

ATIVIDADE ECTOPARASITICIDA DE UMA NOVA FORMULAÇÃO (BENZOILFENILUREIA + ORGANOFOSFORADO) EM BOVINOS

ECTOPARASITICIDE ACTIVITY OF A NEW FORMULATION (BENZOYLPHENYLUREA +
ORGANOPHOSPHORADE) IN CATTLE

I. HARDT¹; L. V. C. GOMES²; D. P. MELO¹; C. BUZZULINI²; G. FELIPPELLI²;
M. A. F. ZUANAZE³; S. B. TOMA³; V. E. SOARES⁴; A. J. COSTA^{1*}

RESUMO

Os ectoparasitos *Rhipicephalus microplus*, *Dermatobia hominis* e *Haematobia hominis* constituem grande entrave à produtividade pecuária, fator agravado, sobretudo, pela aquisição de resistência medicamentosa a muitos princípios ativos. Com o objetivo de minimizar esse fenômeno, foram conduzidos quatro estudos clínicos com uma inédita formulação (benzoilfeniluréia + organofosforado). Para avaliação da atividade anti-ixodídica foram realizados ensaios com bovinos naturalmente e experimentalmente infestados. No primeiro, o índice de eficácia carrapaticida foi superior a 90% do 7º ao 28º DPT (Dias pós-tratamento). No “*Stall test*” (infestações artificiais), índice máximo de eficácia (100%) foi alcançado do 20º ao 47º DPT. A atividade mosquicida da nova formulação contra *Haematobia irritans* (infestação natural) manteve-se superior a 90% do 1º ao 14º DPT. Sobre larvas de *Dermatobia hominis*, observou-se efetividade superior a 90% do 7º ao 21º DPT. Pelos resultados obtidos nos quatro estudos realizados, pode-se recomendar a inédita formulação, na dose e via empregadas, no tratamento e controle de parasitos externos de bovinos.

PALAVRAS-CHAVE: *Rhipicephalus microplus*. *Dermatobia hominis*. *Haematobia irritans*. Fluazuron + Fenthion.

SUMMARY

The ectoparasites *Rhipicephalus microplus*, *Dermatobia hominis*, and *Haematobia hominis* are a major obstacle to livestock productivity, a factor that is aggravated above all by the acquisition of drug resistance to many active ingredients. With the aim of minimizing this phenomenon, four clinical studies were conducted with a new formulation (benzoylphenylurea + organophosphate). In order to assess the anti-ixodid activity, trials were carried out on naturally and experimentally infested cattle. In the former, the carrapaticidal efficacy index was over 90% from the 7º to the 28º DPT (Days post-treatment). In the “*Stall test*” (artificial infestations), the maximum efficacy rate (100%) was achieved from the 20º to the 47º DPT. The mosquicidal activity of the new formulation against *Haematobia irritans* (natural infestation) remained above 90% from the 1º to the 14º DPT. It was more than 90% effective against *Dermatobia hominis* larvae from the 7º to the 21º DPT. Based on the results obtained in the four studies carried out, the unprecedented formulation can be recommended, in the dose and route prescribed, for the treatment and control of external parasites in cattle.

KEY-WORDS: *Rhipicephalus microplus*. *Dermatobia hominis*. *Haematobia irritans*. Fluazuron + Fenthion.

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Campus de Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Zona Rural, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil.

² IPESA - Instituto de Pesquisas em Saúde Animal, Distrito Segredo, zona rural, s/n CEP: 35.570-000, Formiga, Minas Gerais, Brasil.

³ Biovet/Vaxxinova, Rua Cel. José Nunes dos Santos, 639 - Jardim Madalena, Vargem Grande Paulista - SP, 06730-000.

⁴ Universidade Brasil, Descalvado, São Paulo, Brasil.

*projetos@ipesa.com.br

INTRODUÇÃO

A capacidade de insetos e outros artrópodes de resistir aos efeitos letais dos fármacos após a exposição contínua foi reconhecida há quase um século e nas últimas décadas, tem sido o maior problema técnico dos programas de controle da agricultura, pecuária e saúde pública. O aparecimento da tolerância ao princípio ativo surge cronologicamente ao seu uso (Lopes et al., 2017). Estratégias para combater a constante aquisição de resistência dos ectoparasitos aos fármacos incluem: seleção apropriada de inseticidas, redução do número de tratamentos, o uso de rotação de praguicidas, novas moléculas ou a associação de moléculas que já existem (Blagburn & Lindsay, 2010). Essas medidas asseguram uma menor exposição do fármaco ao agente e desta forma diminuem a possibilidade de ganho de resistência ao composto. A descoberta de novos princípios tem sido bastante encorajada, porém, é importante tomar todas as diligências necessárias para preservar a vida útil dos agentes antiparasitários (Kunz & Kemp, 1994).

Em 2014, um levantamento econômico estimou que os parasitos geravam um déficit de 13,96 bilhões de dólares anuais para o Brasil. Esses gastos consideram a população de gado da época (212.797.824 cabeças), os principais ectoparasitos do país (*Rhipicephalus microplus*, *Haematobia irritans*, *Dermatobia hominis*, *Cochliomyia hominivorax* e *Stomoxys calcitrans*) e os endoparasitos. Também são discriminados gastos com diminuição da produção, tratamento, medidas de controle e pesquisa de novas moléculas. Entretanto, não estão incluídos os gastos referentes aos surtos, às doenças em que estes animais atuam como vetores, outras enfermidades nas quais eles facilitam a entrada, nem aqueles referentes à saúde pública (Grisi et al., 2014).

A magnitude desses fatores deixa bem evidenciado o quanto são necessárias precauções constantes sobre tal situação no Brasil. *R. microplus* ocupa a segunda posição em termos de gastos, perdendo apenas para a soma de todos os endoparasitos do país (Grisi et al., 2014). A infestação de carrapatos nos bovinos pode gerar perdas de 90 litros de leite por animal em cada lactação (Rodrigues e Leite, 2013) e o bovino pode emagrecer, em média, 1,18mg a 1,37mg por carrapato parasitado (Jonson, 2006). Esses fatos levaram a estimativa de que se gasta por ano 3.236.35 bilhões de dólares apenas com o *R. microplus* (Grisi et al., 2014).

Os outros ectoparasitos mais importantes para a pecuária, *H. irritans* (“mosca-dos-chifres”) e *D. hominis* (berne), também ocasionam prejuízos significativos. A estimativa de perda anual relacionada à infestação por “mosca-dos-chifres” está em torno de 2.558,32 bilhões de dólares anuais e a média de perda de peso por animal infestado é de 3kg nos adultos e 2kg nos jovens (Grisi et al., 2014). No que se refere ao berne, cada larva infestante tem a capacidade de diminuir 40,6g do ganho de peso (Magalhães & Lesskiu, 1982) e estima-se um gasto anual de 383,48 milhões de dólares (Grisi et al., 2014).

A quimioterapia, no presente, constitui-se, ainda, a forma mais efetiva de se combater ectoparasitos

(Sakamoto et al., 2013). Existem diversos grupos heterogêneos de agentes classificados com base em sua química ou mecanismo de ação (Blagburn & Lindsay, 2010). Mesmo com uma grande quantidade de moléculas disponíveis, o uso indiscriminado levou à seleção de parasitos resistentes, encontrados em todos os rebanhos (Lopes et al., 2017). Além disso, tais organismos possuem características intrínsecas que incluem medidas comportamentais e fisiológicas que geram assimilação reduzida, sob o organismo alvo, com metabolização do princípio ativo, por meio do aumento da atividade de enzimas, mudança dos canais de sódio axonais e genes específicos ativados (Blagburn & Lindsay, et al., 2010). As populações de parasitos que conseguem sobreviver à exposição de um princípio ativo terão proles e podem propagar resistência (Lopes et al., 2017).

Neste contexto, surge a necessidade de pesquisas que busquem novas moléculas (Lopes et al., 2017). Para isso, são necessárias pesquisas para o desenvolvimento de fármacos seguros para a saúde humana e animal e os tratamentos utilizados não devem prejudicar o produto final. A Secretaria de Defesa Animal (SDA) confeccionou um manual técnico a ser seguido para a execução dos estudos antiparasitários. Este deu origem a Portaria 48, publicada 12 de maio de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 1997). Neste documento delinear-se os passos e os experimentos que devem ser utilizados como metodologias para verificar a viabilidade de novos fármacos. Somados a isso as metodologias devem seguir a Lei Arouca nº 11.794 de 08 de Outubro de 2008, que prevê o manejo humanitário e científico dos animais, embasado no CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) (Brasil 2008). Deve-se acrescentar, ainda, que os requerimentos técnicos para registros de novos produtos veterinários, em âmbito internacional, são normatizados pelo Guia de Boas Práticas Clínicas Veterinárias da VICH (International Cooperation on Harmonisation of technical Requirements for Registration for Veterinary Medicinal Products) (VICH, 2017). Além destas premissas, deve haver avaliação e aprovação de uma Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA).

Por conseguinte, propõe-se avaliar (quatro estudos clínicos) uma nova formulação*, contendo benzoilfenilureia (Fluazuron 2,5%) e organofosforado (Fenthion 15%) com mecanismos de ação diferentes, contra importantes ectoparasitos de bovinos, no Brasil: *Rhipicephalus microplus*, *Haematobia irritans* e *Dermatobia hominis*.

Os Organofosforados englobam um grupo de diversas substâncias químicas com propriedades inseticidas, acaricidas, helminticidas, herbicidas e fungicidas (Blagburn & Lindsay, 2010). Seu mecanismo de ação se dá pelo princípio químico ligar-se e inibir, através de uma catalisação, colinesterases, principalmente a acetilcolinesterase (Santos et al., 2010). Acetilcolinesterase é uma enzima responsável por degradar o agente neurotransmissor: acetilcolina. Ação necessária para que haja um controle nos receptores, inibindo o estímulo inicial, e dessa forma, impedir uma hiperestimulação nas

*Vaxxinova

membranas pós-sinápticas (Vital & Acco, 2006). A ligação do organofosforado à acetilcolinesterase resulta em um excesso deste composto, que produz exaustão ou tetania no sítio de ação levando a letalidade de organismos alvo (Fukuto, 1990). É um potente inseticida liberado via *pour on* ou por etiquetas auriculares (EPA, 2001). De acordo com sua estrutura química podem ser subdivididos em fosforados, tiofosforados e clorofosforados, absorvidos por todas as vias possíveis, mas, preferencialmente a dérmica (Larini, 1987). Os organofosforados mais utilizados como antiparasitários são: metaminofós, dimixion, fenitroton, fenthion, fosfomet, triclofon, clorfenvinfos, clorpirifós, ethion e diazinon (Osweileir, 1998).

Enquanto a maioria dos acaricidas atua no sistema nervoso, uma nova categoria de substâncias que agem por outra via tem emergido no mercado. Este é o caso dos reguladores de crescimento dos artrópodes (Coop et al., 2002). Benzoilfenilureia é a molécula base que se insere neste contexto, com mecanismo de ação no metabolismo de quitina de organismos alvo (Van Eck, 1979). Este componente ativo atua por meio da inibição de enzimas específicas envolvidas no processo de ecdise de artrópodes (Kemp et al., 1990). Estudos bioquímicos focando o mecanismo de ação verificaram que a interferência não se dá diretamente sobre a quitina (Grosscurt, 1980), mas, sim por alguma modificação enzimática, provavelmente no transporte de polimerização da N-acetilglicosamina para quitina, reação que deve ocorrer na membrana plasmática celular (Mitsui et al., 1984). Considera-se como mecanismo alternativo à modificação de precursores de quitina. Devido à complexidade de eventos que ocorre antecedendo a formação da quitina, a ação exata pode encontrar-se em diversos sítios das vias metabólicas (Willems et al., 1986).

A quitina está presente na cutícula dos artrópodes (proteção mecânica e manutenção da permeabilidade) (Splinder, 1990), o mesmo material é responsável pelo invólucro dos ovos (Taylor, 2001) e também é encontrado na membrana peritrofica do intestino, que atua como barreira entre a digestão do bolo intestinal e os constituintes internos (You et al., 2003). Portanto, a interferência com o metabolismo da quitina leva a limitação da metamorfose e ecdise, interrompendo o ciclo do parasito (Splinder, 1990), não havendo formação de descendentes viáveis (Taylor, 2001), e o expõe a autodigestão (You et al., 2003). Considera-se que a letalidade dos microrganismos alvo se dá por desidratação, devido à alteração da cutícula e conseqüentemente perda de hemolinfa (Bull et al., 1996). Suas vantagens, como princípio ativo, são que seus componentes necessitam de baixas concentrações, o efeito residual longo e potente (Henderson & Foil, 1993), além de alta especificidade e baixa toxicidade a mamíferos (Splinder, 1990).

Esta associação medicamentosa avaliada é uma escolha de praticidade, que possibilita o tratamento concomitante contra insetos e ácaros, haja vista que os ectoparasitos nos bovinos a campo podem ocorrer frequentemente de forma simultânea (Costa et al., 2014). Para tal, foram realizados quatro estudos clínicos, de acordo com as normas e leis vigentes supracitadas.

Foram conduzidos quatro estudos clínicos, objetivando determinar os índices de eficácia terapêutica e residual contra *Rhipicephalus microplus* (infestações naturais e experimentais – I e II), *Haematobia irritans* (infestação natural - III) e por larvas de *Dermatobia hominis* (IV).

Faz-se necessário ressaltar que anteriormente à execução destes estudos foram realizados ensaios para avaliar a estabilidade das moléculas, a segurança clínica e inocuidade para bovinos frente à nova formulação. Todos os resultados obtidos foram compatíveis com o prosseguimento dos estudos aqui realizados. A formulação (benzoilfenilureia associada à organofosforado) foi fabricada e fornecida pelo Biovet/Vaxxinoa®, sendo administrada, via tópica (*pour on*), na região dorso-lombar, na dose única de 1 mL/10kg de peso corporal.

Todos os estudos propostos seguiram os padrões estabelecidos pelas diretrizes, normas e regulamentos que regem a liberação de antiparasitários no país, incluindo as questões éticas no uso de animais em pesquisas - CEUA da FCAV (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias) da UNESP (Universidade Estadual Paulista – Campus Júlio Mesquita Filho) de Jaboticabal, São Paulo. Os números dos protocolos da CEUA - FCAV/UNESP são os seguintes: estudo I (n° 1857/16), estudo II (n°1856/16), estudo III (n°1862/16) e estudo IV (n° 1858/16).

Foram selecionados 88 bovinos mestiços (zebuínos x taurinos) isentos de tratamentos acaricidas e endectocidas nos últimos 120 dias e vacinados contra importantes enfermidades (raiva, febre aftosa, clostridioses). Os estudos sobre eficácia em animais naturalmente e artificialmente infestados tiveram critérios específicos detalhados a seguir em cada item.

Os bovinos que se adequaram aos critérios foram realocados em baias ou piquetes, permanecendo em observação e adaptação por um período mínimo de duas semanas, antes de iniciarem as pesquisas. Os bovinos foram pesados para o cálculo preciso dos volumes a serem administrados inclusive no grupo controle. Nos estudos que avaliaram a eficácia da formulação em condições naturais de infestação pelos ectoparasitos, durante todo o período experimental, os bovinos foram mantidos em piquetes separados formados com a forrageira cultivada na propriedade. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*. Após o término dos estudos, os animais permaneceram na propriedade de origem em observação por mais 180 dias

Estudo I: Eficácia carrapaticida em bovinos naturalmente infestados por *Rhipicephalus microplus*

Este estudo clínico foi realizado na Fazenda 2P, localizada no município de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil. Foram utilizados 20 bovinos machos, mestiços (zebuínos x taurinos), com idade entre 18 e 36 meses. Para iniciar o estudo, os bovinos apresentavam infestação natural de no mínimo 20 parternóginas, no lado esquerdo.

Contagens de parternóginas, entre 4,5 a 8,0mm, presentes no lado esquerdo de cada bovino, foram realizados nos dias -3, -2 e -1. Estas avaliações constituíram

parâmetro para randomização dos grupos experimentais (10 bovinos cada): um tratado com a nova formulação (benzoilfenilurea + organofosforado) e o outro com veículo da formulação (controle).

No dia experimental zero (D0), os bovinos receberam, individualmente, as respectivas formulações destinadas aos dois grupos. Em seguida, os animais foram observados durante 60 minutos para detecção de eventuais alterações clínicas decorrentes da aplicação.

No 3º, 7º e semanalmente, após os tratamentos, foram quantificadas todas as parternóginas (4,5 mm e 8,0 mm), até o final do estudo (D+49). Estas quantificações foram utilizadas para calcular os percentuais de eficácias terapêutica e residual da nova formulação. Para isto, utilizou-se a fórmula preconizada pelo MAPA, Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), Portaria n.º 48, 12/05/1997:

$$\text{Percentual de eficácia} = \left[1 - \frac{T_a \times C_b}{T_b \times C_a} \right] \times 100$$

Em que:

Ta = número de parternóginas contadas dos animais tratados após a medicação;

Tb = número médio de parternóginas contadas dos animais tratados nos três primeiros dias anteriores ao tratamento;

Ca = número de parternóginas contadas dos animais controle no período após início do experimento;

Cb = número médio de parternóginas contadas dos animais controle nos três dias anteriores ao tratamento.

Estudo II: Eficácia contra *Rhipicephalus microplus* (Stall test)

Todas as etapas do estudo foram realizadas na Fazenda Bananal, pertencente ao IPESA – Instituto de Pesquisas em Sanidade Animal, localizada no distrito Segredo, Formiga, MG, onde havia animais disponíveis (critérios clínicos) e infraestrutura necessária para implantar o estudo.

Foram utilizados 12 bovinos mestiços, machos, entre oito e 10 meses de idade, que se enquadravam nos critérios de seleção. Os animais selecionados foram encaminhados às baias específicas, onde havia uma elevação do piso, e uma área de escoamento com uma peneira capaz de reter teleóginas, quando o recinto fosse lavado.

Os bovinos experimentais ficaram cinco semanas em adaptação e aclimação antes de iniciar o experimento. Na primeira semana, foram desverminados, via subcutânea, com fosfato de levamisol, 1 mL/40kg de peso corporal. Antes das infestações foram lavados com sabão neutro. Após 24 horas, os bovinos foram infestados, repetitivamente, três vezes por semana, com 5000 larvas (0,25g) de *Rhipicephalus microplus*, entre 14 e 28 dias de vida, até um dia antes do tratamento (D-1). Posteriormente, as infestações ocorreram duas vezes por semana. A cepa utilizada no experimento foi obtida de bovinos a campo e mantidas em BOD (28°C e 90% de UR).

Nos três dias anteriores ao tratamento, as baias foram lavadas e as teleóginas desprendidas dos animais foram quantificadas e o resultado anotado. As contagens também serviram como parâmetro para a randomização em

dois grupos, sendo que um recebeu a associação fluazuron 2,5% e fenthion 15% e o outro o veículo da formulação (grupo controle).

Os percentuais de eficácias terapêutica e residual foram calculados, de acordo com as quantificações de teleóginas desprendidas, diariamente, utilizando-se a fórmula preconizada pelo MAPA, SDA, Portaria n.º 48 (Brasil, 1997), ou seja, a mesma utilizada no estudo com infestação natural. Os índices de eficácia obtidos nas datas experimentais pós-tratamento, possibilitaram estimar a duração do efeito residual da nova formulação avaliada, quanto às reinfestações por *Rhipicephalus microplus*. O experimento encerrou-se quando a eficácia anti-ixodídica foi inferior a 80%, em duas contagens consecutivas (D+80).

Estudo III: Eficácia contra *Haematobia irritans*

O estudo foi conduzido na Fazenda São Francisco, localizada no município de Cajuru, São Paulo. Foram utilizados 30 bovinos mestiços (zebuínos x taurinos), com idade inicial de 18 a 24 meses, machos e fêmeas. Como critério para inclusão no estudo de eficácia contra *Haematobia irritans* o número de moscas, por bovino, foi de 50 em toda superfície corpórea, média de duas contagens consecutivas (Brasil, 1997). Contagens de *H. irritans* foram realizadas por duas pessoas, em todo o corpo de cada bovino, por dois dias consecutivos. Tomando por base as médias destas contagens, os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais (tratado e controle). Após pesagem e tratamento no dia zero, os bovinos foram observados por 120 minutos e realocados em piquetes separados com distância 5km entre os grupos. As contagens de *H. irritans* foram realizadas no 1º e 2º DPT (dia pós-tratamento) e repetidas semanalmente até o término, que ocorreu quando a eficácia da nova formulação foi inferior a 80%, em duas contagens consecutivas. Os percentuais de eficácias terapêutica e residual foram calculados em cada uma das datas de contagens, utilizando-se a fórmula preconizada pela Portaria 48, de 12/05/1997, de SDA, MAPA (Brasil, 1997):

$$\text{Percentual de eficácia} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

Em que:

a= número médio de moscas no grupo controle (nas respectivas datas de contagens).

b= número médio de moscas no grupo tratado.

Estudo IV: Efeito bernicida contra larvas de *Dermatobia hominis* (Berne)

O experimento foi realizado na Fazenda Bananal, município de Formiga, Minas Gerais. Para tanto, foram selecionados 20 bovinos entre 18 e 24 meses, machos, mestiços, naturalmente infestados. No que tange a infestação natural por larvas de *Dermatobia hominis*, cada bovino devia ter no mínimo, 10 nódulos larvados em toda a superfície corporal como critério de inclusão ao estudo.

Na data anterior ao tratamento (D-1), foram realizadas contagens de nódulos com larvas vivas de *D. hominis*, presentes em toda a extensão corpórea, mediante leve compressão dos mesmos (inspeção tátil-visual), objetivando a randomização dos dois grupos, com 10 bovinos cada. No dia seguinte (D0), os tratamentos foram realizados com os volumes calculados para cada indivíduo: veículo da formulação (grupo controle) e nova associação (grupo tratado). As contagens foram realizadas semanalmente, até que a eficácia da nova formulação fosse inferior a 80%. Das quantificações de bernes foram calculadas médias aritméticas e geométricas para determinação dos percentuais de eficácia terapêutica e residual da nova associação medicamentosa. Para tal cálculo, utilizou-se a seguinte fórmula estabelecida pela Portaria 48, 12/05/97, da SDA, MAPA (Brasil, 1997):

$$\text{Percentual de eficácia} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

Em que:

a= número médio de larvas vivas de *Dermatobia hominis* no grupo controle.

b= número médio de larvas vivas *Dermatobia hominis* no grupo tratado.

Análise estatística

O delineamento de cada estudo foi em parcela subdividida no tempo (“Split Plot in Time”), considerando-se como parcela principal os tratamentos e como parcela secundária, as datas de observação (Banzatto & Kronka, 1989).

Tabela 1 - Resultados das comparações múltiplas do número de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, entre 4,5 e 8,0 mm de comprimento, presentes no lado esquerdo de bovinos, naturalmente infestados, pertencentes aos grupos controle e tratado com benzoilfenilureia + organofosforado. Médias aritméticas e geométricas; percentuais de eficácia. São Carlos – SP, 2017.

Dias pós-tratamento	GI (Controle)			GII (Tratado)			Eficácia	
	Méd. Aritm.	Méd. Geom.	Aa	Méd. Aritm.	Méd. Geom.	Aa	M.A.	M.G.
0	33,07	31,04	Aa	33,53	30,35	Aa		
7	28,80	25,81	Aa	1,90	1,65	Bc	93,49	93,45
14	22,60	18,87	Aa	0,30	0,23	Be	98,69	98,75
21	22,90	20,42	Aa	0,70	0,47	Bde	96,99	97,63
28	23,30	19,96	Aa	1,60	1,26	Bcd	93,23	93,55
35	22,30	18,56	Aa	2,90	2,16	Bc	87,18	88,07
42	28,90	24,16	Aa	5,50	4,33	Bb	81,23	81,64
49	27,10	22,64	Aa	7,40	5,59	Bb	73,07	74,75

M.G.: Médias geométricas=antilog[1/n ∑ log(x+1)]-1 M.A.: Médias aritméticas. Zero = média das contagens nos dias -3, -2 e -1.

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t (p≥0,05).

2: Valor de F para o desdobramento de Grupos dentro de Período Experimental

3: Probabilidade de Significância para o valor de F

4: Valor de F para o desdobramento de Período Experimental dentro de Grupo.

Quantificações de fêmeas de *R. microplus* desprendidas, diariamente, dos bovinos experimentalmente infestados estão expressos na Tabela 2 (médias aritméticas e geométricas), assim como a avaliação estatística. As datas observacionais foram agrupadas a cada três dias para facilitar a interpretação dos

Os dados foram analisados utilizando-se a metodologia proposta por Little & Hills (1978), ou seja, transformados em log₁₀(x+1). As análises foram realizadas aplicando-se o teste F e as médias comparadas pelo teste estatístico adequado (SAS, 1996), adotando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Durante os estudos não foram observadas anormalidades clínicas decorrentes da administração da nova associação*, incluindo intoxicação sistêmica ou qualquer outro evento adverso. Nenhum animal necessitou de tratamento concomitante ou foi retirado do estudo antes de sua finalização ou veio a óbito.

Os resultados referentes às contagens de fêmeas de *Rhipicephalus microplus*, entre 4,5 mm a 8,0 mm de comprimento (parternóginas), localizadas no lado esquerdo dos bovinos naturalmente infestados, incluindo a análise estatística, estão inseridos na Tabela 1 (médias aritméticas, geométricas e percentuais de eficácia). Os índices da eficácia anti-ixodídica da formulação avaliada* no 7º DPT foram de 93,49% e 93,45%; no 14º DPT de 98,69% e 98,75%, no 21º DPT de 96,99% e 97,63%, no 28º DPT de 93,23% e 93,55%; no 35º DPT de 87,18% e 88,07%; no 42º DPT de 81,23% e 81,64% (médias aritméticas e geométricas, respectivamente). No 49º DPT o índice foi inferior a 80%, razão pela qual o estudo foi encerrado.

As contagens de carrapatos do grupo controle foram estatisticamente (P<0,05) superiores às do grupo medicado com a associação*, o que possibilita afirmar que a formulação inédita foi eficaz contra o *Rhipicephalus microplus* (Tabela 1).

resultados. Os percentuais de eficácia terapêutica e de persistência de eficácia da nova formulação avaliada*, calculados seguindo a metodologia preconizada pela Portaria nº 48, de 12/05/97, de SDA, MAPA (Brasil, 1997), estão ilustrados na Figura 1 (médias aritméticas e geométricas).

**Vaxxinoa

*

Tabela 2 - Resultados das comparações múltiplas do número de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* desprendidas de bovinos, experimentalmente infestados, pertencentes aos grupos Controle (GI), tratado com benzoilfenilureia + organofosforado (GII) e tratado com Fluazuron 2,5 % (GIII). Médias aritméticas e geométricas. Formiga - MG, 2017.

Dia pós-tratamento	GI (Controle)			GII (Tratado)			GIII (Flua. 2,5%)		
	Méd. Aritm.	Méd. Geom.		Méd. Aritm.	Méd. Geom.		Méd. Aritm.	Méd. Geom.	
0	35,89	32,36	Aa	36,06	33,23	Aab	35,89	34,45	Aa
1	35,83	33,95	Aa	41,17	36,94	Aa	25,50	24,63	Aa
4	37,50	35,28	Aa	47,83	44,41	Aab	35,50	35,10	Aa
7	29,83	27,73	Aa	33,33	23,92	Abc	22,83	21,07	Ab
10	24,33	20,37	Aa	25,17	14,89	Ac	19,80	18,74	Ab
13	24,67	19,49	Aa	21,50	9,35	Ade	13,00	10,54	Ac
16	28,17	25,01	Aa	3,67	2,15	Bfg	3,40	2,52	Bdef
19	22,33	21,67	Aa	1,17	0,82	Bh	0,00	0,32	Bg
22	25,00	24,33	Aa	0,00	0,00	Bh	0,00	0,00	Bg
25	32,67	29,17	Aa	0,00	0,00	Bh	0,00	0,00	Bg
28	33,50	29,78	Aa	0,00	0,00	Bh	0,00	0,00	Bg
31	36,17	33,13	Aa	0,00	0,00	Bh	0,00	0,00	Bg
34	35,50	32,48	Aa	0,00	0,00	Bh	0,00	0,00	Bg
37	25,50	23,82	Aa	0,00	0,00	Bh	0,00	0,00	Bg
40	27,33	26,70	Aa	0,00	0,00	Bh	0,00	0,00	Bg
43	37,33	23,44	Aa	0,00	0,00	Bh	0,00	0,00	Bg
46	40,33	34,68	Aa	0,00	0,00	Bh	0,00	0,00	Bg
49	42,67	36,23	Aa	1,50	0,91	Bfgh	2,00	1,64	Bde
52	45,83	39,64	Aa	1,67	1,04	Bfgh	2,60	2,10	Bdef
55	36,00	32,28	Aa	1,17	0,65	Bgh	1,20	0,89	Bef
58	35,67	32,78	Aa	1,33	0,71	Bgh	1,60	1,05	Bf
61	31,50	29,79	Aa	1,33	0,70	Bgh	1,20	1,05	Bef
64	35,33	31,69	Aa	0,83	0,51	Bgh	1,00	0,89	Bf
67	36,83	33,06	Aa	0,83	0,51	Bgh	1,20	1,05	Bdef
70	35,33	31,84	Aa	1,50	0,74	Bfgh	1,40	1,22	Bdef
73	32,33	29,71	Aa	2,17	0,82	Bfgh	2,40	1,99	Bd
76	33,17	29,86	Aa	4,50	1,23	Ref	5,00	4,63	Bc
79	31,67	29,25	Aa	10,17	7,67	Bcd	10,60	10,27	Bb

Zero = média das contagens nos dias -3, -2 e -1; Médias geométricas= $\text{antilog}[1/n \sum \log(x+1)]-1$ M.A.: Médias aritméticas

.1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t ($p \geq 0,05$).

2: Valor de F para o desdobramento de Grupos dentro de Período Experimental

3: Probabilidade de Significância para o valor de F

4: Valor de F para o desdobramento de Período Experimental dentro de Grupo.

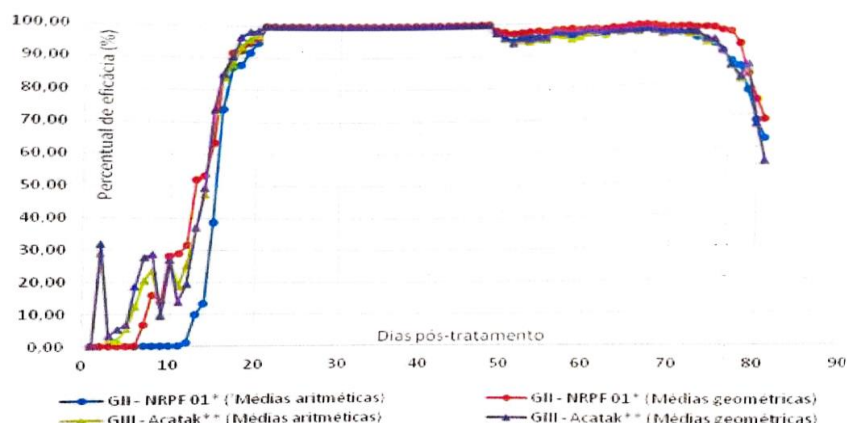


Figura 1 - Percentuais de eficácia das comparações múltiplas do número de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* desprendidas de bovinos, experimentalmente infestados, pertencentes aos grupos controle (GI), tratado com benzoilfenilureia + organofosforado (GII) e tratado com Fluazuron 2,5% (GIII). Formiga – MG, 2017.

A associação* proposta (benzoilfenilurea + organofosforado) alcançou valores de eficácia superiores a 70% do 15º ao 79º DPT. O índice máximo de eficácia (100%) foi registrado do 20º ao 47º DPT, ou seja, ao longo de 28 dias consecutivos pós-tratamento.

Analisando a Tabela 2, verifica-se que as quantificações de teleóginas desprendidas dos grupos medicados foram estatisticamente ($P < 0,05$) inferiores às do grupo mantido como controle do 16º - 18º até as últimas datas experimentais (79º-80º DPT).

Os resultados referentes às contagens de “moscudos-chifres” (*Haematobia irritans*), presentes nos bovinos

de cada grupo experimental e os percentuais de eficácia terapêutica, estão registrados na Tabela 3. De acordo com a referida tabela, verifica-se que a formulação avaliada* alcançou eficácia mosquicida máxima de 99,96% (média aritmética) no 1º DPT. No 3º DPT, os índices de eficácia foram de 99,86% e 99,87%; no 7º DPT de 99,85% e 99,83%. No 14º DPT houve ligeiro declínio dos percentuais, atingindo 95,52% e 93,19% (médias aritméticas e geométricas). No dia 21º DPT e 28º DPT, os índices de eficácia foram inferiores a 80%, encerrando-se estudo.

Tabela 3 - Resultados das comparações múltiplas do número de *Haematobia irritans* presentes no corpo de bovinos, naturalmente infestados, pertencentes aos grupos controle e tratado com benzoilfenilureia + organofosforado. Médias aritméticas e geométricas; e percentuais de eficácia. Cajuru – SP, 2017.

Dias pós-tratamento	GI (Controle)			GII (Tratado)			Eficácia	
	Méd. Aritm.	Méd. Geom.		Méd. Aritm.	Méd. Geom.		M.A.	M.G.
0	237,27	132,27	Aa	236,57	139,39	Aa		
1	152,60	106,61	Aa	0,07	0,05	Be	99,96	99,96
3	140,73	101,34	Aa	0,20	0,13	Be	99,86	99,87
7	180,73	106,25	Aa	0,27	0,18	Be	99,85	99,83
14	166,80	97,27	Aa	7,47	6,62	Bd	95,52	93,19
21	168,67	96,40	Aa	35,93	28,58	Bc	78,70	70,35
28	179,93	100,24	Aa	67,20	53,32	Bb	62,65	46,81

M.G.: Médias geométricas= $\text{antilog}[1/n \cdot \log(x+1)]-1$ M.A.: Médias aritméticas

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t ($p \geq 0,05$).

2: Valor de F para o desdobramento de Grupos dentro de Período Experimental

3: Probabilidade de Significância para o valor de F

4: Valor de F para o desdobramento de Período Experimental dentro de Grupo.

A análise estatística efetuada (Tabela 3) possibilita afirmar que as quantificações de *Haematobia irritans* presentes, em cada data, no grupo controle foram estatisticamente ($P < 0,05$) superiores às do grupo medicado, durante todo o período experimental.

As contagens de nódulos contendo larvas vivas de *Dermatobia hominis*, localizados em todo corpo dos

bovinos experimentais (médias aritméticas e geométricas), incluindo os percentuais de eficácia terapêutica e a análise estatística estão registrados na Tabela 4. Analisando a Tabela 4 verifica-se que os números de larvas de *Dermatobia hominis* no grupo controle foram superiores aqueles quantificados nos animais tratados, ao longo de todo o estudo.

Tabela 4 - Resultados das comparações múltiplas do número de *Dermatobia hominis* presentes no corpo de bovinos, naturalmente infestados, pertencentes aos grupos controle e tratado com benzoilfenilureia + organofosforado. Médias aritméticas e geométricas; e percentuais de eficácia. Formiga – MG, 2017.

Dias pós-tratamento	GI (Controle)			GII (Tratado)			Eficácia	
	Méd. Aritm.	Méd. Geom.		Méd. Aritm.	Méd. Geom.		M.A.	M.G.
-1	24,00	22,26	Aa	24,20	21,94	Aa		
7	28,40	26,32	Aa	2,10	1,51	Bcd	92,61	94,25
14	29,40	27,93	Aa	1,60	1,17	Bd	94,56	95,81
21	29,80	28,34	Aa	1,90	1,45	Bcd	93,62	94,89
28	33,10	31,60	Aa	4,30	2,54	Bcd	87,01	91,96
35	32,40	30,52	Aa	5,90	3,50	Bcd	81,79	88,52
42	34,30	32,50	Aa	9,80	6,43	Bb	71,43	80,23

M.G.: Médias geométricas= $\text{antilog}[1/n \cdot \log(x+1)]-1$ M.A.: Médias aritméticas

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t ($p \geq 0,05$).

2: Valor de F para o desdobramento de Grupos dentro de Período Experimental

3: Probabilidade de Significância para o valor de F

4: Valor de F para o desdobramento de Período Experimental dentro de Grupo.

*

Os percentuais de eficácia revelam que a nova associação* alcançou índices máximos de eficácia de 94,56% e 95,81% no 14º DPT (médias aritméticas e geométricas, respectivamente). Os índices no 7º DPT foram de 92,61% e 94,25%; no 21º de 93,62% e 94,89%; no 28º de 87,01% e 91,96% e no 35º de 81,79% e 88,52% (médias aritméticas e geométricas, respectivamente). No 42º DPT, o índice de eficácia bernicida foi inferior a 80% (médias aritméticas), possibilitando o encerramento do estudo.

DISCUSSÃO

Todos os bovinos experimentais foram mantidos em boas condições gerais de saúde, não sendo observados eventos adversos e não houve necessidade de tratamento concomitante ao longo de cada um dos quatro estudos conduzidos. Adicionalmente, não foram observadas reações dermatológicas no local da aplicação do fármaco avaliado, em nenhum dos bovinos experimentais, decorridos até 180 dias pós-experimento, período no qual os bovinos foram mantidos em monitoração.

A Portaria 48 (Brasil, 1997), que rege as metodologias para estudos com antiparasitários, preconiza que, para ser considerado um fármaco eficaz como carrapaticida, em teste a campo, deve apresentar índices médios no 7º e 14º DPT de $\geq 95\%$. No estudo I (Tabela 1), os percentuais médios de eficácia foram de 96,09% e 96,10% (médias aritméticas e geométricas, respectivamente).

A atividade bernicida deve ser no mínimo de 90% no 7º DPT. No estudo IV, a referida associação* alcançou 92,61% e 94,25% de eficácia. Posto isto, verifica-se que ela atendeu as exigências do MAPA (Brasil, 1997). Faz-se necessário considerar que não há exigência específica para mosquicidas (Brasil, 1997), mesmo assim, a nova associação medicamentosa atingiu valores significativos de eficácia.

No experimento II, em que se utilizou infestação artificial com o *R. microplus*, a formulação avaliada* não atenderia a exigência mínima de eficácia (95%, média nos primeiros 23 DPT) (Brasil, 1997). As médias da formulação fluazuron 2,5% + fenthion 15% foram de 39,04% e 50,13% (médias aritméticas e geométricas, respectivamente). Devido às particularidades de metabolização de Fluazuron, sua eficácia é considerada mais lenta (Maciel et al., 2016). Tal composto (inibidores do crescimento) necessita que os ácaros entrem na fase de ecdise para manifestarem os primeiros indícios de eficácia (Holdsworth et al., 2006). Portanto, a exigência do MAPA (Brasil, 1997) não pode ser aplicada aos princípios ativos que pertencem ao grupo Benzoilfenilureia.

O fluazuron interrompe o ciclo de vida do carrapato, em diferentes estádios, interferindo na formação da quitina: impossibilita a ecdise para o próximo ínstar; inibe o desenvolvimento total dos ovos, ou originam larvas recém-eclodidas inviáveis, durante aproximadamente duas semanas (Graf, 1993).

O fluido de ecdise contém proteases e quitinases que digerem a endocutícula velha cujos componentes são

reciclados. A formação da nova cutícula começa após o espaço de ecdise se abrir como resultado da secreção das proteínas da cutícula e fibras de quitina pelas membranas apicais das células epidermais. Há formação de uma nova cutícula quitinosa não esclerotizada, a procutícula e da epicutícula externa. Esta fecha a epiderme e a protege contra enzimas digestivas do fluido de muda. Finalmente, ocorre a ecdise, saída da cutícula antiga. No final da ecdise ou imediatamente após este processo, o inseto expande a nova cutícula antes de seu enrijecimento por esclerotização (Chapman, 1982; Merzendorfer & Zimoch, 2003). Dessa forma o crescimento e o desenvolvimento são totalmente dependentes da capacidade dos artrópodes de remodelar estruturas quitinosas. Eles sintetizam e degradam a quitina de forma altamente controlada para permitir não somente a ecdise, mas também a regeneração da membrana peritrófica presente no epitélio do intestino médio e importante para o processo de digestão de alimentos e proteção contra patógenos (Merzendorfer; Zimoch, 2003).

De acordo com Graf (1993), os benzoilfenilureias também apresentam um efeito transovariano, pois fêmeas de insetos adultos produzem ovos cujo processo de desenvolvimento é normal, mas a larva fica incapacitada de eclodir. Isso porque, qualquer interferência na ação dos hormônios envolvidos nos processos de muda e desenvolvimento, seja por fontes exógenas de hormônios ou de seus análogos sintéticos, poderia resultar na interrupção ou até mesmo, anormalidade no desenvolvimento e reprodução de insetos (Hoffmann; Lorenz, 1998). Portanto, são necessárias diversas etapas para ação de inibição de crescimento e descendentes viáveis. Tal fato confirma que o fluazuron requer mais tempo para reduzir as populações de parasitos, quando comparados aos parasiticidas convencionais. Este grupo químico não apresenta efeito “knockdown” sobre *R. microplus*, mas, atua de forma lenta e gradual, interferindo no seu crescimento e desenvolvimento. Por isso, é recomendado que sejam utilizados em combinação com adulticidas para alcançar o efeito “knockdown” imediato (Graf et al., 2004), como no caso da nova formulação* que contém fenthion 15%.

Fármacos com mecanismos de ação mais lentos devem conter em seu rótulo, a indicação do tempo requerido para o efeito carrapaticida, neste caso, de acordo com critérios gerados em pesquisas científicas (Holdsworth et al., 2006). Seguindo esta sugestão, estabeleceu-se que os Benzoilfenilureias devem alcançar eficácia acaricida a partir do 14ºDPT (Cruz et al., 2014; Gomes et al., 2015; Maciel et al., 2016). Do 15º DPT ao 78º DPT, a referida associação alcançou percentuais de eficácia superiores a 80% (Tabela 2, Figura 1) o que possibilita inferir que a nova formulação é eficaz contra o *R. microplus* (Maciel et al., 2016).

O amplo espectro de ação dos organofosforados e dos benzoilfenilureias inclui eficácia contra uma ampla variedade de insetos da ordem Diptera, entre outras (Fukuto, 1990; Kunz & Kemp, 1994; Blagburn & Lindsay, 2010).

A resistência do *Rhipicephalus microplus* a ectoparasiticidas é largamente estudada em bovinos

*Vaxxinova

*

brasileiros (Raynal et al., 2020; Vilela et al., 2020; Valsoni et al., 2021; Santos et al., 2022; Ferreira et al., 2022). Apesar de relatos de ixodídeos resistentes à acaricidas em todas as categorias de fármacos, considera-se que o fluazuron é infrequente e aparentemente em estágio inicial (Valsoni et al., 2021), sendo em algumas regiões, como no semiárido, seu uso recomendado (Vilela et al., 2020). Já os organofosforados, atualmente, tem oscilações dentro de fazendas em consequência do seu histórico de uso, agravado por tratamentos inadequados (Lovis et al., 2013), porém, os relatos atuais não atribuem resistência diretamente ao fenthion (Santos et al., 2022).

Embora de menor impacto, a resistência de outros artrópodes, como *D. hominis* (Neves et al., 2015) e *H. irritans* (Temeyer et al., 2008), frente aos fármacos ectoparasiticidas, também é de suma importância na pecuária. Embora existam crescentes casos de resistência a princípios ativos mosquicidas, pode-se considerar que o uso de organofosforados, ainda, alcança bons índices de eficácia. Há uma preocupação com resistência cruzada por piretroides (Guglielmoni et al., 2001), alguns indícios de resistência ao dianizol (Temeyer et al., 2008) e, mais recentemente, à lactonas macrocíclicas. *D. hominis* é capaz de infestar humanos e o crescente uso indiscriminado de lactonas macrocíclicas pode ter contribuído para o aumento de resistência. Esse grupo, por atuar contra endoparasitoses, tem sido bastante difundido na bovinocultura (Conde et al., 2020). Avermectinas e milbemicinas, atualmente, são relatadas em muitos casos de resistência (Raynal et al., 2020; Vilela et al., 2020; Valsoni et al., 2021; Santos et al., 2022; Ferreira et al., 2022).

Posto isto, pode se inferir que a nova formulação* (fluazuron + fenthion) alcançou bons resultados nos quatro estudos a campo, com populações brasileiras de carrapatos, moscas e bernes, realizados na região sudeste do país e, utilizando-se bovinos naturalmente e experimentalmente infestados. As recentes pesquisas com relação ao perfil de resistência a fármacos contra *Rhipicephallus* (*Boophilus*) *microplus*, *Haematobia irritans* e larvas de *Dermatobia hominis*, em bovinos de rebanhos brasileiros, sugerem que a nova formulação poderá ser uma viável alternativa. A associação* (Fluazuron 2,5% + Fenthion 15%), utilizada nos quatro estudos clínicos, foi desenvolvida e está sendo recentemente comercializada pela Vaxxinova.

Os resultados alcançados nos quatro estudos clínicos conduzidos possibilitam inferir que a inédita associação, Fluazuron 2,5% + Fenthion 15%⁵ foi eficaz contra importantes ectoparasitos de bovinos no Brasil (carrapatos, bernes e “mosca-dos-chifres”) possuindo, assim, promissoras perspectivas de sucesso no tratamento e controle de tais ectoparasitoses.

REFERÊNCIAS

BANZATO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação Agrícola**. Jaboticabal, FUNEP, 1989.

BLAGBURN, B.L.; LINDSAY, D. Ectoparasiticidas. Em: ADAMS H.R. **Farmacologia e Terapêutica em**

Veterinária. 8ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.851-870, 2010.

BRASIL. Lei nº 11.794, de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n.196, p.1, 9 de outubro. 2008. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 48 de 12 de maio de 1997. **Diário Oficial (da) União. Brasília**, 12 de maio de 1997. Seção I, n.92, p.10165-10169.

BULL, M. S.; OVEREND, D.; HESS, E. A. Suresion of *Boophilus microplus* populations with fluazuron - an acarine growth regulator. **Australian Veterinary Journal**, v.74, p.468-470, 1996.

CHAMPMAN, R. F. The insects: structure and function. 3rd ed. Cambridge, Massachuset: **Havard University Press**. p.919, 1982.

CONDE, M. H.; BORGES, D. G.; FREITAS, M. G.; SILVA, M. C.; BORGES, F. A. First report of *Dermatobia hominis* resistant to doramectin in cattle. **Veterinary Parasitology** 2020 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109335>.

COSTA, M. S. F.; GUIMARÃES, M. P.; LIMA, W. S.; COSTA, A. J. F.; FACURY FILHO, E.J.; ARAUJO, R. N. Seasonal variation and frequency distribution of ectoparasites in crossbreed cattle in Southeastern Brazil. **Journal of Veterinary Medicine**, p.1-8, 2014.

COOP, R. L.; TAYLOR, M. A.; JACOBS, D. E.; JACKSON, F. Ectoparasites: Recent advances in control. **Trends Parasitology**, v.18, p.55-56, 2002.

CRUZ, B. C.; LOPES, W. D. Z.; MACIEL, W. G.; FELLIPELLI, G.; TEIXEIRA, W. F. P.; FAVERO, F. C. Effect of spray formulation on the reproductive parameters of a susceptible population of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* to ivermectin(200, 500 and 630mg/kg) in field studies in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.207, p.309-317, 2014.

EPA – United States Environmental Protection Agency. **Interim registration eligibility decision for fenthion**, p.1-98, 2001.

FERREIRA, L. C.; LIMA, E. F.; SILVA, A. L. P.; OLIVEIRA, C. S. M.; SILVA-FILHO, G. M.; SOUSA, L. C.; KLAFKE, G. M.; FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R. Cross-resistance between macrocyclic lactones in populations of *Rhipicephalus microplus* in Brazil's semi-arid region. **Experimental Applied Acarology**,

⁵Fusion – Vaxxinova.

87(1):109-117. doi: 10.1007/s10493-022-00730-x Epub Jul 2022 11.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environment Health Persp.** v.87, p.245-254, 1990.

GOMES, L. V. C.; LOPES, W. D. Z.; CRUZ, B. C.; TEIXEIRA, W. F.; FELIPPELLI, G.; MACIEL, W. G.; BICHUETTE, M. A.; RUIVO, M.A.; COLLI, M. H. A.; CARVALHO, R. S.; MARTINEZ, A. C.; SOARES, V. E.; COSTA, A. J. Acaricidal effects of Fluzuron (2.5 mg/kg) and a combination of fluzuron (1.6mg/kg) + ivermectin (0.63mg/kg), administered at different routes, against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitizing cattle. **Experimental Parasitology**, v.153, p.22-28, 2015.

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

GRAF, J. F. R.; GOGOLEWSKI, N.; LEACH-BING, G. A.; SABATINI, M. B.; MOLENTO, E. L.; BORDINI ARANTES, G. J. Tick control "an industry point of view". **Parasitology**, 2004. v.129, n.1, p.427-442.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LÉON, A. AP.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal Parasitology**, v.23, n.2, p.150-156, 2014.

GROSSCURT, C. Effects of diflubenzuron on some chemical and mechanical properties of the elytra of *Leptinotarsa decemlineata*. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie Wetensch.** Amsterdam 83C: v.143, 1980.

GUGLIELMONE, A. A.; CASTELLI, M. E.; VOLPOGNI, M. M.; MEDUS, P. D.; MARTINS, J. R.; SUÁREZ, V. H.; ANZIANI, O.S.; MANGOLD, A. J. Toxicity of cypermethrin and diazinon to *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in its American Southern range. **Veterinary Parasitology**, v.110, p.67-73, 2001.

HENDERSON, G.; FOIL, L. Efficacy of diflubenzuron in simulated households and yard conditions against the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) (Siphonoptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v.30, p.619-621, 1993.

HOFFMAN, K. H.; LORENZ, M. Recent advances in hormones in Pest control. **Phytoparasitica**, v.26, n. 4, p.1-8, 1998.

HOLDSWORTH, P. A.; KEMP, D.; GREEN, P.; PETER, R. J.; DE BRUIN, C.; JONSSON, N. N. World Association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) Guidelines for evaluation the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminantes. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.29-43, 2006.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v.137, n.1-2, p.1-10, 2006.

KEMP, D. H.; HUGHES, S.; BINNINGTON, K. C.; BIRD, P. E. E.; NOLAN, J.; Bull Soc. In: **Journal Parasitology**, v.8, p.1048, 1990.

KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and environment impact. **Reveu Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v.13, p.1249-1286, 1994.

LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Manole, p.315, 1987.

LITTLE, T. M.; HILLS, F. J. **Agricultural experimentation designs and analyses**. Willey, New York, p.350, 1978.

LOPES, W. D. Z.; PINHEIRO, G.; BORGES, F. A.; COSTA, A. J.; VULCANI, V. A. S.; LIMA, C. R. O. Terapia anti-helmintica. LOPES, W. D. Z.; COSTA, A. J. **Endoparasitoses de ruminantes**. Editora UFG, p.1-46, 2017.

LOVIS, L.; MENDES, M. C.; PERRET, J. L.; MARTINS, J. R.; BOUVIER, J.; BETSCHART, B.; SAGER, H. Use of the larval test to determine acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Brazilian field populations. **Veterinary Parasitology**, v.191, p.323-331, 2013.

MACIEL, W. G.; LOPES, W. D. Z.; GOMES, L. V. C.; CRUZ, B. C.; FELIPPELLI, G.; SANTOS, I. B. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to fluzuron (2.5mg/kg) and a combination of novaluron (2.0mg/kg) + eprinomectin (0.36mg/kg) in Field studies in Brazil. **Preventive Veterinary Medical**, v.135, p.74-86, 2016.

MAGALHÃES, F. E. P.; LESSIKU, C. Efeito do controle do berne sobre o ganho de peso e qualidade dos couros em novilhos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, n.2, p.329-336, 1982.

MERZENDOFER, H.; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **The Journal of Experimental Biology**. Cambridge, v.206, p.4393-4412, 2003.

MITSUI, T.; NOBUSAWA, C.; FUKAMI J. Mode of inhibition of chitin synthesis by diflubenzuron in cabbage armyworm **Journal of Pesticide Science**, v.9, p.1, 1984.

NEVES, J. H.; CARVALHO, N.; AMARANTE, A. F. T. *Dermatobia hominis*: Potencial risk of resistance to macrocyclic. **Veterinary Parasitology**, v.212, p.483-486, 2015.

OSWEILEIR, G. D. **Toxicologia Veterinária**. Porto Alegre: **Artes Médicas**, p.536, 1998.

- RAYNAL, J. T.; BASTOS, B. L.; SILVA, M. C.; BAHIENSE, T. C.; MEYER, R.; PORTELA, R. W. Acaricide efficacy against a Brazilian *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* isolated field population over a five-year period. **Pub Vet**, v.14, n.4, a546, p.1-3, Abr., 2020.
- RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decrease milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.5, p.1570-1572, 2013.
- SAKAMOTO, C. A. M.; LOPES, W. D. Z.; BUZULINI, C.; CRUZ, B. C.; FELIPPELLI, G.; LIMA, R. C. A. et al. Anthelmintic efficacy of an oral formulation of Aurixazol against gastrointestinal nematodes of naturally and experimentally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, v.198, p.336-344, 2013.
- SANTOS, M. L.; FIORINI, L. C.; DUARTE, F. C.; ANJOS, K. A.; NASSAR, A. C. F.; BRITO, L. G.; PEREIRA, J. R.; MENDES, M. C. Resistance profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to diazinon and cypermethrin and first report of sodium channel mutation – domain III S6- T2134A, in field samples from the state of Sao Paulo, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.74, n.3, p.473-482, 2022.
- SANTOS, T. R.; MENDONÇA, R. P.; LOPES, W. D. Z.; BUZULINI, C.; CRUZ, B. C.; FELIPPELLI, G.; TEIXEIRA, W. F. Atividade anti-ixodídica de uma nova formulação contendo Fluazuron 3,0% + Abamectina 0,5% em bovinos experimentalmente infestados por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **A Hora Veterinária**, v.7, p.18-21, 2010.
- SAS Institute. **The SAS system for window: version 6.12** (compact disc), Cary, NC, USA. Institute, 1996.
- SPINDLER, K.; SPINDLER-BARTH, M.; LONDERSHAUSEN, M. Chitin metabolism: a target for drugs against parasites. **Parasitol Research**, v.76, p.283-288, 1990.
- TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasitocides. **The Veterinary Journal**, v.161, n.3, p.253-268, 2001.
- TEMEYER, K. B.; LI, Y. A.; LOHMEYER, K. H.; CHEN, A. C.; OLAFSON, P.U.; SANSON, D. W.; FOIL, L. D. Acetylcholinesterase mutation in diazinon-resistant *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). **Veterinary Parasitology**, v.154, p.300-310, 2008.
- VALSONI, L. M.; FREITAS, M. G.; BORGES, D. G. L.; BORGES, F. A. Status of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin, fipronil and fluazuron in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**. 2021. v.30, n.1, e025220. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120201091>.
- VAN ECK, W. H. Mode of action of two benzoylphenylurea as inhibitors of chitin synthesis in insects. **Insect Biochemistry**, v.9, p.295-300, 1979.
- VICH- International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. **Target animal safety for veterinary pharmaceutical products – GL43**, 2017.
- VILELA, V. L. R.; FEITOSA, T. F.; BEZERRA, R. A.; KLAFKE, G. M.; RIET-CORREA, F. Multiple acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. **Tick and Tick-borne diseases**. 11 (2020) 101413. Vital MABF e Acco A. Agonistas e antagonistas colinérgicos. Em: Spinosa HS, Górniak SL, Bernardi MM. **Farmacologia Aplicada a Veterinária** 4ªed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ. p.67-80, 2006.
- WILLEMS, A. G. M.; BROUWER, M. S.; JONGSMA, B. Benzoylaryl ureas insecticides: compounds interfering with chitin synthesis. Em: Muzzarelli R, Jeuniaux C, Gooday GW. **Chitin in Nature and Technology**. Section III. Library of Congress in Publication Data (3rd 1985: Anaconda, Italy). Plenum Press, ova Iorque, p.131-138, 1986.
- YOU, M.; XUAN, X.; TSUJI, N.; KAMIO, T.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Identification and molecular characterization of a chitinase form the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.8556-8563, 2003.