

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

**Depleção de resíduos, segurança clínica e atividade
endectocida de uma nova formulação (benzoilfenilureia +
fenilpirazol + lactona macrocíclica) em bovinos (sete
estudos clínicos)**

**Daniel Pacheco Melo
Médico Veterinário**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

Depleção de resíduos, segurança clínica e atividade endectocida de uma nova formulação (benzoilfenilureia + fenilpirazol + lactona macrocíclica) em bovinos (sete estudos clínicos)

Daniel Pacheco de Melo

Orientador: Prof. Dr. Alvimar José da Costa

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

2024

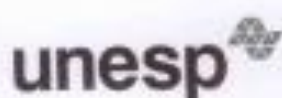
M528d Melo, Daniel Pacheco de
Depleção de resíduos, segurança clínica e atividade endectocida de uma nova formulação (benzoilfenilureia + fenilpirazol + lactona macrocíclica) em bovinos (sete estudos clínicos) / Daniel Pacheco de Melo. -- Jaboticabal, 2024
57p. : il., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Alvimar José da Costa

1. Ectoparasitas. 2. Parasitologia veterinária. 3. Helmintos. 4. Farmacologia veterinária. 5. Controle. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DEPLEÇÃO DE RESÍDUOS, SEGURANÇA CLÍNICA E ATIVIDADE ENDECTOCIDA DE UMA NOVA FORMULAÇÃO (BENZOLFENLUREIA + FENILPRAZOL + LACTONA MACROCÍCLICA) EM BOVINOS (SETE ESTUDOS CLÍNICOS)

AUTOR: DANIEL PACHECO DE MELO
ORIENTADOR: ALVIMAR JOSÉ DA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, área: Saúde Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALVIMAR JOSÉ DA COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / FMVA UNESP Araçatuba

Documento assinado digitalmente
KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
CPF: 11.090.994-34/000-0000
Instituição: FMVA UNESP Araçatuba

Profa. Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES
CPF: 22.082.004-71/000-0000
Instituição: FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 29 de maio de 2024

Dados curriculares do autor

Daniel Pacheco de Melo, filho de Antônia Elizabete Melo Pacheco e Erothides Pacheco Filho, nascido em 03 de dezembro de 1983, em Formiga - MG, Brasil, cursou o ensino fundamental e o médio em Formiga - MG.

Iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária em 2006, no Centro Universitário de Formiga Mg Unifor MG, finalizando em dezembro de 2010.

Desempenhou estágio curricular na Intervet Schering-Plough entre junho a dezembro de 2008 em Porangatu –GO.

Realizou estágio curricular no Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR). Pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal - SP, e no Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda. (IPESA, Formiga - MG), entre março de 2007 a dezembro de 2010. Atua como pesquisador do Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda. (IPESA, Formiga - MG) Início de janeiro de 2021.

Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir.

Steve Jobs

Agradecimentos

A Deus e a Nossa Senhora da Aparecida por guiar, iluminar e abençoar meus caminhos e me conceder saúde, paz, inteligência e discernimento para as escolhas da vida, a fim de vencer as dificuldades até aqui apresentadas.

Ao Prof. Dr. Alvimar José da Costa, pela orientação, amizade, incentivo, por todos os ensinamentos para concretizar um grande sonho com contribuições incalculáveis

A Dra Carolina Buzzulini, por contribuir intensamente em todas as etapas da dissertação, por ter sido fundamental na concretização deste sonho.

Ao grande amigo Prof. Dr. Gustavo Felippelli, por todo o auxílio e orientação imprescindíveis ao longo deste processo.

Ao Prof. Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes, pela diligência na realização desta etapa, pelo incentivo e amizade.

Aos professores que aceitaram fazer parte das bancas de qualificação e defesa, Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani e Profa. Dra. Julieta Rodini Engracia de Moraes.

Aos pesquisadores, técnicos e funcionários do Instituto de Pesquisas em Saúde Animal – IPESA Jaboticabal – SP, Profa Thaís Rabelo dos Santos Doni, Ana Rebeca Castro Lima, Willian Giquelin Maciel, Edilaine Aparecida Miranda e Maria Alice

Aos animais que fizeram parte deste trabalho, sem os quais nada seria possível.

Aos grandes colegas do Instituto de Pesquisas em Saúde Animal - IPESA, Formiga – MG, Aurélio (*in memoriam*), Leandro (*in memoriam*) Lucas, Roberto César Araújo de Lima, Clóvis, Dilcélio, Fabinho, Mardem, Igor, Talvane, Yohan, Paulo, Luquinha, Benedicto, pela amizade, pelos bons momentos vividos e pela força no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV/UNESP de Jaboticabal-SP.

A todos meus amigos e familiares que acreditaram e torceram por mim.

Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho pudesse ser concluído, deixo o meu AGRADECIMENTO!

E finalmente, a Sheyla de Fátima Faria, pelo apoio, carinho e compreensão neste caminho árduo que foi trilhado.



IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda.

Endereço: Distrito de Segredo, CEP: 35.570-000, Formiga/MG

CNPJ: 04149679000136

Telefone: (37) 9118-1157

Site: www.ipesa.com.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO IPESA – INSTITUTO DE PESQUISAS EM SAÚDE ANIMAL LTDA.

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo número PP 026/2018 do projeto de pesquisa intitulado: **“Inocuidade e segurança clínica da formulação CIA 3125, administrada via tópica (pour on), em bovinos jovens e adultos”**, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alvimar José da Costa, - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) está de acordo com o disposto na Lei Federal nº 11.794 de 8 de Outubro de 2008 (Lei AROUCA). O referido projeto cumpre, também, as exigências da Resolução n. 879, de 15/02/2008 do CFMV; Decreto 6.899, de 15/07/2009; Resolução Normativa n.1, de 09/07/2010 do CONCEA; “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, elaborado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Portanto, o projeto supracitado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda., em reunião ordinária realizada em 25 de abril de 2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1 (hum) ano
Espécie/Linhagem/raça	Bovina
Nº de Animais	Mínimo de 70 animais
Peso/Idade	Sem restrição/32 animais entre 2 e 10 meses e 32 animais com idade superior a 24 meses
Sexo	Sem restrição
Origem	IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda.

Jaboticabal (SP), 25 de abril de 2018.

Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira
Presidente da CEUA



IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda.

Endereço: Distrito de Segredo, CEP: 35.570-000, Formiga/MG

CNPJ: 04149679000136

Telefone: (37) 9118-1157

Site: www.ipesa.com.br

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO
IPESA – INSTITUTO DE PESQUISAS EM SAÚDE ANIMAL LTDA.**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo número PP 027/2018 do projeto de pesquisa intitulado: “Colheita de amostras teciduais de bovinos tratados com a formulação CIA 3125, para identificação e quantificação de resíduos medicamentosos”, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alvimar José da Costa, - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) está de acordo com o disposto na Lei Federal nº 11.794 de 8 de Outubro de 2008 (Lei AROUCA). O referido projeto cumpre, também, as exigências da Resolução n. 879, de 15/02/2008 do CFMV; Decreto 6.899, de 15/07/2009; Resolução Normativa n.1, de 09/07/2010 do CONCEA; “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, elaborado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Portanto, o projeto supracitado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda., em reunião ordinária realizada em 25 de abril de 2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1 (hum) ano
Espécie/Linhagem/raça	Bovina
Nº de Animais	Mínimo de 34 animais
Peso/Idade	250 a 400 kg/18 e 24 meses
Sexo	15 machos e 14 fêmeas
Origem	IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda.

Jaboticabal (SP), 25 de abril de 2018.

Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira
Presidente da CEUA



IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda.

Endereço: Distrito de Segredo, CEP: 35.570-000, Formiga/MG

CNPJ: 04149679000136

Telefone: (37) 9118-1157

Site: www.ipesa.com.br


**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO
IPESA – INSTITUTO DE PESQUISAS EM SAÚDE ANIMAL LTDA.**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo número PP 022/2018 do projeto de pesquisa intitulado: **“Eficácia terapêutica da formulação CIA 3125, no tratamento de bovinos naturalmente infestados por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”**, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alvimar José da Costa, - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) está de acordo com o disposto na Lei Federal nº 11.794 de 8 de Outubro de 2008 (Lei AROUCA). O referido projeto cumpre, também, as exigências da Resolução n. 879, de 15/02/2008 do CFMV; Decreto 6.899, de 15/07/2009; Resolução Normativa n.1, de 09/07/2010 do CONCEA; “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, elaborado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Portanto, o projeto supracitado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda., em reunião ordinária realizada em 25 de abril de 2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1 (hum) ano
Espécie/Linhagem/raça	Bovina
Nº de Animais	Mínimo de 25 animais
Peso/idade	Sem restrição /18 e 36 meses de idade
Sexo	Sem restrição
Origem	Propriedades rurais da região de Formiga/MG.

Jaboticabal (SP), 25 de abril de 2018.


Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira
Presidente da CEUA



IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda.

Endereço: Distrito de Segredo, CEP: 35.570-000, Formiga/MG

CNPJ: 04149679000136

Telefone: (37) 9118-1157

Site: www.ipesa.com.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO IPESA – INSTITUTO DE PESQUISAS EM SAÚDE ANIMAL LTDA.

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo número PP 023/2018 do projeto de pesquisa intitulado: “Atividade anti-ixodídica da formulação CIA 3125, no tratamento de bovinos experimentalmente infestados por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alvimar José da Costa, - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) está de acordo com o disposto na Lei Federal nº 11.794 de 8 de Outubro de 2008 (Lei AROUCA). O referido projeto cumpre, também, as exigências da Resolução n. 879, de 15/02/2008 do CFMV; Decreto 6.899, de 15/07/2009; Resolução Normativa n.1, de 09/07/2010 do CONCEA; “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, elaborado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Portanto, o projeto supracitado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda., em reunião ordinária realizada em 25 de abril de 2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1 (hum) ano
Espécie/Linhagem/raça	Bovina
Nº de Animais	Mínimo de 26 animais
Peso/idade	Sem restrição /8 e 10 meses de idade
Sexo	Machos
Origem	IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda.

Jaboticabal (SP), 25 de abril de 2018.

Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira
Presidente da CEUA



IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda.

Endereço: Distrito de Segredo, CEP: 35.570-000, Formiga/MG

CNPJ: 04149679000136

Telefone: (37) 9118-1157

Site: www.ipesa.com.br

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO
IPESA – INSTITUTO DE PESQUISAS EM SAÚDE ANIMAL LTDA.**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo número PP 020/2018 do projeto de pesquisa intitulado: **“Eficácia da formulação CIA 3125, administrada via tópica (pour on) no tratamento de bovinos naturalmente infestados por larvas de *Dermatobia hominis*”**, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alvimar José da Costa, - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) está de acordo com o disposto na Lei Federal nº 11.794 de 8 de Outubro de 2008 (Lei AROUCA). O referido projeto cumpre, também, as exigências da Resolução n. 879, de 15/02/2008 do CFMV; Decreto 6.899, de 15/07/2009; Resolução Normativa n.1, de 09/07/2010 do CONCEA; “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, elaborado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Portanto, o projeto supracitado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda., em reunião ordinária realizada em 25 de abril de 2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1 (hum) ano
Espécie/Linhagem/raça	Bovina
Nº de Animais	Mínimo de 35 animais
Peso/Idade	Sem restrição /18 e 24 meses de idade
Sexo	Sem restrição
Origem	IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda

Jaboticabal (SP), 25 de abril de 2018.

Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira
Presidente da CEUA



IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda.

Endereço: Distrito de Segredo, CEP: 35.570-000, Formiga/MG

CNPJ: 04149679000136

Telefone: (37) 9118-1157

Site: www.ipesa.com.br

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO
IPESA – INSTITUTO DE PESQUISAS EM SAÚDE ANIMAL LTDA.**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo número PP 028/2018 do projeto de pesquisa intitulado: **“Avaliação mosquicida da formulação CIA 3125, administrada via tópica (pour on), contra *Haematobia irritans* em bovinos naturalmente infestados”**, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alvimar José da Costa, - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) está de acordo com o disposto na Lei Federal nº 11.794 de 8 de Outubro de 2008 (Lei AROUCA). O referido projeto cumpre, também, as exigências da Resolução n. 879, de 15/02/2008 do CFMV; Decreto 6.899, de 15/07/2009; Resolução Normativa n.1, de 09/07/2010 do CONCEA; “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, elaborado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Portanto, o projeto supracitado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda., em reunião ordinária realizada em 25 de abril de 2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1 (hum) ano
Espécie/Linhagem/raça	Bovina
Nº de Animais	Mínimo de 50 animais
Peso/Idade	Sem restrição/18 e 24 meses
Sexo	Sem restrição
Origem	Propriedade rural a ser definida

Jaboticabal (SP), 25 de abril de 2018.

Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira
Presidente da CEUA



IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda.

Endereço: Distrito de Segredo, CEP: 35.570-000, Formiga/MG

CNPJ: 04149679000136

Telefone: (37) 9118-1157

Site: www.ipesa.com.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO IPESA – INSTITUTO DE PESQUISAS EM SAÚDE ANIMAL LTDA.

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo número PP 021/2018 do projeto de pesquisa intitulado: **“Atividade anti-helmíntica da formulação CIA 3125, no tratamento de bovinos portadores de nematodioses”**, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alvimar José da Costa, - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) está de acordo com o disposto na Lei Federal nº 11.794 de 8 de Outubro de 2008 (Lei AROUCA). O referido projeto cumpre, também, as exigências da Resolução n. 879, de 15/02/2008 do CFMV; Decreto 6.899, de 15/07/2009; Resolução Normativa n.1, de 09/07/2010 do CONCEA; “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, elaborado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Portanto, o projeto supracitado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPESA – Instituto de Pesquisas em Saúde Animal Ltda., em reunião ordinária realizada em 25 de abril de 2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1 (hum) ano
Espécie/Linhagem/raça	Bovina
Nº de Animais	Mínimo de 19 animais
Peso/Idade	Sem restrição /6 e 12 meses de idade
Sexo	Sem restrição
Origem	Propriedades rurais da região de Formiga/MG.

Jaboticabal (SP), 25 de abril de 2018.

Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira
Presidente da CEUA

SUMÁRIO

	Página
Capítulo 1 – Considerações Gerais	18
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	20
2.2. <i>Haematobia irritans</i>	21
2.3. Larvas de <i>Dermatobia hominis</i> (bernes)	21
2.5 Fluazuron	23
2.6 Fipronil	25
2.7 Eprinomectina	26
3. OBJETIVO	29
4. REFERÊNCIAS	30
Capítulo 2: Assessment of the endectocide efficacy of a pour-on topical solution containing fluazuron, fipronil and eprinomectin in cattle	33
1. Introduction	34
2. Material and Methods	35
Location	35
Experimental design	35
Ethics statement	35
Efficacy against <i>Rhipicephalus microplus</i> in experimentally infected cattle (stall test) – Study 1	35
Efficacy against <i>Rhipicephalus microplus</i> in naturally infested cattle – Study 2	36
Efficacy against <i>Haematobia irritans</i> – Study 3	36
Efficacy against <i>Dermatobia hominis</i> larvae - Study 4	37
Efficacy against <i>Cochliomyia hominivorax</i> larvae in naturally in cattle (therapeutic efficacy) – Study 5	37
Efficacy against GIN in cattle – Study 6	38
Statistical Analysis	39
3. Results	40
Study 1: Efficacy against <i>Rhipicephalus microplus</i> in experimentally infested cattle (Stall Test)	40
Study 2: Efficacy against <i>Rhipicephalus microplus</i> in naturally infested cattle	41
Study 3: Efficacy Against <i>Haematobia irritans</i>	41
Study 4: Efficacy against <i>Dermatobia hominis</i> larvae	41

Study 5: Efficacy against <i>Cochliomyia hominivorax</i> Larvae in Naturally Infested Cattle	41
Study 6: Efficacy Against GIN in Cattle	42
4. Discussion	42
Study 1: Efficacy against <i>Rhipicephalus microplus</i> in experimentally infested cattle (Stall Test)	42
Study 2: Efficacy Against <i>Rhipicephalus microplus</i> in Naturally Infested Cattle	43
Study 3: Efficacy Against <i>Haematobia irritans</i>	43
Study 4: Efficacy against <i>Dermatobia hominis</i> larvae	44
Study 5: Efficacy against <i>Cochliomyia hominivorax</i> Larvae in Naturally Infested Cattle	44
Study 6: Efficacy Against GIN in Cattle	45
5. References	46
Figure 1 Geographical location of Bela Vista and Bananal farms in Formiga municipality with study efficacy results.	51
Table 1 Experimental design used in studies 1, 2, 3, 4, 5 and 6, in accordance with breed type, sex, number of animals included (n per group) and treatment group.	51
Table 2 Average number of <i>Rhipicephalus microplus</i> in experimentally infected cattle (stall test) belonging to the control and treated groups and efficacy percentages; Geometric means – Study 1.	51
Table 3 Efficacy of a topical formulation containing 3.0% fluzaron, 1.25% fipronil, and 0.5% eprinomectin against <i>Rhipicephalus microplus</i> in naturally infested cattle (Study 2), <i>Haematobia irritans</i> (Study 3), <i>Dermatobia hominis</i> larvae (Study 4), and <i>Cochliomyia hominivorax</i> larvae (Study 5).	51
Table 4 Efficacy of a topical formulation containing 3.0% fluzaron, 1.25% fipronil, and 0.5% eprinomectin against nematodes (Study 6).	51

Depleção de resíduos, segurança clínica e atividade endectocida de uma nova formulação (benzoilfenilureia + fenilpirazol + lactona macrocíclica) em bovinos (sete estudos clínicos)

RESUMO - No Brasil, assim como em outros países líderes na produção de produtos de origem animal, observa-se aumento anual da utilização de medicamentos veterinários, sobretudo, para o tratamento e controle das endo e ectoparasitoses. Com a utilização intensiva desses antiparasitários houve a necessidade de determinar limites máximos de resíduos, que podem ser encontrados em tecido animal, com intuito de garantir a segurança alimentar. Tornou-se, portanto, imprescindível a realização de estudos que permitam determinar o período de carência dos medicamentos veterinários. Adicionalmente, os estudos sobre a eficácia dos diversos fármacos e sobre os possíveis efeitos colaterais na espécie alvo são de grande importância para a comercialização segura de tais medicamentos. Diante deste contexto, avaliou-se, neste trabalho, uma formulação inédita, contendo benzoilfenilureia + fenilpirazol + lactona macrocíclica, em sete estudos, assim definidos: segurança clínica em bovinos jovens e adultos, eficácia anti-helmíntica, eficácia contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (infestação natural e infestação experimental), eficácia bernicida, eficácia mosquicida (*H. irritans*) e depleção de resíduos farmacológicos em tecidos comestíveis de bovinos tratados com a referida associação. Alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas não foram observadas nos bovinos jovens e adultos, medicados com a nova formulação, administrada via pour on, até cinco vezes a dose terapêutica, ao longo de todo período experimental (28 dias). Como anti-helmíntico, a formulação alcançou eficácia superior a 95% (médias aritméticas) contra *Cooperia spatulata* e *Trichostrongylus axei*; foi altamente eficaz >98% contra *Oesophagostomum radiatum* e *Cooperia pectinata*; reduziu significativamente ($P \leq 0,05$) o número total de helmintos, recolhidos após a necropsia, nos bovinos mantidos como controle negativo. A referida formulação alcançou índices de eficácia carrapaticida superiores a 90% do 7º ao 35º DPT, sendo a eficácia máxima contra *R. (B.) microplus* obtida no 28º DPT (99,45% e 99,65%, médias aritméticas e geométricas, respectivamente – estudo com infestação natural). Ao longo de 24 datas consecutivas, entre o 22º e o 45º DPT, a nova associação medicamentosa alcançou eficácia máxima (100%) contra *R. (B.) microplus* (stall test). Contra larvas de *D. hominis* (bernes) eficácia máxima (100%) foi obtida pela formulação inédita entre o 14º e o 28º DPT. Percentuais de eficácia superiores a 90% foram mantidos até o 56º DPT (médias geométricas). A formulação endectocida alcançou eficácia contra *Haematobia irritans* superior a 90% do 1º ao 21º DPT (médias aritméticas e geométricas). Eficácia mosquicida máxima foi registrada no 7º DPT (99,41% e 99,53%, média aritmética e geométrica, respectivamente). O período de carência da associação inédita contendo benzoilfenilureia + fenilpirazol + lactona macrocíclica foi estabelecido em 102 dias.

Palavras-chave: bovinos, associação endectocida, depleção de resíduos

Capítulo 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio na atualidade vai muito além do estudo restrito dos segmentos destinados à agricultura e pecuária. Sua abrangência, engloba vários setores responsáveis pela manutenção das atividades, tais como a indústria de fertilizantes, químicos, fármacos, pesquisas em biotecnologia, máquinas agrícolas, dentre outros, que são somados às indústrias que beneficiam a produção agrícola e pecuária, transportes, armazenamento, agências de financiamento e comercialização interna e externa (SANTOS et al., 2022).

De acordo com o *International Monetary Fund* (2019), em valores absolutos, o Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio brasileiro ganha destaque diante das grandes economias mundiais como a China, Dinamarca, Israel, Irlanda dentre outras. Esses dados situam no Brasil em 17º lugar no ranking da economia mundial, mantendo-se à frente de 57 economias. Dados divulgados pelo Cepea/CNA (2023), demonstraram que, no ano de 2023, o PIB do agronegócio alcançou R\$2,63 trilhões, resultado este que, corresponde a aproximadamente 24,4% de todo o PIB brasileiro no referido ano.

Com base em estudos realizados pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) as perspectivas para o mercado da pecuária bovina de corte apontam para um crescimento significativo nos próximos anos, tendo seu ápice em 2027 em virtude da concentração do volume de exportação da carne, situando o Brasil como detentor de um terço da expansão comercial, ficando à frente dos Estados Unidos (OECD/FAO, 2019). O consumo de carne per capita também ganha destaque nas projeções do agronegócio e, conforme o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual indica em seu relatório compreendido no período de 2017/18 a 2027/28 o crescimento do setor da ordem de 22,7% para a produção de carne bovina (BRASIL, 2018).

No entanto, a manutenção da participação brasileira no mercado mundial da carne perpassa por questões relacionadas a cadeia produtiva, assegurando tanto a produção de alimentos seguros e saudáveis, quanto promovendo o bem-estar animal. Assim, para assegurar o retorno econômico dos investimentos, o controle de endo e ectoparasitas por meio da integração de métodos de controle e uso de combinações de fármacos minimamente danosos, otimizam a qualidade dos produtos cárneos produzidos pela cadeia da pecuária, garantindo a segurança alimentar no contexto da saúde pública (ANDREOTTI et al., 2019).

Sob esta perspectiva, a eficiência econômica da produção é imprescindível para a manutenção da produtividade dos criadores de bovinos. No entanto, é mister asseverar que, no Brasil, grande parte do rebanho bovino é criado a pasto e, estes animais, estão naturalmente expostos à aquisição de endo e ectoparasitos (SANTOS et al., 2021) que, se não forem controlados geram perdas na produtividade em virtude de alterações que podem ocorrer em seu metabolismo, alimentação, defasagem na absorção de nutrientes e quadros de anemia (LEÓN; MITCHELL; WATSON, 2020). Para evitar a ocorrência destes episódios, o controle dos parasitos é necessário, devendo ser realizado por meio do uso de medicamentos administrados por via tópica em animais parasitados (COSTA et al., 2023).

As perdas aumentam o custo de produção da carne e resultam em menor retorno financeiro para os produtores de carne bovina, além de contribuir para alterações no ambiente atmosférico e no clima. No entanto, a implementação de medidas estratégicas de controle de parasitas, com profundo conhecimento do risco parasitário, prevalência, perfis de resistência a parasitas e preços, pode resultar em retornos econômicos positivos para os criadores de gado de corte em todos os setores (SANTOS et al., 2022).

As ecto e endoparasitoses representam grande entrave à bovinocultura nacional. Aliado a este fato, a constância de uso, aplicações em épocas inadequadas e doses imprecisas, podem acelerar a redução progressiva da eficácia das formulações disponíveis no mercado, agravando a condição sanitária do rebanho. Acrescenta-se, ainda, a imensa dificuldade na descoberta de novas moléculas. Neste contexto, a investigação científica com o objetivo de avaliar novos ativos e/ou associações de ativos já existentes quanto à segurança e atividade endectocida torna-se premente e indispensável ao sucesso do agronegócio brasileiro (ANDREOTTI et al., 2019).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um aracnídeo pertencente ao filo Artropoda, ordem Acari, subordem Ixodidae (PEREIRA 1982). Considerado o parasita de maior importância para a pecuária mundial, encontrado em todo globo e endêmico na Índia, Austrália, Madagascar, Sul da África, Caribe, México e toda América Central e do Sul. Tem a capacidade de parasitar bovinos, búfalos, cavalos, burros, cabras, ovelhas, porcos, cães e alguns animais selvagens e pode atuar como vetor dos protozoários *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale* e *Babesia equi* dentre outros (CFSPH, 2007). Estima-se que a infestação deste carrapato nos bovinos gere perdas de 90 litros de leite por animal em cada lactação (RODRIGUES & LEITE, 2013), e o bovino emagrece em média 1,18mg a 1,37mg por carrapato parasitado (JONSON, 2006).

O ciclo biológico deste parasito é constituído de uma fase de vida livre e outra parasitária (GONZALES *et al.*, 1993), exigindo um único hospedeiro (monóxeno) para sua evolução, no qual realiza todas as ecdises, passando por todas as suas fases em três semanas, mais duas semanas no ambiente antes de eclodir, ou até meses ao solo, a depender do clima (TAYLOR, COOP & WALL, 2010). É importante ressaltar, ainda, que a maioria da população permanece no ambiente e não no animal, dessa forma, um animal infestado ao ser introduzido em uma propriedade, rapidamente irá disseminar a infestação para todo rebanho (CFSPH, 2007).

Ao nascimento, as larvas são morosas, levando em média 7 dias para ascender à vegetação e alcançar seu hospedeiro, quando o bovino, por exemplo, roça a vegetação, as larvas já ávidas fixam-se às regiões de pele mais tenra (períneo, região inguinal, barbela) onde se nutrem de linfa até desenvolverem-se em metalarva. E seguida, realizam ecdise, originando ninfas e metaninfas. A próxima ecdise dará origem aos adultos, sendo que os de menor tamanho serão machos (neandros e gonandros) e os maiores fêmeas (neóginas, parternóginas e teleóginas). Quando adultos, os machos são encontrados, de forma geral, sobre as fêmeas (neóginas), que após serem fertilizadas (parternóginas) ingurgitam-se completamente e alcançam o estágio de teleógenas, desprendem-se do hospedeiro e caem a solo (OLIVEIRA *et al.*, 1974). Cada fêmea põe 2 a 3 mil ovos dado no término de seu ciclo de aproximadamente 4 semanas (FLECHTMANN, 1977; KLOMPEN, 2005), terminando com a morte da fêmea (quenógena).

2.2. *Haematobia irritans*

Haematobia irritans (mosca do chifre) é um díptero hematófago que foi notificado pela primeira vez no Brasil em Roraima (VALERIO & GUIMARÃES, 1983). Tem preferência parasitária por bovinos, de preferência de linhagem europeia (ou mestiços), sobretudo machos inteiros, e se encontram em maior quantidade em áreas de pelagem escura graças à maior concentração de glândulas sebáceas e liberação de testosterona que esta característica confere (CHRISTENSEN *et al.*, 1979).

O desenvolvimento dos descendentes até a fase adulta requer uma temperatura de 24°C a 26°C e por isso as fases de maior infestação são de agosto a abril (BARROS, 2002). Após vinte e quatro horas uma fêmea pode botar até 400 ovos. O ciclo biológico desta mosca inclui a permanência dos adultos sobre os hospedeiros por tempo integral, só deixando o hospedeiro para depositar os ovos parcelados nas bordas das massas fecais recém-depositadas ao solo (PALMER & BAY, 1982; JONES & KUNZ, 1996), ou em períodos chuvosos (HORN, 1984). Sua permanência provoca grande incômodo, sendo que o emagrecimento está relacionado principalmente ao desconforto em que o animal é submetido, os animais por vezes deixam de comer e dormir para tentar se livrar do parasita esfregando seu corpo em estruturas da propriedade e árvores (GOMES *et al.*, 1988). Além deste enorme prejuízo, o excesso de picadas de *H. irritans*, danifica o couro e pode facilitar a invasão de outros parasitos como a *Cochilomyia hominivorax*, tornando-o inaproveitável para a indústria coureiro-calçadista (OLIVEIRA 1983).

2.3. Larvas de *Dermatobia hominis* (bernes)

Dermatobia hominis (Díptera, Cuterebridae), conhecida popularmente como mosca do berne, é o quarto ectoparasito mais impactante para a pecuária brasileira (GRISSI *et al.*, 2014). É considerado o integrante mais importante da família Oestridae (ZUMPT, 1965) devido à vasta amplitude de hospedeiros que pode parasitar e a pouca seletividade de vetores intermediários que disseminam os ovos.

Possui ciclo biológico complexo, passando por uma fase de vida livre, onde, larva e pupa vivem no solo e adultos vivendo, preferencialmente, em ambientes de morro ou florestais. As fêmeas de *D. hominis* já acasaladas capturam insetos foréticos para transportarem seus ovos, depositam em média 12 ovos no abdômen de moscas ou mosquitos para a dispersão de seus ovos no hospedeiro. A fase subsequente corresponde à fase parasitária, quando depositados, os ovos eclodem em resposta à sensibilidade térmica do contato com o hospedeiro, então as larvas de primeiro estágio penetram na pele do indivíduo sem a necessidade de lesões prévias. As larvas se

desenvolvem no subcutâneo do hospedeiro produzindo lesões furunculosas (GUIMARÃES *et al.*, 1983; HALL & WALL, 1995; GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999). Esta lesão pela forma larvar é denominada miíase furunculosa ou dermatobiose, condição de importância médica e médica veterinária em toda América latina (PINTO *et al.*, 2002), distribuindo-se, também, desde o Sul do México até o norte da Argentina (GRISI *et al.*, 2002).

Após 5 a 10 semanas, larvas de terceiro estágio saem pelo orifício respiratório que criaram na pele, e viram pulpa no solo até eclodirem para mosca, finalizando o ciclo completo entre 3 a 4 meses (O'DONEL, 1984). Cada larva infestada tem a capacidade de diminuir 40,6g do ganho de peso de um bovino (MAGALHÃES & LESSKIU, 1982).

Tem como predileção de hospedeiro a espécie bovina (GUIMARÃES *et al.*, 1983; HALL & WALL, 1995) e neles este berne pode facilitar a infecção concomitante por *Pasteurella granulomatis* (Lechiguana) que causa desde emagrecimento progressivo até a morte (LADEIRA *et al.*, 1996). *D. hominis* é o agente mais comum de miíases cutâneas em humanos (O'DONEL, 1984) e também pode parasitar cães, aves, dentre outros animais domésticos e selvagens de sangue quente. Esta característica de grande diversidade de hospedeiros alternativos e o envolvimento de diversas espécies de insetos como vetores foréticos (dos ovos) dificulta o controle da dermatobiose (BISHOP *et al.*, 2000).

2.4. Helmintos

As endoparasitoses estão entre os fatores principais que exercem considerável influência sobre o desempenho dos bovinos, resultando em consequências adversas tanto do ponto de vista econômico quanto no que se refere ao bem-estar desses animais. Dentre os endoparasitos intestinais, os nematódeos da Ordem Strongylida, pertencentes aos gêneros *Cooperia*, *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Strongyloides*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* e *Dictyocaulus* estão entre os que mais acometem os bovinos (MORAIS *et al.*, 2021).

Esses endoparasitos, em geral, apresentam duas fases distintas: a exógena, que começa com a eliminação de ovos nas fezes do hospedeiro e se estende até a formação das larvas infectantes de terceiro estágio (L3), e a fase endógena, que se inicia quando os hospedeiros ingerem as larvas L3 e continua até que essas larvas alcancem a maturidade sexual e comecem a produzir ovos, completando o ciclo em cerca de 28 a 35 dias na maioria deles (BAIAK, 2017).

A patologia ocasionada por helmintos, pode levar o animal ao emagrecimento, à redução da conversão alimentar, distúrbios gástricos diminuição, da performance reprodutiva, avitaminoses e da qualidade de acabamento de carcaça, e à alterações do sistema imunológico. (MORAIS et al., 2021).

A ocorrência, assim como a prevalência das verminoses gastrointestinais, depende de aspectos ambientais, como: chuva, temperatura, umidade relativa, temperatura do solo, evapotranspiração, radiação solar; e também dos fatores dos hospedeiros, como: espécie, raça, idade, estado fisiológico e nutricional e o manejo desses animais. (BATISTA et al., 2022).

2.5 Fluazuron

Nos últimos anos ocorreram diversas mudanças na pecuária de corte, com modernas aplicações produtivas, que permitiram ao setor aumentar o volume e a produtividade. Devido ao aumento da produção animal, houve multiplicação dos casos de parasitismo, desenvolvendo um encadeamento de espécies parasitárias, sendo uma delas o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (COSTA et al., 2023).

Um dos principais métodos de controle do carrapato é o uso de acaricidas, sendo os principais aplicados em formulações de imersão, spray, *pour-on* e injetáveis e os dois últimos classificados como de ação sistêmica (FERREIRA et al., 2019).

Nos programas de controle de carrapatos, a administração de medicamentos requer plano de dosagem estratégico com horários estabelecidos de acordo com a residualidade dos fármacos ou dependendo do programa de controle ou erradicação do carrapato do estabelecimento (ROBAINA; ALVARIZA; SUÁREZ, 2021). Em programas de controle de carrapatos, acaricidas devem ser usados com organofosforados, piretróides e amidinas, enquanto que em aplicações injetáveis e *pour-on*, lactonas macrocíclicas, fipronil e fluazuron são as mais relevantes. A resistência foi relatada para todas as drogas citadas, exceto para o fluazuron, que não detém testes práticos *in vitro* para sua detecção (SUAREZ et al., 2021).

O fluazuron é responsável por inibir a síntese de quitina em carrapatos imaturos, impedindo-os de atingir estágios adultos. Reguladores de crescimento de insetos, como o fluazuron, podem ser responsáveis pela resposta a longo prazo, dado o efeito tardio que esse tipo de composto tem sobre o ciclo de vida do inseto, reduzindo o número de estágios de vida imaturos de *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) (FERREIRA et al., 2019).

No mercado existem diversos princípios ativos e formulações. Fluazuron (N-[[4-cloro-3-[3-cloro-5-(trifluorometil)piridina-2-il]oxifenil]carbamoil]-2,6-difluorobenzamida) (Figura 1) é um dos mais novos medicamentos veterinários carrapaticidas, que possui a fórmula "pour-on", sendo a aplicação da droga feita nas costas do animal. Pertencente ao grupo das benzoilfenilureias, seu mecanismo de ação atua pela interferência da formação da quitina do carrapato, responsável pelo endurecimento de seus exoesqueletos (RIBEIRO et al., 2019).

Devido ao seu estreito espectro de atividade e à falta de impacto letal nas infestações estabelecidas por carrapatos, a utilização do fluazuron variou de baixa a moderada após a sua introdução. No entanto, sua utilização constantemente devido à crescente resistência de *R. microplus* e *R. decoloratus* aos inúmeros acaricidas, como piretróides sintéticos como amitraz e ivermectina (FERREIRA et al., 2019).

Outros compostos de ureia benzoilfenil, como diflubenzuron, lufenuron e flufenoxuron são eficazes contra uma ampla gama de insetos (JUNQUERA et al., 2019).

Além de cuidar da saúde do animal para que ele receba a medicação nas doses e na forma correta, é importante analisar a segurança do operador. Carrapaticidas são venenos que atuam principalmente no sistema nervoso central (SNC), causando alergias, malformações de órgãos, processos tumorais e, principalmente, intoxicações. Normalmente, os indivíduos que têm contato com esses produtos são os mesmos na propriedade e, como costumam fazer o manuseio, tendem a diminuir os cuidados com essas substâncias tóxicas (SUAREZ et al., 2021).

O fluazuron demonstra maior eficácia contra carrapatos do que contra outros artrópodes (JUNQUERA et al., 2019). No Brasil, os ensaios de campo com fluazuron resultaram em 99% de eficácia após o tratamento por 21 dias. Apenas estágios larvais de carrapatos *R. microplus* puderam ser observados após o hospedeiro ser tratado com fluazuron, e nenhum carrapato foi encontrado que tivesse atingido estágios de desenvolvimento posteriores. A redução da viabilidade dos ovos também ocorreu devido à aplicação de fluazuron (SANTOS et al., 2022).

A redução da resistência a doenças infecciosas em bovinos, foi consequência bem documentada das imunodeficiências primárias e adquiridas, mas um achado novo após a exposição a xenobióticos. O conhecimento das consequências da função imune alterada é o desfecho mais provável da exposição inadvertida (RIBEIRO et al., 2019).

O fluazuron tem a capacidade de se acumular em gordura, podendo ser liberado do organismo através do leite, protegendo assim os bezerros dos carrapatos sem aplicação direta. Foi sugerido que o fluazuron afetou exclusivamente a eclosão de larvas

de fêmeas tratadas de carrapatos, e que um efeito sinérgico do fluazuron com MLs impactou negativamente os parâmetros reprodutivos em *R. microplus*. O fluazuron afetou ninfas e larvas, quando estavam realizando a muda, e não prejudicou nenhum carrapato adulto (JUNQUERA et al., 2019).

O fluazuron tem demonstrado maior eficácia (100%) sob os demais acaricidas usados contra carrapatos *R. microplus*, e quase nenhuma resistência foi relatada contra o fluazuron, embora seja sugerido que seu uso inadequado pode levar ao desenvolvimento de resistência (FERREIRA et al., 2019).

O mecanismo de ação e resistência do fluazuron atua inibindo o crescimento do carrapato por interferir na formação da quitina através da inibição das enzimas envolvidas no processo de muda e resulta no endurecimento do exoesqueleto do carrapato (ROBAINA; ALVARIZA; SUÁREZ, 2021). O tratamento com fluazuron causa danos as várias estruturas quitinosas (hipostomo menor e quelíceras, escudo, sensilla, poros, placa anal) em ninfas de *R. sanguineus*, estruturas que desempenham papéis essenciais na sobrevivência do carrapato (COUTO FILHO; GONÇALVES; MARINO, 2018).

Embora o uso do fluazuron seja necessário para o controle do carrapato e para o manejo do gado, o uso descuidado dessa droga pode enfraquecer o sistema imunológico do hospedeiro, trazendo riscos para doenças (RIBEIRO et al., 2019).

2.6 Fipronil

É um membro da família dos inseticidas fenilpirazólicos e que é usado para controlar infestações por *R. microplus* em bovinos. Embora o uso do fipronil ocorrido no final da década de 1990, a resistência só foi detectada recentemente após o desenvolvimento de testes diagnósticos estáveis. Foi usado persistentemente em muitos países e mostrou-se altamente eficaz contra carrapatos (BECKER et al., 2019).

O fipronil não foi amplamente utilizado no início devido aos seus custos elevados em relação aos outros produtos químicos. Seu uso e demanda aumentaram no início dos anos 2000 devido à diminuição dos custos e ao aumento das populações de carrapatos *R. microplus* resistentes a outros acaricidas (VALSONI et al., 2021).

O fipronil é um composto fenilpirazol que atua bloqueando os canais iônicos GABA-gated, que também estão no sistema nervoso central dos artrópodes (Figura 2). A exposição tanto à ivermectina quanto ao fipronil resulta em paralisia flácida e, eventualmente, morte nos parasitas-alvo. Estes canais de ferro fechados com cloretos não estão presentes em vertebrados (JANER et al., 2021).

O fipronil foi aprovado para uso em animais domésticos em muitos países e é usado para controlar artrópodes como carrapatos, baratas e pulgas. Além disso, o fipronil é utilizado em bovinos no controle de vetores da leishmaniose. Da mesma forma, o fipronil é eficaz contra todas as fases da vida dos mosquitos *Anophele* (KAMRAN et al., 2021). No entanto, estudos de campo sobre seu uso contra mosquitos são limitados. A eficácia dos endectocídeos está ligada à sua farmacocinética, que varia entre as diferentes espécies. A via de administração também tem efeito significativo na farmacocinética das endectocídeos (GUPTA et al., 2021).

Os carrapatos *Rhipicephalus microplus* resistentes ao fipronil são identificados em diferentes regiões, como o Uruguai, Suíça e Brasil (BECKER et al., 2019). Outras espécies do gênero *Rhipicephalus* (*R. sanguineus*) também mostraram se resistentes ao fipronil (SAMEDI; AYDIN; CETIN, 2021). Carrapatos *Hy. anatolicum* resistentes ao fipronil foram relatados no Paquistão (KAMRAN et al., 2021). A resistência ao fipronil pode ter se desenvolvido em taxas mais baixas em *R. microplus* em comparação com *Hy. anatolicum* (GUPTA et al., 2021). O fipronil é eficaz para o controle de carrapato, entretanto é tóxico para abelhas, aves, peixes e para alguns outros invertebrados benéfico. Durante as aplicações de fipronil, os animais, incluindo os humanos (trabalhadores), podem ser expostos através da pele, olhos ou pela respiração, resultando em irritação da pele, sudorese, náuseas, vômitos, dor de cabeça, dor de estômago, tontura, fraqueza e convulsões.

Semelhante aos OCs, como por exemplo, lindano e dieldrin, o fipronil age bloqueando os receptores GABA e inibindo a passagem de íons cloreto através dos canais de cloreto GABA-gated. Pode causar mortalidade quando usado em altas concentrações, enquanto doses menores podem interromper as funções nervosas. O fipronil é classificado como um antagonista seletivo do GABA porque se liga efetivamente aos canais de cloreto do receptor GABA dos carrapatos (SAMEDI; AYDIN; CETIN, 2021).

Mutações também foram identificadas dentro do segundo domínio transmembrana (TM-2) e terceiro transmembrana (TM-3) do gene do canal de cloreto GABA-gated em carrapatos *R. microplus* resistentes ao fipronil (JANER et al., 2019; JANER et al., 2021).

2.7 Eprinomectina

Durante muitas décadas, o controle de parasitas é aplicado para reduzir o impacto negativo na produção, mas também para reduzir o stress animal. Parasitas e

tratamentos são importantes fontes de estresse na pecuária, as constantes picadas de parasitas externos provocam desconforto e dor, além de perda de sangue. Tratamentos regulares por injeção, imersão e pulverização também são fontes de estresse devido ao manejo e processamento do gado (VOLK et al., 2019).

A desparasitação e o controle de parasitas externos aumentam o bem-estar animal e isso pode ser melhorado se a aplicação do antiparasitário for feita de forma contínua e não exigir manejo excessivo. Na busca por uma formulação endectocida que pudesse ser utilizada em todos os bovinos independente da fase de produção, pesquisadores desenvolveram um análogo da avermectina que fosse eficaz, seguro e não deixasse resíduos no leite (MENCHIKOV; DZHAFAROV; ZAVARZIN, 2022). Através de testes realizados primariamente contra nematódeos em ovelhas e por meio da análise de resíduos no leite proveniente de rebanho leiteiro, a eprinomectina foi desenvolvida como sendo o primeiro endectocida tópico que poderia ser utilizado no gado, inclusive em vacas em lactação (RIMES, 2022).

Derivada de uma combinação semissintética da abamectina, a eprinomectina foi lançada no ano de 1996, apresentando as mesmas atividades antiparasitárias das avermectinas, possuindo caráter mais hidrofílico do que a abamectina ou ivermectina, deixando menos resíduos no leite. A avermectina foi modificada quimicamente para a obtenção da eprinomectina através da troca do grupo hidroxila por um substituinte axial acetoamina (RIMES, 2022). A eprinomectina é uma mistura de dois compostos análogos conhecidos como 4"-epiacetylaminio-4"-deoxyavermectin (B1a \geq 90% e B1b \leq 10%), que diferem entre si apenas por um grupo metileno em um substituinte da cadeia lateral (MENCHIKOV; DZHAFAROV; ZAVARZIN, 2022) (Figura 3).

O mecanismo de ação da eprinomectina se dá através da ligação deste composto aos canais de cloro bloqueados pelo glutamato nas células nervosas e musculares dos invertebrados. Ocorre aumento na permeabilidade da membrana celular ao cloreto, causando paralisia e morte do parasita. A eprinomectina melhora a liberação do GABA nos neurônios pré-sinápticos, que atua como neurotransmissor inibitório, bloqueando a estimulação pós-sináptica do neurônio de nematódeos ou a fibra muscular em artrópodes (VOLK et al., 2019).

A eprinomectina quando administrada pela via subcutânea possui concentrações plasmáticas mais elevadas e maior disponibilidade no plasma comparando-se com a administração tópica em bovinos não lactantes, além de também possuir maiores concentrações fecais (RIMES, 2022). Grande parte da eprinomectina não é metabolizada nos tecidos bovinos após administração por via tópica, e é excretada,

predominantemente inalterada, através das fezes. Após a administração da eprinomectina, 85,9% da dose é excretada nas fezes do rebanho tratado sem alteração na estrutura da droga (VILLAMIL et al., 2022).

Dentre os metabólitos encontrados da eprinomectina, quatro foram destacados, sendo eles M1 (24-demethyl-24-hydroxymethyleprinomectin B1a), M2 (24-hydroxyepinomectin B1a), M3 (26-hydroxymethyleprinomectin B1a) e M5 (N-deacetylepinoectin B1a). Esses metabólitos são encontrados em pequenas taxas nas fezes quando comparados às taxas de eprinomectina B1a e eprinomectina B1b (MENCHIKOV; DZHAFAROV; ZAVARZIN, 2022).

Formulações pour-on de eprinomectina têm a vantagem de possuírem carência mínima. Isso quer dizer que os efeitos colaterais deixam de se manifestar nos animais de corte no mesmo dia de aplicação e nos animais de leite um dia apenas. Isso permite que a produção não seja comprometida, evitando que o criador não tenha que esperar para realizar o abate ou a ordenha dos animais (JUNQUERA et al., 2019).

Existem também, apresentações injetáveis de eprinomectina que se destacam no mercado por se manterem cerca de 150 dias no plasma sanguíneo do animal após a aplicação. Tal período é suficiente para quebrar o ciclo de vida e reprodução dos parasitas, reduzindo a infestação de maneira satisfatória. O pico de concentração plasmática ocorre a partir do 70º dia após a aplicação, promovendo longa proteção para o animal (VOLK et al., 2019).

3. OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar a segurança clínica, o período de carência e a atividade endectocida de uma nova formulação, em bovinos (espécie alvo). A inédita formulação é composta por ativos pertencentes aos grupos químicos: benzoilfenilureia, fenilpirazol e lactona macrocíclica, cujos diferentes mecanismos de ação atuam sobre os parasitos mais importantes que afetam os bovinos: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Haematobia irritans*, larvas de *Dermatobia hominis* e *Cochliomyia hominivorax*, além dos nematódeos gastrintestinais e pulmonares.

4. REFERÊNCIAS

ANDREOTTI, Renato et al. **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1107092/1/Carrapatosnacadeiaprodutivadebovinos.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2023.

BECKER, S.; WEBSTER, A.; DOYLE, R.L.; MARTINS, J.R.; RECK, J.; KLAFKE, G.M. Resistance to deltamethrin, fipronil and ivermectin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto*, Latreille (Acari: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 5, p. 1046-1050, 2019.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X19300329?via%3Dihub>. Acesso em: 18 nov. 2023.

Ianete Lima BATISTA^{1*}; Juliane Nunes Pereira COSTA¹; Richard Atila de SOUSA¹; Ivete Lopes de MENDONÇA, **RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA AOS BENZIMIDAZÓIS EM PARASITOS DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO**(Anthelmintic resistance to benzimidazoles in parasites of production animals) *Ciência Animal*, v.32, n.4, p.75-89, out./dez., 2022. Recebido: jun./2021. Publicado: dez./2022.75.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28** projeções de longo prazo. Brasília: MAPA/ACE, 2018.

Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/PROJECOES2018_FINALIZADA_web_05092018.pdf. Acesso em: 10 nov. 2023.

CEPEA. CNA. **PIB do agronegócio brasileiro**. 28 set. 2023. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: 15 nov. 2023.

COSTA, A.J. da; et al. **Primeiro relato da eficácia de um produto pour-on à base de fluralaner (Exzolt® 5%) contra ectoparasitas infestantes de bovinos no Brasil. Parasitas Vetores** v.16, n. 336, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13071-023-05934-7#citeas>. Acesso em: 15 nov. 2023.

FERREIRA, T. P. et al. **Bioanalytical Method to Measure Fluazuron in Bovine Plasma and its Application in Pharmacokinetic Studies**. Disponível em: <https://s3.sa-east-1.amazonaws.com/static.sites.sbg.org.br/rvq.sbg.org.br/pdf/v11n3a31.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2023.

GUPTA, S.; GUPTA, S.; KUMAR, S. **Emergência de resistência ao fipronil em carrapatos bovinos *Rhipicephalus microplus* e *Hyalomma anatolicum* coletados**

em Haryana, Índia. *Int. J. Trop.* 2021, 41, 401–407. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42690-020-00218-4>. Acesso em: 19 nov. 2023.

INTERNATIONAL MONETARY FUND. MF. IMF Data Mapper. 2019. Disponível em: https://www.imf.org/external/datamapper/NGDP_RPCH@WEO/OEMDC/ADVEC/WEOWORLD. Acesso em: 15 nov. 2023.

JANER, E. C.; DÍAZ, A.; FONTES, F.; BARAIBAR, F.; SAPORITI, T.; OLHAGARAY, M. E. Molecular survey of resistance to pyrethroids and fipronil in *Rhipicephalus microplus* isolates in northern Uruguay. *Rev. Intern. Cien. Trop.* 2021, 12, 101747. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42690-020-00218-4>. Acesso em: 14 nov. 2023.

JANER, E. C.; KLAFKE, G. M.; FONTES, F.; CAPURRO, M. L.; SCHUMAKER, T. S. S. Mutations in **Rhipicephalus microplus GABA gated chloride channel gene associated with fipronil resistance**. *Ticks and tick-borne diseases*, 2019, 10, 761–765. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30898542/>. Acesso em: 18 nov. 2023.

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*. 2019;26:26. Disponível em: <https://www.parasite-journal.org/articles/parasite/pdf/2019/01/parasite190003.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2023.

KAMRAN, K.; ALI, A.; VILLAGRA, C. A.; BAZAI, Z. A.; IQBAL, A.; SAJID, M. S. **Hyalomma Anatolicum Resistance against Ivermectin and Fipronil is associated with indiscriminate use of acaricides in southwestern Balochistan, Pakistan**. *Parasitol. Res.* 2021, 120, 15–25. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33225403/>. Acesso em: 19 nov. 2023.

LEÓN, A. P. de; MITCHELL, R. D.; WATSON, D. W. **Ectoparasites of Cattle**. *Vet Clin Food Anim*, v. 36, p. 173–185, 2020.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072019300593#section-cited-by>. Acesso em: 19 nov. 2023.

MENCHIKOV, L. G.; DZHAFAROV, M.; ZAVARZIN, I. V. **Recent advances in avermectin chemistry**. *Russ. Chem. Rev.*, 2022, 91 (9) RCR5051. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/LeonidMenchikov/publication/361280249_Avermectin_chemistry_recent_advances/links/634a44ff9cb4fe44f32983ef/Avermectin-chemistry-recent-advances.pdf?origin=journalDetail&_tp=eyJwYWdlIjoiam91cm5hbERldGFpbCJ9. Acesso em: 19 nov. 2023.

NASCIMENTO, A. F. et al. **Use of anti-tick drugs in dairy farms in the microregion of Alfenas, Minas Gerais, Brazil**. *Braz J Vet Parasitol*, v. 30, n. 1, e020620, 2021. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021016>. Acesso em: 21 nov. 2023.

OECD/FAO. **Agricultural Outlook 2019-2028**. Paris: OECD Publishing, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2019-en. Acesso em: 10 nov. 2023.

RIBEIRO, J. G. et al. Novel Acaricidal Drug Fluazuron Causes Immunotoxicity via Selective Depletion of Lymphocytes T CD8. **Hindawi. Evidence-Based**

Complementary and Alternative Medicine, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/28154612019>. Acesso em: 21 nov. 2023.

Disponível em: <https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/16704/1/APRimes.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2023.

ROBAINA, D.; ALVARIZA, S.; SUÁREZ, G. **Bioequivalence of two novel formulations of ivermectin 1% combined with fluazuron 12.5% for subcutaneous administration in cattle.** *J Pharm Pharmacogn Res*, 2021, 9(1): 88–97. Disponível em: https://jppres.com/jppres/pdf/vol9/jppres20.955_9.1.88.pdf. Acesso em: 19 nov. 2023.

SAMED, K. O. C.; AYDIN, L.; CETIN, H. **O primeiro estudo sobre a resistência ao fipronil, clorpirifós-metil e permetrina em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* da Turquia.** *Int. J. Trop. Insect Sci.*, 2021, 42, 597–602. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42690-021-00578-5>. Acesso em: 19 nov. 2023.

SANTOS, N. R. dos.; LEITZKE, L. S.; NAVARRO, V. S.; RODRIGUES, O. R. M.; CORADINI, M. G. L.; ROSSATO, A. D. P.; SIMÕES, M. da R. S.; BIANCHI, E. **ANÁLISE FINANCEIRA DE UMA PROPRIEDADE RURAL COM PRODUÇÃO DE BOVINOS DE CORTE.** *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 3481–3501, 2022. Disponível em: <https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/3748>. Acesso em: 15 nov. 2023.

SUÁREZ, G.; ROBAINA, D.; MUELA A. **Is the suckling period and application pattern relevant for fluazuron against tick infestation in cows and their suckling calves?** *BMC Vet Res*, 2021, 17:375. Disponível em: https://jppres.com/jppres/pdf/vol11/jppres22.1548_11.2.346.pdf. Acesso em: 14 nov. 2023.

VALIANTE, C.; ROBAINA, D.; ALVARIZA, S.; SUAREZ, V. **Development and validation of UPLC-UV method for the determination of fluazuron in bovine tissues.** *J Pharm Pharmacogn Res* 2023, 11(2): 346–353. Disponível em: <https://jppres.com/jppres/quantification-of-fluazuron-in-bovine-tissues/>. Acesso em: 15 nov. 2023.

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.** *Braz J Vet Parasitol* 2021; 30(1): e025220. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-296120201091>. Acesso em: 15 nov. 2023.

VILLAMIL, E.; GOMEZ, J. A.; VIVEROS, J.; NOVEL, M. **Combination of Fipronil (1%) and Eprinomectin (0,5%) for Internal and External Parasite Control and its Impact on Average Daily Weight Gain on Beef Cattle**, Alimentado em Jalisco, México. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4091553>. Acesso em: 19 nov. 2023.

VOLK, M. J. et al. **Effects of extended-release eprinomectin on fescue toxicosis, performance, and reproduction on fall-calving beef cows.** *Transl. Anim. Sci.* 2019.3:1423–1434.

Disponível em: <https://academic.oup.com/tas/article/3/4/1423/5514548>. Acesso em: 19 nov. 2023.

Capítulo 2: Assessment of the endectocide efficacy of a pour-on topical solution containing fluazuron, fipronil and eprinomectin in cattle*

Daniel de Melo Pacheco^{1*}, Carolina Buzzulini², Gustavo Felippelli², Lucas Vinícius Costa Gomes¹, Gabriele Zaine Teixeira Debortoli³, Thaís Rabelo Santos-Doni³, Alvimar José da Costa¹

¹ Universidade Estadual de São Paulo (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV), Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

² Instituto de Pesquisas em Saúde Animal (IPESA), Distrito Segredo, zona rural, s/n, Formiga, Minas Gerais, Brasil.

³ Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Avenida Universitária, 1000, Unaí, Minas Gerais, Brasil.

Corresponding author and address:

*Corresponding author: Daniel de Melo Pacheco

Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Unaí, MG, Brasil

E-mail: pachecovet@hotmail.com

Abstract

The present study aimed to evaluate the effectiveness of the new formulation composed of active ingredients belonging to the chemical groups: benzoylphenylurea, phenylpyrazole and macrocyclic lactone, whose different mechanisms of action act on the most important parasites as *R. microplus*, *H. irritans*, *D. hominis* larvae, *C. hominivorax* larvae and nematodes. The six experiments were conducted in Formiga (Bananal and Bela Vista farms), in the Center-West region of Minas Gerais, Brazil. This study introduces a new topical formulation containing 3.0% Fluazuron, 1.25% Fipronil, and 0.5% Eprinomectin, which has demonstrated high efficacy against *R. microplus* in both natural (97%) and experimental (95%) infestations. Additionally, the formulation proved effective as a larvicide against *D. hominis* (98%) and *C. hominivorax* (100%), as well as an against *H. irritans* (98%), and as an anthelmintic (97%). Its broad-spectrum activity and prolonged efficacy make it a tool in the management of parasitic infestations in cattle. However, the potential for resistance development and the need for strategic application highlight the

* Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à Veterinary Research Communications e encontra-se em avaliação para publicação.

importance of integrated control programs that combine chemical and non-chemical approaches to ensure sustainable parasite management.

1. Introduction

Based on studies carried out by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), the outlook for the beef cattle market points to significant growth in the coming years, peaking in 2027 due to the concentration of meat export volume, placing Brazil as the holder of one third of commercial expansion (OCDE/FAO 2019).

Recent studies have underscored the pressing challenges in managing parasitic infestations in cattle, particularly within Brazil's robust beef industry. In Brazil, a large part of the cattle herd is raised on pasture and these animals are naturally exposed to the acquisition of endo and ectoparasites (Strydom et al. 2023).

The prevalence of drug-resistant parasites, including *Rhipicephalus microplus*, *Haematobia irritans*, *Cochliomyia hominivorax*, *Dermatobia hominis* and nematodes, poses a significant threat to cattle health and the economic sustainability of the industry. These parasites, if not adequately controlled, can lead to severe productivity losses, driven by reduced feed efficiency, anemia, and overall poor animal health (De León et al. 2020).

Ectoparasites represent a major obstacle to national cattle farming. The economic losses caused by external parasites in Brazilian cattle farming are attributed to the cattle tick (*R. microplus*) in 75% of cases; the other ectoparasites (*H. irritans*, *D. hominis*, *C. hominivorax* and *Stomoxys calcitrans*) together correspond to the remaining 25% (Calvano et al. 2019; Grisi et al. 2014).

Gastrointestinal nematode (GIN) also significantly impact cattle health, with *Haemonchus placei* and *Cooperia punctata* being the most critical species in Brazil, collectively responsible for about 90% of the parasitic load (Santos et al. 2010).

The resistance of these parasites to commonly used antiparasitic drugs, such as fluazuron (Torrents et al. 2022), fipronil (Valsoni et al. 2021) and macrocyclic lactones (Lifschitz et al. 2024), has been well-documented over the past five years. The overuse of these drugs, incorrect dosing, and lack of rotation among different classes of antiparasitic have exacerbated this issue (Campbell and Soman-Faulkner 2024).

To prevent the occurrence of these episodes, parasite control is necessary and should be carried out using medications administered topically to parasitized animals (da Costa et al. 2023). Due to the current situation of records in the literature of resistance to several unique active principles and to optimize the alternatives for strategic controls, the present study proposes to present efficiency data related to a drug combination with endectocide activity, composed of 3% fluazuron + 1.25% fipronil + 0.5% eprinomectin, unprecedented worldwide.

In this context, a total of six experiments were conducted, aims to evaluate the effectiveness of the new formulation composed of active ingredients belonging to the chemical groups: benzoylphenylurea, phenylpyrazole and

macrocyclic lactone, whose different mechanisms of action act on the most important parasites as *R. microplus*, *H. irritans*, *D. hominis* larvae, *C. hominivorax* larvae and nematodes.

2. Material and Methods

Location

The experiments were conducted at the Animal Health Research Institute Ltd. (IPESA), located in Formiga (Bananal and Bela Vista farms), in the Center-West region of Minas Gerais, Brazil (Figure 1), at coordinates 20° 27' 50" S and 45° 25' 33" W, with a maximum altitude of 1,125 meters above sea level. The location is characterized by a tropical highland climate, creating ideal conditions for conducting experiments with cattle, particularly in studies evaluating the efficacy of antiparasitic treatments.

Experimental design

Cattle were carefully selected based on their good clinical and nutritional status, absence of antiparasitic treatment in the 120 days prior to the experiments, and specific parasitic infestation characteristics required for each study (Table 1). All formulations, including the placebo (2.5% fluazuron + 1.25% fipronil), were administered topically (pour-on) at a dose of 1 mL/10 kg of body weight. Each experiment was designed to evaluate the efficacy of a topical formulation with this dosage. The formulation contained 3% fluazuron, 1.25% fipronil, and 0.5% eprinomectin, and was tested against various parasites.

Ethics statement

All experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) at IPESA, under protocol numbers: PP 023/2018 (study 1), PP 022/2018 (study 2) e PP 028/2018 (study 3), PP 020/2018 (study 4), PP 024/2018 (study 5) e PP 021/2018 (study 6), ensuring that the handling of animals strictly adhered to animal welfare regulations.

Efficacy against *Rhipicephalus microplus* in experimentally infected cattle (stall test) – Study 1

In the first experiment, 21 cattle were housed individually in stalls with suspended floors to collect detached engorged females. During the experimental period, the animals underwent an adaptation phase followed by controlled infestation with 5,000 *R. microplus* larvae three times a week, totaling 12 infestations (days -25, -23, -21, -19, -17, -

15, -11, -9, -7, -5, -3, and -1) prior to treatment, where they were subjected to a 40-day adaptation period in individual pens with suspended flooring.

The animals were then randomly assigned to three groups of seven based on the average engorged females counts collected on days -3, -2, and -1 before treatment. Animals were listed in descending order by the average number of ixodid counts and then randomly assigned to different treatments. Post-treatment reinfestations were conducted twice a week (Holdsworth et al. 2006).

The treatments consisted of the topical application of the following formulations: 3% Fluazuron + 1.25% Fipronil + 0.5% Eprinomectin (G2), placebo (G1), and 2.5% Fluazuron + 1.25% Fipronil (G3). Engorged *R. microplus* females that naturally detached were collected daily from the first day post-treatment (DPT) until day 62. Quantification was performed by washing the stalls with pressurized water, capturing the engorged females in an external structure with a ring and sieve.

Therapeutic efficacy was assessed based on the effect on ticks between D1 and D22 (Holdsworth et al. 2022) or D23 (Brazil 1997) post-treatment, while persistent efficacy referred to the evaluation of the duration of protection against new infestations following treatment administration on D0 (Holdsworth et al. 2022).

Efficacy against *Rhipicephalus microplus* in naturally infested cattle – Study 2

In the second experiment, 20 cattle were selected based on three consecutive counts (days -3, -2 and -1) of semi engorged *R. microplus* females (4,5-8,0 mm) on the left side of each animal (Wharton et al. 1970). The animals were divided into two experimental groups in a randomized manner: on day -1, they were listed in descending order by the mean number of ixodids and distributed into 10 replicates, with the first two with the highest counts in replicate 1, the next two in replicate 2, and so on. On the day before treatment (D-1), the cattle were individually weighed, and treatments were administered, one group received the test formulation (3% Fluazuron + 1.25% Fipronil + 0.5% Eprinomectin), while the other group served as a control. *R. microplus* counts were performed on -3, -2, -1, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, and 49 DPT.

Efficacy against *Haematobia irritans* – Study 3

The third experiment involved 30 cattle selected based on three criteria: good clinical and nutritional status, absence of insecticide/endectocide treatment in the 120 days prior to the experiment, and the presence of at least 50 horn flies (*H. irritans*) per animal, according to counts carried out by two people on two consecutive days (D-2 and D-1). The

animals were divided into two groups of 15, each kept in separate paddocks at least 5 km apart and identified with numbered ear tags.

On day 0, the cattle were classified based on *H. irritans* counts from D-2 and D-1 and were then randomly assigned to the experimental groups. The two cattle with the highest number of flies were allocated to repetition 1, the next two to repetition 2, and so on, until 15 repetitions were formed. Within each repetition, the animals were subsequently assigned randomly to the experimental groups. The test formulation was applied topically, and *H. irritans* counts were performed on -2, -1, +3, +7 DPT, and weekly until the end of the experiment. These counts were conducted by two researchers positioned on either side of the animal, always between 07:00 and 10:00 a.m., at each time point.

Efficacy against *Dermatobia hominis* larvae - Study 4

In the fourth experiment, 20 cattle were selected based on the presence of at least 10 nodules containing *D. hominis* larvae across their entire body surface (visual and tactile inspection). The animals were divided into two groups of 10 based on the nodule counts (Lopes et al. 2017) and then randomly assigned to treatment groups. Allocation to the groups began with those showing the highest counts of botflies, ensuring random distribution among the groups. The formulation was applied topically, and nodule counts containing live larvae were performed weekly on D-1 through 70 DPT.

Efficacy against *Cochliomyia hominivorax* larvae in naturally in cattle (therapeutic efficacy) – Study 5

In the fifth experiment, 20 cattle were divided into two groups of 10, with the aim of observing at least 10 active myiasis in each group. To reduce stress and preserve animal welfare, a single skin incision was made in each animal, in the region between the infrascapular fossa and the dorsal edge of the scapula.

On D0, the selected cattle were sedated with xylazine and locally anesthetized with 2% lidocaine. A skin incision of approximately four centimeters was made in the area between the infrascapular fossa and the dorsal edge of the scapula (Brazil 1997; Moya-Borja et al. 1997; Nogueira et al. 2020). After the surgery, the cattle were released into a pasture to allow for spontaneous infestation by *C. hominivorax* larvae (myiasis).

The animals were treated with the test formulation (3% Fluzuron + 1.25% Fipronil + 0.5% Eprinomectin) or placebo, applied topically from the neck to the tail base. The skin lesions were examined daily until the 5 DPT to check for the presence of *C. hominivorax* larvae. Myiasis was classified as active if at least one live larva was present, and as non-active if no live larvae were found.

On the 5th DPT, the cattle in the control group were administered a commercial formulation with both repellent and healing properties. If any of the treated cattle did not exhibit healing within 120 hours after the initial treatment, they were also given the commercial formulation to address the myiasis.

The formulation containing 3.0% Fluazuron, 1.25% Fipronil, and 0.5% Eprinomectin would be considered effective if it achieved a 100% efficacy rate 72 hours after treatment, according to the criteria established by Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (Brazil 1997).

Efficacy against GIN in cattle – Study 6

The sixth experiment was conducted with 14 calves, selected based on fecal egg counts of nematodes greater than 200 fecal egg counts (FEC), using a saturated solution of sucrose or salt (Gordon and Whitlock 1939). Seven days before treatment, the calves were transferred to collective pens with concrete floors, where they received food and water *ad libitum* in the segment (Wood et al. 1995). The volume of the solution used was at least three times the weight of the mucosa. Additionally, the lungs, pancreas *libitum*.

Calves were ranked based on three consecutive FEC (D-2, D-1, and D0) and then distributed into seven replicates, with two calves in each. Within each replicate, one calf was randomly assigned to each experimental group.

After treatment, the calves were necropsied on 14 DPT, through stunning with a pneumatic gun and death by hypovolemia, in accordance with Arouca Law standards and animal welfare guidelines, and their carcasses were discarded at a slaughterhouse. Due to the high lipophilicity of avermectin, which leads to prolonged absorption and distribution of the drug, necropsy was performed 14 DPT.

The cattle were fasted for 24 hours and then humanely euthanized in accordance with the ethical guidelines outlined in the Note for Guidelines on Euthanasia (2013). Subsequently, their gastrointestinal tracts were carefully removed, and the various anatomical segments (abomasum, small intestine, and large intestine) were isolated and separated using double ligatures. Each segment was then opened with enterotomy scissors, and the entire mucosal surface was rinsed with running water to collect all contents, including any parasites present.

The collected contents from each segment were subjected to a secondary washing and sieving (using a Tyler 48 sieve with a 0.297 mm opening) to concentrate the samples, which were then stored in plastic containers with 10% formaldehyde. After the abomasal contents were removed, the mucosa was digested for four to six hours in a hydrochloric pepsin solution preheated to 37°C to recover any helminth larvae present, and liver of all animals were dissected and visually inspected for the presence of helminths, including both adult and larval stages (Wood et al. 1995).

A 10% aliquot of the total content from each gastrointestinal segment was retained for examination and to estimate parasite loads. Helminths were collected using a magnifying glass and identified to genus and species under a stereoscopic microscope (magnification 100–400×) following the taxonomic criteria outlined by (Achi et al. 2003; Levine 1968; Ueno and Golçalves 1998). To aid in the identification process, one or two drops of lactophenol were added.

Statistical Analysis

All studies, except for studies 5 and 6, which used the arithmetic mean, employed the geometric mean for calculations. The data collected on each experimental date were $\log(\text{count} + 1)$ transformed in experiments with cattle naturally infested with *R. microplus* (and experimentally), as well as with *H. irritans*, *C. hominivorax* larvae, and *D. hominis*.

Data were analyzed using an F-test and compared by Tukey's test (study 1) or mean comparisons by Student's t-test (studies 2, 3, 4, 5 and 6), in accordance with Little and Hills (1978). The transformed data were analyzed using a linear mixed model for repeated measures, which included fixed effects for treatment, study day, and their interactions. Differences between treatments across all studies were assessed at a 5% significance level ($P \leq 0.05$). The analyses were performed using SAS software (1996) and followed the formulas proposed by (Brazil 1997; Holdsworth et al. 2022; Roulston and Wharton 1967).

The formula for calculating the percentages of effectiveness against *R. microplus* (study 1 and study 2) is as follows:

$$\text{Percentage of effectiveness} = \left[1 - \frac{T_a \times C_b}{T_b \times C_a} \right] \times 100$$

Where:

T_a = average number of engorged females collected from treated animals after medication.

T_b = average number of engorged females collected from treated animals in the three days prior to treatment.

C_a = average number of engorged females collected from animals in Group 1 in the period after the start of the experiment.

C_b = average number of engorged females collected from animals in Group 1 in the three days prior to treatment.

To calculate the efficacy percentages against *H. irritans* (study 3), *D. hominis* larvae (study 4), *C. hominivorax* larvae (study 5), nematodes (study 6) the following formula was used:

$$\text{Percentage of effectiveness} = \left[\frac{c-t}{c} \right] \times 100$$

Where:

C: average number of flies/myiasis/nodule/nematodes in the control group (on the respective counting dates).

T: average number of flies/myiasis/nodule/nematodes in the treated group (on the respective counting dates).

3. Results

The results of this study demonstrate the high efficacy of a topical formulation containing 3% Fluazuron, 1.25% Fipronil, and 0.5% Eprinomectin against a range of cattle parasites. This efficacy is particularly noteworthy given the increasing prevalence of acaricide resistance, which has become a significant challenge in cattle management globally.

Study 1: Efficacy against *Rhipicephalus microplus* in experimentally infested cattle (Stall Test)

This study assessed the therapeutic and persistent efficacy of 3% Fluazuron + 1.25% Fipronil + 0.5% Eprinomectin and 2.5% Fluazuron + 1.25% Fipronil against artificial infestations and continuous larval challenges of *R. microplus* are presented in Table 2. The control group (G1) maintained high levels of infestation throughout the experiment, indicating the effective challenge of the test.

The therapeutic efficacy of the test formulation (3% Fluazuron + 1.25% Fipronil + 0.5% Eprinomectin) was evaluated based on the daily quantification of detached *R. microplus* females.

The results of the therapeutic efficacy evaluation against *R. microplus* in experimentally infested cattle, along with the data analysis, are presented in Table 2. Based on this information, it was determined that the combination of 3% Fluazuron + 1.25% Fipronil + 0.5% Eprinomectin achieved efficacy rates greater than 95% from the 9th to the 48th DPT, while the 2.5% Fluazuron + 1.25% Fipronil formulation demonstrated 95% efficacy from the 24th to the 40th DPT. The study found an average therapeutic efficacy of 86% up to D22, with persistent efficacy exceeding 95% lasting until D62.

The treated group (G2) showed a consistent reduction in detached *R. microplus* females counts, achieving more than 90% efficacy between 8 and 51 DPT, with peak efficacy of 100% observed between 21 and 45 DPT. The G3, treated with the commercial formulation (2.5% Fluazuron + 1.25% Fipronil), exhibited lower efficacy, with 100% effectiveness observed only between 33 and 37 DPT.

Study 2: Efficacy against *Rhipicephalus microplus* in naturally infested cattle

The therapeutic efficacy of the formulation (3% Fluazuron + 1.25% Fipronil + 0.5% Eprinomectin) demonstrated high effectiveness against naturally infested *R. microplus* (Table 3). Counts were significantly reduced in the treated group (G2) compared to the control (G1). Efficacy exceeded 95% on days 7, 14, 21, and 28 post-treatments, with the highest efficacy recorded on day 28 at 99.45%. Mean efficacy between D7 and D14 was 96.9%. By D49, efficacy had decreased to 71.87%, which marked the conclusion of the study. These results suggest that the formulation provides effective protection against *R. microplus* for approximately 28 DPT.

Study 3: Efficacy Against *Haematobia irritans*

The efficacy against *H. irritans* (Table 3) was evaluated by counting the flies on both control (G1) and treated (G2) cattle. The 3% Fluazuron + 1.25% Fipronil + 0.5% Eprinomectin demonstrated over 95% efficacy on 1 and 21 DPT, with maximum efficacy reaching 99.5% on D7. A gradual decline in efficacy was noted from D28 onwards, with effectiveness greater than 80%. Group 1 consistently showed higher fly counts, which confirmed the treatment's effectiveness in reducing *H. irritans* populations. The quantifications of *H. irritans* in G2 were significantly ($P < 0.0001$) lower than those recorded in the control group, from the 1st to the 42nd DPT.

Study 4: Efficacy against *Dermatobia hominis* larvae

Efficacy was 97.9% (Table 3) at D7 and from D14 to D28, no larvae were found in any treated animal, while counts in the negative control group (G1) remained constant throughout the study period and were significantly higher ($p < 0.0001$). Persistent efficacy remained above the 90% threshold until Day 56, and by Day 63, efficacy dropped to 87.7%.

Study 5: Efficacy against *Cochliomyia hominivorax* Larvae in Naturally Infested Cattle

Therapeutic efficacy was calculated considering the presence or absence of *C. hominivorax* larvae (active or inactive myiasis), following standards established by Brazil (1997). The formulation (3% Fluazuron + 1.25% Fipronil + 0.5% Eprinomectin) achieved 100% efficacy against *C. hominivorax* larvae ($p < 0.0001$) between days 1 and 5 post-treatment (Table 3). No active myiasis was observed in the treated group (G2), while the control group (G1) continued to experience persistent infestations. Although egg masses were still present on the treated cattle until day 4 post-treatment, indicating that the formulation does not have repellent action.

Study 6: Efficacy Against GIN in Cattle

The following helminth species were identified in the control group animals: *Haemonchus placei* (adult), *Cooperia punctata*, *C. pectinata*, *C. spatulata*, *Trichostrongylus axei* and *Oesophagostomum radiatum*. Overall efficacy (all nematodes) was 96.5% (Table 4). The treatment obtained 100% anthelmintic efficacy against *C. pectinata*. For *H. placei* and *C. punctata*, the efficacies were 92.9% and 97.3%, respectively. *Cooperia spatulata*, *T. axei* and *O. radiatum* showed efficacies greater than 95%. The mean counts of these worm species, from parasitological necropsy, for the gastrointestinal tract of the animals in the group treated with the combination were lower ($p < 0.0001$) than those of the control group.

4. Discussion

This study introduces a new topical formulation containing 3.0% Fluazuron, 1.25% Fipronil, and 0.5% Eprinomectin, which has demonstrated high efficacy against *R. microplus* in both natural (97%) and experimental (95%) infestations. Additionally, the formulation proved effective as a larvicide against *D. hominis* (98%) and *C. hominivorax* (100%), as well as an against *H. irritans* (98%), and as an anthelmintic (97%). To this end, the research adhered to both national (Brazil 1997) and international (Holdsworth et al. 2022) guidelines to demonstrate the endectocide efficacy of the 3.0% Fluazuron, 1.25% Fipronil, and 0.5% Eprinomectin formulation in Brazil.

Fluazuron provides long-term control of the tick population due to its insect growth-regulating effect but does not show any insecticidal activity (Bull et al. 1996b). In contrast, fipronil provides immediate and residual acaricidal and insecticidal activity (Davey et al. 1998). Eprinomectin is a macrocyclic lactone medication, that in cattle, it is long-acting and has both endo- and ectoparasiticide effects (Rehbein et al. 2012). The combination of fipronil, fluazuron and eprinomectin showed high efficacy against tick, fly and nematodes. The use of multiple active ingredients in a single formulation can be a strategic approach to delaying the development of resistance in parasitic populations (Borges et al. 2007; Borges et al. 2008).

Study 1: Efficacy against *Rhipicephalus microplus* in experimentally infested cattle (Stall Test)

R. microplus is one of the major challenges from both sanitary and economic perspectives in global cattle farming (Agwunobi et al. 2021; Rodriguez-Vivas et al. 2018). In Brazil, resistance to fipronil in *R. microplus* has developed rapidly, typically within 2 to 3 years, compared to other active ingredients like ivermectin, which generally takes four to five years to develop resistance (Cruz et al. 2015). The use of multiple active ingredients in a single formulation

can help delay the emergence of resistant parasite populations, as noted in previous studies (Lanusse et al. 2015; Leathwick et al. 2015; Suarez et al. 2014).

The study 1, cattle treated with the new topical formulation under artificial infestation conditions, demonstrated therapeutic efficacy rates exceeding 80% up to 60 DPT. This finding aligns with an earlier study by Lopes et al. (2017), which involved an artificial infestation of *R. microplus* populations sensitive to fipronil and fluazuron. In that study, a combination of 1.25% fipronil and 2.5% fluazuron showed residual efficacy ranging from 50 to 60 DPT. The efficacy of the new formulation up to 60 DPT is highly advantageous for livestock management, as it reduces the frequency of treatments needed. This allows producers to achieve consistent parasite control with fewer applications, thereby lowering labor and operational costs while minimizing disruption to livestock routines.

Study 2: Efficacy Against *Rhipicephalus microplus* in Naturally Infested Cattle

Although previous studies, such as (Rocha 2016), evaluated a 0.6% abamectin and 3.0% fluazuron formulation for controlling *R. microplus* in crossbred cattle, achieving therapeutic efficacies of 95.57% and 96.90% against of this ectoparasite on days 7 and 14, respectively, with residual efficacy lasting 91 days, our new formulation not only maintained high efficacy but also demonstrated superior performance.

Specifically, in this research, the new formulation achieved efficacies of 96.12% on day 7 and 97.26% on day 14 for controlling *R. microplus* in naturally infested animals. This enhanced effectiveness can be attributed to the synergistic combination of the three active agents in the new formulation, which outperforms the previously evaluated 0.6% abamectin + 3.0% fluazuron formulation.

The therapeutic effectiveness of fluazuron 2.5% (2.5 mg/kg) administered topically via pour-on exhibited a residual period of 56 days, with efficacy exceeding 80% starting from day 7 post-treatment (Gomes et al. 2015). This pattern of residual efficacy is consistent with the findings of Bull et al. (1996a), which describe fluazuron administered via pour-on in cattle as having a residual period of over 60 days, effectively controlling reinfestations of ticks.

Study 3: Efficacy Against *Haematobia irritans*

In study 3, the new formulation of 3.0% fluazuron combined with 1.25% fipronil and 0.5% eprinomectin was evaluated against *H. irritans* and showed high efficacy from day 1, with results above 98%, reaching 99.5% on day 7 and maintaining more than 80% efficacy until day 28 DPT, with counts being closed on 42 DPT. These results were superior to those of Lopes et al. (2017), where the combination of 1.25% fipronil and 2.5% fluazuron showed a therapeutic efficacy of 99% on 1 DPT, 99.3% on 7 DPT, but dropped to only 26.20% on 28 DPT. In another study,

Scott et al. (2008) reported that the formulation containing 0.5% eprinomectin achieved 100% efficacy in controlling *H. irritans* on days 7, 14 and 21, but reduced to 0% on day 28 after treatment.

The results obtained with the new formulation can be attributed to the synergy among its three active ingredients: phenylpyrazole (fipronil), benzoylphenylurea (fluazuron), and macrocyclic lactone (eprinomectin). According to Tingle et al. (2003) fipronil is a fast-acting, broad-spectrum insecticide that provides immediate control of flies. Fluazuron, an insect growth inhibitor, extends the efficacy of the formulation by disrupting the parasites' life cycle (Kemp et al. 1990). Meanwhile, eprinomectin, a macrocyclic lactone, enhances the formulation by ensuring continuous action against infestations (Shoop et al. 1996). This combination of different modes of action ensures both consistency and durability of effects throughout the observation period (28 DPT), leading to sustained efficacy.

Study 4: Efficacy against *Dermatobia hominis* larvae

The formulation's performance against *D. hominis* larvae (study 4) is significant due to the high efficacy observed, with 100% effectiveness between days 14 and 28, and maintaining effectiveness up to 56° DPT. Few studies have evaluated the efficacy of fipronil, fluazuron, and eprinomectin, combined or not, against larvae of this parasite to date. The broad residual efficacy can be attributed to the association of eprinomectin, which has a high larvicidal action. Nascimento et al. (2015) demonstrated the effectiveness of eprinomectin in penetrating deep tissue to reach larvae located within nodules. It is important to note that authors used injectable eprinomectin, which may have different implications for drug absorption and distribution compared to the topical form used in this research.

Study 5: Efficacy against *Cochliomyia hominivorax* Larvae in Naturally Infested Cattle

Like to the efficacy results presented in Study 4, the formulation eliminated *C. hominivorax* larvae with 100% efficacy within five days. This is consistent with two studies that used a combination of 1.25% fipronil and 2.5% fluazuron in cattle, achieved therapeutic efficacy rates of 100% and $\geq 99\%$ against larvae of *C. hominivorax* and *D. hominis*, respectively (Lopes et al. 2017).

Injectable compounds are commonly used in cattle due to their rapid absorption; topical administration (pour-on) offers advantages such as ease of application, lower cost, and a reduced risk of pathogen transmission, which can occur with the reuse of needles among multiple animals. de Aquino et al. (2022) evaluated the preventive efficacy of injectable and topical products against *C. hominivorax* larvae. Among the topical products tested was fipronil, which demonstrated superior performance compared to injectable products.

The inclusion of fipronil in the topical formulation, combined with other active ingredients, likely contributes to the enhanced efficacy observed in research.

Study 6: Efficacy Against GIN in Cattle

The results from Study 6 demonstrate a high efficacy of the combined anthelmintic treatment against GIN in cattle. This study assessed the response of various helminth species to a combined antiparasitic regimen, highlighting differential efficacy against specific species.

The efficacy in this study was determined by comparing the arithmetic means of the groups before and after treatment, and it was assessed by considering both the lower and upper bounds of the 95% confidence interval.

Species-specific efficacy is a crucial aspect of anthelmintic treatment, as some parasites exhibit varying levels of susceptibility. In this research, it was possible to verify an efficacy of over 95% in all GIN recovered at necropsy. Coumendouros et al. (2003) demonstrated high efficacy with eprinomectin 0.5% (pour-on) against nematode species, achieving rates of 99.7% against *H. placei*, 100% against *C. punctata*, 100% against *O. radiatum*, 100% against *Trichuris discolor* and 100% against *Agriostomum vryburgi*.

Studies have demonstrated that using combination therapies that target multiple parasite species and life stages can enhance overall anthelmintic efficacy (Nielsen et al. 2023). For example, a combination of macrocyclic lactones with other anthelmintic classes has been shown to provide broad-spectrum control against GIN (Allworth et al. 2023; Geurden et al. 2015). A study by DeRosa et al. (2023) found that a combination of doramectin and levamisole exhibited superior efficacy compared to monotherapy, significantly reducing the parasite burden in treated cattle.

In conclusion, the topical formulation containing 3% Fluazuron, 1.25% Fipronil, and 0.5% Eprinomectin has demonstrated high efficacy against a range of important cattle parasites, including *R. microplus*, *H. irritans*, *D. hominis*, *C. hominivorax*, and various nematodes. Its broad-spectrum activity and prolonged efficacy make it a valuable tool in the management of parasitic infestations in cattle. However, the potential for resistance development and the need for strategic application highlight the importance of integrated control programs that combine chemical and non-chemical approaches to ensure sustainable parasite management

Acknowledgments

"Not applicable"

Consent for publication

"Not applicable"

Availability of data and material

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.

Funding Statement

This research received no external funding.

Author Contributions

TRSD: original draft, formal analysis, validation, visualisation; DMP: data curation, investigation, methodology; CB: methodology, validation, writing - review and editing; GF: data curation, investigation, methodology; LVCG: data curation, investigation, methodology; GZTD: validation, writing - review and editing; AJC: conceptualisation, project administration, resources, funding acquisition, supervision, writing - review and editing.

5. References

- Achi, Y., Zinsstag, J., Yao, K., Yeo, N., Dorchie, P., Jacquet, P., 2003. Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. *Veterinary parasitology* 116, 151-158.
- Agwunobi, D.O., Yu, Z., Liu, J., 2021. A retrospective review on ixodid tick resistance against synthetic acaricides: implications and perspectives for future resistance prevention and mitigation. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 173, 104776.
- Allworth, M., Goonan, B., Nelson, J., Kelly, G., McGrath, S., Woodgate, R., 2023. Comparison of the efficacy of macrocyclic lactone anthelmintics, either singly or in combination with other anthelmintic (s), in nine beef herds in southern NSW. *Austr. Vet. J.* 101, 293-295.
- Borges, F., Cho, H., Santos, E., Oliveira, G., Costa, A., 2007. Pharmacokinetics of a new long acting endectocide formulation containing 2.25% ivermectin and 1.25% abamectin in cattle. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 30, 62-67.
- Borges, F., Silva, H., Buzzulini, C., Soares, V., Santos, E., Oliveira, G., Costa, A., 2008. Endectocide activity of a new long-action formulation containing 2.25% ivermectin+ 1.25% abamectin in cattle. *Veterinary Parasitology* 155, 299-307.
- Brazil 1997. Portaria n.48, 12/05/1997, Ministério da Agricultura, P.e.A.M., Secretaria de Defesa Agropecuária ed.
- Bull, M., Swindale, S., Overend, D., Hess, E., 1996a. Suppression of *Boophilus microplus* populations with fluazuron-an acarine growth regulator.

- Bull, M.S., Swindale, S., Overend, D., Hess, E.A., 1996b. Suppression of *Boophilus microplus* populations with fluazuron--an acarine growth regulator. *Aust Vet J* 74, 468-470.
- Calvano, M., Brumatti, R.C., Garcia, M.V., Barros, J.C., Andreotti, R., 2019. Economic efficiency of *Rhipicephalus microplus* control and effect on beef cattle performance in the Brazilian Cerrado. *Exp Appl Acarol* 79, 459-471.
- Campbell, S., Soman-Faulkner, K., 2024. Antiparasitic drugs. StatPearls [Internet].
- Coumendouros, K., Tancredi, I., Scott, F.B., Martins, I.V., Sant'Anna, F.B., Grisi, L., 2003. Eficácia anti-helmíntica da eprinomectina no controle de nematóides gastrintestinais de bovinos. *Rev Bras Parasitol Vet* 12, 121-124.
- Cruz, B.C., Lopes, W.D.Z., Maciel, W.G., Felippelli, G., Fávero, F.C., Teixeira, W.F.P., Carvalho, R.S., Ruivo, M.A., Colli, M.H.A., Sakamoto, C.A.M., 2015. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin (200, 500 and 630 µg/kg) in field studies in Brazil. *Veterinary parasitology* 207, 309-317.
- da Costa, A.J., de Souza Martins, J.R., de Almeida Borges, F., Vettorato, L.F., Barufi, F.B., de Oliveira Arriero Amaral, H., Abujamra, L.C., de Castro Rodrigues, D., Zanetti Lopes, W.D., 2023. First report of the efficacy of a fluralaner-based pour-on product (Exzolt® 5%) against ectoparasites infesting cattle in Brazil. *Parasites & Vectors* 16, 336.
- Davey, R.B., Ahrens, E.H., George, J.E., Hunter, J.S., 3rd, Jeannin, P., 1998. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Vet Parasitol* 74, 261-276.
- de Aquino, L.M., Ferreira, L.L., Zapa, D.M.B., Heller, L.M., Trindade, A.S.N., de Moraes, I.M.L., Salvador, V.F., Leal, L.L.L.L., Couto, L.F.M., de Mendonça, R.P., 2022. Number of rainy days in a week influencing screwworm navel myiasis in beef calves and efficacies of injectable and topical antiparasitics. *Research in Veterinary Science* 152, 698-706.
- De León, A.A.P., Mitchell III, R.D., Watson, D.W., 2020. Ectoparasites of cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 36, 173-185.
- DeRosa, A.A., Nadrasik, A.N., Tena, J.K., 2023. Dose confirmation of a novel fixed dose combination injectable (0.2 mg/kg doramectin + 6.0 mg/kg levamisole hydrochloride) against naturally acquired gastrointestinal nematodes in US cattle. *Veterinary Parasitology* 323, 110070.
- do Nascimento, C.G., Correia, T.R., de Oliveira, G.F., Coumendouros, K., de Abreu Moraes, P., Calado, S.B., Bragaglia, G.N., Rosa, S.C., Toma, S.B., Scott, F.B., 2015. Eprinomectina 1% injetável no controle de *Dermatobia hominis* em bovinos naturalmente infestados. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine* 37, 81-84.
- Euthanasia, N.f.G.o., 2013. Guidelines on euthanasia. American Veterinary Medical Association, Schaumburg, Illinois, USA, 102.

- Geurden, T., Chartier, C., Fanke, J., di Regalbono, A.F., Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Vanimisetti, H.B., Bartram, D.J., Denwood, M.J., 2015. Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 5, 163-171.
- 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., 2015. Acaricidal effects of fluazuron (2.5 mg/kg) and a combination of fluazuron (1.6 mg/kg)+ ivermectin (0.63 mg/kg), administered at different routes, against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitizing cattle. *Experimental parasitology* 153, 22-28.
- Gordon, H.M., Whitlock, H., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.d.S., Barros, A.T.M.d., Andreotti, R., Caçado, P.H.D., León, A.A.P.d., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 23, 150-156.
- Holdsworth, P., Kemp, D., Green, P., Peter, R., De Bruin, C., Jonsson, N., Letonja, T., Rehbein, S., Vercruysse, J., 2006. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. *Veterinary Parasitology* 136, 29-43.
- Holdsworth, P., Rehbein, S., Jonsson, N.N., Peter, R., Vercruysse, J., Fourie, J., 2022. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP): Guideline for evaluating the efficacy of parasiticides against ectoparasites of ruminants. *Veterinary Parasitology* 302, 109613.
- Kemp, D., Dunster, S., Binnington, K., Bird, P., Nolan, J., 1990. Mode of action of CGA 157419 on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Bull Soc Fr Parasitol* 8, 1048-1049.
- Lanusse, C., Lifschitz, A., Alvarez, L., 2015. Basic and clinical pharmacology contribution to extend anthelmintic molecules lifespan. *Veterinary parasitology* 212, 35-46.
- Leathwick, D.M., Ganesh, S., Waghorn, T.S., 2015. Evidence for reversion towards anthelmintic susceptibility in *Teladorsagia circumcincta* in response to resistance management programmes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 5, 9-15.
- Levine, N.D., 1968. Nematode parasites of domestic animals and of man.
- Lifschitz, A., Nava, S., Miró, V., Canton, C., Alvarez, L., Lanusse, C., 2024. Macrocyclic lactones and ectoparasites control in livestock: efficacy, drug resistance and therapeutic challenges. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 100559.
- Little, T.M., Hills, F.J. 1978. *Agricultural experimentation design and analysis* (New York, NY, John Wiley & Sons).

- Lopes, W.D.Z., Chiummo, R.M., Vettorato, L.F., de Castro Rodrigues, D., Sonada, R.B., 2017. The effectiveness of a fixed-dose combination pour-on formulation of 1.25% fipronil and 2.5% fluazuron against economically important ectoparasites and associated pharmacokinetics in cattle. *Parasitol Int* 66, 627-634.
- Moya-Borja, G., Muniz, R., Umehara, O., Goncalves, L., Silva, D., McKenzie, M., 1997. Protective efficacy of doramectin and ivermectin against *Cochliomyia hominivorax*. *Veterinary Parasitology* 72, 101-109.
- Nielsen, M.K., Kaplan, R.M., Abbas, G., Jabbar, A., 2023. Biological implications of long-term anthelmintic treatment: what else besides resistance are we selecting for? *Trends in Parasitology* 39, 945-953.
- Nogueira, S.N.L., da Silva, M.F., Furtado, R.A., Paulino Júnior, D., Soares, M.C., Andrade, M.M.A., Nascimento, E.G., Ferreira, L.L., Soares, V.E., Lopes, W.D.Z., Paranhos de Mendonça, R., 2020. In vitro test for the evaluation of the efficacy of topical products for the control of *Cochliomyia hominivorax* larvae. *Parasitology* 147, 816-821.
- OCDE/FAO, 2019. *Perspectivas Agrícolas 2019-2028*. OCDE-FAO *Perspectivas Agrícolas 2019-2028*, OECD Publishing, Paris/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Roma
- Rehbein, S., Visser, M., Kellermann, M., Letendre, L., 2012. Reevaluation of efficacy against nematode parasites and pharmacokinetics of topical eprinomectin in cattle. *Parasitol Res* 111, 1343-1347.
- Rocha, C.N.C.d., 2016. Eficácia da associação de abamectina com fluazuron no controle de *Rhipicephalus microplus*, *Dermatobia hominis* e nematóides gastrointestinais em bovinos.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Jonsson, N.N., Bhushan, C., 2018. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology research* 117, 3-29.
- Roulston, W., Wharton, R., 1967. Acaricide tests on the Biarra strain of organophosphorus resistant cattle tick *Boophilus microplus* from southern Queensland.
- Santos, T.R.d., Lopes, W.D.Z., Buzulini, C., Borges, F.d.A., Sakamoto, C.A.M., Lima, R.C.d.A., Oliveira, G.P.d., Costa, A.J.d., 2010. Helminth fauna of bovines from the Central-Western region, Minas Gerais State, Brazil. *Ciência Rural* 40.
- Scott, F.B., Coumendouros, K., Martins, I., Grisi, L., Souza, C.P., Fernandes, J.I., Vieira, V., 2008. Efficacy of eprinomectin in the control of *Haematobia irritans* in cattle. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria= Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria* 17, 75-77.
- Shoop, W.L., Egerton, J.R., Eary, C.H., Haines, H.W., Michael, B.F., Mrozik, H., Eskola, P., Fisher, M.H., Slayton, L., Ostlind, D.A., Skelly, B.J., Fulton, R.K., Barth, D., Costa, S., Gregory, L.M., Campbell, W.C., Seward, R.L., Turner, M.J., 1996. Eprinomectin: a novel avermectin for use as a topical endectocide for cattle. *Int J Parasitol* 26, 1237-1242.

- Strydom, T., Lavan, R.P., Torres, S., Heaney, K., 2023. The Economic Impact of Parasitism from Nematodes, Trematodes and Ticks on Beef Cattle Production. *Animals (Basel)* 13.
- Suarez, G., Alvarez, L., Castells, D., Moreno, L., Fagiolino, P., Lanusse, C., 2014. Evaluation of pharmacological interactions after administration of a levamisole, albendazole and ivermectin triple combination in lambs. *Veterinary parasitology* 201, 110-119.
- Tingle, C.C., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, S., King, W.J., 2003. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol* 176, 1-66.
- Torrents, J., Sarli, M., Sarmiento, N.F., Rossner, M.V., Morel, N., Guglielmo, A.A., Nava, S., 2022. Resistance of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to fluazuron in Argentina. *Experimental and Applied Acarology* 86, 599-606.
- Ueno, H., Golçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes, 4 ed. Edition. JICA, Japão, 166p p.
- Valsoni, L.M., Freitas, M.G.d., Borges, D.G.L., Borges, F.d.A., 2021. Status of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin, fipronil and fluazuron in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 30, e025220.
- Wharton, R., Roulston, W., Utech, K., Kerr, J., 1970. Assessment of the efficiency of acaricides and their mode of application against the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Australian Journal of Agricultural Research* 21, 985-1006.
- Wood, I., Amaral, N., Bairden, K., Duncan, J., Kassai, T., Malone Jr, J., Pankavich, J., Reinecke, R., Slocombe, O., Taylor, S., 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary parasitology* 58, 181-213.

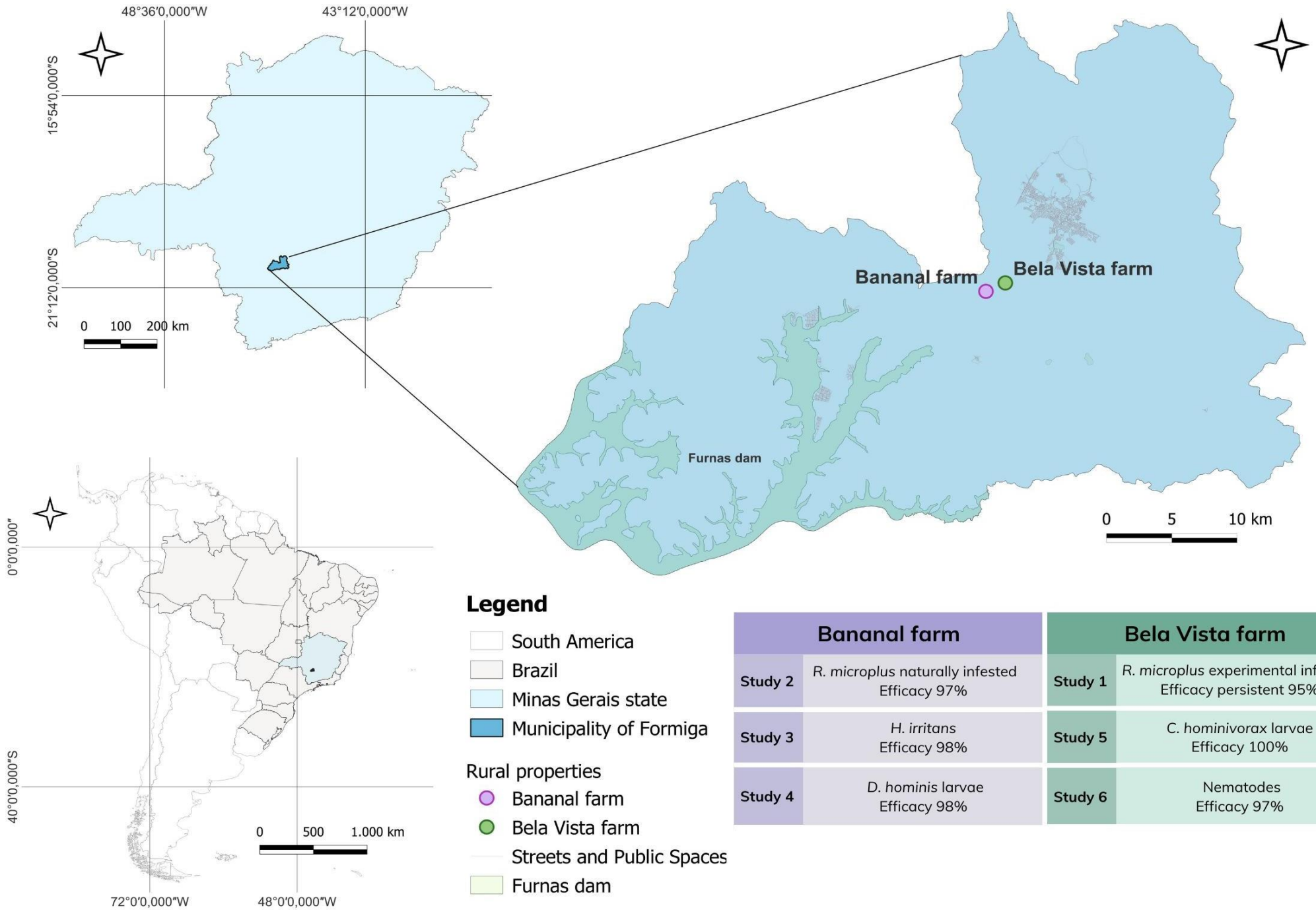
Figure 1 Geographical location of Bela Vista and Bananal farms in Formiga municipality with study efficacy results.

Table 1 Experimental design used in studies 1, 2, 3, 4, 5 and 6, in accordance with breed type, sex, number of animals included (n per group) and treatment group.

Table 2 Average number of *Rhipicephalus microplus* in experimentally infected cattle (stall test) belonging to the control and treated groups and efficacy percentages; Geometric means – Study 1.

Table 3 Efficacy of a topical formulation containing 3.0% fluazuron, 1.25% fipronil, and 0.5% eprinomectin against *Rhipicephalus microplus* in naturally infested cattle (Study 2), *Haematobia irritans* (Study 3), *Dermatobia hominis* larvae (Study 4), and *Cochliomyia hominivorax* larvae (Study 5).

Table 4 Efficacy of a topical formulation containing 3.0% fluazuron, 1.25% fipronil, and 0.5% eprinomectin against nematodes (Study 6).



Parasite	Study number and infestation setting	Breed type	Sex	Number of animals included (n per group)	Treatment group
<i>Rhipicephalus microplus</i> (cattle tick)	1. Experimental infestation	Crossbred (Gyr × Holstein 7/8)	Male (all)	21 (n = 7/group)	G1: Negative control G2: 3% fluazuron + 1.25% fipronil + 0.5% eprinomectin G3: 2.5% fluzauron + 1,25% fipronil
	2. Natural infestation	Crossbred (Gyr × Holstein 7/8)	Male (all)	20 (n = 10/group)	G1: Negative control G2: 3% fluazuron + 1.25% fipronil + 0.5% eprinomectin
<i>Haematobia irritans</i> (horn fly)	3. Natural infestation	Crossbred (Gyr × Holstein 15/16)	Male (all)	30 (n = 15/group)	G1: Negative control G2: 3% fluazuron + 1.25% fipronil + 0.5% eprinomectin
<i>Dermatobia hominis</i> (tropical warble fly) larvae	4. Natural infestation	Crossbred (Gyr × Holstein 7/8)	Male (all)	20 (n = 10/group)	G1: Negative control G2: 3% fluazuron + 1.25% fipronil + 0.5% eprinomectin
<i>C. hominivorax</i> (New World screwworm) larvae	5. Curative efficacy (natural infestation)	Crossbred (Gyr × Holstein 7/8)	Male (all)	20 (n = 10/group)	G1: Negative control G2: 3% fluazuron + 1.25% fipronil + 0.5% eprinomectin
Nematodes	6. Natural infection	Crossbred (Gyr × Holstein 7/8)	Male (all)	21 (n = 7/group)	G1: Negative control G2: 3% fluazuron + 1.25% fipronil + 0.5% eprinomectin

Study day	Mean** fully engorged <i>R. microplus</i> counts			Efficacy (%)	
	G1: Negative control	G2: 3,0% fluzauron + 1,25% fipronil + 0,5% eprinomectin	G3: 2.5% fluzauron + 1,25% fipronil	G2	G3
D0*	38.7 ^A	38.4 ^A	38.5 ^A	–	–
D1	39.3 ^A	39.8 ^A	41.8 ^A	0	0
D2	39.7 ^A	30.0 ^A	37.7 ^A	24	0
D3	39.2 ^A	19.9 ^A	29.3 ^A	49	25
D4	41.2 ^A	12.2 ^B	31.7 ^A	70	23
D5	43.3 ^A	7.5 ^B	31.1 ^A	83	28
D6	44.4 ^A	5.5 ^B	23.5 ^A	88	47
D7	45.7 ^A	5.5 ^B	18.9 ^{AB}	88	58
D8	45.2 ^A	3.7 ^B	14.1 ^B	92	69
D9	43.8 ^A	2.3 ^B	9.8 ^B	95	77
D10	45.3 ^A	2.0 ^B	8.0 ^B	95	82
D11	44.5 ^A	1.2 ^B	5.6 ^B	97	87
D12	47.9 ^A	1.2 ^B	5.4 ^B	97	89
D13	50.2 ^A	0.9 ^B	4.0 ^B	98	92
D14	45.1 ^A	1.1 ^B	5.4 ^B	98	88
D15	48.0 ^A	1.8 ^B	6.0 ^B	96	87
D16	47.9 ^A	1.7 ^B	5.2 ^B	96	89
D17	45.2 ^A	1.6 ^B	5.0 ^B	96	89
D18	43.8 ^A	1.4 ^B	4.8 ^B	97	89
D19	45.5 ^A	1.1 ^B	4.7 ^B	98	90
D20	47.1 ^A	0.8 ^B	4.7 ^B	98	90
D21	44.7 ^A	0.2 ^B	3.8 ^B	100	91
D22	47.2 ^A	0 ^B	2.7 ^B	100	94
D23	44.8 ^A	0 ^B	2.7 ^B	100	94
D24	45.3 ^A	0 ^B	2.1 ^B	100	95
D25	45.0 ^A	0 ^B	2.0 ^B	100	95
D26	46.4 ^A	0 ^B	1.2 ^B	100	97
D27	47.0 ^A	0 ^B	0.7 ^B	100	98
D28	49.0 ^A	0 ^B	0.6 ^B	100	99
D29	46.6 ^A	0 ^B	0.7 ^B	100	99
D30	49.3 ^A	0 ^B	0.4 ^B	100	99
D31	45.2 ^A	0 ^B	0.7 ^B	100	98
D32	46.2 ^A	0 ^B	0.5 ^B	100	99
D33	47.6 ^A	0 ^B	0 ^B	100	100
D34	46.5 ^A	0 ^B	0 ^B	100	100
D35	46.9 ^A	0 ^B	0 ^B	100	100
D36	45.7 ^A	0 ^B	0 ^B	100	100
D37	45.6 ^A	0 ^B	0 ^B	100	100
D38	46.5 ^A	0 ^B	1.2 ^B	100	97
D39	47.0 ^A	0 ^B	1.7 ^B	100	96
D40	45.8 ^A	0 ^B	2.0 ^B	100	96

D41	45.8 ^A	0 ^B	2.6 ^B	100	94
D42	48.3 ^A	0 ^B	3.1 ^B	100	94
D43	47.0 ^A	0 ^B	4.0 ^B	100	91
D44	47.4 ^A	0 ^B	5.2 ^B	100	89
D45	49.6 ^A	0 ^B	7.4 ^B	100	85
D46	50.2 ^A	0.8 ^B	9.3 ^B	98	81
D47	46.6 ^A	1.9 ^B	11.6 ^B	96	75
D48	49.4 ^A	2.3 ^B	12.3 ^B	95	75
D49	47.4 ^A	3.0 ^B	13.9 ^B	94	70
D50	50.2 ^A	3.3 ^B	14.5 ^B	93	71
D51	46.6 ^A	4.8 ^B	17.7 ^B	90	62
D52	46.7 ^A	5.1 ^B	18.5 ^B	89	60
D53	46.4 ^A	6.1 ^B	16.2 ^B	87	65
D54	46.5 ^A	6.1 ^B	15.6 ^B	87	66
D55	46.5 ^A	5.8 ^B	17.0 ^B	87	63
D56	45.4 ^A	6.4 ^B	17.1 ^B	86	62
D57	45.7 ^A	6.0 ^B	18.3 ^B	87	60
D58	45.4 ^A	5.5 ^B	15.4 ^B	88	66
D59	45.6 ^A	6.0 ^B	17.4 ^B	87	62
D60	46.2 ^A	6.6 ^B	18.3 ^B	86	60
D61	45.0 ^A	12.0 ^B	19.3 ^B	73	57
D62	44.8 ^A	16.3 ^B	23.2 ^{AB}	63	48
<hr/>					
Efficacy for the entire period (D1 to D62) ³	46.0 ^A	3.9 ^B	10.0 ^B	92	78
<hr/>					
Therapeutic efficacy (until D22) ⁴	44.7 ^A	6.4 ^B	13.8 ^B	86	69
<hr/>					
Therapeutic efficacy (until D23) ⁵	44.7 ^A	6.2 ^B	13.3 ^B	86	70
<hr/>					
Persistent efficacy (D23 up to D62)	46.7 ^A	2.4 ^C	7.9 ^B	95	83

Efficacy against <i>R. microplus</i> in naturally infested cattle (Study 2)								
Study day	Experimental groups / Mean value of female <i>R. microplus</i> (4.5–8.0-mm) of cattle and standard deviation ¹					Variance analysis		Efficacy (%)
	G1: Negative control			G2: 3,0% fluzauron + 1,25% fipronil + 0,5% eprinomectin		F ² value	prob. < F ³	
0	1.72 ± 0.25	Aac	1.73 ± 0.25	Aab	0.01	0.9267	-	
3	1.73 ± 0.24	Aa	1.65 ± 0.31	Abc	0.43	0.5203	19.4	
7	1.78 ± 0.18	Aa	0.51 ± 0.20	Be	215.21	<0,0001	96.3	
14	1.86 ± 0.17	Aa	0.46 ± 0.19	Be	301.13	<0,0001	97.4	
21	1.88 ± 0.16	Aa	0.45 ± 0.36	Be	134.30	<0,0001	97.6	
28	1.85 ± 0.15	Aa	0.10 ± 0.20	Bf	487.36	<0,0001	99.7	
35	1.89 ± 0.20	Aa	0.76 ± 0.37	Bde	73.31	<0,0001	94.0	
42	1.90 ± 0.19	Aa	1.02 ± 0.24	Bd	82.54	<0,0001	88.3	
49	1.97 ± 0.11	Aa	1.42 ± 0.17	Bc	78.54	<0,0001	73.4	
F ⁴ value	1.71		86.90					
prob. < F ³	0.1018		<0,0001					
Persistent efficacy (D28 up to D49)	1.90 ± 0.16	A	0.82 ± 0.24	A	<0,0001		88.9	
Mean efficacy between D7 and D14	1.82 ± 0.18	A	0.48 ± 0.20	A	<0,0001		96.9	
Efficacy against <i>Haematobia irritans</i> – Study 3								
Study day	Experimental groups / Mean number of <i>Haematobia irritans</i> and standard deviation ¹					Variance analysis		Efficacy (%)
	G1: Negative control			G2: 3,0% fluzauron + 1,25% fipronil + 0,5% eprinomectin		F ² value	prob. < F ³	
0	1.85 ± 0.20	Aa	1.86 ± 0.20	Aa	0.00	0.9879	-	
1	1.81 ± 0.25	Aab	0.26 ± 0.26	Bde	209.62	<0,0001	98.7	
3	1.65 ± 0.27	Abc	0.16 ± 0.19	Be	193.97	<0,0001	98.9	
7	1.71 ± 0.22	Aabc	0.09 ± 0.16	Be	228.95	<0,0001	99.5	
14	1.55 ± 0.28	Ac	0.24 ± 0.28	Bde	149.78	<0,0001	97.8	
21	1.61 ± 0.18	Ac	0.46 ± 0.39	Bd	116.24	<0,0001	95.3	
28	1.67 ± 0.24	Aabc	0.85 ± 0.46	Bc	59.13	<0,0001	86.7	
35	1.72 ± 0.24	Aabc	1.14 ± 0.45	Bb	30.28	<0,0001	75.5	
42	1.64 ± 0.36	Abc	1.23 ± 0.37	Bb	14.93	<0,0001	62.7	
F ⁴ value	1.61		64.57					
prob. < F ³	0.1223		<0,0001					
Efficacy against <i>Dermatobia hominis</i> larvae - Study 4								
Study day	Experimental groups / Mean number of <i>D. hominis</i> larvae and standard deviation ¹					Variance analysis		Efficacy (%)
	G1: Negative control			G2: 3,0% fluzauron + 1,25% fipronil + 0,5% eprinomectin		F ² value	prob. < F ³	
0	1.25 ± 0.20	Ad	1.26 ± 0.20	Aa	0.01	0.9180	-	
7	1.33 ± 0.18	Acd	0.16 ± 0.21	Bfg	111.22	<0,0001	97.9	
14	1.70 ± 0.31	Aab	0.00 ± 0.00	Bg	231.30	<0,0001	100.0	
21	1.71 ± 0.31	Aab	0.00 ± 0.00	Bg	233.82	<0,0001	100.0	
28	1.73 ± 0.31	Aa	0.00 ± 0.00	Bg	240.05	<0,0001	100.0	
35	1.73 ± 0.31	Aa	0.19 ± 0.21	Bfg	189.75	<0,0001	99.0	
42	1.60 ± 0.29	Aab	0.28 ± 0.24	Bef	139.95	<0,0001	97.7	
49	1.58 ± 0.24	Aab	0.43 ± 0.31	Bde	105.13	<0,0001	95.4	
56	1.55 ± 0.18	Aabc	0.55 ± 0.40	Bcd	79.54	<0,0001	92.5	
63	1.52 ± 0.21	Aabc	0.69 ± 0.36	Bc	54.33	<0,0001	87.7	
70	1.49 ± 0.19	Abc	0.98 ± 0.32	Bb	20.49	<0,0001	71.6	
F ⁴ value	4.11		28.56					
prob. < F ³	<0,0001		<0,0001					

Efficacy against <i>Cochliomyia hominivorax</i> larvae - Study 5					
Study day	Experimental groups / Total active myiasis (<i>C. hominivorax</i>) ⁵		Variance analysis		Efficacy (%)
	G1: Negative control	G2: 3,0% fluzauron + 1,25% fipronil + 0,5% eprinomectin	F ² value	prob. < F ³	
0 - morning	7 ^{Ab}	9 ^{Aab}	Not applicable		-
0 - afternoon	10 ^{Aa}	10 ^{Aa}	Not applicable		100.0
1 - morning	10 ^{Aa}	0 ^{Bc}	Not applicable		100.0
1 - afternoon	10 ^{Aa}	0 ^{Bc}	Not applicable		100.0
2 - morning	10 ^{Aa}	0 ^{Bc}	Not applicable		100.0
2 - afternoon	10 ^{Aa}	0 ^{Bc}	Not applicable		100.0
3 - morning	10 ^{Aa}	0 ^{Bc}	Not applicable		100.0
3 - afternoon	10 ^{Aa}	0 ^{Bc}	Not applicable		100.0
4 - morning	10 ^{Aa}	0 ^{Bc}	Not applicable		100.0
4 - afternoon	10 ^{Aa}	0 ^{Bc}	Not applicable		100.0
5 - morning	10 ^{Aa}	0 ^{Bc}	Not applicable		100.0
5 - afternoon	10 ^{Aa}	0 ^{Bc}	Not applicable		100.0

¹: Mean values $[\ln(x+1)]/n$ followed by the same uppercase letter within the same row or the same lowercase letter within the same column do not differ significantly at a 95% confidence level.

² F value for the split groups within experimental period

³: Probability of significance for F value

⁴: F value for the interaction between the Experimental Period and the Group

⁵: Total active myiasis followed by the same uppercase letter within the same row or the same lowercase letter within the same column do not differ significantly at a 95% confidence level, by Fisher test