

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

DISSERTAÇÃO

**Atividade *in vitro* do Novaluron e do Piriproxifen no ciclo de
Ctenocephalides felis felis (Siphonaptera, Pulicidae)**

VICTOR ELIAS CACERES RIOS

2022



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

**ATIVIDADE IN VITRO DO NOVALURON E DO PIRIPROXIFEN NO
CICLO DE *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera, Pulicidae)**

VICTOR ELIAS CACERES RIOS

Sob a Orientação da Professora

THAIS RIBEIRO CORREIA AZEVEDO

e Coorientação de

DIEFREY RIBEIRO CAMPOS

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

Seropédica, RJ

Março, 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)

R586a Rios, Victor Elias Caceres, 1994-
Atividade in vitro do Novaluron e do Piriproxifen
no ciclo de Ctenocephalides felis felis
(Siphonaptera, Pulicidae / Victor Elias Caceres Rios.
- Seropédica, 2022.
43 f.: il.

Orientadora: Thaís Ribeiro Correia Azevedo.
Coorientador: Diefrey Ribeiro Campos.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 2022.

1. Pulga. 2. Controle. 3. Disruptores de
desenvolvimento. I. Azevedo, Thaís Ribeiro Correia,
1978-, orient. II. Campos, Diefrey Ribeiro, 1988-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS. IV. Título.



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



ATA Nº 996/2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.020148/2022-15

Seropédica-RJ, 31 de março de 2022.

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

VICTOR ELIAS CÁCERES RIOS

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 31/03/2022

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

(Assinado digitalmente em 31/03/2022 18:45)

THAIS RIBEIRO CORREIA AZEVEDO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)

Matricula: 2929889

(Assinado digitalmente em 31/03/2022 20:48)

VIVIANE DE SOUZA MAGALHAES

FARMACEUTICO-HABILITACAO

DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)

Matricula: 2146385

(Assinado digitalmente em 31/03/2022 19:55)

YARA PELUSO CID

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptCF (12.28.01.00.00.00.47)

Matricula: 1700427

(Assinado digitalmente em 01/04/2022 08:05)

BARBARA MARIA PARANA DA SILVA SOUZA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 803.462.355-53

Dedico a minha querida família, que ainda estando longe sempre me deram o apoio para poder chegar à meta.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a oportunidade de poder realizar mais um sonho na minha vida.

A minha família, que nunca me deixou sozinho, mesmo estando a muitos quilômetros de distância, sempre estiveram presentes.

A minha orientadora, Prof^a. Thaís Correia, minha segunda mãe no Brasil, agradeço a ela pela acolhida, pelos ensinamentos e a paciência que teve comigo pra poder chegar a cumprir essa meta.

A meu coorientador Dr. Diefrey Campos, pela ajuda e ensinamentos que me aportou na hora da execução dos experimentos.

A minha amiga Dandara e os demais estagiários do LQEPV pelo acompanhamento constante na execução dos experimentos.

A todos meus queridos amigos que sempre estiveram ao meu lado, me acompanhando em cada experiência, são irmãos que conheci no Brasil e levo para a vida.

A Capes e à Organização de Estados Americanos, pela oportunidade que me brindaram para poder realizar essa pós-graduação fora do país.

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

A UFRRJ por me dar a oportunidade de formar parte da família Ruralina.

A Equipe LQEPV por cada apoio e aprendizagem que me deram durante esses anos que formei parte desse maravilhoso grupo.

BIOGRAFIA

Victor Elias Caceres Rios, nascido na cidade de Villarrica, Paraguai, no dia 12 de dezembro do ano 1994. Filho de Victor Ramón Caceres Sanchez e Maria Lourdes Rios Dávalos, é o primeiro de quatro filhos da família.

Cursou o ensino fundamental na Escola N° 2299 San Blas - Itá Azul e o ensino meio no Colégio Nacional Ybytyruzu, ambos localizados numa pequena cidade rural bem no interior do Paraguai, chamada Independência.

Desde criança, sempre teve contato com os animais visto que a família tinha uma pequena fazenda, isso o motivou a estudar Medicina Veterinária, começando assim em 2013 o curso de graduação na Universidad Católica de Asunción, localizada na cidade de Coronel Oviedo, Paraguai. Encerrou os estudos no ano 2017, graduando-se no ano de 2018.

Durante a graduação sempre foi um aluno dedicado nos estudos, graças a isso, no final de 2018 foi selecionado entre milhes de candidatos para formar parte dos bolsistas da Organização de Estados Americanos, se convertendo dessa maneira a partir de 2019 a UFRRJ sua nova casa e o Rio de Janeiro no seu novo Estado.

Após vários meses de estudo, intercâmbio cultural, desafios com o idioma e várias experiências passadas, hoje ele está alcançando mais uma meta em sua vida.

RESUMO

RIOS, Victor Elias Caceres. **Atividade in vitro do Novaluron e do Piriproxifen no ciclo de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera, Pulicidae)**. 2022. 43p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

As pulgas estão entre os ectoparasitos que mais acometem os animais de companhia. Elas produzem e transmitem doenças que representam um perigo para a saúde dos animais e humanos. O controle desses insetos envolve o uso de inseticidas. Os disruptores de desenvolvimento de insetos são um grupo de inseticidas que pode atuar como alternativa no controle de pulgas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade do novaluron e do piriproxifen sobre as larvas de *Ctenocephalides felis felis* em testes *in vitro* na interrupção do ciclo, determinando a concentração letal (CL) dos dois compostos. O estudo foi realizado no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, utilizando-se larvas da subespécie *C. felis felis* mantidas na colônia de pulgas do laboratório. Para cada desafio foram incubados 1500 ovos, coletando-se as larvas após 48 horas do início da incubação. Inicialmente foi avaliado o método de impregnação de substrato larval a ser utilizado no experimento. Para isso foi preparada uma solução de piriproxifen a 400 ppm e utilizado um volume de impregnação de 200 µL para dois gramas de substrato. O resultado foi satisfatório, sendo que a metodologia não interferiu no resultado, havendo 100 % de inibição do ciclo de desenvolvimento da pulga e não houve interferência no desenvolvimento do ciclo para o controle. Para a execução do experimento com os disruptores, foi empregada a metodologia anteriormente citada. Diferentes concentrações de piriproxifen (0,049 a 25 ppm) e de novaluron (0,001 a 5,0 ppm) foram preparadas. Após a impregnação do substrato, as larvas de primeiro ínstar foram expostas ao substrato larval tratado. O material foi mantido em condições controladas por um período de 21 dias. Foram realizadas avaliações qualitativas, quantitativas e foi determinada as concentrações letais através da análise de Probit. Na avaliação da atividade do piriproxifen sobre o desenvolvimento das larvas constatou-se uma eficácia de 100% nas concentrações superiores a 1,563 ppm, apresentando uma concentração letal CL₅₀ e CL₉₀ de 0,07 e 0,27 ppm, respectivamente. As pulgas mortas apresentavam alterações na morfologia, na coloração e no tamanho. Observou-se uma diferença significativa entre a quantidade de pulgas vivas recuperadas do grupo controle e os tratados, com quantidade maior de fêmeas. Na avaliação da atividade do novaluron constatou-se 100% de mortalidade larval na maior concentração (5,0 ppm), com um cálculo de concentração letal CL₅₀ e CL₉₀ de 0,25 e 2,29 ppm, respectivamente. As pulgas mortas apresentavam alterações no exoesqueleto, porém sem variações no tamanho. Entre as pulgas vivas recuperadas, o controle teve uma diferença significativa com os tratados a partir da concentração 1,0 ppm, maioritariamente sendo pulgas fêmeas recuperadas. Baseando-se nos resultados deste trabalho, pode se afirmar que tanto piriproxifen como novaluron demonstraram ter atividade sobre as larvas de *C. felis felis*, interrompendo o ciclo de desenvolvimento do inseto. Além disso, o novaluron foi avaliado pela primeira vez em uma população laboratorial de pulgas no Brasil, demonstrando ser uma alternativa para o seu controle.

Palavras-chave: pulga; controle; disruptores de desenvolvimento de insetos; concentração letal.

ABSTRACT

RIOS, Victor Elias Caceres. **In vitro activity of Novaluron and Pyriproxyfen in the *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera, Pulicidae) cycle.** 2022. 43p. Dissertation (Master Science in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Fleas are among the ectoparasites that most affect companion animals. They produce and transmit diseases that pose a danger to the health of animals and humans. The control of these insects involves the use of insecticides. Insect growth disruptors are a group of insecticides that can act as an alternative in flea control. The objective of this work was to evaluate the activity of novaluron and pyriproxyfen on *Ctenocephalides felis felis* larvae in in vitro tests during cycle interruption, determining the lethal concentration (LC) of the two compounds. The study was carried out at the Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, using larvae of the subspecies *C. felis felis* maintained in the flea colony of the laboratory. For each challenge, 1500 eggs were incubated, and larvae were collected 48 hours after the start of incubation. Initially, the larval substrate impregnation method to be used in the experiment was evaluated. For this, a 400 ppm pyriproxyfen solution was prepared and an impregnation volume of 200 µL was used for two grams of substrate. The result was satisfactory, and the methodology did not interfere with the result, with 100% inhibition of the flea development cycle and there was no interference in the development of the cycle for control. To carry out the experiment with the disruptors, the aforementioned methodology was used. Different concentrations of pyriproxyfen (0.049 to 25 ppm) and of novaluron (0.001 to 5.0 ppm) were prepared. After substrate impregnation, the first instar larvae were exposed to the treated larval substrate. The material was kept under controlled conditions for a period of 21 days. Qualitative and quantitative assessments were performed and lethal concentrations were determined through Probit analysis. In the evaluation of the activity of pyriproxyfen on the development of the larvae, an efficiency of 100% was found in concentrations above 1,563 ppm, with a lethal concentration LC₅₀ and LC₉₀ of 0.07 and 0.27 ppm, respectively. The dead fleas showed changes in morphology, color and size. There was a significant difference between the number of live fleas recovered from the control and treated groups, with a greater number of females. In the evaluation of novaluron activity, 100% larval mortality was observed at the highest concentration (5.0 ppm), with a calculation of lethal concentration LC₅₀ and LC₉₀ of 0.25 and 2.29 ppm, respectively. The dead fleas showed alterations in the exoskeleton, but without variations in size. Among the live fleas recovered, the control had a significant difference with those treated from the concentration 1.0 ppm, mostly being recovered female fleas. Based on the results of this work, it can be stated that both pyriproxyfen and novaluron have shown activity on *C. felis felis* larvae, interrupting the insect's development cycle. In addition, novaluron was evaluated for the first time in a laboratory population of fleas in Brazil, proving to be an alternative for its control.

Keywords: flea; control; insect growth disruptors; lethal concentration.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Número de ovos incubados, número de pulgas vivas recuperadas, número de pulgas mortas, mortalidade e mortalidade corrigida para *Ctenocephalides felis felis* submetidas ao substrato impregnado com piriproxifen a 400 ppm. 16
- Tabela 2.** Número de ovos incubados, número de pulgas vivas recuperadas, número de pulgas mortas, percentual de mortalidade, percentual de mortalidade corrigida e concentração letal para *Ctenocephalides felis felis* submetidas ao substrato impregnado com várias concentrações de piriproxifen. 17
- Tabela 3.** Número de pulgas adultas da subespécie *Ctenocephalides felis felis* recuperadas após 21 dias de desafio com a representação da média, desvio padrão e porcentagem de eficácia correspondente a cada concentração de piriproxifen. 18
- Tabela 4.** Número de ovos incubados, número de pulgas vivas recuperadas, número de pulgas mortas, percentual de mortalidade total, percentual de mortalidade corrigida e concentração letal para *Ctenocephalides felis felis* submetidas ao substrato impregnado com várias concentrações de novaluron. 20
- Tabela 5.** Número de pulgas adultas da subespécie *Ctenocephalides felis felis* recuperadas após 21 dias de desafio com a representação da média, desvio padrão e porcentagem de eficácia correspondente a cada concentração de novaluron. 21

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Adulticidas e Disruptores de Crescimento de Insetos utilizados em animais de companhia. 6
- Quadro 2.** Inibidores da Síntese de Quitina (Benzoilfenilureias) atualmente aprovadas para uso em animais domésticos. 7
- Quadro 3.** Disruptores de Desenvolvimento de Insetos (DDIs) comercializados ou que receberam licenças limitadas para controle de artrópodes. 8

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do Piriproxifen.	9
Figura 2. Estrutura química do Novaluron.	11
Figura 3. Frasco de vidro utilizado para a impregnação.	133
Figura 4. Substrato larval impregnado com solução contendo disruptor de desenvolvimento de insetos.	13
Figura 5. Placas de petri com substrato impregnado com solução contendo disruptor de desenvolvimento de insetos e larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> .	14
Figura 6. Pulga da subespécie <i>Ctenocephalides felis felis</i> viva (A) sem alterações morfológicas e pulgas mortas (B,C e D) com alterações morfológicas após 21 dias sob tratamento com piriproxifen.	18
Figura 7. Larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> mortas (A, B, C e D) no substrato larval sob tratamento com piriproxifen (Fonte: Arquivo pessoal).	19
Figura 8. Pulga morta com alterações morfológicas após 21 dias sob tratamento com novaluron.	20

LISTA DE ABREVIACÕES

AHJ – Análogo do Hormônio Juvenil

CL – Concentração letal

DAPP – Dermatite alérgica à picada de pulga

DBO – Câmara climatizada com demanda bioquímica de oxigênio

DDI – Disruptor de Desenvolvimento de Insetos

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FeLV – Vírus da Leucemia Felina

HJ – Hormônio Juvenil

IV – Instituto de Veterinária

L1 – Larva de primeiro instar

LQEPV – Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária

OMS – Organização Mundial da Saúde

RJ – Rio de Janeiro

SOK – Velocidade de morte (Speed of kill)

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Biologia e importância da pulga	2
2.3 Controle de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	4
2.4 Disruptores de Desenvolvimento de insetos	7
2.4.1 Piriproxifen	8
2.4.2 Novaluron	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Localização do Estudo	12
3.2 Manutenção de Pulgas no Laboratório	12
3.3 Larvas de Pulgas	12
3.4 Delineamento Experimental	12
3.5 Análise de Dados	15
4 RESULTADOS	16
4.1 Avaliação da Metodologia de Impregnação do Substrato Larval	16
4.2 Atividade e Concentração Letal de Piriproxifen sobre o desenvolvimento de larva a adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	17
4.3 Atividade e Concentração Letal de Novaluron sobre o desenvolvimento de larva a adultos de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	19
5 DISCUSSÃO	22
6 CONCLUSÃO	24
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os animais de estimação cumprem um papel importante na vida de muitas pessoas, eles além de proporcionar companhia, ajudam a criar um bem-estar recíproco, trazendo benefícios tanto para o dono, quanto para o próprio animal. Os cães e gatos são os animais de estimação mais populares do mundo pelas suas características e pela tradição histórica. Visto que existem várias doenças que podem afetar aos animais de estimação e algumas delas tem capacidade zoonótica, é primordial manter a saúde deles em boas condições, eliminando qualquer tipo de agente capaz de infectar os animais ou transmitir infecções.

Os ectoparasitos são de grande importância na medicina veterinária, visto que são responsáveis pela transmissão de agentes patogênicos para seus hospedeiros e à população humana. Um dos ectoparasitos que mais acomete pequenos animais é a pulga, um inseto pequeno, cuja subespécie *Ctenocephalides felis felis* é a mais comum entre cães e gatos.

São várias as patologias causadas por esta subespécie, a que mais atinge cães e gatos é a dermatite alérgica por picada de pulga, além disso no momento da alimentação esses ectoparasitos provocam feridas na pele do hospedeiro, que podem causar outros problemas dermatológicos de origem infeccioso e até mesmo transmitir doenças na hora da sucção do sangue. Para evitar esses problemas é necessário realizar um controle desses insetos.

É comum o uso de inseticidas para o controle de pulgas, principalmente os orgânicos sintéticos, mas nos últimos anos têm sido feitos estudos sobre a possibilidade de usar outros químicos alternativos que são menos agressivos com o meio ambiente.

Os disruptores de desenvolvimento de insetos (DDI) são inseticidas alternativos que têm sido usados no controle de insetos, a ação fundamental desses inseticidas baseia-se na interrupção do desenvolvimento normal de artrópodes. Entre os DDI temos o piriproxifen e o novaluron, o primeiro é amplamente utilizado no controle de vários tipos de insetos de importância agrícola e veterinária, com vários estudos feitos sobre sua ação para o controle de pulgas, porém, sem pesquisas específicas sobre a concentração letal (CL) deste composto para *Ctenocephalides felis felis* feito no Brasil. Por outra parte, o novaluron também tem sido utilizado no controle de artrópodes da área agrícola, mas na medicina veterinária ainda são escassos os estudos feitos, apresentando poucos registros sobre a CL deste composto para *Ctenocephalides felis felis* no mundo. O conhecimento da ação dos DDI sobre os insetos de importância na medicina veterinária é primordial para proporcionar possíveis soluções no controle destes ectoparasitos.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade dos disruptores de desenvolvimento de insetos novaluron e piriproxifen sobre *Ctenocephalides felis felis* em testes *in vitro* na interrupção do ciclo de desenvolvimento, e determinar a concentração letal para ambos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia e importância da pulga

As pulgas são insetos que pertencem à ordem Siphonaptera (palavra que vem do grego *siphon* = tubo; *a* = sem; *pteron* = asa, que faz referência a insetos sugadores e ápteros) e à família Pulicidae (RUST, 2017), inclui insetos pequenos (2,0-3,0 mm em média), que apresentam uma coloração castanha, sem asas e achatados lateralmente. Possuem um corpo coberto de cerdas dirigidas para trás, em certas ocasiões apresentando algumas mais esclerosadas denominadas ctenídios que cumprem a função de fixação e locomoção das pulgas no hospedeiro. Elas alcançam seus hospedeiros através do salto (LINARDI, 2017).

São consideradas como insetos cosmopolitas porque podem ser encontradas em várias regiões do mundo, com quase 3.000 espécies registradas, agrupadas em 240 gêneros (ou 330 quando incluindo subgêneros), 44 tribos, 28 famílias e 15 famílias (LEWIS, 1998).

O gênero *Ctenocephalides* inclui 13 espécies, identificado segundo critérios morfológicos baseado na forma e estrutura dos genitais, como também a presença e distribuição de espinhos, cerdas e ctenídios no corpo (LINARDI; SANTOS, 2012).

A pulga *Ctenocephalides felis felis* (Bouche) (Siphonaptera: Pulicidae) conhecida popularmente como pulga do gato, é considerado como o ectoparasito que mais acomete cães e gatos em muitas partes do mundo (SAMISH *et al.*, 2020). No Brasil, é a subespécie de pulga mais importante em animais de estimação, devido a sua distribuição geográfica, número de outros hospedeiros parasitados e competência vetorial (LINARDI; SANTOS, 2012).

O ciclo de vida da pulga começa quando os adultos emergem do pupário principalmente em resposta a vibrações externas ou a um aumento local de dióxido de carbono (RUST; DRYDEN, 1997). Possuem uma metamorfose completa, sendo seu ciclo biológico dividido em quatro estágios: ovo, larva (que possui três estágios larvais), pupa e adulto (KRASNOV, 2008). Dependendo de fatores como a temperatura e a umidade no microambiente, o ciclo de vida da subespécie *Ctenocephalides felis felis* pode se completar em 12 a 14 dias, ou se estender por até 174 dias. Não obstante, na maioria das condições domésticas, quase a totalidade das pulgas completam o seu ciclo de vida dentro de três a oito semanas (BLAGBURN; DRYDEN, 2009). Os ovos, as larvas e as pupas não são encontradas no animal, porém acumulam-se em torno dos locais de alimentação e descanso do hospedeiro (BECK *et al.*, 2006).

Tanto os machos como as fêmeas são hematófagos, eles contam com o aparelho bucal do tipo sugador-pungitivo (LINARDI, 2017). Uma vez que a pulga sai da pupa, ela imediatamente procura um hospedeiro para se alimentar. Vários são os estímulos produzidos pelos hospedeiros que atraem as pulgas, entre eles está o calor do corpo, os movimentos e o dióxido de carbono exalado pelo animal (BITAM *et al.*, 2010). No caso da pulga não encontrar um hospedeiro para se alimentar, pode sobreviver por algum tempo, dependendo da temperatura e umidade do ambiente, porém uma vez alimentadas, geralmente sobrevivem menos tempo, se posteriormente morrem de fome, do que uma pulga não alimentada. As pulgas adultas correspondem a cerca de 5% de uma população em parasitismo (SILVERMAN; RUST; REIERSON, 1981; BITAM *et al.*, 2010).

Os adultos de *C. felis felis* presumivelmente desenvolveram uma relação de parasitismo persistente com seus hospedeiros (ELBEL, 1951) (RUST; DRYDEN, 1997). Elas

permanecem no hospedeiro e, ao contrário da opinião popular, não saltam de animal para animal (RUST, 2017).

As pulgas adultas requerem uma refeição de sangue fresco para acasalar e começar a postura de ovos. A alimentação começa minutos após encontrar ao seu hospedeiro e a postura de ovos começa 24-48 horas depois. A pulga fêmea pode colocar até cinquenta ovos por dia (RUST, 2017). Os ovos são ovais, lisos e medem cerca de 0,5 mm de tamanho, caem facilmente do pelo do animal no ambiente. As larvas eclodem dentro de 48 horas e se desenvolvem, dependendo da temperatura e umidade, nos próximos 5-15 dias. Eles são fotofóbicos e geotrópicos, por isso tendem a se enterrar profundamente em tapetes e lençóis, onde a umidade relativa e a temperatura são maiores (DRYDEN; RUST, 1994) (PATERSON, 2019). Durante o desenvolvimento larval, eles passam por três instares, separados entre si por duas mudas de cutícula. No final do seu desenvolvimento, o terceiro instar larval deixa de se alimentar e esvazia seu trato digestivo, iniciando a produção de tênues fios de seda viscosos, para a formação do casulo pupal, que irá aderir-se a qualquer sujidade ambiental como grãos de areia ou outro tipo de resíduo. A emergência das pulgas adultas ocorre em cerca de 5 a 9 dias após o início da pupação, podendo chegar a um tempo tão longo como 140 dias (DRYDEN, 1993; DRYDEN; RUST, 1994; LINARDI; GUIMARÃES, 2000; LINARDI, 2004; DA SILVA *et al.*, 2008).

A longevidade das pulgas adultas é variável de acordo com as condições climáticas, espécie e com a condição alimentar, sendo assim, *C. felis felis* pode ter uma sobrevivência de 30 dias alimentando-se e de 19 dias em jejum (DRYDEN, 1993; LINARDI, 2004).

Geralmente, as pulgas de gato são problemáticas por causa da irritação e alergia que podem ocasionar, mas também são consideradas como possíveis vetores para patógenos de cães e gatos. Elas também têm a capacidade de causar lesões em humanos como urticária papular e atuar como transmissor de alguns patógenos com potencial zoonótico como tênia ou febre da arranhadura do gato (causada por *Bartonella henselae*) (SHAW *et al.*, 2004; PATERSON, 2019; MARCHIONDO *et al.*, 2013).

Um quadro anêmico pode ser causado pelas pulgas, embora sejam ectoparasitos de um pequeno tamanho, uma alta infestação desses insetos pode causar uma perda considerável de sangue. Durante o repasto sanguíneo, uma fêmea adulta de *C. felis felis* consome até 13,6 µL de sangue por dia, o que equivale a 15 vezes seu peso corporal e são capazes de atingir um peso médio de 0,95 mg (COUTINHO; LINARDI, 2007; DRYDEN, 1993; IANNINO *et al.*, 2017).

Duas espécies de *Rickettsia*, *Rickettsia felis* e *R. typhi*, são transmitidas aos humanos por pulgas, a primeira é uma bactéria Gram negativa intracelular é considerada um patógeno emergente em todo o mundo; a segunda, é conhecida por ser o agente causal do tifo murino, uma doença transmitida principalmente por *Xenopsylla cheopis* (ANGELAKIS *et al.*, 2016; BROWN; MACALUSO, 2016), não obstante têm autores que demonstraram que alguns animais silvestres e domésticos se infectam com *R. typhi*, e se encontram parasitados juntamente por *C. felis* (ADJEMIAN *et al.*, 2010), inclusive em uma pesquisa feita na Califórnia foi detectada a presença de *R. typhi* em 37% das pulgas da espécie *C. felis*, achadas em gambás e gatos domésticos (MAINA *et al.*, 2016).

A Bartonelose, conhecida como a doença da arranhadura do gato, é uma doença causada por *Bartonella henselae*, sendo a espécie mais comum encontrada em humanos e gatos (RUST, 2017). A pulga *C. felis* é considerada o principal vetor de *B. henselae*, sendo a bactéria inoculada no hospedeiro a partir da matéria fecal contaminada em um corte ou arranhão (MCELROY *et al.*, 2010).

A pulga *C. felis* também atua como hospedeira intermediária do cestódeo *Dipylidium caninum*. As larvas de pulgas se infectam ao consumir o ovo do cestóide e o cisticercoide se

desenvolve na hemocele do inseto. O hospedeiro definitivo se infecta quando as pulgas adultas são ingeridas pelo mesmo (RUST, 2017).

Outra doença comum causada por pulgas é a dermatite alérgica à picada da pulga, também conhecida como DAPP, é uma hipersensibilidade que é comum entre gatos e cães (BLAGBURN; DRYDEN, 2009). Existem outros patógenos que *C. felis* pode ser considerado como um potencial vetor, podemos citar algumas como o vírus da leucemia felina (FeLV), *Coxiella burnetii*, calicivírus felino, *Acanthocheilonema reconditum* e *Leishmania* spp. (RUST, 2017).

2.3 Controle de *Ctenocephalides felis felis*

A pulga *Ctenocephalides felis felis* é considerada uma das pragas mais importantes para cães e gatos (RUST, 2020). É um ectoparasito que se caracteriza por ter uma alta taxa de infestação em todos os lugares, por conseguinte, o tratamento e a prevenção são essenciais para controlar esses parasitos (IANNINO *et al.*, 2017). Como a maior parte do ciclo de vida de *C. felis* acontece fora do hospedeiro, aproximadamente 95% da população de pulgas estão ocultas e são compostos de ovos, larvas e pupas presentes no ambiente, dificultando o controle dos mesmos (HALOS *et al.*, 2014). A fonte principal de pulgas para cães e gatos são as recém-emergidas que estão presentes no ambiente. A proporção de pulgas adultas que se movimentam de um hospedeiro a outro é pouca, por tanto o risco de infestação horizontal entre animais que compartilham a mesma sala permanece baixa, desde que não haja estágios imaturos no local (FRANC; BOUSHIRA; BEUGNET, 2013).

É essencial que qualquer programa de controle de pulgas tenha um objetivo claro, tanto em termos do nível geral desejado de controle, bem como o papel de cada animal doméstico dentro do programa. Um programa de controle de pulgas eficaz, visa eliminar a população residente de adultos e interromper o ciclo de vida das pulgas integrando medidas dirigidas em diferentes estágios da vida da pulga, tanto no animal quanto no meio ambiente. (PERRINS; HENDRICKS, 2007).

O sucesso no controle de infestações por pulgas em animais de estimação envolve uma combinação de estratégias (PERRINS; HENDRICKS, 2007; BLAGBURN; DRYDEN, 2009). Estas incluem inseticidas direcionados ao hospedeiro e ao ambiente, e meios mecânicos para reduzir ou eliminar os estágios ambientais da pulga (BLAGBURN; DRYDEN, 2009).

Para ter uma visão mais organizada sobre as medidas de controle de pulgas, podemos citar as seguintes (PERRINS; HENDRICKS, 2007; RUST, 2020):

2.3.1 Controle mecânico

Existem vários meios mecânicos de controle ambiental para infestação de pulgas, elas incluem a lavagem de roupas de cama dos animais de estimação ou roupas de cama frequentadas pelos animais. Também pode ser realizada a aspiração de carpetes, almofadas de moveis, tapetes ou substratos com uma máquina de vácuo (contendo uma barra batidora), que irá remover as formas imaturas da pulga. Além disso, como a vibração estimula às pulgas adultas a emergirem de seus casulos, isso facilita que também sejam coletados na máquina de vácuo. Por conseguinte, durante uma infestação por pulgas, a aspiração frequente pode reduzir a carga geral no local onde ficam os animais. Mas deve ser assegurado que os sacos de vácuo sejam eliminados de forma adequada, para evitar a recolonização do local com estágios de pulgas previamente removidos por aspiração. A remoção mecânica de pulgas adultas diretamente do hospedeiro pode ser feita de forma manual penteando os animais (BLAGBURN; DRYDEN, 2009).

2.3.2 Controle Biológico

Embora exista o interesse de controlar as pulgas com agentes menos prejudiciais para o meio ambiente e os hospedeiros, tem havido poucos avanços no controle de pulgas com agentes biológicos (RUST, 2017). Um estudo feito por De Melo *et al.*, (2008) demonstrou que os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são capazes de inibir a eclodibilidade de ovos e causar a mortalidade de adultos de *C. felis felis*, dando como resultado que esses fungos entomopatogênicos têm potencial para uso no controle de *C. felis felis*. Embora esses resultados sejam bons, assim como outros feitos com bactérias e fungos tiveram demonstrado atividade contra *C. felis*, eles nunca foram desenvolvidos em estratégias de controle bem-sucedidas e a pesquisa sobre o controle biológico de pulgas foi limitada (RUST, 2017).

2.3.3 Controle químico

O controle de pulgas pode ser realizado com produtos químicos que vêm em diferentes apresentações (Quadro 1), existem os repelentes e adulticidas para uso em animais e os produtos que atuam contra as fases de vida das pulgas no meio ambiente (PERRINS; HENDRICKS, 2007). Nos últimos anos, o foco de pesquisa e desenvolvimento tem sido o tratamento de animais de estimação, matando de forma rápida as pulgas adultas e evitando que o ciclo de vida da pulga se mantenha (RUST, 2020).

Ao usar drogas pesticidas é crucial considerar a velocidade de ação contra as infestações, a eficácia de longa duração e o nível de segurança para os animais e proprietários. Na co-infestação por pulgas e outros parasitas, uma combinação de formulações pode ser recomendada para limitar o número de distribuições (IANNINO *et al.*, 2017).

Um adulticida deve matar 95% das pulgas dentro de um período de tempo designado para ser licenciado. Portanto, como todos os produtos de pulgas licenciados têm, por definição, um alto grau de eficácia, estudos recentes sobre produtos de pulgas se concentraram na persistência da atividade adulticida de um produto entre as aplicações e a velocidade com que um produto mata as pulgas. Embora a velocidade de morte e a persistência sejam importantes, outros fatores, como a conformidade do proprietário (comprimido vs spot-on vs colar), duração da ação (por exemplo, 28 vs 84 dias; e 7–8 meses para coleiras) e espectro de atividade ectoparasiticida todos devem ser considerados ao prescrever um produto contra pulgas. Em uma situação ideal, um produto administrado ou aplicado mensalmente deve ter a mesma taxa de morte de 95% em 4 semanas que em 8 horas, para que um animal tenha níveis de proteção idênticos ao longo de todo o período de tratamento (PATERSON, 2019).

Existe uma linha de sprays aerossóis que está projetado para uso externo em animais de estimação e outro para o meio ambiente. Esses contêm um inseticida ou uma combinação de inseticida e um disruptor de desenvolvimento de insetos, e variam em relação a sua duração de ação no meio ambiente. Idealmente, o inseticida deve ter uma duração de ação que exceda a duração média de um ciclo de vida completo da pulga, como as pupas geralmente não são afetadas por esses produtos e aplicações repetidas tornam-se necessárias (PERRINS; HENDRICKS, 2007).

Quadro 1. Adulticidas e Disruptores de Crescimento de Insetos utilizados em animais de companhia, adaptado de Paterson (2019).

Modo de ação	Exemplo	Apresentação
Ativadores de Canal de Cloreto		
As avermectinas são agonistas dos canais de cloreto dependentes de glutamato nas pulgas, causando bloqueio da neurotransmissão e paralisia	Selamectina	Spot-on
Inibidores da biossíntese de quitina (juvenoide / DDI)		
Derivado de benzoilfenilureia que inibe o desenvolvimento de pulgas por meio do bloqueio da produção de quitina e da eclosão dos ovos	Lufenuron	Comprimido
Antagonista do canal de cloreto controlado por GABA		
(1) Fenilpirazol que bloqueia o GABA do invertebrado e os canais de glutamato de cloreto, necessários para a inibição dos impulsos nervosos, levando à hiperexcitabilidade e neurotoxicidade	Fipronil	Spot-on ou spray
(2) Potente antagonista da isoxazolina GABA do invertebrado e canais de glutamato de cloro bloqueados (ligação ao receptor mais potente do que o fipronil)	Afoxolaner	Comprimidos
	Fluralaner	Comprimidos e Spot-on
	Lotilaner	Comprimidos
	Sarolaner	Comprimidos
Miméticos de hormônio juvenil (juvenóide / DDI)		
Imitação de hormônios juvenis para evitar que as larvas completem a metamorfose	Piriproxifen	Spot-on, shampoo, spray tópico, coleiras e spray ambiental
	Metoprene	Spot-on, shampoo, spray tópico, coleiras e spray ambiental
Agonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina		
Os inseticidas furanicotinil e cloronicotinil (neonicotinóides) se ligam aos receptores nicotínicos pós-sinápticos de acetilcolina, resultando na inibição da transmissão colinérgica e paralisia dos parasitos	Dinotefuran	Spot-on
	Imidacloprida	Spot-on ou colar
	Nitenpyram	Comprimidos
Os derivados da espinosina ativam os receptores nicotínicos da acetilcolina. Causa hiperatividade devido à interrupção da ligação da acetilcolina em receptores nicotínicos de acetilcolina na célula pós-sináptica, o que evita a repolarização da célula	Spinetoram	Spot-on (apenas gato)
	Spinosad	Comprimidos
Moduladores do canal de sódio		
Piretróides, grupo de drogas que atuam pelo prolongamento da abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem em invertebrados, resultando em potenciais de ação aumentados e neurotoxicidade	Cifotrina	Spot-on
	Deltametrina	Colar
	Etofenprox	Shampoo, spray e spray ambiental e nebulizador
	Flumetrina	Colar
	Permetrina	Spot-on, spray tópico e ambiental
	Fenotrina	Spot-on
Bloqueadores do canal de sódio dependentes de voltagem		
Inibe a entrada do íon sódio nas células nervosas, o que resulta em função nervosa prejudicada, interrupção da alimentação do parasito, paralisia e morte	Indoxacarb	Spot-on

2.4 Disruptores de Desenvolvimento de insetos

O termo disruptores de desenvolvimento de insetos (DDIs) utilizado por (PENER; DHADIALLA, 2012) foi adaptado neste estudo para se referir aos reguladores de crescimento de insetos (IGR) que também é utilizado por outros autores para se referir ao mesmo composto químico (PATERSON, 2019). Esses compostos estão dentro do grupo de inseticidas usados no controle químico de insetos e são conhecidas como: hormônios mimetizadores ou análogos sintéticos do hormônio juvenil, inibidores do desenvolvimento, inibidores da muda e da síntese de quitina (BERTI *et al.*, 2013). São produtos químicos (sintéticos ou naturais) que interferem com espécies específicas de insetos, a maioria são específicas de artrópodes (PENER; DHADIALLA, 2012). A ação fundamental dos reguladores de crescimento é baseada na interrupção do crescimento e desenvolvimento normais, inibindo o surgimento de adultos e/ou afetando a reprodução normal do inseto adulto (BERTI; ZIMMERMAN, 1998; BERTI *et al.*, 2013). São considerados compostos pouco tóxicos para o homem ou outros mamíferos, biodegradáveis, com mínimo impacto para o meio ambiente e menos propensos ao desenvolvimento de resistência pelos insetos (AGUILERA; MARQUETTI; NAVARRO, 2001; BERTI *et al.*, 2013; KHOOBDEL *et al.*, 2021).

São classificados em dois grupos, os inibidores da síntese de quitina (CSIs: “Chitin Synthesis Inhibitors”) e os análogos do hormônio juvenil (JHAs: “Juvenile Hormone Analogs”) ou agonistas da ecdisona (RUST; HEMSARTH, 2016).

Os CSIs (Quadro 2) atuam inibindo a síntese de quitina e, portanto, com a deposição da nova cutícula, dá lugar a uma cutícula anormal, que conseqüentemente provoca a morte após a próxima muda do inseto suscetível. Eles também afetam os ovos e podem afetar a fecundidade dos insetos. A quitina é o principal componente da cutícula do inseto (PENER; DHADIALLA, 2012).

Quadro 2. Inibidores da Síntese de Quitina (Benzoilfenilureias) atualmente aprovados para uso em animais domésticos, adaptado de Junquera *et al.*, (2019).

Ingrediente ativo	Pragas alvos	Animais alvos	Introdução	Principais países
Diflubenzuron	Moscas criadas em esterco	Gado	1970s	USA
	Mífase cutânea	Ovelha	1990s	Australia, Nova Zelândia
	Piolho do mar	Salmonídeos	1990s	Chile, Noruega, Ilhas Faroe
Fluazuron	Carrapato	Gado	1990s	Austrália, América Latina, África do Sul
Lufenuron	Pulga	Cães, gatos	1980s	No mundo todo
	Piolho do mar	Salmonídeos	2010s	Chile
Novaluron	Pulga	Cães, gatos	2010s	USA
	Moscas criadas em esterco, carrapato	Gado	2010s	Brasil
Teflubenzuron	Piolho do mar	Salmonídeos	1990s	Canada, USA, Noruega, Ilhas Faroe
Triflumuron	Mífase cutânea, piolho	Ovelha	1990s	Australia (pioelhos), Nova Zelândia

Os JHAs afetam o equilíbrio hormonal dentro dos insetos, suprimindo a embriogênese, a metamorfose e a formação de adultos (RUST; HEMSARTH, 2016). Essa ação acontece da seguinte forma, o hormônio juvenil (JH) é secretado pelas glândulas endócrinas do inseto, sua função é a de regular a metamorfose, essa metamorfose acontece quando a glândula limita a produção de JH durante um tempo específico, ficando ausente e deixando uma janela de tempo onde ocorre a metamorfose. Os JHAs por sua parte, interferem na metamorfose quando estão presentes na janela de tempo durante o qual o JH endógeno está ausente (PENER; DHADIALLA, 2012).

A utilização dos DDIs para o tratamento da infestação por ectoparasitos é feita combinando com um adulticida ou apenas o DDI, dando resultados interessantes. Os DDIs afetam os ovos, larvas e pulgas adultas; a combinação com adulticidas aplicados a cães e gatos demonstrou prevenir a eclosão de ovos de *C. felis felis* e o desenvolvimento de larvas no meio ambiente. Além disso, os DDIs diminuem o tempo necessário para controlar pulgas em ambientes fechados e também podem diminuir a probabilidade de desenvolvimento de resistência a inseticidas (LEBON *et al.*, 2018) (RUST, 2017).

Atualmente, existem DDIs aprovados para a utilização no controle de artrópodes (Quadro 3) e de entre elas, duas formas de DDIs estão disponíveis para o manejo de infestações por pulgas em animais de estimação. Estes são os inibidores da biossíntese de quitina (lufenuron) e os análogos do hormônio juvenil (metopreno e piriproxifen) (PATERSON, 2019).

Quadro 3. Disruptores de Desenvolvimento de Insetos (DDIs) comercializados ou que receberam licenças limitadas para controle de artrópodes, adaptado de Pener e Dhadialla (2012).

Inibidores da Síntese de Quitina (CSIs)	Análogos do Hormônio Juvenil (JHAs)
Bistrifluron	Metopreno
Clorbenzuron e Diclorbenzuron	Hidropreno
Chlorfluazuron	Fenoxicarb
Diflubenzuron	Piriproxifen
Fluazuron	Kinoprene
Flucicloxuron	Triprene
Flufenoxuron	
Hexaflumuron	
Lufenuron	
Novaluron	
Teflubenzuron	
Triflumuron	
Buprofezin	
Etoxazole	
Cyromazine	
Dicyclanil	

2.4.1 Piriproxifen

O composto químico Piriproxifen (Figura 1) é um análogo do hormônio juvenil (JHA) que foi sintetizado pela primeira vez no Japão, na década dos 80 (BERTI; ZIMMERMAN,

1998; BERTI *et al.*, 2013). O composto imita a ação biológica do hormônio juvenil natural do inseto e bloqueia a iniciação de mudanças genéticas que normalmente ocorreriam no ciclo de desenvolvimento de várias células e órgãos essenciais para a formação de embriões, larvas, pupas ou tecidos adultos (KARHU; ANDERSON, 2000).

O Piriproxifen atua da seguinte forma, a muda e a metamorfose em insetos estão sob o controle de dois hormônios, o esteróide ecdisona e um grupo de sesquiterpenóides acíclicos conhecidos como hormônios juvenis (JH). A ecdisona induz e regula a muda, mas o caráter da muda é mediado por JH. Quando o JH está presente, não há diferenciação na forma. Na sua ausência, a ecdisona inicia a troca na expressão gênica necessária para a metamorfose, primeiro para a pupa e depois para o adulto. Normalmente, quando ocorre o crescimento suficiente do inseto, a produção de JH cessa e leva a muda para o estágio adulto. O piriproxifen imita a ação de JH e mantém o inseto em um estado imaturo. Os insetos tratados com esse produto químico são incapazes de mudar com sucesso até o estágio adulto e não podem se reproduzir normalmente (SULLIVAN; GOH, 2008). Dessa forma, o piriproxifen atua para reduzir as populações de insetos, interferindo no desenvolvimento fisiológico dos estágios de vida (KARHU; ANDERSON, 2000).

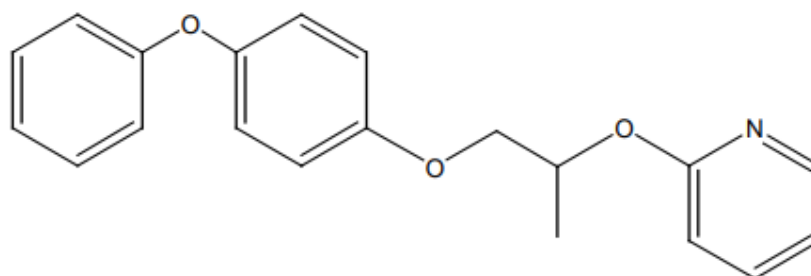


Figura 1. Estrutura química do Piriproxifen (KHOOBDEL *et al.*, 2021).

É um composto à base de piridina que é relativamente estável. Tem uma volatilidade moderada de $1,0 \times 10^{-7}$ mmHg a 20°C (SULLIVAN, 2000). A DL_{50} oral para ratos é > 5.000 mg/kg, o que o torna útil como um produto tópico em animais de estimação (SULLIVAN, 2000; RUST; HEMSARTH, 2016).

O piriproxifen não é tão eficaz para o controle de formas adultas de pulgas, porém pode interferir na eclosão dos ovos e afetar as formas imaturas do inseto (PALMA; MEOLA; MEOLA, 1993) (MEOLA *et al.*, 2000). Além tem sido demonstrado que o piriproxifen possui efeito larvicida sobre outras espécies de insetos, como é o caso de *Alphitobius diaperinus* (ZORZETTI *et al.*, 2015). Com a finalidade de potencializar seu efeito, pode ser utilizado associado a adulticidas ou outros DDIs. Os tratamentos combinados com adulticidas e DDIs interrompem o ciclo de vida de pulgas e conseguem o controle dentro das residências. Em estudos feitos se demonstrou que o piriproxifen potencializou a atividade do metopreno contra as larvas de *Ctenocephalides felis felis* na combinação de piriproxifen:metopreno (10:1) sendo duas vezes mais ativo (CL_{50} 0,20 ppm em meio de criação de larvas) como metopreno ou piriproxifeno sozinho (RUST; HEMSARTH, 2016; RUST, 2020). O sinergismo permitiu que concentrações mais baixas de cada DDI fossem aplicadas e ainda fossem eficazes. As pulgas podem absorver o piriproxifen através da cutícula por contato direto ou por ingestão (KARHU; ANDERSON, 2000).

Existem combinações entre piriproxifen e outros princípios ativos testadas e registradas contra *C. felis felis* em testes in vitro e/ou in vivo, algumas combinações são a de imidacloprid / piriproxifen, imidacloprid / permetrina / piriproxifen, dinotefuran / permetrina / piriproxifen e dinotefuran / piriproxifen (RUST, 2017).

2.4.2 Novaluron

O Novaluron é uma benzoilfenilureia (BPU) que forma parte do grupo dos inibidores de síntese de quitina (CSI), um dos últimos introduzidos no mercado (JUNQUERA *et al.*, 2019). É um potente supressor de importantes pragas agrícolas como lepidópteros, coleópteros, homópteros e dípteros (CUTLER; SCOTT-DUPREE, 2007). O composto foi aprovado para sua utilização contra parasitos de cultivos nos Estados Unidos (EUA) no ano de 2003. Há pouco tempo, foi introduzido em alguns produtos veterinários para o controle de pulgas em animais de estimação nos EUA, combinado com fipronil (PetArmor® plus IGR e Sentry® Fiprogard® plus IGR, ambos da Sergeant's) e para controle de carrapatos no Brasil em combinação com eprinomectina (Novatack® Gold da Clarion) (JUNQUERA *et al.*, 2019).

A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) considerou o novaluron como um composto que apresenta baixo risco para o meio ambiente e organismos não-alvos, e o avaliou como uma opção importante para diminuir a dependência de inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides (EPA, 2001; FAO; WHO, 2005).

O modo de ação do novaluron é o mesmo aplicado aos CSIs. No nível do organismo, os sintomas geralmente são expressos na muda, quando a quitina está sendo ativamente produzida e é interrompida. Em geral, apenas as larvas são afetadas e todos os efeitos, incluindo a inibição completa da muda, inibição parcial da muda, pupas malformadas e falta de alimentação são devido à má formação da cutícula (RETNAKARAN; WRIGHT, 1987; CUTLER; SCOTT-DUPREE, 2007). Atua principalmente por ingestão contra estágios imaturos de insetos, mas potencialmente tem toxicidade de contato (CUTLER *et al.*, 2005) e atividade translaminar, ampliando seu espectro de aplicação. Embora efeitos letais agudos em adultos não sejam observados, várias investigações demonstraram redução na produção de ovos e/ou viabilidade de adultos de insetos expostos ao novaluron (CUTLER; SCOTT-DUPREE, 2007).

Entre as características físicas e quimicamente do composto, podemos afirmar que novaluron (Figura 2) tem uma baixa pressão de vapor, baixa solubilidade em água (3 µg/L), que não é afetada pelo pH, e um Log Pow (log P) relativamente alto de 4,3. As taxas de hidrólise e fotólise são lentas e não se espera que esses processos degradem significativamente o composto no meio ambiente. Não tem efeitos adversos na respiração do solo e N-mineralização, e é fortemente adsorvido pelos solos, uma característica que deve reduzir a probabilidade de lixiviação e contaminação dos sistemas de água subterrânea (EPA, 2001; FAO, 2004).

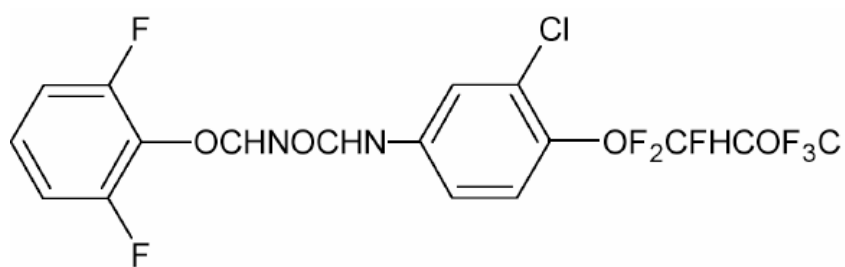


Figura 2. Estrutura química do Novaluron (CUTLER; SCOTT-DUPREE, 2007).

O composto é usado atualmente apenas em uma das dezenas de spot-ons para cães nos EUA. Foi introduzido recentemente para o controle de pulgas combinado com fipronil; o novaluron adiciona eficácia larvicida ao efeito adulticida de fipronil. Até agora, não é usado na Europa ou América latina para o controle de pulgas. Pode-se presumir que o uso ainda é muito limitado. No Brasil, o uso de novaluron contra carrapatos de gado provavelmente ainda é marginal (JUNQUERA *et al.*, 2019).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Localização do Estudo

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), vinculado ao Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

3.2 Manutenção de Pulgas no Laboratório

Foram utilizadas pulgas da subespécie *Ctenocephalides felis felis* e sua manutenção foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob o número de protocolo 4313110419. Para a manutenção da colônia, os gatos foram infestados com pulgas adultas (25 machos e 75 fêmeas) não alimentadas e com idade variando de sete a 14 dias. As infestações aconteciam uma vez na semana. Os gatos foram mantidos em gaiolas adaptadas (240 x 210 x 60 cm) com bandejas retráteis para realização da coleta dos ovos que ocorria diariamente.

Após a coleta, os detritos e os ovos das bandejas foram processados de forma que fosse possível realizar a coleta de ovos e adição de substrato larval (CORREIA *et al.*, 2003). Em seguida, o material foi acondicionado em câmaras climatizadas (BOD) com controle de temperatura ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade ($80\pm 10\%$) até a emergência das pulgas adultas (21 dias aproximadamente), e assim dando continuidade ao ciclo da manutenção de pulgas no laboratório.

3.3 Larvas de Pulgas

Para a realização de cada teste foram coletados aproximadamente 1500 ovos com idade inferior a 24 horas da pulga *Ctenocephalides felis felis*. A coleta foi realizada utilizando um pincel número 0 e um microscópio estereoscópico, os ovos foram coletados de forma delicada e colocados em uma placa de petri (60 x 15 mm); em total foram colocados aproximadamente 100 ovos em cada placa, totalizando 15 placas incubadas = 1500 ovos. Esses ovos foram incubados na câmara climatizada (do tipo B.O.D) com temperatura ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade ($80\pm 10\%$) controlados por um período de 48 horas, tempo no qual as larvas eclodem, estando no primeiro instar (L1). Para a realização do experimento foram utilizadas as larvas de primeiro instar.

3.4 Delineamento Experimental

O experimento foi desenvolvido em duas etapas:

A primeira etapa foi o teste de triagem, realizado com a finalidade de validar a metodologia descrita por Rust e Hemsarh (2016).

Para o desenvolvimento do experimento foram utilizados dois gramas de substrato larval, os quais foram impregnados com 200 μ L de uma solução de piriproxifen na concentração de 400 ppm. O solvente utilizado foi a acetona.

A impregnação do substrato foi realizada em frascos de vidro de 10 mL (5,3 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro) (Figura 3), os quais foram lavados 24 horas antes da impregnação com dois mililitros de acetona para remover qualquer tipo resíduo na superfície interna dos mesmos.



Figura 3. Frasco de vidro utilizado para a impregnação (Fonte: Arquivo pessoal).

Após a impregnação, foi feita a homogeneização do substrato no vórtex durante ± 1 minuto. Imediatamente, os frascos foram colocados na capela de exaustão para a secagem, durante duas horas. Posteriormente, cada frasco foi homogeneizado novamente no vórtex durante um minuto e em seguida os substratos impregnados foram colocados na placa de petri correspondente (Figura 4).



Figura 4. Substrato larval impregnado com solução contendo disruptor de desenvolvimento de insetos (Fonte: Arquivo pessoal).

Em cada placa de petri (60 x 15 mm) foram colocadas 10 larvas de primeiro instar, mais o substrato previamente impregnado com piriproxifen. Foram divididos em 10 grupos tratados e 1 grupo controle. As placas foram identificadas e posteriormente fechadas com a ajuda de elásticos de borracha para evitar que as larvas fugissem (Figura 5).



Figura 5. Placas de Petri com substrato impregnado com disruptor de desenvolvimento de inseto e larvas de *Ctenocephalides felis felis* (Fonte: Arquivo pessoal).

As placas de petri com as larvas e o substrato impregnado foram colocadas na câmara BOD a uma temperatura de 27°C e 80% de umidade, sendo monitorado constantemente. Foram deixadas durante 21 dias aproximadamente, sem manipular as placas durante esse período.

A segunda etapa foi a avaliação dos disruptores de desenvolvimento de insetos (DDI) piriproxifen e novaluron. O experimento foi realizado da mesma forma que o teste descrito anteriormente.

Foram preparadas diferentes concentrações, totalizando 10 concentrações correspondentes ao piriproxifen 0,049, 0,098, 0,195, 0,391, 0,781, 1,563, 3,125, 6,25, 12,5 e 25 ppm, e 10 concentrações correspondentes ao novaluron 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 1,0, 1,5, 1,75, 2,0, 2,5 e 5,0 ppm.

Para cada concentração e para o grupo controle foram preparadas seis repetições. As seguintes etapas e os materiais utilizados foram similares à primeira etapa descrita anteriormente.

3.5 Análise de Dados

Foi realizada uma análise descritiva das alterações morfológicas observadas nos testes de piriproxifen e novaluron. A avaliação do número de pulgas adultas emergidas do pupário foi realizada após 21 dias de incubação das larvas com a dieta contendo os disruptores de crescimento. Para a avaliação, as placas de petri foram retiradas da câmara climatizada, observando primeiramente a presença ou ausência de pulgas emergidas do pupário e seguidamente deixando as mesmas expostas a temperatura de -20°C durante 15 min aproximadamente. Os pupários foram abertos com ajuda de estiletes entomológicos para observar a morfologia das pulgas adultas formadas.

Para a avaliação de mortalidade foi adotado o seguinte critério: foram consideradas como pulgas vivas aquelas que conseguiram emergir da pupa, assim também aquelas que continuavam dentro do pupário, mas estavam totalmente formadas, com as pernas livres do corpo, cumprindo com as características de uma pulga normal para a espécie; foram consideradas como mortas aquelas que apresentassem as pernas comprimidas ao corpo ou se a pupa estivesse aderida à cutícula. As larvas que não conseguissem passar para o estágio de pupa também foram consideradas mortas. Esses critérios foram adaptados do trabalho de Rust e Hemsarth (2016). Além disso, alterações relacionadas à morfologia foram descritas.

A avaliação da mortalidade para cada concentração e para cada teste foi determinada pela fórmula de Abbott (1987): $\text{Mortalidade corrigida (\%)} = \frac{\text{número de indivíduos mortos no grupo tratado} - \text{número de indivíduos mortos no grupo controle}}{100 - \text{número de indivíduos mortos no grupo controle}} \times 100$. Foi calculada a eficácia para cada concentração através da fórmula: $\text{Eficácia (\%)} = \frac{[(\text{número médio de pulgas vivas do grupo controle} - \text{número médio de pulgas vivas do grupo tratado})]}{(\text{número médio de pulgas vivas do grupo controle})} \times 100$ (MARCHIONDO *et al.* 2013).

Foram determinadas as concentrações letais 50 e 90 (CL₅₀ e CL₉₀) para o novaluron e o piriproxifen por meio da análise Probit, utilizando o programa computacional RStudio © 2009-2019 Versão 1.2.1335 Inc., pacote “Ecotoxicology” (CARVALHO *et al.*, 2017).

Os valores de média e desvio padrão foram calculados no programa computacional Microsoft Excel. Os dados foram transformados (log 10) e submetidos a análise de variância (Anova: 1 critério). O nível de significância foi de 95%. Os dados foram analisados no programa computacional Bioestat 5.3 (AYRES *et al.*, 2007).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da Metodologia de Impregnação do Substrato Larval

No teste de triagem para a validação da metodologia de impregnação foram utilizados 400 ppm de piriproxifen em cada tratamento (10 grupos tratados mais um grupo controle). Na avaliação foi constatada 100% de mortalidade em todos os grupos tratados, enquanto o grupo controle apresentou apenas 10% de mortalidade. Não foram recuperadas pulgas mortas em nenhum dos grupos submetidos ao estudo. Os resultados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Número de ovos incubados, número de pulgas vivas recuperadas, número de pulgas mortas recuperadas, mortalidade e mortalidade corrigida para *Ctenocephalides felis felis* submetidas ao substrato impregnado com piriproxifen a 400 ppm.

Repetição	[ppm]	Número de ovos incubados	Pulgas vivas recuperadas	Pulgas mortas	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%)
1	400	10	0	0	100	100
2	400	10	0	0	100	100
3	400	10	0	0	100	100
4	400	10	0	0	100	100
5	400	10	0	0	100	100
6	400	10	0	0	100	100
7	400	10	0	0	100	100
8	400	10	0	0	100	100
9	400	10	0	0	100	100
10	400	10	0	0	100	100
Controle	0	10	9	1	10	0

Neste teste foram observadas algumas alterações na motilidade das larvas. Notou-se que a partir do dia 5 após o início do experimento, pelo menos uma larva de cada placa de petri do grupo tratado apresentou-se imóvel, enquanto o restante das larvas do grupo em tratamento, assim como as larvas do grupo controle apresentavam uma motilidade normal. A partir do dia 9, a quantidade de larvas imóveis aumentou a pelo menos duas larvas em cada placa do grupo tratado. No dia 12, foram observadas pelo menos três larvas imóveis em cada placa de petri do grupo tratado. Nesse período de tempo no grupo controle já foi observada a formação de pupários. No dia 15, foram observadas apenas duas larvas móveis entre todas as placas do grupo tratado. No dia 19, não foi observada nenhuma larva móvel nas placas sob tratamento com piriproxifen, embora no grupo controle foram observados os pupários.

A observação que foi feita com pouca manipulação das placas de petri e de forma macroscópica para evitar uma possível interferência no ciclo da pulga demonstrou que a partir do dia 5 já existem larvas com a motilidade afetada, mas no dia 15, após duas semanas do início do tratamento a motilidade das larvas tratadas foi quase nula e sem formação de pupários.

4.2 Atividade e Concentração Letal de Piriproxifen sobre o desenvolvimento de larva a adultos de *Ctenocephalides felis felis*

Na avaliação do teste com piriproxifen diluído em diferentes concentrações foi possível observar uma mortalidade de 100% nas concentrações superiores a 1,563 ppm, essa porcentagem de mortalidade foi decrescendo gradualmente, chegando a 28,8% na última concentração que foi de 0,049 ppm. No grupo controle foi observado uma mortalidade de 13,3%.

Foi notada a formação de pupários, alguns apresentando pulgas vivas e outras mortas. Nas concentrações maiores a 1,563 não foram recuperadas pulgas mortas, não assim nas menores, onde sim foram recuperadas pulgas mortas dos pupários. As larvas chegaram até a formação do pupário, mas por algum motivo não conseguiram se tornar pulgas totalmente formadas.

A concentração letal CL_{50} e CL_{90} do piriproxifen com um índice de confiança de 95% foi de 0,07 e 0,27 ppm, respectivamente. A CL_{50} teve um mínimo de 0,04 e máximo de 0,09 ppm, enquanto que a mínima e máxima do CL_{90} foi de 0,18 a 0,66 ppm. O calculo foi feito utilizando as faixas de 1,563, 0,0781, 0,0195, 0,0098 e 0,0049 ppm. O Slope foi de 2,168, a Variação = 0,46, o $R^2 = 0,6949$, o Qui-quadrado = 7,027 e o $P = 0,9289$.

Os resultados do percentual de mortalidade de cada nível de concentração, assim como os resultados das concentrações letais estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Número de ovos incubados, número de pulgas vivas recuperadas, número de pulgas mortas, percentual de mortalidade, percentual de mortalidade corrigida e concentração letal para *Ctenocephalides felis felis* submetidas ao substrato impregnado com várias concentrações de piriproxifen.

Grupos	[ppm]	Número de ovos incubados	Pulgas vivas recuperadas	Mortas	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%)	Concentração letal (ppm)
Piriproxifen	25	60	0	60	100	100	$CL_{50} = 0,07$ (0,04 – 0,09)
	12,5	60	0	60	100	100	
	6,25	60	0	60	100	100	
	3,125	60	0	60	100	100	
	1,563	60	0	60	100	100	
	0,781	60	2	58	96,7	96,2	$CL_{90} = 0,27$ (0,18 – 0,66)
	0,391	60	2	58	96,7	96,5	
	0,195	60	7	53	88,3	86,5	
	0,098	60	16	44	73,3	69,2	
	0,049	60	37	23	38,3	28,8	
Controle	0	60	52	8	13,3	0	

As pulgas mortas recuperadas apresentavam os membros colados ao corpo, com aparência de um corpo ressecado, em alguns casos de cor amarelado e muito comprimidos lateralmente, algumas apresentando parte da pupa colada na cutícula e com o tamanho do corpo menores ao normal correspondente à subespécie (Figura 6).

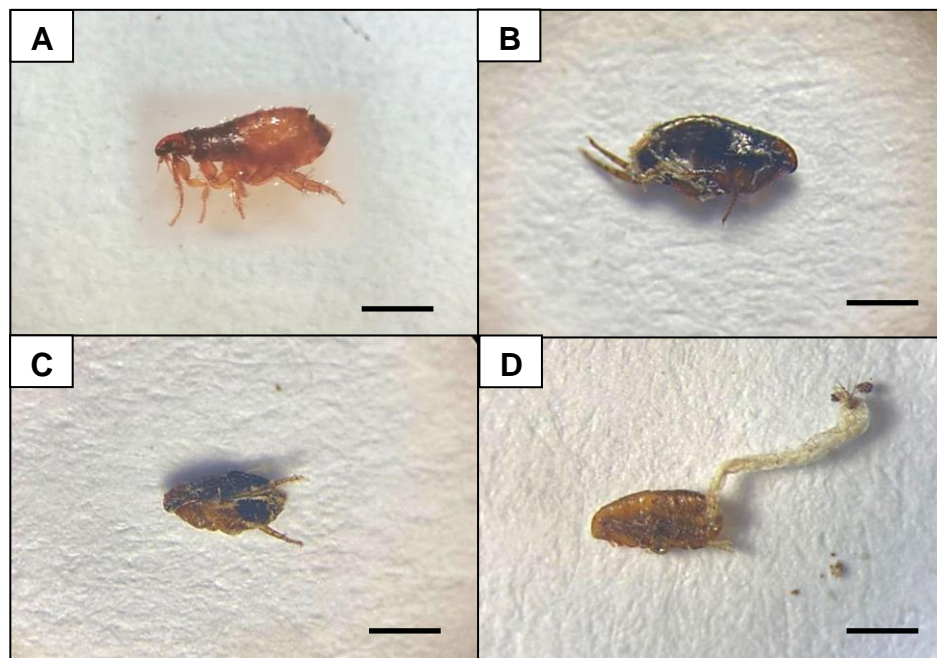


Figura 6. Pulga da subespécie *Ctenocephalides felis felis* viva (A) sem alterações morfológicas e pulgas mortas (B,C e D) com alterações morfológicas após 21 dias sob tratamento com piriproxifen (Fonte: Arquivo pessoal).

A quantidade de pulgas adultas vivas recuperadas foi decrescendo conforme a concentração de piriproxifen aumentava. Na análise estatística foi possível constatar que existiu diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados, assim também entre os grupos tratados entre si, exceto as concentrações maiores a 0,391 ppm, onde não existiu diferença significativa entre eles. Os resultados da quantidade de pulgas vivas recuperadas, assim como os dados estatísticos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Número de pulgas adultas da subespécie *Ctenocephalides felis felis* recuperadas após 21 dias de desafio com a representação da média, desvio padrão e porcentagem de eficácia correspondente a cada concentração de piriproxifen.

Repetições	Número de adultos vivos recuperados/Concentrações (ppm)										
	Controle	0,049	0,098	0,195	0,391	0,781	1,563	3,125	6,25	12,5	25
1	10	3	4	1	0	0	0	0	0	0	0
2	8	7	2	1	1	0	0	0	0	0	0
3	8	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0
4	9	6	2	3	1	0	0	0	0	0	0
5	8	7	3	2	0	0	0	0	0	0	0
6	9	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	52	37	16	7	2	0	0	0	0	0	0
Média	8,7 ^a	6,2 ^b	2,7 ^c	1,2 ^c	0,3 ^d	0,3 ^d	0,0 ^d	0,0 ^d	0,0 ^d	0,0 ^d	0,0 ^d
Desvio padrão	0,8	1,7	0,8	1,2	0,5	0,5	0	0	0	0	0
Eficácia (%)		28,8	69,2	86,5	96,2	96,2	100	100	100	100	100

^{abcd}Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si (p>0,05).

Entre as pulgas vivas recuperadas foi examinado o sexo, apresentando-se uma quantidade maior de fêmeas, que foi decrescendo conforme aumentava a concentração de piriproxifen.

Algumas pulgas adultas conseguiram emergir do pupário nas menores concentrações, foi observado que enquanto menor era a concentração de piriproxifen no substrato larval, maior a quantidade de pulgas adultas emergidas do pupário no dia 21.

Na avaliação também foram encontradas larvas mortas que pelas características morfológicas estavam entre o segundo ou terceiro instar, ressecadas e dispostas em forma de “U” (Figura 7).

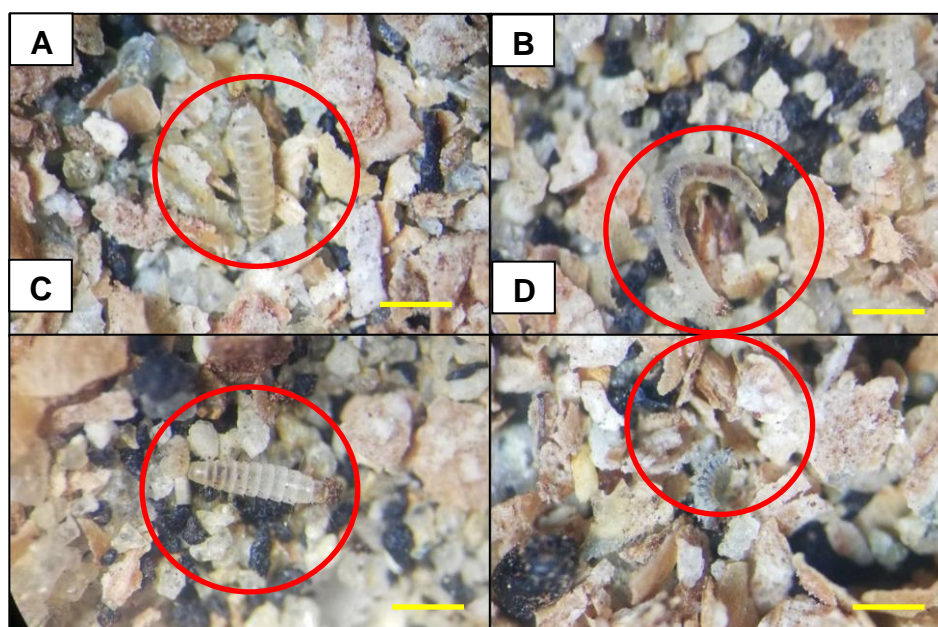


Figura 7. Larvas de *Ctenocephalides felis felis* mortas (A, B, C e D) no substrato larval sob tratamento com piriproxifen (Fonte: Arquivo pessoal).

4.3 Atividade e Concentração Letal de Novaluron sobre o desenvolvimento de larva a adultos de *Ctenocephalides felis felis*

No teste do novaluron houve 100% de mortalidade na maior concentração que foi de 5 ppm, e conforme a concentração do composto foi diminuindo, a taxa de mortalidade foi recíproca. No grupo controle foi observada uma mortalidade de 26,7%. Foram encontrados pupários com pulgas vivas e mortas. A quantidade de pulgas mortas recuperadas foi pouca, distribuindo-se entre a segunda e a sexta concentração (2,5 e 1 ppm). A maioria das pulgas morreram na fase imatura (larva), sem chegar à formação de pupários.

A concentração letal CL_{50} e CL_{90} do novaluron com um índice de confiança de 95% foi de 0,25 e 2,29 ppm, respectivamente, com um mínimo e máximo de 0,12 e 0,40 correspondente ao CL_{50} e 1,42 a 4,71 ppm que correspondem ao CL_{90} . O calculo foi feito utilizando as faixas de 5, 2,5, 1,75, 1 e 0,1 ppm. O Slope foi de 1,32, a Variação = 0,76, o R^2 = 0,867, o Qui-quadrado = 11,22 e o P = 0,976.

Os resultados de percentual de mortalidade de cada nível de concentração, como também as concentrações letais estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Número de ovos incubados, número de pulgas vivas recuperadas, número de pulgas mortas, percentual de mortalidade total, percentual de mortalidade corrigida e concentração letal para *Ctenocephalides felis felis* submetidas ao substrato impregnado com várias concentrações de novaluron.

Grupos	Concentrações (ppm)	Nº de ovos incubados	Pulgas vivas recuperadas	Total de Mortas	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%)	Concentração letal (ppm)
Novaluron	5,0	60	0	60	100	100	CL ₅₀ = 0,25 (0,12 – 0,40)
	2,5	60	2	58	96,7	95,5	
	2,0	60	6	54	90	86,4	
	1,75	60	12	48	80	72,7	
	1,5	60	9	51	85	79,5	
	1,0	60	18	42	70	59,1	CL ₉₀ = 2,29 (1,42 – 4,71)
	0,1	60	39	21	35,0	11,4	
	0,05	60	42	18	30	4,5	
	0,01	60	33	27	45	25,0	
	0,001	60	44	16	26,7	0	
Controle	0	60	44	16	26,7	0	

As pulgas mortas recuperadas dos pupários apresentavam os membros totalmente colados ao corpo e eram de uma coloração amarelada, provavelmente com alterações no exoesqueleto, porém sem alterações visíveis no tamanho da pulga (Figura 8).



Figura 8. Pulga da subespécie *Ctenocephalides felis felis* morta com alterações morfológicas após 21 dias sob tratamento com novaluron (Fonte: Arquivo pessoal).

A quantidade de pulgas adultas recuperadas foi descontínua, com altas e baixas conforme aumentava a concentração de novaluron, porém a partir da concentração 1,75 ppm foi decrescendo até chegar a ser nula na última concentração 5,0 ppm. Estatisticamente, o grupo controle não teve diferença significativa com as menores concentrações, a partir da concentração 1,0 ppm houve diferença estatística.

Os resultados da quantidade de pulgas vivas recuperadas, assim como os dados estatísticos estão representados na Tabela 5.

Tabela 5. Número de pulgas adultas da subespécie *Ctenocephalides felis felis* recuperadas após 21 dias de desafio com a representação da média, desvio padrão e porcentagem de eficácia correspondente a cada concentração de novaluron.

Repetições	Número de adultos vivos recuperados/Concentrações (ppm)										
	Controle	0,001	0,01	0,05	0,1	1,0	1,5	1,75	2,0	2,5	5,0
1	6	9	7	7	6	5	2	2	1	0	0
2	8	8	6	6	8	4	1	1	0	0	0
3	7	8	6	7	6	1	3	3	2	1	0
4	9	8	7	9	5	3	2	2	2	1	0
5	5	7	3	7	8	3	1	1	1	0	0
6	9	4	4	6	6	2	0	3	0	0	0
Total	44	44	33	42	39	18	9	12	6	2	0
Média	7,3^a	7,3^a	5,5^a	7,0^a	6,5^a	3,0^b	1,5^b	2,0^b	1,0^{bc}	0,3^c	0,0^{cd}
Desvio padrão	1,6	1,8	1,6	1,1	1,2	1,4	1,0	0,9	0,9	0,5	0,0
Eficácia(%)		0	25	4,5	11,4	59,1	79,5	72,7	86,4	95,5	100

^{abcd}Médias com letras iguais não diferem significativamente entre si (p>0,05).

Entre as pulgas vivas recuperadas, foi observado uma maior quantidade de fêmeas na maioria das concentrações utilizadas, exceto na concentração 1,75 ppm na qual a quantidade de machos foi maior.

Também foram recuperadas larvas mortas em todas as concentrações menores a 0,25 ppm, essas larvas apresentavam as mesmas características morfológicas descritas no teste de piriproxifen (Figura 7).

5 DISCUSSÃO

A avaliação da ação larvicida de compostos realizada pelo método de impregnação do substrato larval para pulgas tem sido mencionada por Marchiondo *et al.* (2013) como modelo básico para os investigadores prepararem planos para a definição da eficácia de um novo material de investigação. O método em princípio foi desenvolvido por Rust *et al.* (2002) como um bioensaio para determinar a susceptibilidade de cepas de *Ctenocephalides felis felis* ao Imidaclopride. Rust e Hemsarh (2016, 2019, 2020) utilizaram esse método em experimentos com disruptores de desenvolvimento de insetos. Neste estudo foi adaptado o método mencionado para determinar a concentração letal do piriproxifen e novaluron. O método resultou ser conveniente para realizar o cálculo de CL e demonstrar a suscetibilidade das larvas de *C. felis felis* ao piriproxifen e novaluron, no obstante é um método árduo, que requer de muita atenção na hora da sua execução, principalmente no momento da manipulação das larvas para evitar qualquer dano que possa interferir na evolução normal do ciclo biológico. Rust *et al.* (2002) recomendaram o uso de placas de Petri de vidro para reduzir a estática e evitar que as larvas voem ou grudem nas laterais das placas, neste trabalho foram utilizadas placas de petri de plástico e não foram observados inconvenientes na hora da manipulação das mesmas, tendo em conta que as placas de plástico atuais são livres de estática. Uma vantagem deste método utilizando larvas de pulgas é que o composto impregnado pode atuar de duas formas, por contato e/ou ingestão.

Como a função dos DDIs é a de impedir que as formas imaturas continuem com a sua evolução, neste estudo foi observada uma diferença de ação nos dois compostos. As larvas expostas ao piriproxifen chegaram a evoluir até ínstares superiores, algumas morrendo como larvas, mas a maioria chegou até a formação de pupas, porém morrendo dentro dos mesmos, isso foi refletido na quantidade de pulgas mortas recuperadas dos pupários. Com base a esses fatos pode se presumir que o piriproxifen pode ter uma maior ação por ingestão, visto que a maioria das larvas conseguiram evoluir, mas não chegaram a ser adultos íntegros. Porém, também não é descartada a sua ação através do contato, visto que a sua absorção pode ser feita por essas duas vias (KARHU; ANDERSON, 2000). Meola *et al.* (2000) observaram que as larvas de pulgas alimentadas com sangue fecal excretado por adultos alimentados com piriproxifen morrem antes de atingirem o estado adulto. Em outras espécies de insetos, como *Alphitobius diaperinus*, a aplicação direta de piriproxifen nas larvas ocasiona maior porcentagem de mortalidade do que quando o produto aplicado na ração, indicando assim que o piriproxifen tem uma maior ação por contato (ZORZETTI *et al.*, 2015).

O novaluron atua principalmente por ingestão contra estágios imaturos de insetos, mas potencialmente pode ter toxicidade de contato (CUTLER *et al.*, 2005). Neste estudo a maioria das larvas que foram expostas ao novaluron morreram na fase de larva e poucas chegaram a morrer dentro dos pupários; presume-se que a maior ação do novaluron contra as larvas de *C. felis felis* foi por contato e em menor grau por ingestão.

Em relação às pulgas vivas recuperadas, espera-se que as pulgas adultas que foram resultado do tratamento com piriproxifen apresentem problemas reprodutivos, visto que existem estudos onde indivíduos adultos de *C. felis* foram submetidos a uma dieta de sangue contendo piriproxifen e outra ao contato com o químico, dando como resultado uma inibição da eclosão dos ovos, indicando uma atividade de esterilização dos mesmos (MEOLA *et al.*, 2000; PALMA; MEOLA; MEOLA, 1993). Não existem ainda estudos que demonstrem a ação

residual do novaluron nas pulgas adultas alimentadas ou que estiveram em contato com o químico na fase imatura da sua evolução.

As concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ deste estudo, que correspondem ao piriproxifen, foram de 0,07 e 0,27 ppm, respectivamente. Rust e Hemsarth (2016) demonstraram num estudo realizado com larvas de *C. felis felis* que a CL₅₀ e CL₉₀ do piriproxifen foi de 0,19 e 1,51 ppm, respectivamente. Outro estudo similar demonstrou uma CL₅₀ de 0,23 e CL₉₀ de 1,13 ppm (RUST; HEMSARTH, 2019). Os dois estudos mencionados apresentaram concentrações letais maiores aos demonstrados neste estudo. O fator que pode ter influenciado nessa variação é desconhecido, mas tendo em conta que foram controladas todas as variáveis do método utilizado, teve uma variável que não foi mencionado nos trabalhos de Rust e Hemsarth (2016 e 2019) e poderia ter causado essa diferença que foi o da homogeneização do substrato, que no presente trabalho foi realizada durante um minuto antes e depois da secagem do substrato impregnado, presume-se que essa homogeneização aumentou a dispersão do composto no substrato e assim aumentando a disponibilidade do químico para as larvas de *C. felis felis*.

No caso do novaluron, a CL₅₀ e CL₉₀ foram de 0,25 e 2,29 ppm, respectivamente, essas concentrações foram maiores aos registrados por Rust e Hemsarth (2020) no trabalho onde utilizaram larvas de *C. felis felis*, sendo a CL₅₀ de 0,03 e CL₉₀ de 0,13 ppm.

A concentração letal 50 do novaluron foi superior a do piriproxifen neste estudo. Tanto o piriproxifen, como o novaluron apresentaram atividade sobre as formas imaturas de *Ctenocephalides felis felis*, afetando o desenvolvimento dos mesmos e demonstrando assim ser eficientes para o controle destes insetos. Existem trabalhos que mencionam a eficiência do piriproxifen sobre as formas imaturas das pulgas, principalmente associado a outros DDI's ou adulticidas (PALMA; MEOLA; MEOLA, 1993) (LEBON *et al.*, 2018) (RUST; HEMSARTH, 2019), mas no caso do novaluron, embora no mercado exista um produto veterinário utilizado para o controle de ectoparasitos (JUNQUERA *et al.*, 2019), ainda são escassos os estudos feitos que possibilitem uma melhor compreensão da ação desse composto contra as pulgas. Sendo assim são necessários mais estudos que demonstrem a atividade do novaluron frente a este inseto, inclusive desafiando outras fases do ciclo, já que este se trata do primeiro trabalho com este ativo frente a uma população laboratorial no Brasil.

6 CONCLUSÃO

Os disruptores de desenvolvimento de insetos novaluron e piriproxifen demonstraram ter atividade sobre as larvas de *Ctenocephalides felis felis*, interrompendo o ciclo normal de desenvolvimento da pulga.

Tanto o novaluron quanto o piriproxifen em altas concentrações demonstraram ação larvicida.

A concentração letal 50 do novaluron foi superior a do piriproxifen.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJEMIAN, J.; PARKS, S.; MCELROY, K.; CAMPBELL, J.; EREMEEVA, M. E.; NICHOLSON W. L.; MCQUISTON, J.; TAYLOR, J. Murine typhus in Austin, Texas, USA, 2008. **J Emerg Infect Dis**, USA, v. 16, n. 3, p. 412–417, Mar. 2010. DOI: 10.3201/eid1603.091028.

AGUILERA, L.; MARQUETTI, M. C.; NAVARRO, A. Actividad biológica del diflubenzuron sobre *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). **Rev Cubana Med Trop**, Cuba, v. 53, n. 1, p. 48–52, Jan./Apr. 2001.

ANGELAKIS, E.; MEDIANNIKOV, O.; PAROLA, P.; RAOULT, D. *Rickettsia felis*: The Complex Journey of an Emergent Human Pathogen. **Trends Parasitol**, Elsevier, v. 32, n. 7, p. 554–564, Jul. 2016. ISSN: 14715007, DOI: 10.1016/j.pt.2016.04.009.

AYRES, M.; AYRES-JUNIOR, M.; AYRES, D.; SANTOS, A. Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: IDSM, 2007.364p.

BECK, W.; BOCH, K.; MACKENSEN, H.; WIEGAND, B.; PFISTER, K.. Qualitative and quantitative observations on the flea population dynamics of dogs and cats in several areas of Germany. **Vet Parasitol**, Germany, v. 137, n. 1–2, p. 130–136, 2006. ISSN: 03044017, DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.12.021.

BERTI, J.; ZIMMERMAN, R. Métodos para el control integrado de los vectores de la malaria en Venezuela. **Bol Dir Malariol Saneam Ambient**, Venezuela, v. 38, n. 2, p. 123–136, 1998.

BERTI, J.; MANZO, D.; RAMOS, M.; GUERRA, L. A. Eficacia y actividad residual del regulador de crecimiento pyriproxyfen sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. **Bol Malariol Salud Ambient**, Venezuela, v. 53, n. 1, p. 56–64, 2013. ISSN: 16904648.

BEUGNET, F.; SOLL, M.; BOUHSIRA, E.; FRANC, M. Sustained speed of kill and repellency of a novel combination of fipronil and permethrin against *Ctenocephalides canis* flea infestations in dogs. **Parasit Vectors**, Lyon, v. 8, n. 52, p. 1–6, 2015. ISSN: 17563305, DOI: 10.1186/s13071-015-0680-1.

BITAM, I.; DITTMAR, K.; PAROLA, P.; WHITING, M. F.; RAOULT, D. Fleas and flea-borne diseases. **Int J Infect Dis**, v. 14, n. 8, p. e667–e676, 2010. ISSN: 12019712, DOI: 10.1016/j.ijid.2009.11.011.

BLAGBURN, B. L.; DRYDEN, M. W. Biology, Treatment, and Control of Flea and Tick Infestations. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 39, n. 6, p. 1173–1200, 2009. ISSN: 01955616, DOI: 10.1016/j.cvsm.2009.07.001.

BROWN, L. D.; MACALUSO, K. R. *Rickettsia felis*, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. **Curr Trop Med Rep**, v. 3, p. 27–39, 2016. ISSN: 21963045, DOI: 10.1007/s40475-016-0070-6.

CARVALHO, J.R.; PRATISSOLI, D.; VIANNA, U.R.; HOLTZ, A.M. **Análise de probit aplicada a bioensaios com insetos**. Colatina: IFES, 2017. 102p.

CORREIA, T.; DE SOUZA, C.; FERNANDES, J.; VILHENA, I.; MARTINS, F.; SCOTT, F. Ciclo biológico de *Ctenocephalides felis felis* a partir de diferentes dietas artificiais. **Rev Bras Zoociênc**, Brasil, v. 5, n. 2, p. 153–160, 2003.

COUTINHO, M. T.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet Parasitol**, Brasil, v. 147, n. 3–4, p. 320–325, 2007. ISSN: 03044017, DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.04.008.

CUTLER, G. C.; SCOTT-DUPREE, C. D. Novaluron: prospects and limitations in insect pest management. **Pest Technol.**, Canadá, v. 1, n. 1, p. 38–46, 2007.

CUTLER, G. C.; SCOTT-DUPREE, C. D.; TOLMAN, J. H.; HARRIS, C. R. Acute and sublethal toxicity of novaluron, a novel chitin synthesis inhibitor, to *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Pest Manag Sci**, Canadá, v. 61, p. 1060–1068, 2005. DOI: 10.1002/ps.1091.

DE MELO, D. R.; FERNANDES, É. K.; DA COSTA, G. L. SCOTT, F. B.; BITTENCOURT, V. R. Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to *Ctenocephalides felis felis*. **Ann N Y Acad sci**, Brasil, v. 1149, p. 388–390, 2008. ISBN: 9781573317146, ISSN: 17496632, DOI: 10.1196/annals.1428.009.

DRYDEN, M. Biology of fleas of dogs and cats. **Compendium of Continuing Education. Pract Vet**, v. 15, p. 569–579, 1993.

DRYDEN, M. W.; RUST, M. K. The cat flea: biology, ecology and control. **Vet. Parasitol.**, v. 52, n. 1–2, p. 1–19, 1994. ISSN: 03044017, DOI: 10.1016/0304-4017(94)90031-0.

ELBEL, R. Comparative studies on the larvae of certain species of fleas (Siphonaptera). **J Parasitol.**, v. 37, n. 2, p. 119-128, 1951.

EPA - Environmental Protection Agency. **Pesticide Fact Sheet**: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances: Novaluron. USA: EPA, 2001. 4 p.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Novaluron**: FAO Specifications and Evaluations for Novaluron: FAO, 2004. 25 p.

FAO; WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. **Pesticide Residues in Food**. Rome: FAO; WHO, 2005. 360 p.

FRANC, M.; BOUHSIRA, É.; BEUGNET, F. Direct transmission of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) between cats exhibiting social behaviour. **Parasite**, France, v. 20, n. 1, 2013. ISSN: 1252607X, DOI: 10.1051/parasite/2013050.

HALOS, L.; BEUGNET, F.; CARDOSO, L.; FARKAS, R.; FRANC, M.; GUILLOT, J. PFISTER, K.; WALL, R. Flea control failure? Myths and realities. **Trends Parasitol.**, v. 30, n. 5, p. 228–233, 2014. ISSN: 14715007, DOI: 10.1016/j.pt.2014.02.007.

IANNINO, F.; SULLI, N.; MAITINO, A.; PASCUCCHI, I.; PAMPIGLIONE, G.; SALUCCI, S. Fleas of dog and cat: species, biology and flea-borne diseases. **Vet Ital**, Italia, v. 53, n. 4, p. 277–288, 2017. ISSN: 18281427, DOI: 10.12834/VetIt.109.303.3.

JUNQUERA, P.; HOSKING, B.; GAMEIRO, M.; MACDONALD, A. Benzoylphenyl ureas as veterinary antiparasitics. An overview and outlook with emphasis on efficacy, usage and resistance. **Parasite**, v. 26, 2019. ISSN: 17761042, DOI: 10.1051/parasite/2019026.

KARHU, R.; ANDERSON, S. Effects of pyriproxyfen spray, powder, and oral bait treatments on the relative abundance of fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae) in black-tailed prairie dog (Rodentia: Sciuridae) towns. **J Med Entomol**, v. 37, n° 6, p. 864–871, 2000. ISSN: 00222585, DOI: 10.1603/0022-2585-37.6.864.

KHOOBDEL, M.; RANJBAR, R.; SENDI, J. J.; SHAYEGAN, D. A Effective and Safe Control of Plague-Carrying Fleas Using Insect Growth Regulators: A Review Study. **J Mil Med**, Iran, v. 23, n. 6, p. 529–540, 2021. DOI: 10.30491/JMM.23.6.529.

KRASNOV, B. R. Functional and Evolutionary Ecology of Fleas: A Model for Ecological Parasitology. **Cambridge University Press**, Cambridge, p. 593, 2008.

LEBON, W.; FRANC, M.; BOUHSIRA, E.; LIENARD, E.; MURRAY, M.; CARITHERS, D.; BEUGNET, F. Prevention of flea egg development in a simulated home environment by Frontline® Gold (fipronil, (S)-methoprene, pyriproxyfen) applied topically to cats. **Int. J. Appl. Res. Vet. Med.**, v. 16, n. 1, p. 67–73, 2018.

LEWIS, R. E. Resume of Siphonaptera (insecta) of the world. **J Med Entomol**, v. 35, n. 4, p. 377–389, 1998.

LINARDI, P. M. Biologia e epidemiologia das pulgas. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 13, p. 103–106, 2004.

LINARDI, P. M. Checklist dos Siphonaptera do Estado do Mato Grosso do Sul. **Iheringia Ser Zool**, Brasil, v. 107, p. 1–6, 2017. DOI: 10.1590/1678-4766e2017148.

LINARDI, P. M.; SANTOS, J. L. Ctenocephalides felis felis vs. Ctenocephalides canis (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, n. 4, p. 345–354, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000400002>.

MACHADO, M.; CAMPOS, D; LOPES, N.; BASTOS, I.; ALVES, M.; CORREIA, T.; SCOTT, F.; FERNANDES, J. Efficacy of afoxolaner in the flea control in experimentally infested cats. **Rev Bras Parasitol Vet**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 4, p. 760–763, 2019.

MAINA, A. N.; FOGARTY, C.; KRUEGER, L.; MACALUSO, K. R. ODHIAMBO, A.; NGUYEN, K.; FARRIS, C. M.; LUCE-FEDROW, A.; BENNETT, S.; JIANG, J.; SUN, S.; CUMMINGS, R. F.; RICHARDS, A. L. Rickettsial infections among ctenocephalides felis and host animals during a flea-borne rickettsioses outbreak in orange county, California. **PLoS ONE**, USA, v. 11, n. 8, p. 1–13, 2016. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0160604.

MCELROY, K. M. BLAGBURN, B. L.; BREITSCHWERDT, E. B.; MEAD, P. S. MCQUISTON, J. H. Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. **Trends Parasitol**, USA, v. 26, n. 4, p. 197–204, 2010. ISSN: 14714922, DOI: 10.1016/j.pt.2010.01.001.

MEOLA, R.; MEIER, K.; DEAN, S.; BHASKARAN, G. Effect of pyriproxyfen in the blood diet of cat fleas on adult survival, egg viability, and larval development. **J Med Entomol**, v.

37, n. 4, p. 503-506, 2000. DOI:10.1603/0022-2585-37.4.503.

PALMA, K.; MEOLA, S.; MEOLA, R. Mode of Action of Pyriproxyfen and Methoprene on Eggs of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **J Med Entomol**, v. 30, n. 2, p. 421-426, 1993. DOI:10.1093/jmedent/30.2.421

PATERSON, S. Canine flea control: too much choice? **Companion Anim**, v. 24, n. 9, p. 452-457, 2019. ISSN: 2053-0889, DOI: 10.12968/coan.2019.0041.

PENER, M. P.; DHADIALLA, T. S. **An Overview of Insect Growth Disruptors; Applied Aspects**. 1st. ed. Oxford: Elsevier, 2012. 531 p.

PERRINS, N.; HENDRICKS, A. Recent advances in flea control. **Companion Anim Pract**, v. 29, n. 4, p. 202-207, 2007. ISSN: 20427689, DOI: 10.1136/inpract.29.4.202.

RETNAKARAN, A.; WRIGHT, J. E. Control of insect pests with benzoylphenyl ureas. **Dr W Junk Publishers**, Dordrecht, p. 205-282, 1987.

RUST, M. K. The biology and ecology of cat fleas and advancements in their pest management: A review. **Insects**, v. 8, n. 4, 2017. ISSN: 20754450, DOI: 10.3390/insects8040118.

RUST, M. K.; WAGGONER, M.; HINKLE, N. C.; MENCKE, N.; HANSEN, O.; VAUGHN, M.; DRYDEN, M. W.; PAYNE, P.; BLAGBURN, B. L.; JACOBS, D. E.; BACH, T.; BLEDSOE, D.; HOPKINS, T.; MEHLHORN, H.; DENHOLM, I. Development of a larval bioassay for susceptibility of cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) to imidacloprid. **J Med Entomol**, v. 39, n. 4, p. 671-674, 2002. ISSN: 00222585, DOI: 10.1603/0022-2585-39.4.671.

RUST, M. K. Recent advancements in the control of cat fleas. **Insects**, v. 11, n. 10, p. 1-17, 2020. ISSN: 20754450, DOI: 10.3390/insects11100668.

RUST, M. K.; DRYDEN, M. W. The biology, ecology, and management of the cat flea. **Ann Rev Entomol**, v. 42, p. 451-473, 1997. ISSN: 00664170, DOI: 10.1146/annurev.ento.42.1.451.

RUST, M. K.; HEMSARTH, W. L. Synergism of the IGRs methoprene and pyriproxyfen against larval cat fleas (siphonaptera: Pulicidae). **J Med Entomol**, v. 53, n. 3, p. 629-633, 2016. ISSN: 19382928, DOI: 10.1093/jme/tjw010.

RUST, M. K.; HEMSARTH, W. L. Intrinsic Activity of IGRs and Insecticides Against Cat Fleas, 2016–2018. **Arthropod Manag Tests**, v. 45, n. 1, p. 2020, 2020. ISSN: 2155-9856, DOI: 10.1093/amt/tsz095.

RUST, M. K.; HEMSARTH, W. L. Synergism of adulticides and insect growth regulators against larval cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **J Med Entomol**, v. 56, n. 3, p. 790–795, 2019. ISSN: 19382928, DOI: 10.1093/jme/tjy239.

SAMISH, M.; ROT, A.; GINDIN, G.; MENT, D.; BEHAR, A.; GLAZER, I. Biocontrol of the cat flea, *Ctenocephalides felis*, by entomopathogenic nematodes and fungi. **Biol Control**, v. 149, p. 104–301, 2020. ISSN: 1049-9644, DOI: 10.1016/j.biocontrol.2020.104301.

SHAW, S. E.; KENNY, M. J.; TASKER, S.; BIRTLES, R. J. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. **Vet Microbiol**, v. 102, n. 3–4, p. 183–188, 2004. ISSN: 03781135, DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.06.013.

DA SILVA, H. C.; VERONEZ, V. A.; CASTAGNOLLI, K. C.; PRETTE, N.; BORGES, F.; MIYASAKA D. S.; OLIVEIRA, G. P.; DA COSTA, A. J. Implantation of a *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) colony and determination of the development period of the immature stages under controlled conditions. **Ambiência**, Brasil, v. 4, n. 3, p. 473–481, 2008. ISSN: 2175-9405.

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). **J Med Entomol**, v. 18, n. 1, p. 78–83, 1981. ISSN: 00222585, DOI: 10.1093/jmedent/18.1.78.

SULLIVAN, J. Environmental fate of pyriproxyfen. **Environmental Monitoring & Pest Management Branch**, p. 9, 2000.

SULLIVAN, J. J.; GOH, K. S. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. **J Pestic Sci**, v. 33, n. 4, p. 339–350, 2008. ISSN: 1348589X, DOI: 10.1584/jpestics.R08-02.

ZORZETTI, J.; CONSTANSKI, K.; SANTORO, P.; FONSECA, I.; NEVES, P. Growth regulator insecticides for the control of the lesser mealworm beetle *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Rev Col Entomol**, v. 41, n. 1, p. 24–32, 2015. ISSN 0120-0488.