccap.org/uploads/docs/tj3qwivx_3.1_Flea_life_cycle_WM.pdf. Acesso em: 14 dez. 2021.

ESCCAP. **Zwalczanie pasożytów zewnętrznych u psów i kotów**. United Kingdom: [s. n.], 2018. Disponível em: https://www.esccap.org/uploads/docs/6lcwphmx_GL3_Zwalczanie_pasoytw_zewntrznnych_u_psw_i_kotw_09_2020.pdf. Acesso em: 8 jan. 2022.

ESTRADA, J. G.; MULLA, M. S. Evaluation of two new insect growth regulators against mosquitoes in the laboratory. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 2, n. 1, p. 57–60, 1986.

FENG, J.; WANG, R.; CHEN, Z.; ZHANG, S.; YUAN, S.; CAO, H.; JAFARI, S. M.; YANG, W. Formulation optimization of D-limonene-loaded nanoemulsions as a natural and efficient biopesticide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 596, p. 124746, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124746>

FERNANDES, S. R.; BARREIROS, L.; OLIVEIRA, R. F.; CRUZ, A.; PRUDÊNCIO, C.; OLIVEIRA, A. I.; PINHO, C.; SANTOS, N.; MORGADO, J. Chemistry, bioactivities, extraction and analysis of azadirachtin: State-of-the-art. **Fitoterapia**, v. 134, p. 141–150, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.02.006>

FOLLETT, P. A.; DUAN, J. J. **Nontarget Effects of Biological Control**. [S. l.]: Springer Science & Business Media, 2012.

FRANC, M.; YAO, K. P. Comparison of the activity of selamectin, imidacloprid and fipronil for the treatment of cats infested experimentally with *Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides felis strongylus*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 131–133, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.006>

FRIEDLI, A.; WILLIAMS, G. R.; BRUCKNER, S.; NEUMANN, P.; STRAUB, L. The weakest link: Haploid honey bees are more susceptible to neonicotinoid insecticides. **Chemosphere**, v. 242, p. 125145, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125145>

FRITZ, E. *Illicium verum* Hook. f. and *Illicium anisatum* L.: Anatomical Characters and their Value for Differentiation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, n. 1, p. 65–76, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3797/scipharm.0802-03>

GASSEL, M.; WOLF, C.; NOACK, S.; WILLIAMS, H.; ILG, T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, p. 111–124, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.009>

GHAZANFAR, M. U.; RAZA, M.; RAZA, W.; QAMAR, M. I. Trichoderma as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: A review. **Plant Protection**, v. 2, n. 3, 2018. Disponível em: <https://esciencepress.net/journals/index.php/PP/article/view/3142>. Acesso em: 11 dez. 2021.

GODINHO, A. F.; DE OLIVEIRA SOUZA, A. C.; CARVALHO, C. C.; HORTA, D. F.; DE FRAIA, D.; ANSELMO, F.; CHAGURI, J. L.; FARIA, C. A. Memory impairment due to fipronil pesticide exposure occurs at the GABAA receptor level, in rats. **Physiology & Behavior**, v. 165, p. 28–34, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.06.035>

GOMES DA ROCHA VORIS, D.; DIAS, L. S.; LIMA, J. A.; LIMA, K. S. C.; LIMA, J. B. P.; LIMA, A. L. S. Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of *Illicium verum* Hook. f., *Pimenta dioica* (L.) Merr., and *Myristica fragrans* Houtt. against Zika virus vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 23, p. 22541–22551, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2362-y>

GOPINATH, D.; MEYER, L.; SMITH, J.; ARMSTRONG, R. Topical or oral fluralaner efficacy against flea (*Ctenocephalides felis*) transmission of *Dipylidium caninum* infection to dogs. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 557, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3140-x>

GUEDES, R. N.; PICANÇO, M.; PEREIRA, E.; SILVA, É.; SILVA, G.; SOUSA, F. Características dos principais grupos de inseticidas e acaricidas. In: ZAMBOLIM, L.; PIÇANCO, M. C.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. A. (org.). **Produtos fitossanitários (fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas)**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 2008. p. 489–518.

GUPTA, R. C.; MILLER MUKHERJEE, I. R.; DOSS, R. B.; MALIK, J. K.; MILATOVIC, D. Chapter 35 - Organophosphates and Carbamates. In: GUPTA, R. C. (org.). **Reproductive and Developmental Toxicology (Second Edition)**. [S. l.]: Academic Press, 2017. p. 609–631. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00035-4>. Acesso em: 11 dez. 2021.

GUSMÃO, N. M. S.; DE OLIVEIRA, J. V.; NAVARRO, D. M. do A. F.; DUTRA, K. A.; DA SILVA, W. A.; WANDERLEY, M. J. A. Contact and fumigant toxicity and repellency of *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus staigeriana* F., *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Foeniculum vulgare* Mill. essential oils in the management of *Callosobruchus maculatus* (FABR.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). **Journal of Stored Products Research**, v. 54, p. 41–47, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2013.02.002>

HAINZL, D.; CASIDA, J. E. Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 23, p. 12764–12767, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.12764>

HAMPEL, V.; KNAUS, M.; SCHÄFER, J.; BEUGNET, F.; REHBEIN, S. Treatment of canine sarcoptic mange with afoxolaner (NexGard) and afoxolaner plus milbemycin oxime (NexGard Spectra) chewable tablets: efficacy under field conditions in Portugal and Germany. **Parasite**, v. 25, p. 63, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/2018064>

HEIMPEL, G. E.; COCK, M. J. W. Shifting paradigms in the history of classical biological control. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 27–37, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9841-9>

HEUKELBACH, J.; VAN HAEFF, E.; RUMP, B.; WILCKE, T.; MOURA, R. C. S.; FELDMEIERS, H. Parasitic skin diseases: health care-seeking in a slum in north-east Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, n. 4, p. 368–373, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2003.01038.x>

HICKEL, E. R.; MILANEZ, J. M.; HINZ, R. H. Infecção artificial de adultos da bicheira-da-raiz com *Beauveria bassiana* em armadilha luminosa. **Agropecuária Catarinense**, v. 28, n. 1, p. 74–77, 2015.

HINK, W. F.; NEEDHAM, G. R. Vacuuming is lethal to all postembryonic life stages of the cat flea, *Ctenocephalides felis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 125, n. 2, p. 221–222, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2007.00615.x>

HO, S. H.; MA, Y.; HUANG, Y. Anethole, a potential insecticide from *Illicium verum* Hook F., against two stored product insects. **International Pest Control**, v. 39, n. 2, p. 50–51, 1997.

HUANG, Y.; LIAO, M.; YANG, Q.; XIAO, J.; HU, Z.; CAO, H. iTRAQ-based quantitative proteome revealed metabolic changes of *Sitophilus zeamais* in response to terpinen-4-ol fumigation. **Pest Management Science**, v. 75, n. 2, p. 444–451, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.5135>

HUANG, Y.-J.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. Biological Control Strategies for Mosquito Vectors of Arboviruses. **Insects**, v. 8, n. 1, p. 21, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects8010021>

IKBAL, C.; PAVELA, R. Essential oils as active ingredients of botanical insecticides against aphids. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 3, p. 971–986, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01089-6>

ISMAN, M. B. Botanical Insecticides in the Twenty-First Century—Fulfilling Their Promise? **Annual Review of Entomology**, v. 65, n. 1, p. 233–249, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025010>

ITOIGAWA, M.; ITO, C.; TOKUDA, H.; ENJO, F.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Cancer chemopreventive activity of phenylpropanoids and phytoquinoids from *Illicium* plants. **Cancer Letters**, v. 214, n. 2, p. 165–169, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.05.005>

J. NOLAN, T.; B. LOK, J. Macrocyclic Lactones in the Treatment and Control of Parasitism in Small Companion Animals. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 1078–1094, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138920112800399167>

JAE-YEON, L.; JAE-IK LEE. **Preservative and insecticide composition using illicium verum hook.f.** KR20110035504A. Depósito: 30 set. 2009. Concessão: 2011.

JESCHKE, P.; NAUEN, R. Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. **Pest Management Science**, v. 64, n. 11, p. 1084–1098, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.1631>

JESCHKE, P.; NAUEN, R.; SCHINDLER, M.; ELBERT, A. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2897–2908, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf101303g>

JIANG, B.; JIN, X.; DONG, Y.; GUO, B.; CUI, L.; DENG, X.; ZHANG, L.; YANG, Q.; LI, Y.; YANG, X.; SMAGGHE, G. Design, Synthesis, and Biological Activity of Novel Heptacyclic Pyrazolamide Derivatives: A New Candidate of Dual-Target Insect Growth Regulators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 23, p. 6347–6354, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00522>

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Encapsulation in cyclodextrins to widen the applications of essential oils. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 129–143, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0783-y>

KHARE, R.; DAS, G.; KUMAR, A. S.; BENDIGERI, S.; SACHAN, S.; SAIYAM, R.; BANERJEE, D.; KHARE, D. Herbal insecticides and Acaricides: Challenges and constraints. v. 7, n. 4, p. 118–125, 2019.

KIM, S.-I.; PARK, C.; OHH, M.-H.; CHO, H.-C.; AHN, Y.-J. Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n. 1, p. 11–19, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(02\)00013-9](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(02)00013-9)

KRASNOV, B. R. **Functional and Evolutionary Ecology of Fleas: A Model for Ecological Parasitology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542688>. Acesso em: 11 dez. 2021.

KUMAR, S.; POOJA; TROTTA, F.; RAO, R. Encapsulation of Babchi Oil in Cyclodextrin-Based Nanosponges: Physicochemical Characterization, Photodegradation, and In Vitro Cytotoxicity Studies. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 169, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040169>

KUNTZ, E. A.; KAMMANADIMINTI, S. Safety evaluation of lotilaner in dogs after oral administration as flavoured chewable tablets (Credelio™). **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 538, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2468-y>

LAMBERT, M. M.; CAMPOS, D. R.; BORGES, D. A.; AVELAR, B. R.; FERREIRA, T. P.; CID, Y. P.; BOYLAN, F.; SCOTT, F. B.; ALMEIDA CHAVES, D. S.; COUMENDOUROS, K. Activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and its main constituent eugenol in the inhibition of the development of *Ctenocephalides felis felis* and the control of adults. **Veterinary Parasitology**, v. 282, p. 109126, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109126>

LAWRENCE, A. L.; HIL, S.-F.; JIRSOVÁ, D.; PANÁKOVÁ, L.; IONICĂ, A. M.; GILCHRIST, K.; MODRÝ, D.; MIHALCA, A. D.; WEBB, C. E.; TRAUB, R. J.; ŠLAPETA, J. Integrated morphological and molecular identification of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and dog fleas (*Ctenocephalides canis*) vectoring *Rickettsia felis* in central Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 3–4, p. 215–223, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.029>

LI, S.-G.; LI, M.-Y.; HUANG, Y.-Z.; HUA, R.-M.; LIN, H.-F.; HE, Y.-J.; WEI, L.-L.; LIU, Z.-Q. Fumigant activity of *Illicium verum* fruit extracts and their effects on the acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in adult *Sitophilus zeamais*. **Journal of Pest Science**, v. 86, p. 677–683, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10340-013-0520-z>

LI, Y.; WANG, Y.; KONG, W.; YANG, S.; LUO, J.; YANG, M. *Illicium verum* essential oil, a potential natural fumigant in preservation of lotus seeds from fungal contamination. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 141, p. 111347, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111347>

LIMA, M. A. **Importância da embalagem na manutenção da qualidade pós-colheita de frutas**. [s. l.], 2014. Disponível em: http://www.infobibos.com/artigos/2014_1/frutas/index.htm. Acesso em: 6 out. 2021.

LINARDI, P. M. Checklist de Siphonaptera (Insecta) do Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 607–617, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000500027>

LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. R. **Sifonápteros do Brasil**. São Paulo: Editora Museu de Zoologia da USP/FAPES, 2000.

LINARDI, P. M.; SANTOS, J. L. C. Ctenocephalides felis felis vs. Ctenocephalides canis (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 345–354, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000400002>

LITTLE, S. E. Lotilaner - a novel systemic tick and flea control product for dogs. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 539, s13071- 017-2471–3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2471-3>

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil : nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. *E-book*. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/catalogo/REC000gbpasrvf02wx5ok07shnq94etlj3h.html. Acesso em: 12 dez. 2021.

MAGALHÃES, V. S.; CID, Y. P.; FERREIRA, T. P.; MEDEIROS, D. M. V.; DE S. O. BATISTA, L. C.; CORREIA, T. R.; ALBERT, A. L. M.; SCOTT, F. B. Evaluation of pharmacokinetics and efficacy of ivermectin following oral administration in dogs against experimental infection of Ctenocephalides felis felis and Rhipicephalus sanguineus. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 167–171, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.09.004>

MAHONEY, R.; TINEMBART, O.; SCHENKER, R. Flearelated itching in cats and dogs after treatment with nitenpyram. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinaria**, v. 23, p. 20–23, 2001.

MANCINI, E.; SENATORE, F.; DEL MONTE, D.; DE MARTINO, L.; GRULOVA, D.; SCOGNAMIGLIO, M.; SNOUSSI, M.; DE FEO, V. Studies on Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five Thymus vulgaris L. Essential Oils. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12016–12028, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules200712016>

MARRERO, S.; GONZÁLEZ, S.; GUEVARA, H.; EBLEN, A. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A ÓRGANOFOSFORADOS Y CARBAMATOS EN TRABAJADORES DE UNA COMUNIDAD AGRARIA. **Comunidad y Salud**, v. 17, n. 1, p. 12, 2017.

MARRIOTT, P. J.; MASSIL, T.; HÜGEL, H. Molecular structure retention relationships in comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 15–16, p. 1273–1284, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jssc.200401917>

MARTINS, F. R.; GUARNIERI, R. A.; PEREIRA, E. B. O aproveitamento da energia eólica. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 30, p. 1304.1-1304.13, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1806-11172008000100005>

MATOS, L. F.; BARBOSA, D. R. e S.; LIMA, E.; DUTRA, K. A.; NAVARRO, D. M. A. F.; ALVES, J. L. R.; SILVA, G. N. Chemical composition and insecticidal effect of essential oils from *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllus* on *Callosobruchus maculatus* in cowpea.

Industrial Crops and Products, v. 145, p. 112088, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112088>

MATOS, M.; ALHO, A. M.; OWEN, S. P.; NUNES, T.; CARVALHO, L. M. Parasite control practices and public perception of parasitic diseases: A survey of dog and cat owners.

Preventive Veterinary Medicine, v. 122, n. 1–2, p. 174–180, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.09.006>

MAURYA, S.; CHANDRA, M.; YADAV, R. K.; NARNOLIYA, L. K.; SANGWAN, R. S.; BANSAL, S.; SANDHU, P.; SINGH, U.; KUMAR, D.; SANGWAN, N. S. Interspecies comparative features of trichomes in *Ocimum* reveal insights for biosynthesis of specialized essential oil metabolites. **Protoplasma**, v. 256, n. 4, p. 893–907, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00709-018-01338-y>

MEKHLIF, A. F. Larvicidal efficacy and residual toxicity of selected xerophyte plants against *Culex pipiens molestus* mosquito. **International Journal of Mosquito Research**, v. 4, n. 3, p. 117–122, 2017.

MELO, L. C. A.; SILVA, C. A.; DIAS, B. de O. Caracterização da matriz orgânica de resíduos de origens diversificadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 101–110, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000100010>

MELO, R. M. P. S.; VIEIRA, V. P. C.; BATISTA, L. C. S. O.; CARNEIRO, M. B.; CORREIA, T. R.; CID, Y. P.; COUMENDOUROS, K.; SCOTT, F. B. **Eficácia do fipronil oral no controle de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: pulicidae) e *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) em cães.** [s. l.], 2012.

MILLER, R. J.; DRYDEN, M. W.; BROCE, A. B.; SUITER, D. R. Pupation Site Selection of Cat Fleas (*Siphonaptera: Pulicidae*) in Various Carpet Types and Its Influence on Insecticide Efficacy. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 4, p. 1391–1397, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.4.1391>

MIRANDA, L. **Brasil torna-se o segundo maior mercado de produtos pet.** [s. l.], 2020. Disponível em: <https://forbes.com.br/principal/2020/08/brasil-torna-se-o-segundo-maior-mercado-de-produtos-pet/>. Acesso em: 8 jan. 2022.

MIYAZAWA, M.; OTA, H.; ISHIKAWA, Y.; KAMEOKA, H. An Insecticidal Compound from *Illicium verum*. **ChemInform**, v. 24, n. 44, 1993.

MOREIRA, M.; PICANÇO, M.; ÉZIO, M.; DA, S.; MORENO, S.; MARTINS, J. USO DE INSETICIDAS BOTÂNICOS NO CONTROLE DE PRAGAS. In: **Controle Alternativo de pragas e doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG/CTZM, 2006. p. 89–120.

MORTON, M. **Cupboard Love: A Dictionary of Culinary Curiosities, 2nd Edition**. Revised edição ed. Toronto: Insomniac Press, 2004.

MOSSA, A.-T. H. Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 354–378, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/jest.2016.354.378>

MOTA, I.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, J.; PEDRO, L. G.; SOUSA, M. J. Composition variation of the essential oil from *Ocimum basilicum* L. cv. Genovese Gigante in response to *Glomus intraradices* and mild water stress at different stages of growth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 90, n. 90, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104021>. Acesso em: 12 dez. 2021.

MURPHY, D. F. **Combination insecticide composition**. Depositante: United States. US n. US2203919A. Depósito: 25 jul. 1935. Concessão: 11 jun. 1940.

NARANJO, S. E.; ELLSWORTH, P. C.; FRISVOLD, G. B. Economic Value of Biological Control in Integrated Pest Management of Managed Plant Systems. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 621–645, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021005>

NDOLO, D. *et al.* Research and Development of Biopesticides: Challenges and Prospects. **Outlooks on Pest Management**, v. 30, n. 6, p. 267–276, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1564/v30_dec_08

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5. ed. Brasil: [s. n.], 2015. *E-book*. Disponível em: <https://www.saraiva.com.br/medicina-interna-de-pequenos-animais-5-ed-2015-8852939/p>. Acesso em: 14 dez. 2021.

NISBET, A. J.; HUNTLEY, J. F. Progress and opportunities in the development of vaccines against mites, fleas and myiasis-causing flies of veterinary importance. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 4, p. 165–172, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00803.x>

NOLI, C.; COLOMBO, S. (org.). **Feline Dermatology**. 2020^a edição ed. Cham: Springer, 2020.

OLIVEIRA, A. C.; MACHADO, J. A. C.; ANTÔNIO, N. S.; NEVES, M. F. CTENOCEPHALIDES CANIS E CTENOCEPHALIDES FELIS: **Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária**, v. 11, n. 6, p. 5, 2008.

OSBRINK, W. L. A.; RUST, M. K.; REIERSON, D. A. Distribution and Control of Cat Fleas in Homes in Southern California (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 79, n. 1, p. 135–140, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jee/79.1.135>

OTRANTO, D. NEXGARD®. Afoxolaner, a new oral insecticide-acaricide to control fleas and ticks in dogs. Editori. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 3–4, p. 177–178, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.029>

PANGNAKORN, U.; CHUENCHOOKLIN, S. Evaluation of essential oils against *Sitophilus zeamais* (Motshulsky) (Coleoptera: Curculionidae). **Advancement in Medicinal Plant Research**, v. 6, n. 2, p. 19–25, 2018.

PANTI-MAY, J. A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; GARCÍA-PRIETO, L.; SERVIÁN, A.; COSTA, F. Worldwide overview of human infections with *Hymenolepis diminuta*. **Parasitology Research**, v. 119, n. 7, p. 1997–2004, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06663-x>

PARK, C. G.; SHIN, E.; KIM, J. Insecticidal activities of essential oils, *Gaultheria fragrantissima* and *Illicium verum*, their components and analogs against *Callosobruchus chinensis* adults. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 2, p. 269–273, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.03.001>

PASSARA, H.; INSUNG, A. Evaluation of Insecticidal Properties of Four Essential Oils from *Illicium verum*, *Curcuma longa*, *Foeniculum vulgare*, and *Ocimum tenuiflorum* against *Spodoptera exigua*. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 1163, n. 1, p. 5, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1163/1/012011>

PATRA, J. K.; DAS, G.; BOSE, S.; BANERJEE, S.; VISHNUPRASAD, C. N.; DEL PILAR RODRIGUEZ-TORRES, M.; SHIN, H. Star anise (*Illicium verum*): Chemical compounds, antiviral properties, and clinical relevance. **Phytotherapy research: PTR**, v. 34, n. 6, p. 1248–1267, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.6614>

PAVONI, L.; BENELLI, G.; MAGGI, F.; BONACUCINA, G. Green nanoemulsion interventions for biopesticide formulations. *In: Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives*. [S. l.: s. n.]. p. 133–160. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815829-6.00005-X>

PENER, M. Paul.; DHADIALLA, T. S. An Overview of Insect Growth Disruptors; Applied Aspects. *In: SIMPSON, S. J.; CASAS, J. (ed.). Advances in Insect Physiology: Insect Growth Disruptors*. [S. l.]: Elsevier, 2012. v. 43p. 1–162. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391500-9.00001-2>. Acesso em: 7 jan. 2022.

PENG, W.; LIN, Z.; WANG, L.; CHANG, J.; GU, F.; ZHU, X. Molecular characteristics of *Illicium verum* extractives to activate acquired immune response. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 3, p. 348–352, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.10.027>

PEREIRA, F.; OLIVEIRA, J.; MUNIZ, P.; PEIXOTO, G.; GUIMARÃES, R.; COSTA CARVALHO, D. D. Growth promotion and productivity of lettuce using *Trichoderma* spp. commercial strains. **Horticultura Brasileira**, v. 37, p. 69–74, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-053620190111>

PERIBÁÑEZ, M. A.; CALVETE, C.; GRACIA, M. J. Preferences of Pet Owners in Regard to the Use of Insecticides for Flea Control. **Journal of Medical Entomology**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjy088>. Acesso em: 12 dez. 2021.

PISA, L. W. *et al.* Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68–102, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>

PITTARATE, S.; THUNGRABEAB, M.; MEKCHAY, S.; KRUTMUANG, P. Virulence of Aerial Conidia of *Beauveria bassiana* Produced under LED Light to *Ctenocephalides felis*

(Cat Flea). **Journal of Pathogens**, v. 2018, p. 1–4, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/1806830>

PRADO, A.; PIOZ, M.; VIDAU, C.; REQUIER, F.; JURY, M.; CRAUSER, D.; BRUNET, J.; LE CONTE, Y.; ALAUX, C. Exposure to pollen-bound pesticide mixtures induces longer-lived but less efficient honey bees. **Science of The Total Environment**, v. 650, p. 1250–1260, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.102>

PRICHARD, R.; MÉNEZ, C.; LESPINE, A. Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 134–153, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.04.001>

PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 3352, Fipronil**. Bethesda - USA, 2022a. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3352>. Acesso em: 8 jan. 2022.

PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 3034287, Nitenpyram**. Bethesda - USA, 2022b. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3034287>. Acesso em: 8 jan. 2022.

PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 86287518, Imidacloprid**. Bethesda - USA, 2022c. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/86287518>. Acesso em: 8 jan. 2022.

PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 11442, Allethrin**. Bethesda - USA, 2022d. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11442>. Acesso em: 8 jan. 2022.

PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 5053, Resmethrin**. Bethesda - USA, 2022e. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5053>. Acesso em: 8 jan. 2022.

PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 5281303, Azadirachtin**. Bethesda - USA, 2022f. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281303>. Acesso em: 8 jan. 2022.

PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 440917, D-Limonene**. Bethesda - USA, 2022g. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440917>. Acesso em: 8 jan. 2022.

PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 6549, Linalool**. Bethesda - USA, 2022h. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6549>. Acesso em: 8 jan. 2022.

PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 440968, (-)-alpha-Pinene**. Bethesda - USA, 2022i. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440968>. Acesso em: 8 jan. 2022.

PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 637563, Anethole**. Bethesda - USA, 2022j. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/637563>. Acesso em: 8 jan. 2022.

PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 8748, beta-Terpineol**. Bethesda - USA, 2022k. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8748>. Acesso em: 8 jan. 2022.

PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 8815, Estragole**. Bethesda - USA, 2022l. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8815>. Acesso em: 8 jan. 2022.

PULMAN, D. A. Deltamethrin: The Cream of the Crop. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2770–2772, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf102256s>

RASZL, S. M.; CABRAL, D. D.; LINARDI, P. M. Notas sobre sifonápteros (Pulicidae, Tungidae e Rhopalopsyllidae) de carnívoros domésticos brasileiros. **Revista brasileira de entomologia**, v. 43, n. 1–2, p. 95–97, 1999.

ROCHA, L.; TIETBOHL, L. A. C. Chapter 85 - Staranise (*Illicium verum* Hook) Oils. *In*: PREEDY, V. R. (ed.). **Essential oils in food preservation, flavor and safety**. London - UK: Academic Press, 2016. p. 751–756.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; BOLIO-GONZÁLEZ, M. E.; ROSADO-AGUILAR, J. A.; GUITÉRREZ-RUÍZ, E.; TORRES-ACOSTA, F.; ORTEGA-PACHECO, A.; GUTIÉRREZ-BLANCO, E.; AGUILAR-CABALLERO, A. Uso de isoxazolinas: alternativa para control de pulgas, ácaros y garrapatas en perros y gatos. **Bioagrociencias**, v. 12, n. 2, p. 8, 2020.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; OJEDA-CHI, M. M.; TRINIDAD-MARTINEZ, I.; BOLIO-GONZÁLEZ, M. E. First report of amitraz and cypermethrin resistance in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato infesting dogs in Mexico. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, n. 1, p. 72–77, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mve.12207>

ROMERO-NÚÑEZ, C.; BAUTISTA-GÓMEZ, L. G.; SHEINBERG, G.; MARTÍN, A.; ROMERO, A.; FLORES, A.; HEREDIA, R.; MIRANDA, L. Efficacy of Afoxolaner Plus Milbemycin Oxime in the Treatment of Canine Demodicosis. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 17, n. 1, p. 7, 2019.

ROTHSCHILD, M.; SCHLEIN, Y.; PARKER, K.; NEVILLE, C.; STERNBERG, S. The Flying Leap of the Flea. **Scientific American**, v. 229, p. 92–100, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1173-92>

ROTHSCHILD, N. C.; HOPKINS, G. H. E.; ROTHSCCHILD, M.; MARDON, D. K. **An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History) : with keys and short descriptions for the identification of families, genera, species and subspecies**. 652. ed. London: Trustees of the British Museum, 1953.

RUKESH PRAMOD, K. N.; ACHARYA, M. F.; RODE, N. S. Residual toxicity of different insecticides on tomato against serpentine leaf miner (*L. trifolii*) Burgess. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 4, p. 780–783, 2019.

- RUST, M. The Biology and Ecology of Cat Fleas and Advancements in Their Pest Management: A Review. **Insects**, v. 8, n. 4, p. 118, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects8040118>
- RUST, M. K. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 5, p. 232–236, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.03.010>
- RUST, M. K. Recent Advancements in the Control of Cat Fleas. **Insects**, v. 11, n. 10, p. 668, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects11100668>
- RUST, M. K.; DRYDEN, M. W. The Biology, Ecology, and Management of the Cat Flea. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1, p. 451–473, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.451>
- SAMISH, M.; ROT, Asael.; GINDIN, G.; MENT, D.; BEHAR, A.; GLAZER, I. Biocontrol of the cat flea, *Ctenocephalides felis*, by entomopathogenic nematodes and fungi. **Biological Control**, v. 149, p. 104301, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104301>
- SANTANA, H. t.; TRINDADE, F. T. T.; STABELI, R. G.; SILVA, A. A. E.; MILITÃO, J. S. T. L.; FACUNDO, V. A. Essential oils of leaves of *Piper* species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_052. Acesso em: 12 dez. 2021.
- SANTOS, J. V. B. *et al.* In vitro activity of essential oils against adult and immature stages of *Ctenocephalides felis felis*. **Parasitology**, v. 147, n. 3, p. 340–347, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182019001641>
- SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides – uma visão geral. **Alimentos e Nutrição - Araraquara**, v. 18, n. 3, p. 339–349, 2007.
- SARTOR, I. F.; BICUDO, P. L. Agentes empregados no controle de ectoparasitos. *In*: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (org.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 514–515.
- SCHENKER, R.; TINEMBART, O.; HUMBERT-DROZ, E.; CAVALIERO, T.; YERLY, B. Comparative speed of kill between nitenpyram, fipronil, imidacloprid, selamectin and cythioate against adult *Ctenocephalides felis* (Bouché) on cats and dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n. 3, p. 249–254, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00425-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00425-9)
- SCIENCEDIRECT. **ScienceDirect.com | Science, health and medical journals, full text articles and books**. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/>. Acesso em: 11 jan. 2022.
- SHAHRAJABIAN, M. H.; SUN, W.; CHENG, Q. Chinese star anise (*Illicium verum*) and pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariifolium*) as natural alternatives for organic farming and health care- A review. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 03, p. 517–523, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21475/ajcs.20.14.03.p2209>

- SHAHRIARI, M.; ZIBAEI, A.; SAHEBZADEH, N.; SHAMAKHI, L. Effects of α -pinene, trans-anethole, and thymol as the essential oil constituents on antioxidant system and acetylcholine esterase of *Ephesia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 150, p. 40–47, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.06.015>
- SHEETS, L. P.; LI, A. A.; MINNEMA, D. J.; COLLIER, R. H.; CREEK, M. R.; PEPPER, R. C. A critical review of neonicotinoid insecticides for developmental neurotoxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 153–190, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1090948>
- SILVA, A. B.; OLIVEIRA, C. R. F. de; MATOS, C. H. C.; SANTOS, P. É. M. dos; LIRA, C. R. I. de M. BIOATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton blanchetianus* Baill (Euphorbiaceae) SOBRE *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Chrysomelidae). **Nativa**, v. 8, n. 4, p. 450–455, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.31413/nativa.v8i4.8456>
- SILVA, J. K. R.; SILVA, N. N. S.; SANTANA, J. F. S.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; SETZER, W. N. Phenylpropanoid-rich Essential Oils of Piper Species from the Amazon and their Antifungal and Anti-cholinesterase Activities. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 12, p. 1934578X1601101233, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1934578X1601101233>
- SILVERMAN, J.; RUST, M. K. Extended Longevity of the Pre-emerged Adult Cat Flea (Siphonaptera: Pulicidae) and Factors Stimulating Emergence from the Pupal Cocoon. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, n. 6, p. 763–768, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aesa/78.6.763>
- SILVERMAN, J.; RUST, M. K.; REIERSON, D. A. Influence of Temperature and Humidity on Survival and Development of the Cat Flea, *Ctenocephalides Felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 18, n. 1, p. 78–83, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/18.1.78>
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. *In: Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre-RS: Artmed, 2017. p. 486.
- SOARES, M. A.; CAMPOS, M. R.; PASSOS, L. C.; CARVALHO, G. A.; HARO, M. M.; LAVOIR, A.-V.; BIONDI, A.; ZAPPALÀ, L.; DESNEUX, N. Botanical insecticide and natural enemies: a potential combination for pest management against *Tuta absoluta*. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 4, p. 1433–1443, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10340-018-01074-5>
- SOUZA, H. N.; RIBEIRO, M. F.; SILVA, R. Z. Compatibilidade entre defensivos naturais e o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (bals.). Vuill. **MAGISTRA**, v. 30, p. 60–66, 2019.
- STARY, F. **The Natural Guide to Medicinal Herbs and Plants**. [S. l.]: Barnes & Noble Books, 1996.

STEJSKAL, V.; VENDL, T.; AULICKY, R.; ATHANASSIOU, C. Synthetic and Natural Insecticides: Gas, Liquid, Gel and Solid Formulations for Stored-Product and Food-Industry Pest Control. **Insects**, v. 12, n. 7, p. 590, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects12070590>

SU, L.-C.; HUANG, C.-G.; CHANG, S.-T.; YANG, S.-H.; HSU, S.-H.; WU, W.-J.; HUANG, R.-N. An improved bioassay facilitates the screening of repellents against cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Pest Management Science**, v. 70, n. 2, p. 264–270, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.3554>

TAKEO, S.; HISAMORI, D.; MATSUDA, S.; VINETZ, J.; SATTABONGKOT, J.; TSUBOI, T. Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target. **Parasitology International**, v. 58, n. 3, p. 243–248, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.05.002>

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 247–268, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>

TONG, Z.; DUAN, J.; WU, Y.; LIU, Q.; HE, Q.; SHI, Y.; YU, L.; CAO, H. A survey of multiple pesticide residues in pollen and beebread collected in China. **Science of The Total Environment**, v. 640–641, p. 1578–1586, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.424>

TOUTAIN, C. E.; SEEWALD, W.; JUNG, M. The intravenous and oral pharmacokinetics of lotilaner in dogs. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 522, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2475-z>

TU, X.-F.; HU, F.; THAKUR, K.; LI, X.-L.; ZHANG, Y.-S.; WEI, Z.-J. Comparison of antibacterial effects and fumigant toxicity of essential oils extracted from different plants. **Industrial crops and products**, v. 124, p. 192–200, 2018.

TURETA, E. F.; VARGAS, G. P.; FIORIO, M. S.; WORTMANN, B. B.; OLIVEIRA, L. R. S.; ROSA, R. L.; SOUZA, E. M.; SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O. Métodos alternativos e sustentáveis de controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*. **Revista Liberato**, v. 21, n. 35, p. 1–100, 2020.

VALE, E. S. M. **Formulado de Eugenol e seu uso, em condições de laboratório, no controle de *Aedes aegypti* vetor da Dengue, *Chikungunya* e *Zika***. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2018. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/6682>. Acesso em: 7 jan. 2022.

VAN DER MESCHT, L.; MATTHEE, S.; MATTHEE, C. A. New taxonomic and evolutionary insights relevant to the cat flea, *Ctenocephalides felis*: A geographic perspective. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 155, p. 106990, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106990>

VARLOUD, M.; HODGKINS, E. Five-month comparative efficacy evaluation of three ectoparasiticides against adult cat fleas (*Ctenocephalides felis*), flea egg hatch and emergence, and adult brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus sensu lato*) on dogs housed outdoors.

Parasitology Research, v. 114, n. 3, p. 965–973, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4262-5>

VEGA, F. E.; DOWD, P. F.; PELL, J. K.; JACKSON, D. M.; KLEIN, M. G. Dissemination of beneficial microbial agents by insects. *In*: LACEY, L. E.; KAYA, H. K. (org.). Dordrecht, Netherlands.: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 2000. p. 153–177. *E-book*. Disponível em: <https://repository.rothamsted.ac.uk/item/88575/dissemination-of-beneficial-microbial-agents-by-insects>. Acesso em: 12 dez. 2021.

VERGHESE, J. The world of spices and herbs. **Indian Spices**, v. 34, n. 1–2, p. 11–13, 1997.

VILLAVARDE, J. J.; SANDÍN-ESPAÑA, P.; SEVILLA-MORÁN, B.; LÓPEZ-GOTI, C.; ALONSO-PRADOS, J. L. Biopesticides from natural products: Current development, legislative framework, and future trends. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 5618–5640, 2016.

WANG, G.-W.; HU, W.-T.; HUANG, B.-K.; QIN, L.-P. Illicium verum: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 10–20, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.051>

WANG, Q.; JIANG, L.; WEN, Q. Effect of three extraction methods on the volatile component of Illicium verum Hook. f. analyzed by GC-MS. **Wuhan University Journal of Natural Sciences**, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11859-006-0080-7>

WANG, X.; ZHANG, L.; CAO, Y.; WEI, W.; LIU, C.; WANG, Y.; BIAN, S.; WANG LI-CHUN. Grain Filling Characteristics of Maize Hybrids Differing in Maturities. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 47, n. 18, p. 3557–3565, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2014.18.004>

WARREN, S. Flea busters: principles of flea control. **Modern veterinary practice (USA)**, v. 67, n. 8, p. 732–734, 1986.

WEI, L.; HUA, R.; LI, M.; HUANG, Y.; LI, S.; HE, Y.; SHEN, Z. Chemical composition and biological activity of star anise Illicium verum extracts against maize weevil, Sitophilus zeamais adults. **Journal of Insect Science**, v. 14, p. 80, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jis/14.1.80>

WILCKE, T.; HEUKELBACH, J.; SABÓIA-MOURA, R. C.; FELDMEIER, H. Scabies, pediculosis, tungiasis and cutaneous larva migrans in a poor community in northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 83, n. 1, p. 100, 2002.

WONG, Y.; LEE, P.; NURDIYANA, W. Extraction and Antioxidative Activity of Essential Oil From Star Anise (Illiciumverum). **Oriental Journal of Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 1159–1171, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.13005/ojc/300329>

WORDPRESS. **Beautiful designs, powerful features, and the freedom to build anything you want. WordPress is both free and priceless at the same time.** [s. l.], 2022. Disponível em: <https://wordpress.org/>. Acesso em: 8 jan. 2022.

WRIGHT, I. Lotilaner - a novel formulation for cats provides systemic tick and flea control. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 407, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2970-x>

YANG, J.-F.; YANG, C.-H.; CHANG, H.-W.; YANG, C.-S.; WANG, S.-M.; HSIEH, M.-C.; CHUANG, L.-Y. Chemical Composition and Antibacterial Activities of *Illicium verum* Against Antibiotic-Resistant Pathogens. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 5, p. 1254–1262, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.1086>

YANG, Y.; CHENG, J.; GARAMUS, V. M.; LI, N.; ZOU, A. Preparation of an Environmentally Friendly Formulation of the Insecticide Nicotine Hydrochloride through Encapsulation in Chitosan/Tripolyphosphate Nanoparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1067–1074, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04147>

YEWHALAW, D. *et al.* Determination of the residual efficacy of carbamate and organophosphate insecticides used for indoor residual spraying for malaria control in Ethiopia. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 471, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2122-3>

YOUSSEFI, M. R.; EBRAHIMPOUR, S.; REZAEI, M.; AHMADPOUR, E.; RAKHSHANPOUR, A.; RAHIMI, M. T. Dermatitis caused by *Ctenocephalides felis* (cat flea) in human. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 5, n. 4, p. 248–250, 2014.

ZAKSON-AIKEN, M.; GREGORY, L. M.; MEINKE, P. T.; SHOOP, W. L. Systemic Activity of the Avermectins Against the Cat Flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 576–580, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.4.576>

ZHAI, Y.; SUN, S.; WANG, Z.; CHENG, J.; SUN, Y.; WANG, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.; YU, A. Microwave extraction of essential oils from dried fruits of *Illicium verum* Hook. f. and *Cuminum cyminum* L. using ionic liquid as the microwave absorption medium. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 20, p. 3544–3549, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jssc.200910204>

ZHANG, W.; YANG, K.; LYU, Z.; ZHU, J. Microbial groups and their functions control the decomposition of coniferous litter: A comparison with broadleaved tree litters. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 133, p. 196–207, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.03.009>

ZHAO, N. N.; ZHOU, L.; LIU, Z. L.; DU, S. S.; DENG, Z. W. Evaluation of the toxicity of the essential oils of some common Chinese spices against *Liposcelis bostrychophila*. **Food Control**, v. 2, n. 26, p. 486–490, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.021>

ZHOU, B.-G.; WANG, S.; DOU, T.-T.; LIU, S.; LI, M.-Y.; HUA, R.-M.; LI, S.-G.; LIN, H.-F. Aphicidal Activity of *Illicium verum* Fruit Extracts and Their Effects on the Acetylcholinesterase and Glutathione S-transferases Activities in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **Journal of Insect Science**, v. 16, n. 1, p. 11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev163>

ZHOU, J.; SUN, J.; XU, S.; ZHOU, Q.; SUN, S. Study on the identification of *Illicium vatum* Hook. f. and *illicium lanceolatum* A. C. Smith by multi-ateps infrared macro-fingerprint method. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi = Guang Pu**, v. 28, n. 12, p. 2864–2867, 2008.

ANEXOS

A – Artigo científico publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária
Brazilian Journal of
Veterinary Parasitology
ISSN 1984-2961 (Electronic)
www.cbpv.org.br/rbpv

Original Article

Efficacy and residual effect of *Illicium verum* (star anise) and *Pelargonium graveolens* (rose geranium) essential oil on cat fleas *Ctenocephalides felis felis*

Eficácia e efeito residual dos óleos essenciais de *Illicium verum* (anis-estrelado) e *Pelargonium graveolens* (gerânio rosa) em pulgas de gato *Ctenocephalides felis felis*

Juliana Pereira Freitas¹; Ingrid Lins Raquel de Jesus¹; Jéssica Karoline de Oliveira Chaves¹; Isabela Scalioni Gijssen¹; Diefrey Ribeiro Campos^{1*}; Debora Pereira Baptista²; Thais Paes Ferreira¹; Melina Cardilo Campos Alves¹; Katherina Coumendouros¹; Yara Peluso Cid^{1,2}; Douglas Siqueira de Almeida Chaves^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

How to cite: Freitas JP, Jesus ILR, Chaves JKO, Gijssen IS, Campos DR, Baptista DP, et al. Efficacy and residual effect of *Illicium verum* (star anise) and *Pelargonium graveolens* (rose geranium) essential oil on cat fleas *Ctenocephalides felis felis*. *Braz J Vet Parasitol* 2021; 30(4): e009321. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021088>

Abstract

The essential oils (EOs) of *Illicium verum* and *Pelargonium graveolens* were evaluated for lethality, inhibition of development and residual efficacy against the flea *Ctenocephalides felis felis*. Their chemical composition was characterized by means of gas chromatography with a flame ionization and mass spectrometry detection. Mortality at different immature stages and among adult fleas was measured through *in vitro* filter paper tests at different concentrations of EOs. The chemical characterization of *I. verum* volatile oil showed that *E*-anethole (79.96%) was the major constituent, while the major compounds in *P. graveolens* were citronellol (29.67%) and geraniol (14.85%). Insecticidal activity against both immature and adult flea stages were observed. The EO of *I. verum* had insecticidal activity for approximately 18 days, while the EO activity of *P. graveolens* lasted for 13 days. The pulicidal activity of *I. verum* remained above 70% for up to 9 days, while the activity of *P. graveolens* was 41.7% for up to 2 days. Essential oils, especially that of *I. verum*, showed insecticidal activity for flea control at different life cycle stages and have potential for the development of ectoparasiticides (biopesticides) for veterinary use.

Keywords: Flea, volatile oil, phenylpropanoid, terpenes, geranium, gas chromatography.

Resumo

Os óleos essenciais (OE) de *Illicium verum* e *Pelargonium graveolens* foram avaliados quanto à letalidade, inibição do desenvolvimento e eficácia residual contra a pulga *Ctenocephalides felis felis*. Sua composição química foi caracterizada por meio de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama e espectrometria de massas. A mortalidade entre os diferentes estágios imaturos e pulgas adultas foi avaliada por meio de testes *in vitro* em papel filtro, contendo diferentes concentrações de OEs. A caracterização química do óleo volátil de *I. verum* mostrou que o *E*-anetol (79,96%) foi o constituinte majoritário, enquanto os principais compostos de *P. graveolens* foram citronelol (29,67%) e geraniol (14,85%). Foi observada atividade inseticida contra os estágios imaturos e adulto da pulga. O OE de *I. verum* teve atividade inseticida por aproximadamente 18 dias, enquanto o de *P. graveolens* durou 13 dias. A atividade pulcida de *I. verum* permaneceu acima de 70% até o 9º dia, enquanto a atividade de *P. graveolens* foi de 41,7% até o 2º dia. Os óleos essenciais, principalmente de *I. verum*, apresentam atividade inseticida para o controle de pulgas em diferentes estágios do ciclo de vida e têm potencial para o desenvolvimento de ectoparasiticidas (biopesticidas) de uso veterinário.

Palavras-chave: Pulga, óleo volátil, fenilpropanóide, terpenos, gerânio, cromatografia gasosa.

Received May 23, 2021. Accepted September 29, 2021.

*Corresponding author: Diefrey Ribeiro Campos. E-mail: diefrey8@gmail.com



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Braz J Vet Parasitol 2021; 30(4): e009321 | <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021088>

1/11

Introduction

Ownership of pets such as dogs and cats is increasing, causing rising concern over methods to control infestations caused by ectoparasites such as fleas. *Ctenocephalides felis felis* is the most prevalent flea subspecies parasitizing companion animals worldwide. They are responsible for causing blood loss and irritation of parasitized animals (Rust, 2020). Saliva inoculation can lead to the development of flea allergy dermatitis, which represents a large part of dermatological care in dogs and cats (Streicher, 2019). Furthermore, they are responsible for the transmission of several pathogens such as: *Bartonella* species, *Coxiella burnetii*, Hemoplasmas, *Rickettsia* species and *Yersinia pestis* (Lappin et al., 2020).

Essential oil are complex mixtures originated from the secondary metabolism, produced by the glandular trichomes, and in different secretory structures. Then can be compose of terpenes (mainly mono and sesqui) and/or phenylpropanoids. These can be applied by industry, food and pharmaceuticals (Dawood et al., 2021). Activity of essential oils against fleas has been reported (Lambert et al., 2020; Dos Santos et al., 2020; Conceição et al., 2020). It is believed that these oils can act by means of several mechanisms, since the chemical composition of essential oils is complex, possibly including mono and sesquiterpenes and/or phenylpropanoids.

Illicium verum, known as star anise, has shown activity against several insects of agricultural and veterinary importance (Matos et al., 2020). Its major compound is the phenylpropanoid *E*-anethole. *Pelargonium graveolens*, known as rose geranium, is also toxic to various insects (Saraiva et al., 2020). Its oil is rich in the monoterpenes citronellol and geraniol (Saraiva et al., 2020).

The aim of the present study was to conduct an *in vitro* evaluation on the insecticidal activity of the essential oils of star anise and rose geranium against the different immature stages and residual efficacy against the adult form of the flea *Ctenocephalides felis felis*.

Material and Methods

Essential oils

Essential oils of *Illicium verum* L. (Schisandraceae) (star anise) - and *Pelargonium graveolens* L'Hér. ex Aiton (Geraniaceae) (rose geranium) were purchased commercially (Via Aroma®). The EOs were kept protected from the light and were stored at -20 °C until the time of the chromatographic and biological analyses.

Dereplication of chemical constituents

The analysis was performed by means of a gas chromatography (GC) device equipped with a flame ionization detector (FID) and a split/split-less injector to separate and detect the constituents of the volatile oils of *I. verum* and *P. graveolens*. The compounds were separated using a fused silica capillary column (5% phenyl; 95% dimethylpolysiloxane), of dimensions 30 m × 0.25 mm (i.d.) × 0.25 µm (film thickness). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The column temperature was programmed as follows: 60 °C for 2 min followed by heating at 5 °C/min to 110 °C, followed by heating at 3 °C/min to 150 °C and, lastly, followed by heating at 15 °C/min up to 290 °C and holding this constant for 15 min. The injector temperature was 220 °C and the detector temperature was 290 °C. To separate and identify the substances, 1 µL of volatile oils samples diluted in dichloromethane (10 µl/ml) was injected at the times defined, into the gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC-MS) QP-2010 Plus (Shimadzu, Japan). The flow of the helium carrier gas, the capillary column and the temperature conditions for the GC-MS analysis were the same as described for the GC. The temperature of the injector was 220 °C and the interface temperature was 250 °C. Mass spectra were obtained with a quadrupole detector operating at 70 eV, with a mass range of 40-400 *m/z* and a scanning rate of 0.5 scan/s.

The chemical identification of the essential oil was based on linear retention indices (LRI) and mass spectra of the samples. These were compared with authentic standards injected under the same conditions, and using the NIST database (2008) and the Kovats index (KI) (Adams, 2007). The LRI was calculated based on co-injection of alkane series (van Den Dool & Kratz, 1963).

Flea origin

Different stages (adults, eggs, larvae and pupae) of *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1935), obtained from a laboratory colony maintained in cats without introduction of external specimens and without exposure to

insecticides since 1998, were used in this study. This species is registered in the National System of Genetic Heritage Management and Associated Traditional Knowledge (SisGen) under number A710DC4 and the flea colony was approved by the Ethics Committee for Animal Use of the Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, under protocol number 4313110419.

Essential oil activity against *Ctenocephalides felis felis* *in vitro*

The technique using filter paper was used for the bioassays. Dilutions of the essential oils of *I. verum* and *P. graveolens* were made using acetone as diluent and as a negative control. For positive control, a solution of fipronil (400 µg.mL⁻¹) was used. Direct dilutions of the essential oil were made, to obtain 10 solutions at concentrations ranging from 40,000 µg.mL⁻¹ to 100 µg.mL⁻¹ for *I. verum* and from 12,000 µg.mL⁻¹ to 50 µg.mL⁻¹ for *P. graveolens*, according to the flea stage under analysis. The bioassays were performed in sextuplicate, with filter paper strips of 10 cm² and filter paper discs of 23.76 cm², for adult fleas and immature phases, respectively. The strips were impregnated with 200 µL and the discs with 475 µL of their respective dilutions, so that the final concentrations for *I. verum* and *P. graveolens* were in the range of 800.00 to 100.00 µg.cm² and 240.00 to 120.00 µg.cm² respectively. After impregnation, the tapes and discs were dried for 1 h before the bioassay procedure.

The *in vitro* activity of the essential oils against immature stages of *C. felis felis* was evaluated using filter paper tests against (Conceição et al., 2020) eggs, larvae and pupae. The inhibition of flea development was also analyzed. The dried impregnated discs were inserted in petri dishes containing 10 eggs, larvae or pupae of *C. felis felis*. After sealing, the petri dishes were kept in a climatized chamber (Eletrolab®, Model: 102FC, Serie: 970603) at 28 ± 1 °C and relative humidity of 75 ± 10%.

The evaluation criteria for ovicidal, larvicidal and pupicidal tests were the hatching, motility and emergence of adult fleas, respectively. In the evaluation of developmental inhibition, 10 newly collected eggs were incubated in a petri dish with the impregnated disc, and the emergence of adult fleas was evaluated. The results from the ovicidal test were evaluated after 72 h, as was also the development inhibition test, the larvicidal test after 24 and 48 h, while the pupicidal test was evaluated after 15 days. All tests were performed in sextuplicate.

In vitro insecticidal activity against *C. felis felis* adults was evaluated using the impregnated filter paper technique (Conceição et al., 2020) against unfed fleas obtained from the laboratory colony. The impregnated and dried strips were inserted into glass tubes containing 10 unfed adult cat fleas (five males and five females). After sealing with non-woven tissue and rubber bands, the tubes were kept in a climatized chamber at 28 ± 1 °C and relative humidity of 75 ± 10%. Insecticidal activity was evaluated according to the motility of the fleas, which were deemed to be alive at the slightest movement observed. The tests were performed in sextuplicate for each concentration. The mean number of live adult fleas per concentration was evaluated after 24 and 48 h using a stereo microscope (Wild Heerbrugg, M5-52796).

Efficacy evaluation and establishment of LC₅₀ and LC₉₀ and Statistical analysis

To calculate the efficacy, Abbott's formula (Abbott, 1987) was used: percentage efficacy = [(mean number of fleas (corresponding flea stage) of the control group - mean number of fleas (corresponding flea stage) of the treated group] / (mean number of fleas (corresponding flea stage) of the control group) × 100. LC₅₀ and LC₉₀ were established through Probit analysis using the RStudio Team software (2020, RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA, USA). Statistical significance was set at 5% (P < 0.05).

To compare the mortality means between the different concentrations, the Shapiro Wilks test was performed to determine the normality of the data. The comparison of means was performed using the ANOVA test followed by the T-test (LSD). The BioEstat version 5.3 program was used for the statistical analysis of the data, considering a significance level (α) 5%.

Residual efficacy

The residual efficacy of the essential oils against adults of *C. felis felis* was assessed by means of the filter paper impregnation technique (Conceição et al., 2020) against unfed fleas. The impregnated and dried strips were inserted into glass tubes containing 10 unfed adult cat fleas (five males and five females). After sealing with non-woven tissue and rubber bands, the tubes were kept in a climatized chamber at 28 ± 1 °C and relative humidity of 75 ± 10%. Every 24 h, live fleas were counted and the fleas in the tubes were replaced with 10 new fleas. The impregnated

tape was maintained to assess the durability of the insecticidal activity of the essential oils in a single application. The tests were performed in sextuplicate, using the concentration responsible for 100% mortality: 800 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ and 240 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, for *I. verum* and *P. graveolens*, respectively. Insecticidal activity was evaluated according to the motility of the fleas, which were deemed to be alive at the slightest movement observed.

Results

Chemical analysis

The gas chromatography analysis (Table 1) led to identification of 15 compounds in *I. verum* EO, among which the phenylpropanoid (*E*)-anethole was the major compound (79.96%) and the other constituents were in a concentration lower than 10% (Figure 1a). In turn, the *P. graveolens* EO was found to contain 27 compounds, among which the major ones were the class of monoterpene oxygenated as citronellol (29.67%) and geraniol (14.85%) (Figure 1b).

Efficacy and LC_{50} and LC_{90}

The essential oil of *I. verum* caused 100% mortality of adult fleas at a concentration of 400.0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ after 48 hours. This same total mortality was observed for concentrations of 80.0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, 20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ and 140.0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ against the egg, larval and pupal stages, respectively. The concentration of 40.0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ totally inhibited development from egg to adult. In turn, the essential oil of *P. graveolens* caused 100% mortality at lower concentrations after exposure for 48 hours: 240.0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ against adult fleas; 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ against pupae; and 35.0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ for inhibition of the biological cycle. On the other hand, the concentrations causing 100% mortality were greater for ovicidal activity (60.0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and larvicidal activity (40.0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) (Table 2).

Comparison of the estimated lethal concentration values revealed that the immature stages were more susceptible when measured using the LC_{50} values, ranging from 7.9 to 12.4 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ for inhibition of the biological cycle, 18.8 to 36.9 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ against eggs, 12.1 to 16.3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ versus larvae, and 35.4 to 67.6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ against pupae. The same pattern was observed for the estimated LC_{90} values, ranging from 20.4 to 30.1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ for inhibition of the biological cycle, 54.5 to 55.6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ against eggs, 16.8 to 32.3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ against larvae and 85.4 to 87.9 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ versus pupae. Both essential oils presented similar LC_{50} and LC_{90} values for inhibition of the biological cycle and egg stage, while for larvicidal activity, the *I. verum* essential oil presented relative potency (LC_{90}) 2-fold higher. For adult fleas, the insecticidal activities measured by LC_{50} and LC_{90} ranged from 119.1 to 164.6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ and from 209.5 to 258.1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectively (Table 3).

Residual efficacy

The residual efficacy of the essential oils was measured to assess the longevity of insecticidal activity (Figure 2a and 2b). The EO of *I. verum* retained its insecticidal activity for approximately 18 days, while the OE activity of *P. graveolens* lasted for 13 days. The EO of *I. verum* caused 80% mortality on the 7th day of exposure, decreasing to approximately 50% on the 10th day of analysis. On the 13th day, it was still able to kill 36.7% of the fleas and this went down to 1.7% activity on the 18th day. Although the EO of *Pelargonium graveolens* had the lowest concentration capable of causing 100% mortality, its effectiveness did not last long. On the 3rd day of exposure, the pulicidal activity of the *P. graveolens* EO declined to approximately 50% mortality, falling to just under 30% on the 5th day, 9.5% on the 12th day and no activity on the 13th day of exposure.

Discussion

This is the first study to show the insecticidal activity of essential oils from *I. verum* and *P. graveolens* against adult fleas and their immature stages, as well as their residual activity. The chromatographic analysis showed a total of 16 substances in *I. verum* and 27 in *P. graveolens*. GC/MS identified that monoterpenes were the major class in *P. graveolens* (63.01%) and phenylpropanoids formed the majority in *I. verum* (86.34%). As described by other authors, *E*-anethole (1) was the major compound of star anise essential oil, but other phenylpropanoids, such as (*Z*)-anethole (2) and estragole (3), were also abundant (Yu et al., 2021). *E*-anethole has already been described as the major constituent of *I. verum* essential oil in some studies that report insecticidal activity (Nilprapat et al.,

Table 1. Chemical characterization of *Illicium verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils.

Compounds	AIT	IVEO	PGEO
Monoterpenes hydrocarbons			
α-pinene	932	0.97	-
α-phellandrene	1002	0.57	-
Carene	1008	0.36	-
Limonene	1024	2.05	0.80
β-phellandrene	1025	0.43	-
Monoterpenes oxygenated			
1,8-cineol	1026	0.42	-
Linalool	1095	-	5.00
(E)-rose oxide	1122	-	2.58
β-terpineol	1140	3.58	-
(+)-menthone	1148	-	2.50
(-)-menthone	1148	-	5.72
4-terpineol	1174	0.29	-
α-terpineol	1186	-	1.29
Citronellol	1223	-	29.67
Neral	1235	-	0.77
Geraniol	1249	-	14.85
Geranial	1264	-	0.45
Citronellyl formate	1271	-	9.41
Neryl formate	1280	-	4.13
Sesquiterpenes hydrocarbons			
α-cubebene	1348	-	0.40
Ylangene	1373	0.31	-
α-ylangene	1375	-	0.96
β-elemene	1389	-	0.34
(Z)-farnesene	1440	-	3.37
6,9-guaiadiene	1442	-	1.62
(E)-Muurola-3,5-diene	1451	-	0.71
α-clovene	1452	-	0.55
α-humulene	1452	-	0.35
Sesquiterpenes oxygenated			
β-thujaplicin	1475	0.39	-
Geranyl propanoate	1476	-	2.02
γ-himachalene	1481	1.20	-
Citronellyl butanoate	1532	-	0.84
2-phenyl ethyl tiglate	1584	-	1.86
γ-eudesmol	1630	-	2.32
α-eudesmol	1637	-	0.48
Citronellyl angelate	1656	-	0.66
Geranyl tiglate	1696	-	1.65
Phenylpropanoid			
Estragole	1195	5.75	-
Anisaldehyde	1247	2.49	-
(Z)-anethole	1249	0.63	-
(E)-anethole	1282	79.96	-
Monoterpenes hydrocarbons		4.38	1.98
Monoterpenes oxygenated		4.29	61.83
Sesquiterpenes hydrocarbons		1.51	8.30
Sesquiterpenes oxygenated		-	4.45
Phenylpropanoid		86.34	-
Total		95.92	95.75

The chemical composition was analyzed by GC-MS and organized in the table by order of elution (EO) in the chromatographic column. The concentration (%) was calculated based on the total area of the peak by GC-FID. Tabulated arithmetic index (AIT). Not detected (-). IVEO – *Illicium verum* essential oil. PGEO – *Pelargonium graveolens* essential oil.

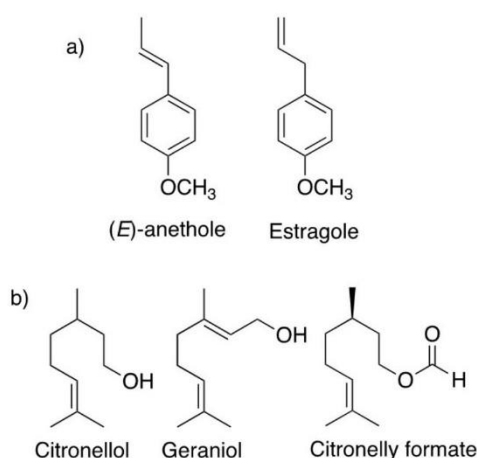


Figure 1. Major compounds identified in the (a) *Illicium verum* and (b) *Pelargonium graveolens* essential oil.

Table 2. Mortality (%) and life cycle inhibition of *Illicium verum* and *Pelargonium graveolens* volatile oils against different stage of the flea.

<i>Illicium verum</i>											
Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Egg* Mortality (%)	Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Larva (24h)	Larva (48h)	Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Pupae* Mortality (%)	Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	ID* Mortality (%)	Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Adult (24h)	Adult (48h)
Cont. neg.	11.7 \pm 36.7	Cont. neg.	0 \pm 0	0 \pm 0	Cont. neg.	13.3 \pm 12.1	Cont. neg.	21.7 \pm 11.7	Cont. neg.	0 \pm 0	0 \pm 0
Placebo	15.0 \pm 10.5	Placebo	0 \pm 0	0 \pm 0	Placebo	13.3 \pm 11.6 ^a	Placebo	21.7 \pm 10.6	Placebo	0 \pm 0	0 \pm 0
30.0	26.7 \pm 8.2	10.0	21.7 \pm 11.7	26.7 \pm 10.3	20.0	25.0 \pm 8.4	2.0	4.3 \pm 7.5	100.00	40.0 \pm 25.0	41.7 \pm 19.4
40.0	61.7 \pm 14.7	12.0	38.3 \pm 11.7	45.0 \pm 5.5	40.0	58.3 \pm 24.0	5.0	41.7 \pm 14.7	200.00	75.0 \pm 21.8	75.0 \pm 18.7
50.0	78.3 \pm 29.3	14.0	53.3 \pm 17.5	75.0 \pm 22.4	60.0	66.7 \pm 25.8	10.0	78.3 \pm 14.7	240.00	85.0 \pm 17.6	85.0 \pm 17.6
60.0	93.3 \pm 8.2	16.0	71.7 \pm 21.4	80.0 \pm 46.4	80.0	85.0 \pm 10.5	20.0	85.0 \pm 16.4	300.00	90.0 \pm 11.0	93.3 \pm 5.2
70.0	98.3 \pm 4.1	18.0	86.7 \pm 13.7	95.0 \pm 5.5	100.0	93.3 \pm 8.2	30.0	95.0 \pm 8.4	400.00	96.7 \pm 5.2	100.0 \pm 5.5
80.0	100.0 \pm 0.0	20.0	98.3 \pm 4.1	100.0 \pm 0	140.0	100.0 \pm 0	40.0	100.0 \pm 0	800.00	100.0 \pm 0	100.0 \pm 0
<i>Pelargonium graveolens</i>											
Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Egg* Mortality (%)	Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Larva (24h)	Larva (48h)	Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Pupae* Mortality (%)	Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	ID* Mortality (%)	Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Adult	
										Mortality (%)	
Cont. neg.	11.7 \pm 10.6	Cont. neg.	0 \pm 0	0 \pm 0	Cont. neg.	11.7 \pm 12.1	Cont. neg.	11.7 \pm 7.5	Cont. neg.	0 \pm 0	0 \pm 0
Placebo	13.3 \pm 10.3	Placebo	0 \pm 0	0 \pm 0	Placebo	13.3 \pm 8.6	Placebo	11.6 \pm 8.2	Placebo	0 \pm 0	0 \pm 0
10.00	26.7 \pm 11.7	11.6	15.0 \pm 10.5	21.7 \pm 11.7	50.0	36.7 \pm 12.1	1.0	4.8 \pm 7.5	120.00	10.2 \pm 21.9	13.2 \pm 22.2
20.00	55.0 \pm 12.1	20.0	23.3 \pm 37.8	33.3 \pm 13.7	60.0	55.0 \pm 15.2	10.0	28.7 \pm 9.8	140.00	18.3 \pm 13.3	23.3 \pm 16.3
30.00	60.0 \pm 10.5	25.0	53.3 \pm 10.3	70.0 \pm 6.3	70.0	70.0 \pm 12.6	20.0	63.7 \pm 16.7	160.00	38.3 \pm 11.7	41.7 \pm 14.7
40.00	75.0 \pm 11.0	30.0	70.0 \pm 11.0	86.7 \pm 12.1	80.0	83.3 \pm 16.3	25.0	75.1 \pm 8.9	180.00	53.3 \pm 17.5	65.0 \pm 25.1
50.00	90.0 \pm 5.5	35.0	93.3 \pm 8.2	98.3 \pm 4.1	90.0	91.7 \pm 7.1	30.0	85.1 \pm 11.7	200.00	70.0 \pm 15.5	83.3 \pm 10.3
60.00	100.0 \pm 0	40.0	100.0 \pm 0	100.0 \pm 0	100.0	100.0 \pm 0	35.0	100.0 \pm 0	240.00	96.7 \pm 8.2	100.0 \pm 0

*Corrected mortality. ID = inhibition of development; h hours; Conc. = concentration; Neg. Cont. = negative control. Note: ANOVA test followed by the T-test (LSD). Different letters a b c indicate statistical difference.

Table 3. Lethal concentrations [LC_{50} and LC_{90} ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)] and slopes for *Illicium verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils against different immature stages and adults of *Ctenocephalides felis felis*.

Essential oil	Flea stage	(95% CI)		Slope (SE)	R ²	χ^2
		LC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	LC_{90} ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)			
IVEO	Egg	36.9 (33.4-39.9)	55.6 (51.1-62.8)	7.20 (0.4)	0.953	0.900
	Larvae (24 h)	14.4 (13.5-15.3)	20.8 (19.2-23.4)	8.1 (0.8)	0.951	0.568
	Larvae (48 h)	12.1 (11.21-12.7)	16.8 (15.7-18.5)	8.1 (0.9)	0.960	0.562
	Pupae	35.4 (29.1-41.1)	87.9 (75.2-108.4)	3.2 (0.3)	0.958	0.707
	ID	7.9 (3.7-9.3)	20.4 (15.3-30.5)	2.1 (0.2)	0.904	0.733
	Adult (24 h)	121.7 (82.4-152.1)	290.6 (230.5-434.1)	3.8 (0.4)	0.757	0.067
	Adult (48 h)	119.1 (65.4-157.4)	258.1 (194.4-494.1)	3.8 (0.6)	0.955	0.750
PGEO	Egg	18.8 (14.9-22.4)	54.5 (44.1-75.6)	2.8 (0.5)	0.989	0.964
	Larvae (24 h)	20.1 (18.7-23.1)	36.7 (31.7-44.7)	4.2 (1.1)	0.970	1
	Larvae (48 h)	16.3 (14.1-18.4)	32.3 (26.8-51.8)	3.6 (0.8)	0.978	1
	Pupae	67.6 (62.0-71.4)	85.4 (78.1-96.5)	7.4 (0.7)	0.970	0.384
	ID	12.5 (8.9-15.1)	30.1 (24.9-41.3)	3.4 (0.6)	0.997	0.851
	Adult (24 h)	173.0 (163.8-192.0)	229.0 (212.3-261.1)	10.5 (2.4)	0.904	0.337
	Adult (48 h)	164.6 (156.1-172.1)	209.5 (196.9-232.2)	12.2 (1.1)	0.917	0.357

ID = inhibition of development; h = hours; SE = standard error; CI = confidence interval. IVEO – *Illicium verum* essential oil. PGEO – *Pelargonium graveolens* essential oil.

2017; Gomes da Rocha Voris et al., 2018). Li et al. (2013). Wang et al. (2021) suggest that its mechanism of action is through the inhibition of acetylcholinesterase.

The major compounds in *P. graveolens* were citronellol and geraniol, according to the results of Verma et al. (2013). According to Gallardo et al. (2015), the main constituents of geranium essential oil showed insecticidal activity against *Musca domestica* alone. However, the synergistic effect was not observed when evaluated in combination. It is not known whether the same profile applies to the pulicidal effect. Therefore, studies with the constituents isolated and in association against *C. felis felis* should be encouraged.

The insecticidal activity of crude extract of *I. verum* fruits has already been reported (Sripongpun, 2008; Szczepanik & Szumny, 2011; Wei et al., 2014). Its essential oil has insecticidal activity for larvae ($LC_{50} = 39.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and adults ($LC_{50} = 10.3 \mu\text{g}\cdot\text{mg}\cdot\text{female}^{-1}$) of *Aedes aegypti* (Gomes da Rocha Voris et al., 2018) and against the insect of importance for grain storage *Tribolium confusum* ($LC_{50} = 552 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$) (Popović et al., 2019). Acaricide activity has also been described for environmental mites *Dermatophagoides pteronyssinus* ($LC_{50} = 0.032 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) (Nilprapat et al., 2017) and tick nymph *Ixodes ricinus* ($LC_{50} = 0.2 \mu\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$) (Elmhalli et al., 2018). Added to the results obtained in this study, star anise essential oil demonstrates to be able to act against different classes of arthropods, hematophagous or not, making it promising for the development of an ectoparasiticide formulation.

Other essential oils have already demonstrated in vitro insecticidal activity against the *C. felis felis* flea. Essential oils that contain eugenol as their major constituent such as *Syzygium aromaticum* (Lambert et al., 2020) and *Ocimum gratissimum* (dos Santos et al., 2020) have low LC_{50} values for adults of *C. felis felis*. regarding the activity against the immature stages, the essential oils of *Cinnamomum* spp. (Conceição et al., 2020), *S. aromaticum* (Lambert et al., 2020) and *O. gratissimum* (dos Santos et al., 2020) demonstrated to be superior to those found in this study. However, it is important to highlight that both essential oils evaluated in this study presented satisfactory insecticidal activity,

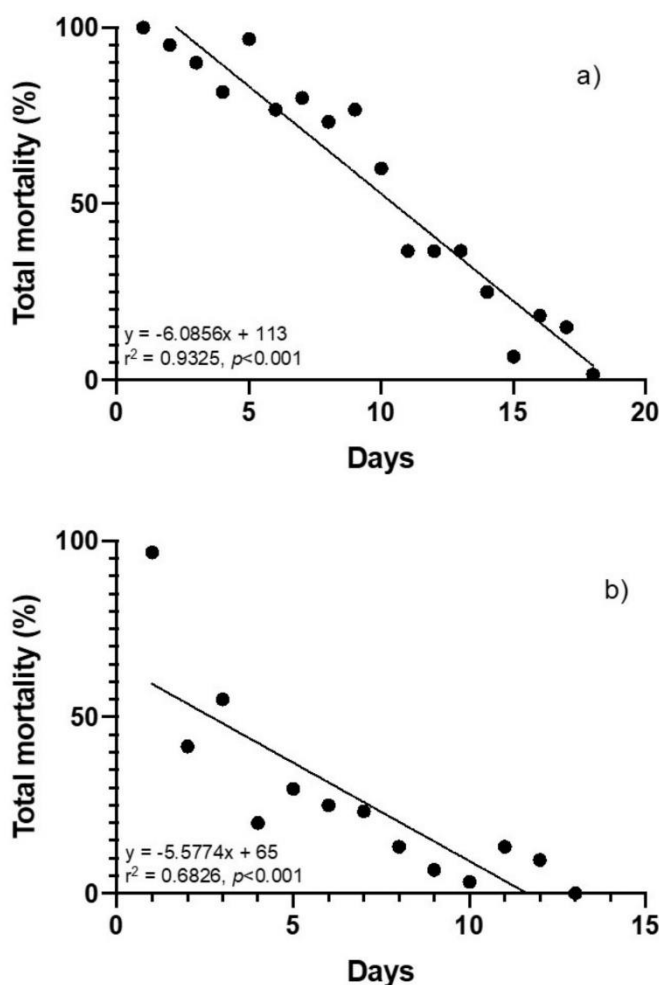


Figure 2. Residual efficacy of essential oils of (a) *Illicium verum* (800 µg·cm⁻²) and (b) *Pelargonium graveolens* (240 µg·cm⁻²).

which encourages future studies aiming at their applicability for the control of infestation in animals and in the environment.

We observed mortality of eggs and pupae in the negative control and placebo groups, as well as inhibition of development. According to Rust & Dryden (1997) and Rust (2005), the total emergence of adults, in *C. felis felis*, during the biological cycle can vary between 70-100%.

Both essential oils showed the same characteristic of susceptibility against different stages of the cat flea, which is, comparing the LC₉₀ the order of susceptibility was ID<Larva<Egg<Pupae<Adult. The most susceptible was ID because of the essential oil's chronic exposure to all stages. Adults and pupae are the least susceptible and the larval stage most susceptible to ectoparasiticides going as described by Rust (2020).

Star anise is traditionally used as a mosquito repellent and can be used for vector control (Tisgratog et al., 2016). According to the Bio-Pesticides Database (BPDB), use of star anise (70-90% anethole) is authorized in several countries of the European Union (Lewis et al., 2016), although the threshold of toxicological concern is high (class III). Anethole and estragole, which are the major compounds, are effective against stored grain pests (Bedini et al., 2016) and mites (Shin et al., 2013).

The major compounds of *Pelargonium graveolens* were citronellol (29.67%) and geraniol (14.85%), which are both monoterpenes. Their chemical structures are similar, so both compounds can contribute to the effect against fleas, especially against eggs ($LC_{50} = 20.97 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and for inhibition of development ($12.45 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Commercial use of monoterpenes as repellents and insecticides is promising, such as in the product Fulltec[®], a tick repellent containing 1% geraniol (Khallaayoune et al., 2009).

The residual effect should be highlighted in relation to development of new biopesticides. In the literature, there are few studies showing the residual effect of essential oils against fleas (Conceição et al., 2020). It is important for EOs to remain active in the environment or on the host after use, to prevent flea reinfestations. Our results showed that the pulicidal activity of the essential oils evaluated remained above 70% for up to 9 days at a concentration of $800 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ of *I. verum*. On the other hand, *P. graveolens* at $240 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (100% mortality of adult stage) only had a residual effect of 41.7% after 2 days.

The future of biopesticides using essential oils is promising (Pavela & Benelli, 2016; Mossa, 2016; Raveau et al., 2020). Essential oils have high effectiveness, several mechanisms of action (good for use against resistant insects) and low toxicity, including towards humans. Furthermore, to obtain essential oils is generally relatively simple and cheap, and there is low health risk of intoxication (Pavela & Benelli, 2016).

As shown, both essential oils were able to eliminate both adult fleas and immature stages, in addition to inhibiting the development of the biological cycle of *C. felis felis*, showing potential for the development of formulations for the control of infestations in animals and also for the environmental control of this insect.

Conclusion

Use and application of essential oils requires attention to standardization of the product in order to avoid loss of activity. There are several websites that claim effectiveness of the essential oils of these species for tick control, either applied directly on the animal or in collars or in pharmaceutical medicines. The pulicidal activity and residual efficacy of the essential oils of star anise and rose geranium were demonstrated in the present study for the first time. This efficacy is attractive to the pharmaceutical and agronomy industry for development of biopesticides for veterinary medicine, because the essential oils are safe and environmentally friendly.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Apoio à Pesquisa Tecnológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (FAPUR) and Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) code 001.

References

- Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. *J Am Mosq Control Assoc* 1987; 3(2): 302-303. PMID:3333059.
- Adams RP. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4th ed. Carol Stream: Allured Pub Corp; 2007.
- Bedini S, Bougherra HH, Flamini G, Cosci F, Belhamel K, Ascrizzi R, et al. Repellency of anethole-and estragole-type fennel essential oils against stored grain pests: the different twins. *Bull Insectol* 2016; 69(1): 149-157.
- Conceição CL, de Moraes LAS, Campos DR, Chaves JKO, dos Santos GCM, Cid YP, et al. Evaluation of insecticidal activity of thyme, oregano, and cassia volatile oils on cat flea. *Rev Bras Farmacogn* 2020; 30(6): 774-779. <http://dx.doi.org/10.1007/s43450-020-00111-8>.
- Dawood MA, El Basuini MF, Zaineldin AI, Yilmaz S, Hasan MT, Ahmadifar E, et al. Antiparasitic and antibacterial functionality of essential oils: an alternative approach for sustainable aquaculture. *Pathogens* 2021; 10(2): 185. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10020185>. PMID:33572193.
- dos Santos JVB, de Almeida Chaves D, De Souza MAA, Riger CJ, Lambert MM, Campos DR, et al. *In vitro* activity of essential oils against adult and immature stages of *Ctenocephalides felis felis*. *Parasitology* 2020; 147(3): 340-347. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182019001641>. PMID:31840630.
- Elmhalli F, Pålsson K, Örberg J, Grandi G. Acaricidal properties of ylang-ylang oil and star anise oil against nymphs of *Ixodes ricinus* (Acari: ixodidae). *Exp Appl Acarol* 2018; 76(2): 209-220. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-018-0299-y>. PMID:30302625.

Gallardo A, Picollo MI, Mougabure-Cueto G. Lethal activity of individual and mixed monoterpenoids of geranium essential oil on *Musca domestica*. *Parasitol Res* 2015; 114(3): 1229-1232. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-015-4315-4>. PMID:25604671.

Gomes da Rocha Voris D, Dos Santos Dias L, Alencar Lima J, Dos Santos Cople Lima K, Pereira Lima JB, Dos Santos Lima AL. Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of *Illicium verum* Hook. f., *Pimenta dioica* (L.) Merr., and *Myristica fragrans* Houtt. against Zika virus vectors. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018; 25(23): 22541-22551. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-2362-y>. PMID:29808407.

Khallaayoune K, Biron JM, Chaoui A, Duvallet G. Efficacy of 1% geraniol (Fulltec®) as a tick repellent. *Parasite* 2009; 16(3): 223-226. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2009163223>. PMID:19839268.

Lambert MM, Campos DR, Borges DA, de Avelar BR, Ferreira TP, Cid YP, et al. Activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and its main constituent eugenol in the inhibition of the development of *Ctenocephalides felis felis* and the control of adults. *Vet Parasitol* 2020; 282: 109126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109126>. PMID:32417602.

Lappin MR, Tasker S, Roura X. Role of vector-borne pathogens in the development of fever in cats: 1. Flea-associated diseases. *J Feline Med Surg* 2020; 22(1): 31-39. <http://dx.doi.org/10.1177/1098612X19895941>. PMID:31916873.

Lewis KA, Tzilivakis J, Warner DJ, Green A. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum Eco Risk Assess: An Int J* 2016; 22(4): 1050-1064. <http://dx.doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>.

Li SG, Li MY, Huang YZ, Hua RM, Lin HF, He YJ, et al. Fumigant activity of *Illicium verum* fruit extracts and their effects on the acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in adult *Sitophilus zeamais*. *J Pest Sci* 2013; 86(4): 677-683. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-013-0520-z>.

Matos LF, Barbosa DRS, Lima EC, Dutra KA, Navarro DMAF, Alves JLR, et al. Chemical composition and insecticidal effect of essential oils from *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllus* on *Callosobruchus maculatus* in cowpea. *Ind Crops Prod* 2020; 145: 112088. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112088>.

Mossa ATH. Green pesticides: essential oils as biopesticides in insect-pest management. *J Environ Sci Technol* 2016; 9(5): 354-378. <http://dx.doi.org/10.3923/jest.2016.354.378>.

Nilprapat P, Pumnuan J, Insung A. Acaricidal properties of star anise (*Illicium verum* Hook. f.) essential oil against house dust mite [*Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart)]. *Int J Agric Technol* 2017; 13(7.3): 2307-2315.

Pavela R, Benelli G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant Sci* 2016; 21(12): 1000-1007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>. PMID:27789158.

Popović A, Petrović M, Stojanović T, Buđen M. The effect of the mint and star anise essential oil on the adults of *Tribolium confusum* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Biljni Lek* 2019; 47(5): 344-354.

Raveau R, Fontaine J, Lounès-Hadj Sahraoui A. Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: a review. *Foods* 2020; 9(3): 365. <http://dx.doi.org/10.3390/foods9030365>. PMID:32245234.

Rust MK, Dryden MW. The biology, ecology and management of the cat flea. *Annu Rev Entomol* 1997; 42(1): 451-473. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.451>. PMID:9017899.

Rust MK. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. *Trends Parasitol* 2005; 21(5): 232-236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2005.03.010>. PMID:15837612.

Rust MK. Recent advancements in the control of cat fleas. *Insects* 2020; 11(10): 668. <http://dx.doi.org/10.3390/insects11100668>. PMID:33003488.

Saraiva LC, de Matos AFIM, Cossetin LF, Couto JCM, dos Santos Petry L, Monteiro SG. Insecticidal and repellent activity of geranium essential oil against *Musca domestica* and *Lucilia cuprina*. *Int J Trop Insect Sci* 2020; 40(4): 1093-1098. <http://dx.doi.org/10.1007/s42690-020-00137-4>.

Shin E-H, Song BG, Il Lee H, Park MY, Ahn Y-J, Chang K-S. Repellency of cassia bark, eucalyptus, and star anise oils and their major constituents to *Leptotrombidium pallidum* (Acari: trombiculidae). *J Med Entomol* 2013; 50(3): 579-584. <http://dx.doi.org/10.1603/ME12129>. PMID:23802452.

Sripongpun G. Contact toxicity of the crude extract of Chinese star anise fruits to house fly larvae and their development. *Songklanakaraj J Sci Technol* 2008; 30(5): 667-672.

Streicher M. Flea allergy dermatitis. In: Horne K, Schwassmann M, Logas D, editors. *Small animal dermatology for technicians and nurses*. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2019. p. 85-101. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119108641.ch6>

Szczepanik M, Szumny A. Insecticidal activity of star anise (*Illicium verum* Hook. F.) fruits extracts against lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: tenebrionidae). *Allelopathy J* 2011; 27(2): 277-288.

Control of cat fleas and residual effect

Tisgratog R, Sanguanpong U, Grieco JP, Ngoen-Kluan R, Chareonviriyaphap T. Plants traditionally used as mosquito repellents and the implication for their use in vector control. *Acta Trop* 2016; 157: 136-144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.024>. PMID:26826392.

van Den Dool H, Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr* 1963; 11: 463-471. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X). PMID:14062605.

Verma RS, Rahman L, Verma RK, Chauhan A, Singh A. Essential oil composition of *Pelargonium graveolens* L'Her ex Ait. cultivars harvested in different seasons. *J Essent Oil Res* 2013; 25(5): 372-379. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2013.782476>.

Wang Z, Xie Y, Sabier M, Zhang T, Deng J, Song X, et al. *Trans*-anethole is a potent toxic fumigant that partially inhibits rusty grain beetle (*Cryptolestes ferrugineus*) acetylcholinesterase activity. *Ind Crops Prod* 2021; 161: 113207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113207>.

Wei L, Hua R, Li M, Huang Y, Li S, He Y, et al. Chemical composition and biological activity of star anise *Illicium verum* extracts against maize weevil, *Sitophilus zeamais* adults. *J Insect Sci* 2014; 14: 80. <http://dx.doi.org/10.1093/jis/14.1.80>. PMID:25368036.

Yu CY, Zhang JF, Wang T. Star anise essential oil: chemical compounds, antifungal and antioxidant activities: a review. *J Essent Oil Res* 2021; 33(1): 1-22. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2020.1813213>.