

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

**TESE**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PIRIPROXIFEN  
ADMINISTRADO POR VIA ORAL NO CONTROLE  
DAS FORMAS IMATURAS DE *Haematobia irritans*  
EM FEZES DE BOVINOS**

**GABRIELA FERREIRA DE OLIVEIRA**

**2017**



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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PIRIPROXIFEN ADMINISTRADO  
POR VIA ORAL NO CONTROLE DAS FORMAS IMATURAS DE  
*Haematobia irritans* EM FEZES DE BOVINOS**

**GABRIELA FERREIRA DE OLIVEIRA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Fabio Barbour Scott**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora em  
Ciências**, no Curso de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias - Seropédica,  
RJ

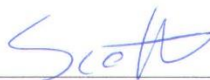
Seropédica, RJ  
Dezembro de 2017

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

GABRIELA FERREIRA DE OLIVEIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

TESE APROVADA EM 20/12/2017



---

Fabio Barbour Scott. Dr. UFRRJ  
(Orientador)



---

Bruno Gomes de Castro. Dr. UFMT



---

Paulo Henrique Duarte Cançado. Dr. EMBRAPA – Gado de Corte



---

Viviane de Souza Magalhães. Dr. UFRJ



---

Yara Peluso Cid. Dr. UFRRJ

Para o meu melhor exemplo de vida, minha mãe Iára  
Rosa, com quem aprendi que os caminhos trilhados  
através da Educação são capazes de transformar vidas,  
dedico essa Tese.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha existência.

Aos animais, gratidão, respeito e admiração.

Ao meu orientador Prof. Fabio Barbour Scott, pela acolhida de coração e braços abertos num dos momentos em que eu mais precisei. Sempre serei grata pela oportunidade e confiança. Seus incentivos diários juntamente com os desafios impostos me fizeram chegar até aqui. Obrigada por tudo.

Ao meu esposo, amigo, companheiro, Bruno Souza, por todo amor, companheirismo, paciência e cuidados, desde sempre, tornando a minha vida mais feliz.

À minha irmã, Fernanda Oliveira, pelo companheirismo e pela compreensão de sempre com a minha vida acadêmica. Ao meu cunhado, Rodrigo dos Santos, por cuidar da minha irmã e ao meu sobrinho, Jorge José, por ser esse menino lindo e por me fazer acreditar que podemos ser melhores para sermos bons exemplos.

Ao #currealteam, minha família, vocês moram no meu coração. Todos. Alunos do CTUR, Bolsistas de apoio, bolsistas de iniciação científica, alunos da pós-graduação, funcionários queridos: José Reginaldo (Mano), Sidinei Santos (Sid), Fabrício Silva, Inocêncio Garcia (Nono), Amarildo. Todos sempre pegando firme nas missões, seja incubando milhões de ovos, coletando fezes ou mil amostras de sangue. Tantas vezes e por tantas semanas. Foram tantas pessoas. Cláudio Satler, Cíntia Santos, Sandro Jr, Paloma Silvestre, Raphael Comissário, Vinícius Gaia (Vigato), Liz Waltenberg, Naira Rani, Gabriel Andrade (God), Luiza Mesquita, Bruna Patrícia (BP), Vinícius Vasconcelos (Preto), Simone Calado (Sissi), Douglas Porto, Bruno de Toledo (Sequela), Lara Persona, Rayane Assis, Gabriela Bonel, Jaime Cardoso... e todos que já fizeram parte dessa equipe.

À Monique Medeiros, minha fiel escudeira, por toda amizade, disponibilidade e dedicação.

À família LQEPV, sempre com você! Todos, todos, sem exceção, contribuíram para a minha formação.

Ao Diefrey Campos, pela ajuda na Colônia sempre, principalmente, enquanto eu terminava a tese.

À Viviane Magalhães por toda disponibilidade e boa vontade em me ajudar farmacologicamente, pela confecção das cápsulas e pela ajuda com as diluições das amostras e análise dos dados.

À Thais Paes pela ajuda com as diluições das amostras.

À Prof. Thaís Azevedo pela ajuda com os artigos científicos.

A todos do Laboratório de Farmacométrie pelo apoio, sempre que necessário.

Ao CNPQ, pela bolsa de estudos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa da Universidade Rural (FAPUR) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento desta tese.

Ao Laboratório Labfor pela análise química das amostras biológicas.

## **BIOGRAFIA**

Gabriela Ferreira de Oliveira, filha de Iára Rosa Rodrigues Ferreira e Carlos Antônio Caputo de Oliveira, nasceu no bairro de Laranjeiras, Rio de Janeiro/RJ em 26 de dezembro de 1983. cursou o Ensino Fundamental e o Ensino Médio Técnico em Processamento de Dados (concluído em 2000) no Colégio Nossa Senhora da Conceição, no bairro de Anchieta, Rio de Janeiro. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no dia 22 de novembro de 2004 e, durante os cinco anos de graduação, dedicou-se à Clínica e Patologia de Grandes Animais. Entre os anos de 2006 e 2008, foi monitora da disciplina de Anatomia Patológica Geral, pertencente ao Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública. Assim que se formou em 2009, trabalhou com extensão rural no Programa Vassouras Leite, vinculado à Prefeitura Municipal de Vassouras, na cidade de Vassouras, interior do Rio de Janeiro. Em 2010, dedicou-se à Residência em Clínica Médica de Animais de Produção, no Hospital Veterinário de Grandes Animais na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. No ano de 2011, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, desta mesma IFES, à nível de Mestrado em Medicina Veterinária, que foi concluído em 2013, mesmo ano que ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, na mesma Universidade. No ano de 2012, integrou o corpo efetivo do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Estado do Espírito Santo IDAF/ES e, desde 2014, encontra-se como servidora Técnico-administrativa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como Técnica em Anatomia e Necropsia.

## RESUMO

OLIVEIRA, Gabriela Ferreira de. **Avaliação do potencial de piriproxifen administrado por via oral no controle das formas imaturas de *Haematobia irritans* em fezes de bovinos.** 2017. 97p Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

*Haematobia irritans* é um dos principais ectoparasitos de bovinos no Brasil, causando prejuízos à pecuária por perdas ligadas diretamente à produção. Atualmente, o controle tradicional encontra-se amplamente pautado em produtos químicos, objetivando-se controlar a população de adultos, expondo animais, seres vivos e meio ambiente à riscos tóxicos e problemas de resistência. Em contrapartida, os inibidores do crescimento dos insetos (IGR), são uma classe parasiticida com mecanismos de ação bastante seletivos, muito mais seguros para envolvidos e pautados no controle das formas imaturas do inseto. Avaliou-se o potencial do IGR, análogo do hormônio juvenil, piriproxifen no controle das formas imaturas de *H. irritans* no bolo fecal de bovinos. Em estudo *in vitro*, em triplicata, com 23 concentrações de piriproxifen: 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600 e 1700 ng/mL (ppb), adicionadas à 20 g de fezes bovinas incubou-se 30 ovos, acompanhados até a emergência de adulto determinando, em análise de probitos, uma dose letal 50 (DL50) de 321,251ppb e uma dose letal 99 (DL99) de 1959,491ppb. A partir desses resultados, calculou-se a quantidade de piriproxifen a ser administrado por via oral, considerando-se a capacidade do rúmen, o tempo de esvaziamento do trato gastrointestinal e a quantidade de fezes produzidas diariamente por um bovino adulto. No teste *in vivo*, utilizou-se três grupos de tratamento (GC, G2,5 e G40), administrando-se, durante 12 dias consecutivos, 2,5 mg (G2,5) ou 40 mg (G40) de piriproxifen por via oral por animal. A eficácia de piriproxifen sobre as formas imaturas de *H. irritans* foi determinada incubando *in vitro* ovos de *H. irritans* nas fezes coletadas na ampola retal nos dias zero, + 3, + 6, + 10 e + 13. A eclodibilidade variou de 71,67 % a 87,00 % no GC; de 74,67 % a 92,00 % no G2,5; de 68,00 % a 86,33 % no G40. Não houve atividade de piriproxifen sobre os ovos. A eficácia larvicida variou de 10,7 % a 41,3 % para o G2,5 e de 12,2 % a 38,2 % para o G40. A eficácia pupicida foi de 58,4 % a 81,2 % no G2,5 e de 98,7 % a 100,0 % no G40. A eficácia total variou de 57,9 % a 81,2 % para o G2,5 e de 99,0 % a 100,0 % no G40. Notou-se discreta ação de piriproxifen sobre as larvas de *H. irritans*, mesmo sem diferenças significativas, demonstrada pela produção de formas extra-larvais e mortalidade. A principal atividade exibida por piriproxifen foi a de não emergência de adultos, nos dois grupos de tratamento. A análise piriproxifen nas fezes e no plasma dos bovinos tratados por via oral foram realizadas por cromatografia líquida de alta performance comprovando-se, pioneiramente, que piriproxifen é eliminado por via fecal. A concentração de piriproxifen no plasma dos bovinos ficou abaixo dos limites mínimos de detecção e, dessa forma, a curva plasmática de piriproxifen não pode ser construída. Em conclusão, piriproxifen possui excelente potencial IGR no controle de formas imaturas de *H. irritans* quando administrado por via oral em bovinos, principalmente por causa da via de eliminação fecal da molécula, comprovada pela análise química nas fezes dos bovinos.

Palavras-chave: dose letal, mosca-dos-chifres, regulador do crescimento dos insetos.



## ABSTRACT

OLIVEIRA, Gabriela Ferreira de. **Effects of piriproxifen by oral administration in the control of *Haematobia irritans* immature forms in feces of bovines.** 2017. 97p Thesis. (Philosophy Doctor in Veterinary Science, Animal Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

*Haematobia irritans* can be considered one of the most important cattle parasites in Brazil, causing great losses to livestock production. Traditional control methods is largely based on chemicals, aiming to control the adult population, but exposing animals, living beings and the environment to toxic risks and being also susceptible to the development of resistance with loss of efficacy. On the other hand, insect growth regulators (IGRs) are a parasiticide class with very selective action mechanisms, much safer and with focus on the control of insect immature forms. The potential of the IGR pyriproxifen, a juvenile hormone analogue, for the control of *H. irritans* immature forms in the bovine feces was evaluated. In the *in vitro* test with 23 different concentrations of pyriproxifen (20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1600 and 1700 ng / mL (ppb)), the drug was added to 20g of bovine feces and 30 eggs were incubated, followed up to the adult emergence, and then was determined, in probit analysis, the lethal dose 50 (LD50) in 321,251 ppb and the lethal dose 99 (LD99) in 1959,491 ppb. With these results and considering the rumen capacity, feed passage rate and the total feces amount produced daily by an adult bovine, the dose of pyriproxifen required for oral administration in each experimental groups was calculated. For this test, three treatment groups were used (control group (CG), G2.5 and G40), where none (CG) or 2.5 mg (G2.5) or 40 mg (G40) of pyriproxifen were orally administered daily to the animals for 12 consecutive days. The efficacy of pyriproxifen was determined from the incubation data of *H. irritans* eggs in feces collected directly from the rectal ampulla at days 0, +3, +6, +10 and +13. The hatchability rate ranged from 71.67 % to 87.00 % in the CG; from 74.67 % to 92.00 % in G2.5; from 68.00 % to 86.33 % in G40. There was no apparent activity of pyriproxifen on the eggs evolution process. The larvicidal efficacy ranged from 10.7 % to 41.3 % for G2.5 and from 12.2 % to 38.2 % for G40. The pupicidal efficacy ranged from 58.4 % to 81.2 % in G2,5 and from 98.7 % to 100.0 % in G40. Overall or total efficacy of pyriproxifen ranged from 57.9 % to 81.2 % for G2.5 and from 99.0 % to 100.0 % on G40. A discrete action of pyriproxifen on *H. irritans* larvae was observed, even without statistical significant differences, demonstrated by the production of extra-larval forms during the evolutionary process and increased mortality rate on treated groups. The most relevant activity of pyriproxifen was the inhibition of adult emergency in the both treatment groups. The quantification of pyriproxifen in feces and plasma of orally treated cattle was performed by high performance liquid chromatography, proving, for the first time, that pyriproxifen is mostly eliminated by fecal route in bovines. The plasma concentration of pyriproxifen was below the minimum detection limits and, therefore, the plasmatic curve of pyriproxifen could not be constructed. In conclusion, pyriproxifen when administered orally in cattle has an excellent potential in the control of *H. irritans* immature forms, mainly due to the massive fecal elimination of this molecule, as evidenced by the feces analysis performed.

Keywords: horn fly, insect growth regulator (IGR), lethal dose.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- (A)** Puçá entomológico de Organza com exemplares de *H. irritans* recém-capturados; **(B)** Gaiolas de acondicionamento de *H. irritans* para oviposição. .... 39
- Figura 2 – (A)** Papel filtro após ter sido retirado da gaiola, contendo ovos depositados por *H. irritans*; **(B)** Pincel número zero e massa de ovos de *H. irritans*. .... 40
- Figura 3 – (A)** Unidade experimental com ovos de *H. irritans* depositados no papel filtro sobre o substrato; **(B)** Unidades experimentais fechadas com TNT e elástico. .... 41
- Figura 4 – (A)** Pupas formadas sobre o substrato; **(B)** Pupas flutuando sobre substrato diluído em água no momento da catação, no oitavo dia. .... 42
- Figura 5 – (A)** Pupas acomodadas em almofada de algodão, após catação; **(B)** Exemplar de pupa e adulto de *H. irritans* (Aumento de 12x); **(C)** Placas de petri (R1 e R2) abertas no décimo quinto dia de estudo para observação da emergência de adultos. .... 43
- Figura 6 –** Esquema de montagem das cápsulas administradas por via oral em bovinos. .... 45
- Figura 7 – (A)** Cápsula pronta, visão superior; **(B)** Cápsula pronta, visão lateral; **(C)** Aplicador de bolus utilizado para a administração das cápsulas; **(D)** Momento da introdução da cápsula por via oral em bovino contido em tronco de contenção. .... 46
- Figura 8 -** Percentuais de eclodibilidade de ovos de *Haematobia irritans* em teste in vivo que foram inoculados em fezes de bovinos medicados ou não, com diferentes dosagens diárias de piriproxifen. O grupo G2,5 corresponde ao grupo medicado com 2,5mg de piriproxifen; o grupo G40 corresponde ao grupo medicado com 40mg de piriproxifen; grupo controle mantido sem tratamento. .... 58
- Figura 9 – (A)** Larvas de terceiro estágio (L3) de *H. irritans*, transparentes, encontradas frequentemente no momento da verificação de eclodibilidade; **(B)** Larvas que não se transformaram em pupa, de coloração amarelada, algumas vivas e letárgicas, outras mortas. 64
- Figura 10 –** Percentuais de eficácia de piriproxifen em larvas de *Haematobia irritans* em teste in vivo a partir de ovos que foram inoculados em fezes de bovinos medicados ou não, com diferentes dosagens diárias de piriproxifen. O G2,5 corresponde ao grupo medicado com 2,5mg de piriproxifen; O G40 corresponde ao grupo medicado com 40mg de piriproxifen; grupo controle mantido sem tratamento. .... 66
- Figura 11 –** Percentuais de eficácia de piriproxifen em pupas de *Haematobia irritans* em teste in vivo a partir de ovos que foram inoculados em fezes de bovinos medicados ou não, com diferentes dosagens diárias de piriproxifen. O G2,5 corresponde ao grupo medicado com 2,5mg de piriproxifen; O G40 corresponde ao grupo medicado com 40mg de piriproxifen; grupo controle mantido sem tratamento. .... 69
- Figura 12 –** Percentuais de eficácia total de piriproxifen dos grupos G2,5 e G40, ao longo do tempo, em teste in vivo a partir de ovos de *Haematobia irritans* que foram inoculados em fezes de bovinos medicados ou não, com diferentes dosagens diárias de piriproxifen. O G2,5 corresponde ao grupo medicado com 2,5mg de piriproxifen; O G40 corresponde ao grupo medicado com 40mg de piriproxifen; grupo controle mantido sem tratamento. .... 71

<b>Figura 13</b> – Percentuais de eficácia de piroproxifen do grupo G2,5, ao longo do tempo, sobre larvas e pupas de <i>Haematobia irritans</i> em teste in vivo, a partir de ovos que foram inoculados em fezes de bovinos medicados com a dosagem diária de 2,5mg/animal.....	71
<b>Figura 14</b> - Percentuais de eficácia de piroproxifen do grupo G40, ao longo do tempo, sobre larvas e pupas de <i>Haematobia irritans</i> em teste in vivo, a partir de ovos que foram inoculados em fezes de bovinos medicados com a dosagem diária de 40mg/animal.....	72
<b>Figura 15</b> – Representação gráfica da concentração de piroproxifen (em ng/g) nas fezes dos bovinos ao longo do tempo nas duas doses utilizadas no teste in vivo (2,5mg e 40mg) para controle de formas imaturas de <i>H. irritans</i> no bolo fecal.....	77
<b>Figura 16</b> – Representação gráfica da eficácia e da concentração de piroproxifen (em ng/g) nas fezes dos bovinos nas duas doses utilizadas no teste in vivo (2,5mg e 40mg) para controle de formas imaturas de <i>H. irritans</i> no bolo fecal. ....	78
<b>Figura 17</b> – Farmacocinética e farmacodinâmica de piroproxifen para o G2,5U. Concentração (ng/g) em fezes bovinas, percentual de eficácia para larvas, pupas e eficácia total de piroproxifen sobre as formas imaturas de <i>H. irritans</i> incubadas em fezes de bovinos tratados por via oral em teste in vivo na dose de 2,5mg de piroproxifen por animal.....	78
<b>Figura 18</b> - Farmacocinética e farmacodinâmica de piroproxifen para o G40U. Concentração (ng/g) em fezes bovinas, percentual de eficácia para larvas, pupas e eficácia total de piroproxifen sobre as formas imaturas de <i>H. irritans</i> incubadas em fezes de bovinos tratados por via oral em teste in vivo na dose de 40mg de piroproxifen por animal.....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Critérios de exatidão e precisão utilizados. ....	47
<b>Tabela 2</b> – Gradientes de concentração de B de acordo com o tempo. ....	48
<b>Tabela 3</b> - Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1, R2 e R3), percentual de eclodibilidade, taxa de mortalidade de larvas, de pupas e de mortalidade total, taxa de sobrevivência de larvas, de pupas e de sobrevivência total referentes à incubação in vitro de ovos de <i>Haematobia irritans</i> em fezes bovinas para determinação das doses letais DL50 e DL99 para as formas imaturas de <i>Haematobia irritans</i> . ....	52
<b>Tabela 4</b> - Análise probitos das 23 concentrações de piriproxifen utilizadas (20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 110, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600 e 1700ppb) e determinação da CL50 e CL99. ....	54
<b>Tabela 5</b> - Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1 e R2) e somatório (R1+R2), taxa de sobrevivência de larvas, de pupas e de sobrevivência total, médias e desvio padrão referentes à incubação de ovos de <i>Haematobia irritans</i> em fezes bovinas antes do tratamento (dia zero) com piriproxifen por via oral. ....	57
<b>Tabela 6</b> – Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1 e R2), taxa de mortalidade e de sobrevivência total referentes à incubação de ovos de <i>Haematobia irritans</i> em fezes bovinas dos animais excluídos do estudo no dia zero. ....	58
<b>Tabela 7</b> - Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1 e R2) e somatório (R1+R2), taxa de sobrevivência de larvas, de pupas e de sobrevivência total, eficácia nos grupos tratados, médias e desvio padrão referentes à incubação de ovos de <i>Haematobia irritans</i> em fezes bovinas no terceiro dia de tratamento (dia + 3) com piriproxifen por via oral. ....	61
<b>Tabela 8</b> - Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1 e R2) e somatório (R1+R2), taxa de sobrevivência de larvas, de pupas e de sobrevivência total, eficácia nos grupos tratados, médias e desvio padrão referentes à incubação de ovos de <i>Haematobia irritans</i> em fezes bovinas no sexto dia de tratamento (dia + 6) com piriproxifen por via oral. ....	62
<b>Tabela 9</b> – Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1 e R2) e somatório (R1+R2), taxa de sobrevivência de larvas, de pupas e sobrevivência total, eficácia nos grupos tratados, médias e desvio padrão referentes à incubação de ovos de <i>Haematobia irritans</i> em fezes bovinas no décimo dia de tratamento (dia + 10) com piriproxifen por via oral. ....	63
<b>Tabela 10</b> - Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1 e R2) e somatório (R1+R2), taxa de sobrevivência de larvas, de pupas e de sobrevivência total, eficácia nos grupos tratados, médias e desvio padrão referentes à incubação de ovos de <i>Haematobia irritans</i> em fezes bovinas no primeiro dia após o término do tratamento (dia + 13) com piriproxifen por via oral. ....	65
<b>Tabela 11</b> – Resumo dos resultados da validação da metodologia para análise de fezes. ....	75
<b>Tabela 12</b> – Concentração de piriproxifen (em ng/g) nas fezes de cada bovino tratado por via oral no teste in vivo, média e desvio padrão das duas doses de tratamento. ....	76
<b>Tabela 13</b> - Resumo dos resultados da validação da metodologia para análise de fezes. ....	81

**Tabela 14** - Concentração de piroxicam (em ng/ml) no plasma de cada bovino tratado por via oral no teste in vivo para as duas doses de tratamento (2,5mg e 40mg) ..... 82

## LISTA DE ABREVIações, SIGLAS OU SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µL	microlitro(s)
20E	Ectisona ou 20-hidroxiectisona
BOD	Estufa Incubadora tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio
BPU	Benzilfenilureias
cm	centímetro(s)
CQeq	Coeficiente de equipamento
CQex	Coeficiente de extração
DDT	Diclorodifeniltricloreto
DL50	Dose Letal 50
DL99	Dose Letal 99
ETH	Hormônio do desencadeamento da ecdise
FAO	Food and Agriculture Organization of United Nations
FM	Fator Matriz
FMI	Fundo Monetário Internacional
g	grama(s)
G2,5	grupo que recebeu a dose de 2,5mg de piriproxifen
G2,5U	grupo que recebeu uma dose única de 2,5mg de piriproxifen
G40	grupo que recebeu a dose de 40mg de piriproxifen
G40U	grupo que recebeu uma dose única de 40mg de piriproxifen
GC	Grupo Controle
h	hora(s)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Id	número de identificação dos animais
IGR	Insect Growth Regulators
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JH	hormônio juvenil
kg	quilograma(s)
l	litro(s)
LC50	Concentração letal média
LC-MS/MS	Cromatógrafo líquido de alto desempenho com espectrômetro de massa/massa
LQ	limite de quantificação
LQEPV	Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária
m <sup>2</sup>	metro(s) quadrado(s)
mg	miligrama(s)
ml	mililitro(s)
MS/MS	Massa/massa
ng	nanograma(s)
NOAEL	Nível de efeito adverso não observado
PIB	Produto Interno Bruto
ppb	parte(s) por bilhão
ppm	parte(s) por milhão
PTTH	Hormônio pró-torácico
R1	Repetição 1
R2	Repetição 2

R3	Repetição 3
TNT	Tecido não tecido
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UR	Umidade Relativa
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1.	<i>Haematobia irritans</i> : Histórico e Biologia .....	3
2.2.	Impacto Econômico Decorrente do Parasitismo por <i>Haematobia irritans</i> .....	6
2.2.1.	A pecuária e a economia Brasileira .....	7
2.2.2.	Perdas econômicas e principais danos.....	7
2.3.	Controle e Resistência .....	10
2.4.	Insect Growth Regulator (IGR) ou Regulador do Crescimento de Insetos .....	16
2.4.1.	Metamorfose dos insetos .....	17
2.4.2.	Inibidores da síntese de quitina .....	18
2.4.3.	Derivados da triazina/pirimidina .....	22
2.4.4.	Agonistas não esteroidais da ectisona ou compostos aceleradores da muda dos insetos .....	24
2.4.5.	Análogos do hormônio juvenil .....	24
2.4.6.	Piriproxifen.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	38
3.1.	Teste <i>in vitro</i> para Determinação das Concentrações Letais – Concentração Letal 50 (CL50) e Concentração Letal 99 (CL99).....	38
3.1.1.	Animais doadores de <i>H. irritans</i> e fezes.....	38
3.1.2.	Acomodação e alimentação dos animais .....	38
3.1.3.	Coleta de <i>H. irritans</i> a campo para obtenção de ovos.....	38
3.1.4.	Coleta de ovos de <i>H. irritans</i> .....	39
3.1.5.	Coleta de fezes para confecção dos substratos .....	40
3.1.6.	Montagem das repetições das unidades experimentais .....	40
3.1.7.	Preparo das soluções experimentais .....	41
3.1.8.	Definição e fórmulas das taxas utilizadas: .....	41
3.1.9.	Avaliação da eclodibilidade das larvas.....	42
3.1.10.	Separação de pupas.....	42
3.1.11.	Observação da emergência de adultos.....	43
3.1.12.	Cálculo das concentrações letais .....	43
3.2.	Avaliação da Eficácia de piriproxifen administrado por via Oral no Controle <i>H. irritans</i> – Teste <i>in vivo</i> .....	44
3.2.1.	Animais.....	44



3.2.2.	Acomodação e alimentação dos animais .....	44
3.2.3.	Cálculo das doses a serem administradas por via oral em forma de cápsula aos bovinos .....	44
3.2.4.	Confecção e preenchimento das cápsulas.....	45
3.2.5.	Pesagem dos animais .....	45
3.2.6.	Avaliação da Eficácia do Tratamento no controle de <i>H. irritans</i> .....	45
3.2.7.	.. Quantificação de piriproxifen nas fezes dos bovinos tratados por via oral	46
3.2.8.	Validação do método analítico para amostras fecais.....	46
3.2.9.	Metodologia para criação <i>in vitro</i> de <i>H. irritans</i> .....	48
3.2.10.	Estatística.....	49
3.3	Construção da Curva Plasmática do Piriproxifen .....	49
3.3.1.	Animais.....	49
3.3.2.	Acomodação e alimentação dos animais .....	49
3.3.3.	Tratamento em dose única.....	49
3.3.4.	Validação do método analítico para amostras de plasma .....	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
4.1.	Teste <i>in vitro</i> para Determinação das Concentrações Letais .....	51
4.2.	Teste <i>in vivo</i> .....	55
4.3	Análise de Piriproxifen nas Fezes dos Bovinos Tratados com Piriproxifen por Via Oral no Teste <i>in vivo</i> .....	73
4.3.1.	Validação da Metodologia para Análise de Fezes.....	73
4.3.2.	Detecção de piriproxifen nas fezes dos bovinos.....	75
4.4	Construção da Curva Plasmática de Piriproxifen Administrado por Via Oral em Dose Única em Bovinos. ....	79
4.4.1.	Validação da metodologia para análise em plasma. ....	79
4.4.2.	Detecção de piriproxifen no plasma dos bovinos.....	81
5	CONCLUSÕES .....	84
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

# 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil ocupa a liderança no ranking mundial em produção de bovinos, sendo o maior exportador global de carne bovina, com 9,56 e 1,88 milhões de toneladas produzidas e exportadas, respectivamente, e ainda ocupa a posição de quarto maior produtor mundial de leite, com 23 milhões de vacas ordenhadas e mais de 34 bilhões de litros produzidos em 2015 (ABIEC, 2016; IBGE, 2017a).

Entretanto, há inúmeros prejuízos ligados à criação onde, entre eles, destacam-se os que estão voltados para o controle de helmintoses e ectoparasitos em bovinos no Brasil, com maior relevância para as infestações por carrapatos e mosca-dos-chifres e perdas potenciais que podem chegar a R\$14 bilhões por ano (GRISI et al., 2014; STOTZER et al., 2014).

Os maiores danos e prejuízos do parasitismo por *Haematobia irritans* estão relacionados diretamente com a biologia desse díptero, que é hematófago obrigatório e tem por hábito manter-se praticamente dia e noite sobre seu hospedeiro, onde somente as fêmeas movimentam-se rapidamente para ovipor em fezes frescas de bovinos, retornando imediatamente para o hospedeiro. Há o desequilíbrio do bem-estar geral gerando irritação com conseqüente redução do ganho de peso, produção de leite, apetite e conversão alimentar dos bovinos infestados, além da redução da qualidade do couro proveniente destes animais, possibilidade de transmissão de patógenos, como *Staphylococcus aureus* em tetos de novilhas desencadeando mastites, ou mesmo danos mecânicos resultantes de sucessivas picadas. Somado ainda à essas perdas ligadas diretamente à produção, destacam-se os gastos com o controle da mosca, como despesas com produtos mosquicidas, mão-de-obra e gastos com equipamentos ou instalações.

Portanto, apesar do controle de *H. irritans* ser necessário, o controle químico desta mosca tem sido realizado abusivamente, com frequência supressiva de tratamentos e pautado no uso sequencial ou na rotação aleatória de produtos, desencadeando o processo de resistência, que pode rapidamente ser agravado tanto pela pressão de seleção exercida pelos curtos intervalos entre aplicações quanto pelo uso inadequado dos produtos. Tais fatos tornam a resistência irreversível e com manejo complexo e, ainda, mesmo que a restrição do uso do produto químico provoque sua redução, esta não desaparece completamente da população retornando rapidamente caso o inseticida ou outro da mesma classe sejam reutilizados. Atualmente mais de 95 % da população de mosca-dos-chifres no Brasil encontra-se resistente aos piretróides, mas ainda há uma boa susceptibilidade aos organofosforados.

Porém, o efeito excessivamente amplo e persistente dos inseticidas convencionais, tóxicos não apenas para o alvo que se destinam, mas também para outros insetos, juntamente com sua persistência no meio ambiente, que pode ser passada pela cadeia alimentar e apresentar perigo para outros organismos, inclusive o homem, associado à notável habilidade dos insetos em desenvolverem resistência aos pesticidas, despertam a necessidade de desenvolvimento de produtos mais seguros para todos os envolvidos neste processo. Dessa forma, surgem os inseticidas da classe de compostos bio-rationais, os Insect Growth Regulators (IGR), que detém a promessa de serem bastante seletivos com relação ao modo de ação, reduzindo os riscos para organismos não alvos, seres humanos e menor impacto ambiental. E ainda, por causa do seu mecanismo peculiar de ação, determinam um menor risco de desenvolvimento de resistência.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo investigar a molécula de piriproxifen, da classe dos Insect Growth Regulator (IGR), análogo do hormônio juvenil dos insetos, determinar a Dose Letal 50 (DL50) e a Dose Letal 99 (DL99) através de avaliação *in vitro* para as formas imaturas de *H. irritans*; avaliar sua eficácia *in vivo*, quando administrado diariamente por via oral em bovinos na interrupção do ciclo evolutivo desenvolvido no bolo fecal e realizar a

quantificação desta molécula nas fezes e no plasma de bovinos tratados por via oral em dose única.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Haematobia irritans*: Histórico e Biologia

*H. irritans* foi descrita pela primeira vez por Linnaeus (1758), professor, médico, botânico e biólogo naturalista, considerado o pai da taxonomia moderna, autor da mundialmente importante obra chamada *Systema Naturae*, com várias edições, onde reúne uma moderna sistemática de classificação para plantas e animais, que continua sendo seguida atualmente (ERIKSSON, 2008).

Originária do Velho Mundo, *H. irritans* foi reconhecida como uma praga de bovinos na França, em 1830. Após a Guerra Civil, houve crescente expansão agrícola norte-americana que culminou com a importação de muitos bovinos oriundos da Europa e, provavelmente, a mosca-dos-chifres pelas características biológicas de não se afastar do seu hospedeiro, foi junto com os animais importados (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990a), chegando aos Estados Unidos entre 1884 e 1886 (VALÉRIO; GUIMARÃES, 1983).

A denominação “mosca-dos-chifres” foi atribuída a este inseto por causa dos hábitos de agregação das moscas nas bases dos chifres dos bovinos em climas temperados, ou nas manhãs muito frias, podendo raramente ser observado somente no sul do Brasil (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990a).

Em 1898, a mosca se espalhou para quase todo o território dos Estados Unidos e Havai e, no início do século XIX, já se fazia presente nas ilhas do Caribe. Nos anos trinta do século passado chegou à América do Sul, sendo reconhecida na Venezuela e Colômbia em 1937 (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990a).

Acredita-se que *H. irritans* tenha sido introduzida no Brasil pelo estado de Roraima, provavelmente advinda da Venezuela com quem faz fronteira, através do comércio de bovinos, uma vez que essa mosca sempre “viaja” juntamente com seu hospedeiro. Desde 1980, técnicos do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC/EMBRAPA) passaram a observar pequenas moscas hematófagas que se comportavam formando bandos sobre os bovinos, sugando-os em várias partes do corpo onde não eram capazes de espantá-las, deixando-os irritados e com uma tendência em se refugiar em áreas de bosques (VALÉRIO; GUIMARÃES, 1983).

A confirmação de que se tratava de *H. irritans* veio por meio do envio de amostras do díptero ao Dr. Adrian C. Pont, entomologista britânico do Museu de História Natural da Universidade de Oxford, que prontamente a identificou (VALÉRIO; GUIMARÃES, 1983).

Em 1984, a mosca-dos-chifres chegou ao Rio Amazonas, em Santarém. E, como o transporte principal na época era realizado com bovinos, rapidamente disseminou-se até o Pará. No ano de 1987, houve os primeiros registros da presença de *H. irritans* no Maranhão e, posteriormente, no Piauí e Ceará, seguindo para o Tocantins, Acre e Goiás em 1989, chegando em Minas Gerais, Rondônia, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, em 1990 e, em seguida, nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e no território argentino (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990a).

A disseminação da mosca-dos-chifres foi bastante rápida na região Norte do Brasil, devido às condições climáticas propícias marcadas por verões chuvosos, juntamente com a localização das propriedades produtoras de bovinos em regiões com vegetação de cerrado e a predominância do gado Nelore criado de forma extensiva, que facilitaram a disseminação da mosca (BRITO et al., 2005).

A expansão da mosca-dos-chifres no Brasil a partir de 1984 foi mais rápida porque atingiu regiões tradicionais na pecuária de corte, onde os animais eram comercializados, principalmente, para as Regiões Sul e Centro-Oeste do país (MENESCAL et al., 1990) pela

movimentação de bovinos ou veículos sujos com fezes infestadas (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990a). Collares (1990) acrescenta ainda que, qualquer veículo que permita a entrada da mosca poderia transportá-la por pelo menos 30km de distância e com os vidros abertos. Por essa razão, uma das recomendações para o transporte de bovinos de uma região para outra seria a pulverização destes com inseticida antes do deslocamento, assim como nos veículos de transporte (MENESCAL et al., 1990).

*H. irritans* é um parasito hematófago obrigatório de bovinos, possui como característica marcante pousar no hospedeiro de cabeça para baixo e asas parcialmente abertas para poder suga-lo, raramente anda, mas voa quando muda de um lugar para outro e em grupos agregados (“nuvens”) retornando imediatamente ao animal, permanecendo quase que dia e noite sobre seu hospedeiro. Somente as fêmeas movimentam-se rapidamente quando o bovino defeca, descendo da barriga para as pernas e depois para a massa fecal, retornando rapidamente para o hospedeiro depois de ovipor (DRUMMOND; GEORGE; KUNZ, 1988; HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990a) nas fissuras do esterco bovino fresco (até 15 minutos após defecação) e com um potencial de poder depositar de 300 a 400 ovos durante a vida, individualmente ou em lotes de 10 a 15 (CAMPBELL; THOMAS, 1992).

O período chuvoso do ano é o mais propício ao desenvolvimento da mosca-dos-chifres. Apesar disso, quando chove muito em poucos dias, ocorre a destruição das massas fecais depositadas na pastagem e, conseqüentemente, interrupção do ciclo evolutivo da mosca (BIANCHIN; ALVES, 1997).

Com relação à morfologia, segundo Taylor et al. (2010), a mosca adulta mede de 3 a 4mm de comprimento, possui coloração cinzenta e faixas escuras no tórax, a probóscida é mantida para frente, os palpos possuem coloração cinza-escuro, são robustos e tão longos quanto à probóscida. Os ovos apresentam coloração marrom escuro, podendo também ser amarelo claro ou brancos e medem de 1,0 a 1,5mm; as larvas são cilíndricas e as pupas são vermelho-acastanhadas, opacas e medem 3 a 4mm de comprimento.

Em condições laboratoriais, a média do ciclo de vida, com adultos mantidos a temperatura  $33,0 \pm 2$  °C e larvas a  $26,5 \pm 2$  °C, ambos com 55 a 60 % de umidade relativa (UR), é de 12 dias de ovo a adulto e de 17 dias de ovo a ovo (SCHMIDT; HARRIS; HOFFMAN, 1967). Barros (2002) afirma que o período mínimo necessário para o desenvolvimento de *H. irritans*, sob temperaturas de 27,3 a 30,2 °C, foi de nove dias. Collares (1990) desenvolveu um modelo de predição para a emergência das últimas moscas a partir da temperatura ambiental, obtido pela equação de regressão DNUM (Dia de Nascimento das Últimas Moscas)= $67,4 - 2 \times$  Temperatura (em °C). Sendo assim, em uma temperatura de 27 °C, todas as moscas deverão ter emergido em menos de 13,4 dias.

Sanders e Dobson (1969) fizeram algumas observações quanto ao bolo fecal e a oviposição de *H. irritans* e puderam afirmar que *H. irritans* não faz oviposição em bolos fecais muito líquidos, com consistência comparada a uma massa de panqueca, assim como em bolos fecais muito secos, definidos por se quebrarem facilmente ao se impactarem com o solo. E que, as moscas preferem ovipor nos primeiros dois minutos após a defecação do bovino, além de depositar seus ovos nas bordas dos bolos fecais, próximo a junção com o solo, além desta prática ser realizada de igual maneira durante o dia ou no período da noite. E ainda, amostras de fezes com aproximadamente 1 kg ou mais, cultivam maior quantidade de moscas, e são normalmente excretadas pelos bovinos após um período de descanso, ou melhor, assim que se levantam coincidindo, com maior frequência, com as primeiras horas do dia.

Os hábitos de oviposição de *H. irritans* foram melhor esclarecidos por (KUNZ et al., 1970) em estudo de campo, que demonstrou o hábito de ovipor tanto durante o dia quanto à noite. Além disso observou-se, em várias ocasiões, oviposição durante o dia em moderada chuva com subsequente recuperação de adultos sob esta condição, permitindo avaliar que a secagem mais lenta do esterco durante a noite provavelmente determinou maior produção de

moscas nas amostras avaliadas, supondo-se que baixas temperaturas e alta umidade deteriam a dissecação dos ovos e, em consequência, promoveriam um período mais favorável para a incubação e o estabelecimento das larvas no esterco. Em adição, observou-se que o pico da emergência de moscas no meio do verão foi de 9 a 10 dias enquanto que no inverno, o pico foi de 14 a 21 dias comprovando a interferência da temperatura no desenvolvimento desse inseto.

Após chuvas intensas, a população de adultos reduz drasticamente, assim como a de formas imaturas presentes no bolo fecal, uma vez que este torna-se parcial ou totalmente destruído em consequência das chuvas (DE MACEDO; BRITO; BORJA, 2001).

Em 1971, Harris et al. executaram estudo para observar a emergência sob condições laboratoriais e puderam verificar que o horário em que a mosca ovipõe não afeta o ritmo circadiano da emergência de adultos, que foi completamente realizada em três dias a partir da emergência da primeira mosca, com fêmeas emergindo primeiro que os machos e, concentrando-se em poucas horas do dia.

Com relação à dinâmica biológica e a flutuação populacional que ocorre do outono até a primavera, Kunz et al. (1972) mostraram que aproximadamente 45 % da descendência da população de moscas do outono entram em diapausa por causa das baixas temperaturas, afirmando ainda que, em áreas onde ocorre a diapausa no inverno, os níveis de emergência na primavera poderiam ser consideravelmente reduzidos ou praticamente eliminados se as moscas que produzem as populações que estarão presentes nos animais no outono pudessem ser controladas antes de oviporem.

Schreiber e Campbell (1986) utilizaram animais mestiços de Angus X Hereford X Simmental (tricross), com face branca e corpo vermelho e mestiços de Hereford X Angus, de cara branca e corpo preto para avaliar a preferência da coloração do pelo do hospedeiro no parasitismo por *H. irritans* e puderam observar que geralmente os animais negros possuíam uma maior contagem de moscas que os animais vermelhos e que o número médio de moscas apresentado por animal em um ano, repetiu-se para o ano seguinte, novamente com a maior contagem nos animais negros. Collares (1990) também observou uma superioridade de infestação em animais de pelagem escura, sugerindo que a cor e a raça dos animais poderiam influenciar na determinação da preferência da mosca, observando ainda que, com a aglomeração e consequente movimentação do gado, a mosca-dos-chifres tende a se agrupar em bovinos de pelagem escura, da mesma forma que em manhas de grande luminosidade. Já, com relação à preferência por categoria ou sexo animal, os mais parasitados são os machos (tousos, bois ou novilhos) e as fêmeas adultas, sendo os terneiros a categoria de menor predileção (ALVES-BRANCO; PINHEIRO; SAPPER, 2000).

Em estudo com fêmeas das raças Crioula, Nelore, Hereford (34 %) x Nelore (66 %) e Hereford (66 %) x Nelore (34 %) a fim de avaliar a influência da raça na infestação, observou-se que os animais da raça Crioula (taurinos) foram os menos infestados juntamente com a raça Nelore (zebuínos), com diferenças significativas entre os grupos (GUGLIELMONE et al., 2000).

Bianchin et al. (2004) afirmam que o cruzamento entre *B. taurus* e *B. indicus* pode determinar maior carga parasitária nos descendentes produzidos do que aquela verificada em animais com predominância de sangue Nelore.

Schreiber e Campbell (1986) mostraram que a distribuição da mosca nos animais com pelagens de colorações diferentes pode variar de acordo com o horário do dia, com uma predominância de moscas distribuídas nos mesmos lugares de maior preferência, mas em porcentagens diferentes, ou seja, as moscas concentraram-se predominantemente no dorso, laterais do costado e na linha média da barriga. No gado vermelho, as moscas preferiram se alojar em maior quantidade na linha média da barriga; as moscas que estavam no gado escuro, preferiram se alojar em maior quantidade no dorso. Durante a tarde, a maioria das moscas preferiram ficar na linha média da barriga e nas laterais e, no momento do anoitecer, a

movimentação de moscas foi realizada de forma semelhante à distribuição feita pela manhã, com o gado vermelho com a maior porcentagem de moscas na linha média da barriga e o gado negro com predominância no dorso e também nas laterais.

Lima et al. (2002) identificaram as principais regiões anatômicas preferenciais de *H. irritans* no período da manhã em bovinos da raça Nelore como sendo a região escapular, interescapular (“cupim”) e a costal, mas relataram também que, nos meses mais chuvosos, o número de moscas localizadas na região ventral aumentou significativamente, porém sem diferenças estatísticas entre as outras regiões.

Stelman et al. (1997) avaliaram o efeito da densidade do pelo e a produção de sebo de bovinos de corte no parasitismo por *H. irritans* e concluíram que um dos fatores responsáveis pela resistência do bovino poderia ser a densidade do pelo e o correspondente quantitativo de sebo presente na pele do animal. E que, a relação parasito-hospedeiro é influenciada pela composição química ou quantidade de componentes secretados pela pele do bovino, resultando em moscas que evitam parasitar bovinos com altas densidades capilares, por uma suposta maior dificuldade no parasitismo.

O gado apresenta comportamento de agregação frente a populações elevadas de moscas, agrupando-se geralmente em áreas de sombra, em torno de tanques de água, córregos ou lagoas e, com isso, a pastagem normal é interrompida havendo diminuição da eficiência alimentar (CAMPBELL; THOMAS, 1992). Entre as principais demonstrações do incomodo causado por *H. irritans* no seu hospedeiro estão a jogada de cabeça (maneio), movimento de orelha, tremor de pele e pisões fortes (HARVEY; LAUNCHBAUGH, 1982).

## **2.2. Impacto Econômico Decorrente do Parasitismo por *Haematobia irritans***

Em 1961, segundo dados publicados pela Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO), o Brasil possuía um quantitativo de aproximadamente 56.041.312 milhões de cabeça de bovinos e, nessa ocasião, ocupava a posição de quarto maior produtor de bovinos do mundo, com a Índia em primeiro lugar, seguida de Estados Unidos em segundo lugar e a antiga União Soviética em terceiro, e na sequência, China, Argentina, Etiópia, Bangladesh, França e Alemanha, nessa ordem decrescente, compondo os dez países maiores produtores de bovinos do mundo naquela época (FAO, 2017).

Os primeiros dados oficiais de entidade nacional sobre o quantitativo de bovinos no Brasil são de 1970 e foram publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) após a realização do primeiro Censo Agropecuário, onde revelou-se uma população de aproximadamente 78.562.250 milhões de cabeças de bovinos (IBGE, 2017b). Em 2006, quando o último Censo Agropecuário foi publicado pela mesma Instituição, o Brasil já possuía 176.147.501 milhões de cabeças (IBGE, 2017c).

Em 2014, segundo dados da FAO, o rebanho bovino mundial era de composto de aproximadamente 1.474.526.581 bilhões de cabeças de bovinos e o Brasil detinha um rebanho com aproximadamente 212.366.132 milhões de cabeças de gado, tendo sido considerado mais uma vez o país maior produtor de bovinos do mundo, com Índia em segundo lugar, seguida de China em terceiro e Estados Unidos em quarto, e na sequência, Etiópia, Argentina, Paquistão, México, Sudão e Austrália, nessa ordem decrescente, compondo os dez países maiores produtores de bovinos do mundo naquele ano.

O Brasil vem ocupando a posição de liderança no ranking mundial de produção de bovinos desde 2003, quando alcançou pela primeira vez um rebanho maior que a líder anterior, a Índia. A China e os Estados Unidos mantêm-se entre a terceira e a quarta posições, ora alternando-se entre elas (FAO, 2017).

Sendo assim, dono do maior rebanho bovino comercial do mundo, associado ao clima tropical ou subtropical úmido, o Brasil apresenta características muito favoráveis à ocorrência

de doenças parasitárias, sejam elas causadas por parasitos internos ou externos (GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E.; PEREIRA, 2002).

### **2.2.1. A pecuária e a economia Brasileira**

Apesar da grave crise econômica e recessão pelo qual passa, recentemente o Brasil ultrapassou a Itália e voltou a ocupar a oitava colocação no ranking das maiores economias do mundo para 2017, elaborado pelo Fundo Monetário Internacional (FMI) (BRASIL, 2016).

Parte deste resultado se deve ao desempenho do setor primário que, apesar de também ter encolhido nos últimos dois anos, tem registrado menores quedas quando comparado aos demais setores produtivos da economia brasileira, que encolheu no geral 3,6 % em 2016. Dentro do setor primário, as quedas na geração de riquezas neste ano sofreram fortemente em razão da redução significativa dos índices da agricultura, enquanto a pecuária, depois de excelentes resultados em 2015, apresentou neste ano uma tendência a estabilidade (IBGE, 2016).

Em 2015, o Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro foi de R\$5,9 trilhões, tendo o setor primário (agronegócio) contribuído com R\$1,27 trilhões (21,5 % do PIB). A cadeia produtiva da pecuária movimentou cerca de R\$483,5 bilhões neste ano (8,2 % do PIB), registrando um crescimento de mais de 27 % sobre o ano anterior, além de um crescimento de mais de 44 % em relação ao montante movimentado pela cadeia no ano de 2010 (ABIEC, 2016).

Dos R\$483,5 bilhões totais movimentados pela cadeia produtiva da pecuária em 2015, R\$147,03 bilhões estão relacionadas às atividades anteriores e/ou nas próprias fazendas, R\$145,88 bilhões às atividades nas indústrias e R\$181,59 bilhões no varejo (SINDAN, 2017).

A grandeza destes números se justifica quando lembramos que, segundo dados recentes, temos o maior rebanho bovino do mundo, com 209,13 milhões de cabeças de gado distribuídos em 167 milhões de hectares de pastagens. Somos o maior exportador global de carne bovina, com 9,56 e 1,88 milhões de toneladas produzidas e exportadas, respectivamente. Além disso, somos ainda o quarto maior produtor mundial de leite, com 23 milhões de vacas ordenhadas e mais de 34 bilhões de litros produzidos em 2015 (ABIEC, 2016; IBGE, 2017d).

Neste mesmo ano, insumos relacionados à nutrição, reprodução e sanidade/saúde animal, movimentaram mais de R\$49 bilhões (ABIEC, 2016), dos quais apenas o mercado de parasiticidas movimentou cerca de R\$1,24 bilhões, correspondendo a 25 % do mercado total de produtos veterinários no país, assumindo a liderança do ranking brasileiro de produtos para saúde animal ao ultrapassar pela primeira vez o mercado dos produtos biológicos (SINDAN, 2017).

Ainda assim, e por diversas razões, a pecuária brasileira sofre anualmente com grandes prejuízos econômicos causados pelas parasitoses e seus efeitos deletérios sobre a saúde e consequentemente sobre os índices produtivos do rebanho bovino. Segundo estimativa feita por Grisi et al. (2014) e corroborada por Stotzer et al. (2014) as perdas potenciais com o parasitismo de bovinos no Brasil pode chegar a quase R\$14 bilhões por ano, sendo as helmintoses, as infestações por carrapato e pela mosca-dos-chifres os maiores responsáveis por tais perdas.

### **2.2.2. Perdas econômicas e principais danos**

No cenário externo, em 1981, segundo Grisi et al. (2002), houve perdas econômicas estimadas em aproximadamente 730,3 milhões de dólares causadas pela ação de ectoparasitos em bovinos nos Estados Unidos, totalizando uma perda de aproximadamente 2.260.600 bilhões de dólares.

Em 2002, Grisi et al. (2002) estimaram em aproximadamente 150 milhões de dólares as perdas econômicas decorrentes da ação de *H. irritans* no Brasil, totalizando prejuízo anual de 2.650.000.000 bilhões de dólares causados pela ação dos principais ectoparasitos de bovinos.



Já em 2014, Grisi et al. (2014) reavaliaram o impacto econômico causado pelos parasitos de bovinos no Brasil e puderam concluir que houve um total de perdas em consequência do parasitismo por *H. irritans* de aproximadamente 2.558.320 bilhões de dólares, com um prejuízo anual relacionado aos principais endo e ectoparasitos de aproximadamente 13.958.32 bilhões de dólares.

Somado às perdas causadas diretamente na produção, destacam-se os gastos com o controle da mosca, como despesas com produtos, mão-de-obra e gastos com equipamentos ou instalações, difíceis de serem contabilizados (BARROS, 2005).

Campbell (1976) realizou um estudo para determinar os efeitos do controle de *H. irritans* nas vacas de corte em relação ao peso de desmame dos bezerros e observou que a diferença de ganho de peso dos bezerros de matrizes tratadas foi significativamente superior, concluindo que seria financeiramente viável fazer o controle por causa do retorno financeiro posterior que cobriria os custos do tratamento no momento da venda dos animais.

Harvey e Brethour (1979) avaliaram os efeitos de *H. irritans* no ganho de peso de bezerros sobreano e, puderam observar que os animais tratados ganharam significativamente mais peso que os não tratados, com uma média significativamente maior de peso nos animais tratados ao longo dos 6 anos de estudo e um total de ganho de peso de aproximadamente 10kg/cabeça no momento do abate.

Kunz et al. (1984) avaliaram o efeito do controle da mosca no ganho de peso de novilhos e puderam determinar que, naqueles animais onde a mosca-dos-chifres foi totalmente controlada, houve um ganho de peso 14,3 % superior, correspondendo a aproximadamente 12,5kg por animal. Os animais tratados não tiveram mosca-dos-chifres, enquanto que os não tratados mantiveram infestação média de 700 moscas por animal, ao longo dos 120 dias de estudo.

Kunz et al. (1984) em outro estudo, avaliaram o efeito da infestação por mosca-dos-chifres nas matrizes no peso de desmame de suas crias e, puderam determinar que houve um ganho de 7,3kg por bezerro pertencente ao grupo tratado, assim como houve um maior ganho de peso nos machos. Mas, mesmo assim, os estudos mostraram que o controle de populações de *H. irritans* proporcionou substancial, mas nem sempre significantes aumentos no ganho de peso diário de bezerros antes da desmama e mesmo quando mais velhos. Campbell (1976) sugere que o principal efeito indireto para o ganho de peso dos bezerros seria uma maior quantidade de leite produzida por vacas tratadas contra *H. irritans*.

Schreiber e Campbell (1986) afirmam ainda que se o rebanho bovino possuir animais com vários tipos de colorações de pelagens e as infestações por *H. irritans* forem próximas dos níveis econômicos, os animais mais escuros ou negros poderão ter uma maior redução no ganho de peso quando comparados aos animais mais claros.

Em estudo de comparação de ganho de peso, utilizou-se novilhos Angus, Gelbvieh e mestiços de Brahman durante três anos consecutivos e pode-se observar que animais dos grupos tratados tiveram significativamente maiores ganhos de peso diário e total, quando comparados ao grupo controle (DEROUEN et al., 1995).

Em estudo de ganho de peso em vacas Nelore durante quatro anos consecutivos, observou-se um ganho de peso significativo a favor das vacas tratadas, da mesma forma que o peso dos bezerros no desmame. Porém, houve diferença na taxa de prenhez das vacas e, levando-se em conta que os níveis de infestação foram baixos durante todo o período experimental e que não houve diferença estatística de ganho de peso, justifica-se a diferença nas taxas de prenhez devido ao estresse dos touros, que quase sempre apresentam altas infestações de *H. irritans*. A conclusão é de que mesmo com infestações reduzidas, a mosca-dos-chifres causa prejuízos e sua presença ou ausência seria mais importante do que a intensidade da infestação (BIANCHIN; ALVES, 1997).

Bianchin e Alves (2002) avaliaram a influência de *H. irritans* no ganho de peso de vacas da raça Nelore e bezerros antes da desmama, observando as vacas paridas, por quatro anos consecutivos. Os animais adultos tiveram baixa infestação durante todo o estudo, além da ausência ou carga reduzidíssima de moscas nos bezerros e, concluiu que, apesar de haver uma tendência para um maior ganho de peso nas vacas tratadas, não houve diferença significativa entre os grupos, demonstrando que o reduzido nível de infestação produziu pouco ou nenhum efeito no ganho de peso dos animais destas categorias, assim como Da Silva et al. (2002) avaliaram o ganho de peso em bovinos infestados naturalmente por *H. irritans* e concluíram que, se a infestação dos animais for leve, pode não serem observadas alterações de ganho de peso, assim como rendimento de carcaça de bovinos.

Bianchin et al. (2004) avaliaram o efeito da mosca-dos-chifres no ganho de peso dos bovinos machos da raça Nelore e puderam concluir que, apesar das baixas médias de infestações observadas durante o período experimental, ocorreu redução significativa no ganho de peso dos animais não tratados, podendo-se notar também que, nesse caso, ausência teria sido mais importante que a intensidade da infestação.

Em estudo para avaliar o ganho de peso de bovinos mediante infestação de *H. irritans*, utilizou-se 120 nelores tratados a cada 30 dias com anti-helmíntico em todos os animais, independentemente do grupo de tratamento, durante os 150 dias de experimento e pode verificar uma diferença significativa de 20kg na média dos pesos entre o grupo controle e o grupo de tratamento mais eficaz, concluindo que a presença da mosca influencia no ganho de peso desses animais (MACIEL et al., 2015).

A infestação por *H. irritans* tem impacto negativo sobre a produção e o desempenho do gado, expressos na diminuição do ganho de peso, da produção de leite, do apetite e da conversão alimentar (BYFORD; CRAIG; CROSBY, 1992).

A qualidade do couro de bovinos pode ser influenciada pela presença de ectoparasitos, dentre os principais, destacam-se *Rhipicephallus microplus*, *Dermatobia hominis* e *H. irritans*. Em estudo para avaliação das lesões no couro causadas por esses ectoparasitos em Mato Grosso e Paraná, em 1999 e 2000, revelou-se que, nos dois Estados, acima de 60 % das lesões foram causadas por carrapatos. No Paraná, houve maior acometimento de lesões causadas por bernes, com aproximadamente 35 % das lesões; já no Mato Grosso, esse tipo de lesão representou aproximadamente 20,0 % das lesões e, no que diz respeito à *H. irritans*, Paraná teve um acometimento de cerca de 3,0 a 4,5 % do couro com esse tipo de lesão, enquanto que no Mato Grosso, esses valores variaram de 14,0 a 15,0 %, concluindo que o berne, apesar da maior incidência de carrapatos, é o principal depreciador da qualidade do couro bovino e, a mosca-dos-chifres juntamente com o carrapato, constitui menores perdas econômicas atreladas à características menos agressivas e permanentes que provocam no couro, quando comparados ao berne, tendendo a desaparecer durante os processos de curtimento, promovendo um couro de qualidade superior associado à lesões imperceptíveis (MARQUES; YAMAMURA; VIDOTTO, 2000).

Em outro estudo, mostrou-se que nos locais em que *H. irritans* costuma parasitar com maior frequência, como por exemplo, flanco e garupa, havia inúmeras lesões no couro dos animais do grupo controle quando comparado aos animais tratados, mas que também, após o término do processo de curtimento do couro, apesar de *H. irritans* causar lesões macroscópicas na pele dos bovinos, estas não chegam a causar perdas econômicas para a indústria, uma vez que o processo de curtimento repara totalmente as lesões (DA SILVA; DE LA RUE; GRAÇA, 2002).

Para avaliar lesões no couro cru, foram realizadas biópsias da região da cernelha dos bovinos, onde revelou-se que os couros crus, com mais de 50 % de área lesada, possuíam lesões (manchas negras, fendas e cicatrizes) espalhadas por toda a superfície, exceto a garupa, porém sem diferença significativa na porcentagem de área danificada entre os grupos de acordo com

a intensidade de infestação. Na histopatologia, encontrou-se eosinofilia perivascular com infiltrados de células mononucleares na derme superficial, infiltrado de eosinófilos no meio e dentro da derme, edema, hiperemia e hemorragia. E, finalmente concluiu que, seja pelos efeitos mecânicos da picada, ou mesmo fatores individuais e ligados a raça, infestações por *H. irritans* são provavelmente uma importante causa de perdas econômicas para a indústria do couro (GUGLIELMONE et al., 1999).

Estas moscas são consideradas vetores de *Staphylococcus aureus*, transmitindo a bactéria assim que inserem a probóscida dentro dos capilares das pontas dos tetos das novilhas, durante o hábito alimentar hematófago. Nesse processo, injetam *S. aureus* na pele, resultando em pequenos abscessos e formação de crostas e lesões. (OWENS et al., 1998). *H. irritans* foi associada a surto de dermatite causando atresia de tetos em novilhas em puberdade. A dermatite foi notada nos tetos, particularmente nos tetos anteriores e também na área sem pelos do períneo. Na histopatologia do tecido mamário, verificou-se formação de fibrose, inclusive no ducto papilar dos tetos, dermatite perivascular, intersticial, superficial e profunda, mastócitos perivascularares, poucos eosinófilos, sem edema ou hiperemia, exsudato ou exocitose neutrofílica, sem formação folículo linfóide em torno dos ductos ou no interstício, caracterizando dermatite alérgica ou induzida por artrópodes, associado à presença do agente no ventre e nas laterais dos animais em quantidade superior a 250 e à resolução do problema após o controle de *H. irritans* no gado (EDWARDS et al., 2000).

Ryman et al. (2013) avaliaram a influência da mosca-dos-chifres na localização de infecção intramamária entre os quartos de novilhas leiteiras criadas a pasto, assim como a condição da pele do teto e puderam perceber que a probabilidade de diagnosticar mastites causadas por algum tipo de patógeno era 5,1 vezes maior de ocorrer nos tetos anteriores que nos posteriores; assim como na infecção por *S. aureus*, em que probabilidade foi 3,9 maior de ocorrer nos quartos anteriores que nos posteriores. Edwards et al. (2000) também notaram predileção de *H. irritans* pelos tetos anteriores, que não está clara, mas supõe-se que seja causada pela atração das moscas em se posicionarem no baixo ventre do animal além da evidente proximidade com os tetos dianteiros que parecem maiores que os tetos posteriores, ampliando a superfície de contato para as moscas. Tal predileção poderia ainda estar relacionada também com a eficiência da cauda em repelir moscas ao longo do seu alcance, como os tetos posteriores (RYMAN et al., 2013).

### 2.3. Controle e Resistência

Com o surgimento de *H. irritans* nos Estados Unidos por volta de 1885, foram adotadas medidas de controle pautadas na repelência tópica da mosca com óleos de peixe, alcatrão, ácido carbólico e graxa ou pautadas na ação tóxica, com emulsões de querosene ou tabaco e creosoto em pó, além de armadilhas escuras por onde o gado passava e do tratamento do esterco com cal ou por dessecação, que persistiram até aproximadamente os anos 40 do Século XX quando finalmente, o controle foi revolucionado com o advento dos sprays ou banhos de diclorodifeniltricloreto (DDT) (DRUMMOND; GEORGE; KUNZ, 1988), pesticida da classe dos organoclorados, classificado como derivado etano clorado, responsável pela inibição da condução do sódio ao longo das fibras nervosas motoras ou sensoriais (TAYLOR, 2001).

Porém, em pouco tempo, resíduos de organoclorados haviam contaminado praticamente todos os ecossistemas, sendo detectados nos mais variados substratos e na segunda metade da década de 60, muitos países trataram de intensificar as pesquisas relativas ao assunto e, ao mesmo tempo, tomaram medidas legais, restringindo ou proibindo seu emprego (FLORES et al., 2004).

Próximo do final dos anos 50, a classe de inseticidas organofosforados foi testada e desenvolvida para o tratamento do gado no controle de uma variedade de artrópodes, incluindo

*H. irritans* (DRUMMOND; GEORGE; KUNZ, 1988). Essa classe atua inibindo a ação da acetilcolinesterase em sinapses colinérgicas, nos músculos e nas placas motoras. Ou seja, os organofosforados mimetizam a estrutura da acetilcolina e, quando se ligam a acetilcolinesterase, causam transforilação da enzima e, com isso, acetilcolina se acumula nas membranas pós-sinápticas levando a paralisia neuromuscular, com um potencial tóxico elevado para seres vivos. (TAYLOR, 2001). Os sinais clínicos em bovinos, principalmente são salivação, tremores musculares, miose e respiração ruidosa (RADOSTITS et al., 2002). Os compostos organofosforados mais conhecidos e utilizados no controle de parasitos são diazinon, fenthion, clorpirifós, diclorvós (TAYLOR, 2001). De Castro et al. (2007) relataram a intoxicação aguda de bovinos em propriedade onde o produtor, desconhecendo a toxicidade do diazinon, na tentativa de controlar a persistente infestação por carrapatos do rebanho, usou concentração extremamente alta do produto, aproximadamente seis vezes a dose recomendada, resultando no decúbito permanente e óbito dos animais.

Então, no final dos anos 70, século XX, os inseticidas piretróides foram sintetizados com a promessa de alta efetividade contra uma significativa variedade de artrópodes, controlando as populações de *H. irritans* de forma efetiva (DRUMMOND; GEORGE; KUNZ, 1988). Kunz e Schmidt (1985) demonstraram, em 1977, que acessórios plásticos incorporavam inseticida e aplicaram em brincos para bovinos no controle de *Amblyomma maculatum*, chamando atenção para o controle causado também na mosca-dos-chifres. Então, os primeiros brincos impregnados foram produzidos contendo os organofosforados clorpirifós ou stirofós, que não tiveram uma atividade residual tão longa quanto os brincos de piretróide que se seguiram. Em virtude disso, durante 5 anos, uma quantidade significativa de brincos impregnados com vários piretróides foram desenvolvidos e muito bem aceitos pelo mercado americano. Entretanto, o uso indiscriminado, associado a uma contínua pressão de seleção nas populações, levaram ao surgimento de resistência em mosca-dos-chifres aos piretróides (DRUMMOND; GEORGE; KUNZ, 1988).

Logo após o verão de 1982, problemas relacionados ao controle de *H. irritans* na Flórida, onde produtores e a indústria puderam acompanhar a perda de eficácia dos brincos impregnados com piretróides no controle das infestações, propiciaram o desenvolvimento dos primeiros testes de determinação de resistência em *H. irritans* para piretróides. Até o fim a estação da mosca em 1984, 10 estados já possuíam populações de mosca-dos-chifres resistentes aos piretróides, com disseminação em quase todo o sul e o sudeste dos Estados Unidos (KUNZ; SCHMIDT, 1985).

Quando a resistência aos piretróides utilizados impregnados em brincos de orelha surgiu, os entomologistas ficaram com recursos limitados, mas recomendaram que as velhas práticas de controle, como óleos, sprays, aditivos alimentares ou bolus, voltassem a ser aplicadas no gado. Em contrapartida, empresas mudaram a confecção dos brincos de piretróides para organofosforados ou uma associação entre as duas classes, com adição de sinergistas, ou piretróides mais tóxicos (CAMPBELL et al., 2006). A partir de então, novas classes foram introduzidas no mercado, incluindo as lactonas macrocíclicas e fenilpirazoles (BARROS, 2004).

Em busca do desenvolvimento de um produto com apelo duplo, tanto para nematoides quanto para artrópodes, a ivermectina foi primeiramente introduzida como parasiticida veterinário em 1981 (SUTHERLAND, 1990). As ivermectinas são compostos de lactonas macrocíclicas oriundas da fermentação do fungo *Streptomyces sp.* que, em contato com os parasitos, produz ataxia e paralisia da musculatura faringo-esofágica (ROHRER; ARENA, 1995).

Um número expressivo de lactonas estão disponíveis para uso veterinário e atualmente incluem: as avermectinas – abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina, selamectina; e as milbemicinas – moxidectina e milbemicina oxima. São altamente lipofílicas, ficam

estocadas nas gorduras para que possam ser lentamente liberadas, metabolizadas e excretadas. São moléculas conhecidas por agirem no GABA, bloqueando a estimulação neuronal do neurônio motor e levando a paralisia flácida (TAYLOR, 2001).

Estudos sobre o uso da ivermectina revelaram que grande parte é excretada nas fezes, inibindo o desenvolvimento das larvas de moscas, impedindo a ação de uma diversidade de artrópodes simbovinos na decomposição fecal e levando ao comprometimento do controle da população de moscas. Lima (2005) avaliou a influência do tratamento endectocida com ivermectina na fauna coprófila no desenvolvimento da mosca-dos-chifres e na entomofauna e, como resultados, mostrou que o tratamento por ivermectina influenciou o número, a frequência, a dominância, a diversidade e à similaridade das famílias emergidas das fezes de bovinos tratados.

Atualmente, medidas de controle de mosca-dos-chifres em bovinos são pautadas quase totalmente no controle químico, com a utilização dos compostos sob a forma de imersão, pulverização, *pour on*, *spot on*, polvilhamento, mecanismos autodosadores e brincos impregnados com inseticidas, além dos produtos chamados endectocidas, que são aplicados de forma injetável (ALVES-BRANCO; PINHEIRO; SAPPER, 2000). O controle biológico também é uma realidade e vários estudos tem sido conduzidos nesse sentido.

A melhor estratégia de controle atualmente é a de rotação de classes inseticidas, com mecanismos de ação diferenciados, onde a substituição periódica de uma classe (e não somente a troca do inseticida por outro da mesma classe) ajuda a manter a susceptibilidade da população (BARROS, 2005).

No Brasil, ainda em 1989, a preocupação com o futuro do controle de *H. irritans* devido à possibilidade do aparecimento de resistência já era uma realidade, uma vez que diversas autoridades locais regulamentavam o uso de inseticida em grande escala (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990a).

Em 1990, O Programa de Controle Nacional da Mosca-dos-chifres foi lançado pela EMBRAPA e as duas metas do programa eram: reduzir as infestações da mosca a níveis toleráveis e, evitar, quanto possível, o desenvolvimento de resistência da mosca aos inseticidas. Então, após levantamento de todas as informações disponíveis sobre o controle da mosca nos Estados Unidos e Austrália, definiu-se que uso racional de inseticidas e o besouro destruidor de massas fecais, *Onthophagus gazela*, seriam chaves no controle integrado da mosca. Os autores acrescentaram ainda que, no futuro, o programa poderia receber alguns ajustes, como: tratamento de todos os animais em setembro, com produto organofosforado; durante a época de chuva, tratamento com produto piretróide, mas somente quando infestação média fosse acima de 200 moscas, optando pela conveniência de usar brincos impregnados com o inseticida, mas com a forte recomendação de retirá-los em fevereiro, para assim, tentar evitar a promoção do desenvolvimento da resistência por parte da mosca e, por último, tratar todos os animais em maio, utilizando inseticida a base de piretróide (aspersão, imersão ou *pour on*), não utilizando brincos no período seco, pois as infestações são mais baixas (HONER; BIANCHIN; GOMES, 1990b).

Em 2000, o Ministério da Agricultura lançou uma instrução técnica para o produtor como orientação básica para o controle da mosca-dos-chifres, com as principais recomendações: somente efetuar o tratamento imediato quando o número de moscas tiver excedido 200 unidades por animal e/ou o comportamento dos animais tiver sido alterado em função do parasitismo, como jogada de cabeça e movimentos bruscos e frequentes da cauda, deixando animais com infestações consideradas médias, sem tratamento, na tentativa de retardar a resistência. Quando a opção fosse produto sob a forma *pour on* para controlar somente *H. irritans*, sem a necessidade de controle de carrapato, poderia-se utilizar pelo menos metade da dose indicada para o tratamento carrapaticida e, quando houvesse a necessidade de controlar os dois ectoparasitos, seria utilizada a dose carrapaticida. Os autores ainda recomendam o

controle efetivo de *H. irritans* em touros, principalmente na monta, com brincos mosquicidas, produto à base de fipronil e endectocidas “pour on” ou ainda, brincos impregnados de diazinon alertando ainda, que se esses últimos forem usados, devem ser retirados após quatro meses de uso para retardar o processo de resistência pela subdosagem (ALVES-BRANCO; PINHEIRO; SAPPER, 2000).

Oliveira et al. (2006) afirmam que, de modo geral, o controle químico da mosca tem sido realizado abusivamente, com frequência de tratamentos acima do necessário e baseado no uso sequencial ou na rotação aleatória de produtos. Um agravamento do problema tende a ocorrer tanto pela pressão de seleção exercida pelos curtos intervalos entre aplicações quanto pelo uso inadequado dos produtos. Paralelamente, é marcante o desconhecimento, por parte dos produtores, dos diversos aspectos relacionados ao controle desta ectoparasitose e ao manejo de resistência.

Pelo fato da mosca dos chifres adulta gastar grande parte do seu período de vida no hospedeiro e os seus estágios imaturos se desenvolverem nas fezes do seu hospedeiro, este parasito poderia ser vulnerável a uma variedade de práticas de manejo envolvendo o uso de inseticidas químicos mas, infelizmente, a mosca do chifre tem habilidade de desenvolver resistência a muitos inseticidas disponíveis no mercado e as falhas do controle no campo são comuns (BULL; MEOLA, 1993).

Infelizmente, a maioria dos produtores negligencia o modo de utilização dos inseticidas, assim como o momento de tratar adequadamente o animal, utilizando critérios baseados em tratamentos supressivos, estéticos, ou ainda oportunistas, este último visando conciliar o momento de vacinação ou pesagem dos animais para serem concomitantemente tratados. Enquanto o mais correto seria observar os sinais de incomodo do gado, para então tratar de forma tática, caso os animais manifestem necessidade imediata de tratamento, ou de forma estratégica, caso possa haver o planejamento do tratamento, para o início e fim da época de chuvas (BARROS, 2005).

A resistência mostra-se como uma realidade numa vasta quantidade de ectoparasitos de importância econômica, e com a redução da eficácia de produtos disponíveis, uma maior perda de produção configura-se em um cenário de difícil e onerosa reversão (BARROS, 2004). A resistência, uma vez desenvolvida na população, é irreversível e com manejo complexo, e, muito embora a redução deva ocorrer caso essa base química não seja mais utilizada durante alguns anos, a ela não desaparece completamente da população, se fazendo presente rapidamente caso o inseticida ou outro da mesma base seja reutilizado (BARROS, 2005).

Segundo Barros (2005), os piretróides são a classe inseticida mais representativa do mercado, seja sozinha ou em associações, uma vez que os piretróides estão presentes em três de cada quatro produtos indicados no controle da mosca-dos-chifres e, conseqüentemente, a classe mais empregada para o controle da mosca no país.

Pelo menos uma década após o início do controle químico baseado principalmente em produtos contendo piretróide, estudos em larga escala indicam que há uma ampla resistência a piretróides em populações de mosca-dos-chifres em todo o Brasil, tornando-se uma preocupação nacional e um problema crítico na rotina de produtores, porém as práticas de controle adotadas por eles, assim como um mercado dominado por produtos contendo piretróides tem caminhado em direção a resistência. (BARROS et al., 2012)

O estabelecimento da resistência nas populações parasitárias ocorre em virtude de mutações genóticas, que as tornam independentes da pressão de seleção de resistência exercida pelas bases químicas. O processo da pressão de seleção inicia-se com a utilização de um parasiticida no controle de determinada população, fazendo com que os indivíduos mais sensíveis sejam eliminados, selecionando uma frequência de genótipos que determinam a resistência nessas populações, determinando o desenvolvimento da resistência à base química utilizada. Finalmente, a resistência se desenrola com a continuidade da utilização da base

química associada ao aumento na frequência de genótipos resistentes na população que se traduzem em redução de eficácia do produto em questão assim como dos níveis de controle parasitário (BRITO et al., 2014).

Em 1991, avaliou-se a susceptibilidade de populações de *H. irritans* à organofosforados e piretróides no estado de São Paulo, logo após a introdução e estabelecimento do parasito no Estado e o uso indiscriminado dos agentes inseticidas, seja sob a forma de “pour on” ou pulverização e puderam concluir que as populações presentes naquela época foram bastante sensíveis a piretróides e organofosforados. Além disso, quando utilizou-se uma dose inferior de piretróide àquela preconizada como carrapaticida, observou-se resultados satisfatórios, inclusive com relação ao período residual (GRISI; SCOTT, 1991). Entre 1991 e 1992, houve nova confirmação de susceptibilidade de populações de *H. irritans* aos piretróides e os organofosforados no estado de São Paulo (SCOTT; COUMENDOUROS; GRISI, 1994).

De 2000 a 2003, avaliou-se a susceptibilidade de *H. irritans* aos inseticidas piretróides (permetrina e cipermetrina) e organofosforado diazinon em 14 estados e 78 municípios do Brasil em 154 populações de moscas divididos entre as cinco regiões. A permetrina foi utilizada apenas em 2000, substituída por cipermetrina nos anos seguintes. As populações de moscas investigadas eram compostas por 96,67 % de moscas resistentes a permetrina no primeiro ano e, 98,46 % resistentes a cipermetrina nos anos posteriores. Todas as populações das regiões nordeste e sudeste foram resistentes a pelo menos um dos dois piretróides testados, com uma frequência de resistência também bastante alta na região Centro Oeste (98,48 %) e na região Norte (94,12 %) do país, e com a maioria das populações altamente susceptíveis ao diazinon, demonstrando uma resistência generalizada e bem estabelecida de *H. irritans* no Brasil frente aos piretróides e susceptibilidade das populações ao organofosforado diazinon (BARROS et al., 2012).

Entre 2000 e 2001, verificou-se a susceptibilidade de populações de *H. irritans* ao diazinon em 18 propriedades de 10 municípios de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e todas as populações testadas mostraram um elevado nível de sensibilidade, que poderia ser explicado pelo pouco uso de organofosforados e a presença de resistência ao piretróide, indicando que esta molécula ou qualquer outra desta classe poderia ser utilizado no controle da mosca-dos-chifres e no manejo da resistência, particularmente em populações resistentes aos piretróides (BARROS et al., 2002).

De abril de 2001 a dezembro de 2002 realizou-se um diagnóstico da suscetibilidade da mosca-dos-chifres a piretróides e organofosforados em distintos municípios nos estados de Alagoas, Bahia e Sergipe, totalizando 23 propriedades, localizadas em 12 municípios, nos três estados. Houve elevada suscetibilidade da mosca-dos-chifres frente ao diazinon nestas regiões. Com relação a permetrina, 75 % das propriedades avaliadas no presente estudo já estariam apresentando problemas no controle da mosca caso fossem utilizados produtos com essa base, porém, a resistência aos piretróides tornou-se mais evidente nos ensaios biológicos realizados com cipermetrina, que evidenciaram a ocorrência de elevados níveis de resistência em todas as populações testadas, e os princípios ativos principalmente utilizados foram cipermetrina e deltametrina, ambos piretróides, utilizados em 88,46 % e 80,77 % das propriedades, respectivamente. Dentre os inseticidas organofosforados, os que se destacam são o diclorvós (42,31 %), presente apenas em associações com piretróides, seguido do triclorfon (26,92 %) e diazinon (23,08 %). A significativa utilização de produtos organofosforados nas propriedades resulta da ampla resistência já desenvolvida aos piretróides e da conseqüente necessidade de substituir os produtos (piretróides) em uso (OLIVEIRA; AZEVEDO; MELO, 2006).

Em 2003, avaliou-se a susceptibilidade de populações de *H. irritans* a inseticidas em 16 propriedades rurais em Goiás, Tocantins e Distrito Federal e obteve-se como resultado que 62,5 % das populações testadas foram resistentes aos piretróides, representados por permetrina e cipermetrina, sendo que 100 % destas foram susceptíveis para organofosforados. Os autores

alertam para a falta de conhecimento ou mesmo de critério no controle da mosca-dos-chifres, havendo necessidade de conscientizar os produtores quanto as formulações, vias de aplicação e frequência de utilização de produtos inseticidas, buscando a preservação das classes inseticidas eficientes enquanto ainda existentes (SAUERESSING; BARROS, 2003).

Entre 2012 e 2014, objetivou-se avaliar a resistência de populações de *H. irritans* a piretróides e organofosforados em bovinos de corte no estado de São Paulo, avaliando-se 17 propriedades. Demonstrou-se uma baixa frequência de alelos de resistência nas populações de mosca-dos-chifres estudadas, além de uma alta susceptibilidade de *H. irritans* aos inseticidas organofosforados (OLIVEIRA et al., 2015).

Brito et al. (2014) avaliaram os fatores de risco associados à resistência a pesticidas em populações de mosca-dos-chifres no estado de Rondônia, com um levantamento dos fatores de risco realizado na forma de entrevistas aos proprietários de rebanhos de bovinos e bubalinos. Percebeu-se que a principal necessidade de utilização de produtos químicos seria para o controle de carrapato, realizado com frequência maior que 6 vezes ao ano em pelo menos 50 % das propriedades avaliadas, podendo chegar a 26 tratamentos anuais em algumas propriedades. Tal fato alerta para uma situação preocupante, a determinação da pressão de seleção intensiva pelo uso contínuo, traduzido pela ineficácia das bases utilizadas no controle da população de carrapato. Os autores ressaltam ainda que a base química utilizada por mais de 70 % dos fazendeiros entrevistados foi o piretróide e, durante a época de maior infestação por carrapatos, coincidente com a época de maior parasitismo por *H. irritans*, 15 % tratavam o gado semanalmente e 25 %, quinzenalmente. Com a avaliação do fator de resistência para piretróides em amostras de adultos de *H. irritans* das propriedades avaliadas, mostrou-se que, no momento, 82 % das propriedades demonstram ser susceptíveis a pesticidas piretróides, levando a conclusão que o desenvolvimento da resistência da população de mosca-dos-chifres das propriedades avaliadas está sendo desencadeado pelo mau uso das bases químicas pelos produtores.

Em 2014, avaliou-se a susceptibilidade da mosca-dos-chifres aos pesticidas organofosforados utilizando-se diazinon em 10 propriedades de diferentes microrregiões de Rondônia. Adicionalmente, pode-se observar o mau uso dos produtos endectocidas, assim como a utilização de até três produtos de classes farmacológicas diferentes utilizados de forma concomitante no gado, além do critério de conveniência adotado pelo produtor para o tratamento do gado, como na época de vacinações. As populações de *H. irritans* mostraram-se altamente susceptíveis aos organofosforados, reforçados pela ausência de infestações em propriedades onde os rebanhos utilizam brincos impregnados com esses pesticidas, que parece ser uma tendência no controle de mosca-dos-chifres em Rondônia. Recomenda-se ainda, no sentido de prolongar a eficácia, que o uso de brincos impregnados com organofosforados somente sejam utilizados em níveis de infestação acima de 300 moscas/animal e que as bases sejam rotacionadas anualmente, a fim de retardar o processo de resistência (BRITO et al., 2014).

Desde muito cedo, muitas dificuldades tem sido encontradas no controle de insetos nocivos e as duas principais são: o efeito excessivamente amplo e persistente dos inseticidas, tóxicos não apenas para o alvo que se destinam, mas também para outros insetos, juntamente com a persistência desses inseticidas no meio ambiente, que podem ser passados pela cadeia alimentar, apresentando um perigo para outros organismos, inclusive o homem; a segunda dificuldade ocorre por causa de uma notável habilidade que os insetos tem demonstrado de desenvolver resistência aos pesticidas (WILLIAMS, 1967).



## 2.4. Insect Growth Regulator (IGR) ou Regulador do Crescimento de Insetos

O termo insect growth regulator (IGR) foi designado para descrever uma nova classe de compostos bio-rationais (STAAL, 1975), ou seja, químicos à base de plantas levemente alterados ou moléculas produzidas após produtos naturais, com propriedades resultantes bem similares ao composto natural. Da mesma forma, moléculas semelhantes aos químicos baseados em micro-organismos também são consideradas bio-rationais (DEBOUN; FRANCES; STRICKMAN, 2014).

Os pesticidas de terceira geração, como os IGR assim foram chamados por Williams (1967), surgiram de duas dificuldades existentes já naquela época, onde uma delas eram os pesticidas desenvolvidos até aquele momento, que possuíam efeitos muito amplos e tóxicos não somente para os parasitos, mas também e, principalmente, para outros insetos. Mais ainda, por persistirem no meio ambiente e, algumas vezes, acabarem sendo passadas pela cadeia alimentar apresentando perigo para outros organismos, incluindo o homem. A outra dificuldade era de que os insetos já estariam demonstrando uma forte habilidade em desenvolver resistência aos pesticidas (WILLIAMS, 1967).

Dessa forma, por causa do aumento da demanda pública por tecnologias mais seguras, implicando em modos de ação mais seletivos, assim como os que reduzissem os riscos para organismos que não fossem alvo do controle, para o meio ambiente e para os seres humanos, houve o aumento dos esforços na pesquisa por moléculas com diferentes mecanismos de ação, por órgãos-alvo alternativos no inseto e com abordagens totalmente diferentes de controle. Os IGR, na sua grande maioria, preenchem esses requisitos, pois abordam outros órgãos alvos que não o sistema nervoso central, exibindo uma maior atividade e mostrando um perfil muito mais seguro por agirem, principalmente, no desenvolvimento embrionário larval e ninfal, interferindo na metamorfose e reprodução (GRAF, 1993).

Os IGR tem como característica marcante não causar a morte do parasito alvo diretamente, mas sim interferência no seu crescimento e desenvolvimento, atuando principalmente nos estágios imaturos (TAYLOR, 2001). Por isso, em muitos casos, os IGR vão precisar de mais tempo para reduzir a população de insetos, quando comparado aos inseticidas convencionais e, às vezes, terão que ser usados em combinações com adulticidas para alcançar um efeito imediato “knock-down” (GRAF, 1993). Assim sendo, não são os mais adequados, quando empregados isoladamente, para o rápido controle de uma população de adultos de insetos já bem estabelecida. Porém, quando o parasito exibe um claro padrão sazonal, a utilização de um IGR pode ser realizada antecipadamente à época de maior desafio como uma medida preventiva (TAYLOR, 2001).

O primeiro efeito dos IGR e também o mais observado em insetos é uma morfogênese anormal do tegumento, geralmente irreversível. Muitas espécies produzem formas extra larvais, ninfais e pupais em resposta à exposição aos IGR, onde tornam-se gigantes, mas com formas quase perfeitas em uma escala intermediária entre forma imatura e adulta do inseto. Além do mais, o período de maior sensibilidade para inibição da metamorfose é o último estágio larval ou ninfal (e a pupa em holometabólico). E, a intensidade e a caracterização da resposta dependerão da espécie, da escolha do momento da aplicação, da dose, do modo de administração, do tipo de composto. Holometabólicos, em especial, parecem possuir uma grande habilidade para compensar suas super larvas através de uma rediferenciação mais extensa e com capacidade variável para postergar temporariamente a pupação quando expostas ao hormônio juvenil (STAAL, 1975).

O crescimento e o desenvolvimento dos insetos são muito bem orquestrados por hormônios e qualquer interferência na homeostase de um ou mais desses hormônios, seja por origem endógena, seja por fontes exógenas, como os análogos sintéticos (agonistas ou antagonistas) poderia resultar na interrupção e/ou crescimento e desenvolvimento anormal do

inseto alvo (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998). Por isso, para que haja melhor entendimento da classe dos IGR, precisamos entender o processo de metamorfose, os hormônios envolvidos e a regulação endócrina relacionada ao crescimento e desenvolvimento dos insetos.

#### **2.4.1. Metamorfose dos insetos**

A estratégia de vida mais amplamente utilizada na história da evolução dos animais é a metamorfose. As marcadas diferenças entre as formas larvais e adulta permitem que os estágios, como são denominados os períodos entre as mudas (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012), explorem diferentes habitats e fontes de alimento, além de garantir elevado grau de adaptação de um estágio para um papel particular, como a dispersão. Insetos com metamorfose completa (holometabólicos) como as moscas, tem os estágios larval, pupal e adulto bastante diferentes, fato que permite-lhes poder separar os recursos necessários para o crescimento daqueles necessários para a reprodução, além de possuírem um ciclo de vida bem rápido (TRUMAN; RIDDIFORD, 1999).

Até o início do século XX, os biólogos acreditavam que os insetos não secretavam hormônios pois, após castração, suas características sexuais secundárias não eram afetadas. Porém, em 1917, Stephan Kopeç demonstrou, através de manobra cirúrgica, que a metamorfose dos insetos era realizada sob o controle hormonal cerebral. Após a metade do século XX, as descobertas na endocrinologia dos insetos avançaram e mostram o clássico esquema de regulação hormonal conhecido atualmente (SUBRAMANYAM; HAGSTRUM, 2012).

A metamorfose é acompanhada por perda periódica ou muda do exoesqueleto e ocorre mediada por hormônios, onde destacam-se: hormônio pró-torácico (PTTH), ectisona ou 20-hidroxiectisona (20E) e hormônio juvenil (JH). Embora haja diferenças específicas entre os mecanismos da metamorfose entre as espécies, sabe-se que esses três hormônios atuam concomitantemente (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

O processo de muda é iniciado pelo aumento nos títulos de 20E e torna-se completo com o declínio dos títulos de 20E e a subsequente liberação do hormônio da eclosão (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998).

Células neuroendócrinas produzem o neuro-hormônio PTTH, que é liberado por exocitose e carregado pela hemolinfa até o tórax, onde estimula as glândulas pro-torácicas a secretarem ectisona que, convertida em 20-hidroxiectisona, atuará no tecido-alvo de sua preferência, a epiderme, localizada logo abaixo da cutícula, estimulando a secreção de enzimas que digerem a cutícula velha e sintetizam uma nova (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

Enquanto a larva se prepara para sofrer a muda larval, a alimentação cessa. Com o aumento dos títulos de 20E, a epiderme se separa da velha cutícula e o espaço ecdisial resultante é preenchido com fluidos da muda que contém enzima quitinolítica inativa para ser utilizada na digestão da velha cutícula. Nesse meio tempo, as células da epiderme se reorganizam para uma maciça síntese proteica, assim como secreção de nova epicutícula e cutícula. Uma vez que os títulos de 20E começam a declinar, as enzimas do fluido da muda são ativadas para digerir a prócutícula (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998).

Imediatamente após, o fluido da muda é reabsorvido e o curtimento pré-ecdisial da nova cutícula ocorre. Finalmente, quando os títulos de 20E declinarem até o nível basal, o escape da velha cutícula (ecdise) inicia-se por liberação de peptídeos, hormônio da eclosão e hormônio do desencadeamento da ecdise (ETH), que agem juntos para garantir o completo sucesso da muda. A alimentação então é retomada e deposição endocuticular continua durante o período entre as mudas (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998).

O JH é liberado pelas células do corpo alado no cérebro e tem por objetivo manter as características juvenis (imaturas) nos insetos em desenvolvimento, prevenindo a metamorfose

a cada muda larval. Sendo assim, quando o 20-hidroxiectisona age sobre epiderme e os níveis hemolinfáticos de hormônio juvenil estão altos, o inseto muda para outra forma, uma forma juvenil grande. Durante o período de alimentação entre as mudas, JH também é necessário para a manutenção da proliferação isomórfica dos discos imaginais, que são tecidos epiteliais desenvolvidos durante o primeiro estágio do ciclo de vida dos insetos holometabólicos e, finalmente, dão origem as principais partes do corpo como olhos, asas, pernas e genitália (TRUMAN et al., 2006).

Quando ectisona atua na ausência de JH, causa a cessação da alimentação e o início da busca de um lugar para pupação (RIDDIFORD, 1976, 1978). No último estágio de larva, o corpo alado torna-se inativo e quando a ectisona é liberada, inicia-se a próxima muda com os níveis de hormônio juvenil baixos ou inexistentes. Nesse momento, a epiderme começará a produzir estruturas de pupa. Em insetos holometabólicos, a ectisona é secretada novamente no final da pupação e, como o hormônio juvenil não está presente, a 20-hidroxiectisona desencadeia a metamorfose para a forma adulta (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012). No estágio adulto, 20E e JH desempenham papel na regulação da maturação reprodutiva (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998).

E, para concluir, os IGR incluem várias classes químicas com diferentes modos de ação, tendo sido então divididos, de acordo com a características de ação, em quatro grupos: os inibidores da síntese de quitina, os derivados da triazina, os agonistas não esteroidais da ectisona ou compostos aceleradores da muda dos insetos e os análogos ou miméticos do hormônio juvenil (GRAF, 1993; STAAL, 1975) (BAKLI et al., 2016; DHADIALLA, 2012; DHADIALLA; LLC, 2005; NAKAGAWA, 2005).

#### **2.4.2. Inibidores da síntese de quitina**

A quitina é um complexo amino polissacarídeo responsável por formar os elementos de suporte nas estruturas extracelulares, principalmente no exoesqueleto dos insetos, além de ser o principal componente do complexo quitinoproteico da cutícula. Sendo assim, qualquer interação com a síntese ou deposição de quitina oferece um meio potencial para o controle do desenvolvimento dos insetos no momento da muda. Muitas substâncias químicas são conhecidas como inibidores da síntese de quitina, agindo na “membrane-bound chitin synthetase”, que é a enzima chave na formação de quitina ou na fase de polimerização (COHEN, 1987).

As Benzilfenilureias (BPU's) são os inibidores da síntese de quitina que mais foram introduzidos para o controle de ectoparasitas na Veterinária (TAYLOR, 2001). O seu potencial para inibição da síntese de quitina foi descoberto quase por acidente na rotina de desenvolvimento de novos herbicidas e, por causa disso, muitos esforços foram feitos para o desenvolvimento do primeiro agente BPU comercial para o controle dos insetos, o diflubenzuron, que além de ter sido utilizado primeiramente na agricultura, em pastagens, para controle de pragas associadas aos prejuízos nas lavouras, também é utilizado atualmente para promover a saúde animal, controlando moscas como a *Musca domestica*, *Stomoxys calcitrans* e *H. irritans*, seja por aplicação tópica no esterco das vacas, por via oral na alimentação ou por liberação lenta em bolus nos bovinos, além de também ser utilizada no controle de piolhos e moscas varejeiras (GRAF, 1993) e outros parasitos e vetores, como o *Aedes aegypti* (BORGES et al., 2004; MARTINS; DA SILVA, 2004).

Os BPU's atuam nos estágios larvais, tornando-os inabilitados a sobreviver a próxima muda. A atividade ovicida também é alcançada através da inibição da deposição de quitina durante o desenvolvimento larval (GRAF, 1993).

Kunz et al. (1977) testaram o potencial de diflubenzuron em controlar a população de campo de mosca-dos-chifres em bovinos. Os animais foram tratados com solução de 0,5 % e

1,0 % de diflubenzuron por via tópica na quantidade de 2 litros/animal, ovos foram recolhidos e incubados em fezes tratadas ou não, coletadas do campo. O acompanhamento dos estágios do parasito foram realizados, obtendo-se como resultado a inibição da reprodução das moscas após o tratamento, com efetividade superior nos animais tratados com a dose de 1 %, além da comprovação da morte de larvas de primeiro estágio criadas nas fezes de animais tratados, levando a conclusões de que diflubenzuron administrado por pulverização foi efetivo em prevenir o desenvolvimento da mosca-dos-chifres no campo, determinando assim uma nova dimensão para no seu controle.

Dell'Porto et al. (2012) avaliaram a eficácia de formulação comercial de diflubenzuron a 25 % no controle de *H. irritans*, misturado ao sal mineral na dosagem de 0,5 g/kg, com ingestão média diária de 70 g por animal. De acordo com os resultados obtidos no estudo *in vitro*, a eficácia foi de 98,83 % e 99,20 % em estudo de campo. Com base nos resultados, os autores afirmam que o produto pode ser indicado como alternativa para o controle desse ectoparasito.

Tfouni et al. (2013), utilizando o diflubenzuron a 3,0 % por via oral, estimando consumo médio diário de 30 g por animal, promoveram um estudo para a determinação de resíduos no leite e tecidos (fígado, rins, gordura e músculos) de bovinos e puderam concluir que, na dose recomendada pelo fabricante para promover efeito inseticida, o produto é considerado seguro para a presença de resíduos de diflubenzuron.

Andreotti et al. (2015) avaliaram a efetividade de diflubenzuron no controle de *R. microplus* à campo e, embasados pela biologia e histologia dos carrapatos realizadas no período do estudo, puderam afirmar que diflubenzuron 3,0 %, consumido numa média diária de 30 g por animal, não afeta o desenvolvimento dos carrapatos que sobreviveram a fase parasitária e o efeito do tratamento somente poderia ser observado na larva de carrapato e com eficácia de aproximadamente 54,6 % de proteção quando utilizado no sal mineral. Os autores também sugerem que diflubenzuron seja associado a outro tratamento acaricida para que eleve as taxas de eficácia no controle de carrapatos.

O sucesso de diflubenzuron gerou o interesse das indústrias farmacêuticas, levando ao desenvolvimento de muitos outros BPUs e, por causa disso, tem-se significativa quantidade de produtos com essa atividade IGR disponíveis no mercado (GRAF, 1993).

Um BPU que foi desenvolvido especificamente para o uso veterinário e atua no controle de pulgas em cães e gatos, chama-se lufenuron, comercialmente conhecido como: Program® e Program Plus®, este último em associação com uma lactona macrocíclica (GRAF, 1993).

DEAN et al. (1998) estudaram o modo de ação de lufenuron em larvas de pulga dos gatos, *Ctenocephalides felis felis*. Como resultados, comparando-se larvas saudáveis de primeiro instar e larvas tratadas com lufenuron, observou-se que a morte resultou por muda incompleta ou sangramento da cutícula lesada que se apresentava dissecada e, muitas vezes, com exoesqueleto rompido e vistas frequentemente arrastando meio larval na parte traseira do abdômen, preso à hemolinfa que extravasava. Micrografias eletrônicas da estrutura cuticular das larvas do grupo controle mostraram uma cutícula composta por três camadas bem definidas: a epi, exo e endocutícula, com poros abundantes, enquanto que as larvas tratadas com lufenuron possuíam as camadas epi- e exocuticulares semelhantes as encontradas no grupo controle com canais abundantes na cutícula.

Entretanto, em muitas das larvas tratadas, a camada endocuticular consistia em uma lâmina de microfibrilas de quitina pequena e parcialmente formada, presença de material amorfo e microfibrilas caídas sem qualquer orientação. Já em outras larvas tratadas, havia a formação da endocutícula normalmente durante o primeiro instar, mas eram incapazes de dissolvê-la e formar uma nova cutícula após a muda. E, finalmente, comparativamente com os insetos do grupo controle que secretaram bastante gel de muda no espaço exuvial, os insetos tratados com lufenuron secretaram pouco gel de muda comprometendo a digestão da velha

endocutícula, além do conteúdo citoplasmático das células da epiderme terem sido significativamente reduzidos nas larvas tratadas, mesmo que a membrana plasmática parecesse estar intacta e algumas células contivessem núcleo, o número de ribossomos, microtúbulos, mitocôndrias e outras organelas citoplasmáticas foram grandemente reduzidas.

Em outro estudo, Dean et al. (1999) contribuíram mais uma vez para o entendimento do modo de ação de lufenuron. Desta vez, em adultos de *C. felis* alimentados com diferentes concentrações de lufenuron adicionados à dieta. Neste estudo, houve mortalidade durante todo o período de execução, que se apresentou de forma crescente à medida que a concentração de lufenuron e o tempo de exposição aumentaram. Secções histológicas de adultos tratados com 0,5 ppm de lufenuron mostraram que a cutícula foi o principal tecido afetado pelo tratamento. Após o terceiro dia de tratamento, a cutícula das pulgas do grupo controle eram uniformes e possuíam camadas contínuas de microfibrilas de quitina enquanto que a das pulgas alimentadas com 0,5ppm de lufenuron continham depósitos de proteína amorfa com matriz de microfibrila interrompida.

A micrografia eletrônica demonstrou que, apesar da exocutícula dos insetos do grupo controle e dos grupos tratados terem sido similares em espessura, a cutícula das pulgas tratadas com 0,5 ppm estava desorganizada com inclusões proteínicas, enquanto que as pulgas tratadas com 1,0 ppm possuíam apenas uma camada laminar comparada com as 13 horas camadas laminares das endocutículas do grupo controle. Além disso, as células epidermais dos insetos tratados estavam degeneradas e possuíam uma quantidade de citoplasma epidermal menor que a do controle. Como efeito o adicional do tratamento com lufenuron, houve inibição da diferenciação das células epiteliais do intestino delgado. Levando a conclusão de que lufenuron causa mortalidade de pulgas adultas, além de outras alterações morfológicas *in vitro*.

Nishida et al. (1995) avaliaram o potencial de lufenuron administrado por via oral na desinfestação de cães e gatos artificialmente infestados com *C. felis*. Em dose única de 15, 30 ou 60 mg/kg para gatos e 5, 10 ou 20 mg/kg para cães. Em gatos, a emergência de pulgas adultas foi intensamente prevenida por 30 dias na dose de 15 mg/kg e por 40 dias nas doses de 30 e 60 mg/kg. Já em cães, a dose de 10 mg/kg foi capaz de prevenir completamente o desenvolvimento de pulgas.

Franc e Cadiergues (1997) avaliaram a eficácia de uma formulação injetável de lufenuron para o tratamento em dose única de gatos artificialmente infestados por *C. felis*. Foram utilizadas duas dosagens, 5 mg/kg e 10 mg/kg por via subcutânea e a efetividade para as ambas dosagens foram maiores que 90 % até cinco semanas após o tratamento, maiores que 95 % até nove semanas após tratamento e maiores que 98 % até treze semanas após o tratamento e puderam concluir que a administração em dose única por via subcutânea em gatos foi eficaz em controlar a população de pulgas em gatos por mais de vinte e seis semanas, evitando inclusive a reinfestação durante esse período.

Blagburn et al. (1999) realizaram um estudo cujo objetivo principal era identificar a mais baixa dose de lufenuron administrada por via subcutânea que resultasse em 90 % de interrupção do ciclo de vida de *C. felis* por até 6 meses em gatos jovens. Utilizou-se as doses de 2,5; 5; 10 ou 20 mg/kg e, após observação dos resultados, nas doses de 10 ou 20 mg/kg houve redução de 90 % do número de pulgas adultas emergentes dos ovos dos animais dos dois grupos tratados, por 196 dias após o tratamento, concluindo que uma formulação injetável pode prover para veterinários e proprietários de gatos uma alternativa eficaz para o tratamento.

Salokhe et al. (2012) avaliaram a eficácia de lufenuron no controle de *Aedes aegypti* em ensaios de campo simulados e, após todos os experimentos terem revelado que a molécula não somente afeta a prevalência sobre as larvas, como também induz o desenvolvimento de adultos anormais. Esses resultados levaram os autores a concluir que lufenuron promove uma atividade residual substancial contra as larvas de *A. aegypti* e também possui excelente potencial para o seu controle com uma atividade residual significante nos sítios de criação.

Bull et al. (1996), citando Kemp (1990), chamaram atenção para o destaque da molécula de fluazuron no controle de carrapatos do gênero *R. microplus*, também uma benzil fenil ureia, um novo princípio ativo de uma formulação *pour on*. (ACATAK® *pour-on*, Ciba Geigy, Austrália) que se tornou o primeiro regulador de crescimento acaricida registrado para o controle de ixodídeos e que em quantidade extremamente baixa inibe a formação da quitina em *R. microplus* através da inibição de enzimas específicas envolvidas no processo da muda.

O fluazuron tem características lipofílicas se ligando fortemente a gordura, entre elas, a do leite. Vacas lactantes que foram tratadas com fluazuron promoveram a excreção deste fármaco na gordura do leite, proporcionando uma proteção parcial para o bezerro lactante sem necessidade de tratamento direto. Porém, como resultado da persistência do agente químico no tecido gorduroso das vacas tratadas, deve haver um período de 6 semanas de espera para o consumo da carne por humanos (BULL et al., 1996).

Bull et al. (1996) realizaram três estudos de Campo com o objetivo de validar os efeitos supressivos de Fluazuron nas populações de carrapato sob uma variedade de manejos e condições ambientais, utilizando a dose de 1,5 mg/kg, com o volume de 3 ml/50 kg de peso corporal, aplicado por via tópica *pour on*. Em todos os estudos, pode se observar uma proteção estendida contra *R. microplus* por mais de 12 semanas, concluindo-se que o tratamento antecipado ou sucessivos tratamentos causam efeitos supressivos na população de forma nunca vista anteriormente, inibindo a produção de ovos viáveis de fêmeas ingurgitadas, reduzindo assim a contaminação do pasto.

Martins et al. (1995) avaliaram o desempenho de fluazuron sobre o desenvolvimento do carrapato *R. microplus*, nas dosagens de 1 e 2 mg/kg, empregado através de formulação "pour-on", em bovinos mantidos a campo e infestados experimentalmente. Puderam concluir que até os 14 dias da aplicação do produto, embora o número médio de carrapatos tenha diminuído, não houve um controle eficaz em nenhuma das duas dosagens, porém, grande parte dos carrapatos presentes apresentaram alterações morfológicas. Ademais, a dosagem de 2 mg/kg demonstrou melhor controle do que a de 1 mg/kg, porém, sugere-se que, como o produto avaliado não apresenta uma ação imediata nos estágios adultos presentes nos animais a serem tratados, necessita ser utilizado de uma maneira diferenciada dos produtos carrapaticidas até então tradicionalmente usados.

Calligaris et al. (2013) avaliaram a eficácia de fluazuron e seus efeitos em ninfas de *R. sanguineus* alimentadas em coelhos em diferentes doses (20, 40, 80 mg/kg) e os achados demonstraram que afetou ninfas de *R. sanguineus*, causando mudanças morfológicas que comprometeram total ou parcialmente o desenvolvimento corporal e a emergência de adultos após o período de ecdise, sugerindo que o IGR pode ser utilizado para o controle deste estágio do ciclo biológico deste carrapato.

Oliveira et al. (2013) avaliaram as mudanças na formação do tegumento e do processo digestivo de ninfas de *R. sanguineus* alimentadas em coelhos tratados com diferentes doses do IGR e puderam verificar a interferência no tegumento e nas células do intestino delgado, prejudicando a polimerização de novas cutículas e o processo de absorção e digestão do sangue do hospedeiro, prevenindo o desenvolvimento do estágio e a emergência de adultos após o período de ecdise, indicando a possibilidade do uso deste IGR para controlar esse estágio biológico.

Novaluron também é uma fenil benzil ureia da classe dos IGR com características estruturais que garante maior solubilidade em solventes orgânicos que os demais. O metabolismo em ruminantes tem como metabólitos o próprio novaluron inalterado, sendo que mais de 90 % do produto é eliminado via fezes e os outros metabólitos, eliminados via fezes e urina (SOUZA, 2009).

Avaliou-se laboratorialmente a eficácia de novaluron aplicado diretamente no esterco bovino para o controle de larvas de *H. irritans*, *M. domestica* e *S. calcitrans*. Avaliou-se se a

localização da colocação do produto (sobre o esterco, no meio do esterco ou na parte inferior do esterco) seria capaz de influenciar a eficácia, chegando-se à conclusão que novaluron formulado como grânulo e aplicado no esterco bovino foi eficaz contra as larvas das três espécies de moscas em testes laboratoriais, e a colocação do produto no meio e na parte inferior do esterco afetou mosca-dos-chifres e moscas domésticas em seus desenvolvimentos reduzindo a emergência de adultos destas moscas em números superiores a 90 %. Ainda, esta formulação foi particularmente eficaz contra mosca dos estábulos com resultados superiores a 98 % de redução de adultos emergidos (LOHMEYER; POUND, 2012).

Em estudos preliminares para o desenvolvimento de uma formulação transdérmica à base de novaluron, Souza (2009) realizou testes de solubilidade, cinética química, estabilidade e metodologias analíticas validadas em tecidos animais como: músculo, rins, fígado, gordura e plasma e concluiu que a formulação transdérmica contendo novaluron a 5 % foi eficaz, em dose única, contra o carrapato *R. microplus*. De modo comparativo, pode-se afirmar também que a formulação contendo 5 % de novaluron no volume de 1 mL/20kg de peso vivo apresentou desempenho similar ao produto comercial contendo fluazuron, aplicado no volume de 1 mL/10kg de peso vivo, correspondente a dose de 2,50 mg/kg de peso corporal.

Ferreira (2009) avaliou os efeitos de novaluron, inibidor da síntese de quitina sobre a formação de larvas de *A. aegypti* e obteve resultados que indicam que o tratamento das larvas com novaluron proporcionaram a diminuição do conteúdo de quitina das larvas de forma dose-dependente.

Ainda há inibidores da síntese de quitina como flucycloxuron, flufenoxuron, hexaflumuron, noviflumuron, triflumuron, entre outros, empregados no controle de pragas agrícolas (DHADIALLA, 2012).

### 2.4.3. Derivados da triazina/pirimidina

A ciromazina, composto químico derivado da triazina (LEVOT, 2012) foi descoberta em meados dos anos 70. Como IGR, seu mecanismo de ação permanecia desconhecido até 2000 (BEL; WIESNER; KAYSER, 2000), mas Chen et al. (2006) mostraram que há um gene implicado nos caminhos de resposta do DNA danificado com alelos ciromazina resistentes e que apesar do alvo ainda ser um mistério, os recentes estudos evidenciariam o envolvimento do metabolismo do DNA.

Tem sido utilizado em ovelhas e cordeiros para prevenir infestações por larvas de Calliphoridae, assim como no controle de outros dípteros como *M. domestica*, mosquitos, entre outros insetos. Uma particularidade desse IGR é a pouca ou nenhuma atividade contra a mífase já instalada, por isso essa substância tem sido usada profilaticamente (GRAF, 1993).

Normalmente, os ovos são postos nas ovelhas tratadas, as larvas eclodem, começam a ingerir ciromazina junto com o tecido e fluidos corporais, que atuará impedindo a mudança para o segundo instar e, como consequência, a interrupção do ciclo evolutivo e o abortamento da infestação. Proteção esta que decresce durante o desenvolvimento da larva, podendo cessar para larvas de terceiro estágio (GRAF, 1993). Os efeitos da ciromazina na reprodução e consequentemente eclodibilidade e desenvolvimento larval em *Lucilia cuprina* foram observados colocando ciromazina na água de moscas adultas em concentrações de até 100 ppm, observando que não houve interferência na oviposição ou eclodibilidade, entretanto o desenvolvimento das larvas subseqüentes foi altamente inibido de forma dose dependente (KOTZE, 1992).

Estudo *in vitro* realizado para avaliação da efetividade de ciromazina no controle de *M. domestica* revelou que o composto possui boa efetividade nas larvas do inseto. A efetividade é maior quando as larvas encontram-se nos estágios iniciais do que nos estágios finais do desenvolvimento (EL-OSCHAR et al., 1985).

Bloomcamp et al. (1987) alertaram para o potencial de ciromazina como uma valiosa ferramenta a ser utilizada no manejo de pragas no esterco das poedeiras, mas que deveria ser utilizada com prudência e moderação a fim de evitar o problema da resistência desenvolvida com muitos inseticidas anteriores.

Acredita-se que um dos principais motivos para o desenvolvimento de populações de *M. domestica* resistentes a ciromazina teria sido o uso indiscriminado pelos produtores de galinhas poedeiras devido ao aumento da dificuldade em controlar esse vetor com inseticidas tradicionais (EL-OSHAR et al., 1985).

Há diversos relatos ao redor do mundo compartilhando casos de resistência de populações de *M. domestica* envolvendo a ciromazina, EUA (SCOTT et al., 2000), Reino Unido, (BELL; ROBINSON; WEAVER, 2010), Brasil (PINTO; PRADO, 2001), Argentina (ACEVEDO; ZAPATER; TOLOZA, 2009). Demonstrou-se também a resistência de populações de *Lucilia cuprina*, causadoras de miíases em ovelhas. Um dos países onde esta resistência foi recentemente detectada foi a Austrália e, segundo sugere o autor, as principais causas da queda da performance da molécula seriam as aplicações em doses inadequadas e a lixiviação ocorrida por conta de excessiva chuvas (LEVOT, 2012).

Graf (1993) relatou a descoberta de uma nova molécula, classificada como derivado da pirimidina, dicyclanil, que aparentemente atuaria de forma similar a ciromazina, mas com uma atividade *in vitro* mais efetiva que esta e que ao diflubenzuron, atuando com efetividade em larvas de *Calliphoridae* em ovelhas com tempo de proteção mais amplo.

Em estudo realizado na Holanda o dicyclanil foi capaz de reduzir 100 % da população de *Lucilia caprina* em cordeiros por um período de 16 semanas, proporcionando um longo período de proteção que pode permitir a redução do número de tratamentos requeridos para proteger as ovelhas do ataque destas moscas durante toda a estação do verão (SCHMID; VAN TULDER; JUNQUERA, 1999).

Estudo de campo realizado por Bowen et al. (1999) na Austrália testou um produto pronto para o uso em spray com 5 % de dicyclanil na profilaxia de ataques de *L. caprina* em carneiros da raça Merino e obteve como resultados que, tanto tendo sido aplicado tanto em ovelhas tosquiadas quanto em lanadas, dicyclanil foi capaz de proteger os animais contra o ataque de moscas por um período de até 20 semanas

Nottingham et al. (2001) avaliaram os efeitos de uma formulação comercial disponível para fazendeiros na Nova Zelândia e Austrália contendo dicyclanil para proteção de ovelhas contra miíase, e puderam observar uma proteção de até 12 semanas para as ovelhas lanadas e até 19 semanas em ovelhas deslanadas, concluindo que esta formulação é uma ferramenta útil para o controle da miíase em ovelhas. Segundo Schmid et al. (1999) mudanças nas condições do tempo, particularmente chuvas, parecem não influenciar na eficácia de dicyclanil 5 % pour on na profilaxia de miíase em cordeiros na Holanda. Em estudo recente na Austrália, dicyclanil, continua mostrando-se eficiente na proteção de ovelhas ao ataque *L. caprina* (LEVOT, 2012).

Dicyclanil foi também utilizado em teste de eficácia na Argentina para a prevenção de miíases por *Cochliomyia hominivorax* em feridas de pós castração em bovinos, apresentando uma porcentagem de proteção de mais de 93 %, que só não foi completa por causa da presença de miíase ativa em apenas um animal no décimo sexto dia após castração. Como observação adicional do estudo, dicyclanil parece não possuir atividade repelente contra o *C. hominivorax*, pois em ambos os grupos do estudo houve deposição de posturas nas feridas durante período observacional (ANZIANI; GUGLIELMONE; SCHMID, 1998).



#### **2.4.4. Agonistas não esteroidais da ectisona ou compostos aceleradores da muda dos insetos**

O hormônio esteroidal 20-hidroxiectisona, conhecido como hormônio da muda, é um indutor fisiológico da muda e da metamorfose dos insetos. (WING; SLAWECKI; CARLSON, 1988). Agonistas não esteroidais da ectisona ou compostos aceleradores da muda dos insetos são compostos de uma nova classe de IGR (BAKLI et al., 2016; DHADIALLA, 2012; DHADIALLA; LLC, 2005; NAKAGAWA, 2005) que atuam no controle de pragas na agricultura. Também chamados diacylhydrazines (DAHs) ou bisacylhydrazines, possuem quatro moléculas que se destacam como inseticidas: tebufenozide, methoxyfenozide, chromafenozide e halofenozide. Apesar desses compostos serem muito tóxicos para os insetos, são muito seguros para mamíferos e o meio ambiente, ratificando sua ação seletiva, onde as primeiras três moléculas são efetivas contra Lepidoptera, mas pouco ativas ou inativas para Diptera, ligando-se a receptores das Lepidoptera com alta afinidade, enquanto que com baixa afinidade em receptores de Diptera ou Coleoptera. Halofenozide é mais potente que tebufenozide ou methoxyfenozide contra *Leptinotarsa decemlineata*, uma espécie de coleóptero, registrado como inseticida para controlar escaravelho (NAKAGAWA, 2005).

Os agonistas da ectisona induzem a muda prematura nas larvas em qualquer tempo do seu desenvolvimento. Agindo também no desenvolvimento dos ovários, reduzindo ou parando a oviposição (GRAF, 1993).

Wing (1988) estudou os efeitos da molécula RH 5849 [1,2-dibenzoyl-1-tert-butylhidrazine] como um agonista não esteroidal análogo da ectisona em célula de *Drosophila melanogaster* e pode concluir que realmente trata-se de um análogo do hormônio juvenil, pelo comportamento similar ao hormônio natural, uma vez que causou a iniciação prematura da muda larval e atuou de forma larvicida contra a mariposa do tabaco, *Manduca sexta*. O composto também mostrou uma correlação positiva entre a indução da muda prematura e afinidade dos receptores para vários análogos da ectisona, embora tenha sido demonstrado mais tarde que alguns compostos têm toxicidade seletiva entre as ordens de insetos. Em estudo realizado para avaliar os efeitos dos miméticos do hormônio ectisona de RH-5849 e RH-5992 na larva de *D. melanogaster* chegou-se à conclusão de que os dois compostos estudados estariam aptos a serem utilizados como hormônios análogos a ectisona. (FARKAŠ; SLÁMA, 1999).

Wing et al. (1988) também descrevem que a molécula RH5849 também atua em larvas de Lepidoptera impedindo que a ecdise ocorra com sucesso, além da observação de hemorragia da hemolinfa e de fluido da muda e o pharate larvar eventualmente morto sem completar a muda. Dhadialla et al. (1998) também salientaram para o fato da molécula RH5849 ser tóxica para a Ordem Lepdoptera, assim como a molécula RH5992, e ao contrário, parece não ser tóxica para outras ordens.

#### **2.4.5. Análogos do hormônio juvenil**

A existência do hormônio juvenil e sua fonte, o corpora allata, foram reconhecidos no início de 1930 (STAAL, 1975), mas a potencialidade dos hormônios juvenis como inseticidas só foram reconhecidas aproximadamente em 1956. Williams (1967) abordou esta descoberta em estudos realizados naquele ano com a primeira preparação ativa de hormônios: um óleo de ouro extraído com éter de um macho de mariposa da Cecropia. Esse hormônio puro era extraordinariamente ativo e surpreendentemente potente, uma vez que apenas um grama desse hormônio poderia resultar na morte de milhões de insetos. A fórmula empírica do hormônio juvenil foi então descoberta (C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>) e, a partir daí, os hormônios sintéticos puderam ser produzidos por vários Laboratórios (WILLIAMS, 1967).

Logo após, Williams (1967) descobriu acidentalmente que quase todo papel originário da América possuía efeito semelhante ao do hormônio juvenil, tendo sido necessárias outras investigações para descobrir a atividade do hormônio juvenil na árvore Balsam fir, principal escolha de polpa para os papéis no Canadá e no norte dos Estados Unidos naquela época. Descobriu-se então que a árvore Balsam fir sintetizava o que eles chamaram de “fator de papel” e essa substância acompanhava a polpa por todo o processo de síntese das folhas, sendo depois isolada e caracterizada, observando-se a evidente semelhança com outros análogos do hormônio juvenil dos insetos.

Dessa forma, os derivados sintéticos desenvolvidos pela indústria química para atuar como agentes de controle dos insetos, foram então chamados de análogos ou miméticos do hormônio juvenil (GRAF, 1993), pois mimetizavam os hormônios juvenis produzidos de forma natural e, conseqüentemente, inibiam a metamorfose para o estágio adulto. Então, assim que a larva se torna completamente desenvolvida, enzimas do sistema circulatório dos insetos destroem os hormônios juvenis endógenos e o desenvolvimento final ocorre para o estágio adulto.

Os análogos do hormônio juvenil ligam-se aos sítios de receptores para hormônios juvenis e, por causa da diferença estrutural, eles não são destruídos pelas esterases dos insetos e, como consequência, a metamorfose e o completo desenvolvimento para o estágio adulto não ocorrem (TAYLOR, 2001). A persistência do hormônio juvenil ou de seus análogos durante o ciclo de vida da larva pode resultar em ínstares larvais extranumerários (onde as larvas mostram aumento progressivo do peso e tamanho) e, dependendo da dose e do tempo de exposição, transformam-se em larva permanente ou o intermediário entre os estágios de larva para ninfa, larva para pupa ou larva para adulto que são inabilitadas para se desenvolver até adultos normais (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998).

Há cinco formas estruturais homólogas de hormônio juvenil, todas com um ou mais centros assimétricos (apesar de somente as configurações absolutas de JH-I e JH-III terem sido rigorosamente estabelecidas). Atividades morfogenéticas de amostras racêmica e sintéticas de hormônios juvenis mostram que JH-I é quem tem a mais alta atividade biológica com a maioria das espécies de insetos, enquanto JH-III é a molécula mais penetrante e tem sido encontrada em todas as ordens de insetos. JH-0 e 4-metil JH-I foram isolados do desenvolvimento embrionário da mosca do tabaco *M. sexta*, enquanto Lepidoptera produz JH-I, JH-II e JH-III. (SULLIVAN; GOH, 2008)

Compostos contendo farnesol, ácido farsênico, farnesil pirofosfato, aqualeno, farnesil dietilamina, farnesil metil éter, com destaque para esta última molécula, foram os primeiros com atividade mimética ao hormônio juvenil a serem pesquisados logo no início da segunda metade do século XX (BOWERS, 1968; STAAL, 1975; WIGGLESWORTH, 1963). Porém, segundo Staal (1975), apesar de muitos dos efeitos genuínos dos hormônios juvenis poderem ser realmente induzidos com esse tipo de composto, não houve utilidade prática para o desenvolvimento comercial deles, por causa da baixa especificidade de muitos insetos e a instabilidade química das moléculas.

As moléculas comerciais com maior destaque como análogos do hormônio juvenil utilizadas no controle de insetos de importância médico veterinária são, principalmente, o metoprene, o fenoxicarb e o piriproxifen (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998; GRAF, 1993; TAYLOR, 2001).

A primeira molécula de sucesso desenvolvida como inseticida bio-racional foi o metoprene, nos anos de 1970, e o seu sucesso comercial foi o marco zero para o uso de destes inseticidas no controle seletivo de insetos de forma segura para o meio ambiente, sendo atóxico para mamíferos e também muito ativo contra uma grande população de insetos nocivos, rapidamente metabolizado e com subproduto final inócuo (HENRICK, 2007; J. MENN; A. HENRICK, 1981).

Desde que o potencial de metoprene como regulador de crescimento de insetos foi descoberto, muitos estudos foram desenvolvidos para avaliar o seu desempenho no controle do desenvolvimento de *H. irritans* no esterco bovino (BEADLES et al., 1975; IVEY; MILLER; WAYNE IVIE, 1982; MILLER et al., 1977).

A utilização de metoprene como aditivo na alimentação para o controle de mosca-dos-chifres foi reportado por Harris et al. (1973) que observaram a completa inibição do desenvolvimento de *H. irritans* nas fezes de bovinos tratados com uma dose mínima de 0,7 mg/animal/dia.

Beadles et al. (1975) desenvolveram uma metodologia para avaliar os efeitos de metoprene oferecido na água de bebida de bovinos para o controle de *H. irritans*. Uma solução emulsionável de metoprene a 2 % foi oferecida aos bovinos por sistema de pressão, que rapidamente completava a água fresca com metoprene logo que o animal começasse a beber, ajudando a minimizar os efeitos fotossensíveis da molécula. Houve 68 % de inibição do desenvolvimento de mosca-dos-chifres nas amostras de fezes, durante seis semanas, sugerindo que a água de beber seria uma abordagem possível no controle da mosca-dos-chifres, com um alerta para a ocorrência de chuvas, com conseqüente formação de poças, onde os bovinos puderam se hidratar alternativamente à água tratada com metoprene, o que poderia ter comprometido a eficácia.

Miller et al. (1976) determinaram a praticidade do uso de tabletes para administrar metoprene na água de bebida de bovinos no controle de *H. irritans*, de forma alternativa, mais barata e mais prática do que o proposto por Beadles et al. (1975). Os tabletes foram colocados em quantidade suficiente de acordo com a capacidade dos cochos de água, com o controle do nível de metoprene oferecido na água por cromatografia gasosa e a emergência de adultos provenientes do esterco de animais tratados utilizada como um indicativo de efetividade do tratamento. Como resultados, a formulação em tabletes mostrou-se prática e efetiva como forma de administrar metoprene na água de bebida do gado. Apenas 0,01 ppm de metoprene na água pareceu inibir o desenvolvimento de mosca-dos-chifres no esterco. Quanto à taxa de erosão dos tabletes, este foi um ponto crítico do estudo, e por isso, houve a necessidade de provocar a turbulência necessária para melhorar a erosão e, conseqüentemente a efetividade de metoprene.

Harris et al. (1974) utilizaram blocos de minerais contendo metoprene (0,01 %, 0,12 % ou 0,94 %) no controle de *H. irritans* e observaram uma taxa de efetividade na inibição do desenvolvimento de *H. irritans* acima de 99 % para blocos com 0,01 % de metoprene e 100 % de efetividade para os blocos contendo 0,12 %, sugerindo que metoprene pode ser efetivo como aditivo alimentar no controle da mosca-dos-chifres.

No ano seguinte, Miller e Picckens (1975) avaliaram formulações de metoprene no controle de *H. irritans* e puderam concluir que metoprene administrado em blocos de sal resultou em um bom controle. Já Moon et al. (1993) avaliaram o consumo e a eficácia de metoprene 0,02 % fornecido em blocos minerais para o controle de *H. irritans* em gado de corte e mostrou que houve uma ingestão de metoprene que excedeu a média prevista e que, mesmo assim, o produto não foi capaz de reduzir de forma satisfatória a produção de moscas viáveis, a principal característica necessária para justificar o uso dos blocos.

Scott et al. (1995) avaliaram a eficácia de metoprene 0,02 % administrado junto ao sal mineral no controle de *H. irritans* em bovinos à pasto e puderam observar que a mistura foi capaz de controlar a população de moscas por um período de quatro meses, com a eficácias médias mensais variando de 99,8 % a 85,9 %, ao final do estudo.

Gingrich e Hopkins (1977) determinaram que metoprene misturado ao esterco bovino na concentração final de 0,2 ppm causa danos ao desenvolvimento dos estágios imaturos de *H. irritans* apenas no terceiro e quarto dias de desenvolvimento larval, considerando as condições de temperatura de  $26,7 \pm 2$  °C e tempo médio de desenvolvimento estimado em 71,04 h, ou seja, larvas de terceiro estágio. Outros resultados do mesmo estudo indicam que as larvas deste

estágio absorvem metoprene em quantidade suficiente para causar inibição da emergência do adulto, parecendo ainda que metoprene não possui efeitos acumulativos.

Estudo *in vitro* realizado para avaliar a correlação entre a toxicidade de metoprene e a densidade larval de *H. irritans* em quatro diferentes doses (0,0025, 0,005, 0,01 e 0,02 ppm) mostrou que, apesar da dose de 0,02 ppm ter sido capaz de reduzir *H. irritans* em entre 96,7 a 100 %, houve uma significativa relação inversa entre a densidade larval no meio e a toxicidade de metoprene (BAY; BOYD, 1987).

Miller et al. (1977) avaliaram a eficácia de bolos de 40 g de metoprene 1 % utilizado no tratamento do gado contra *H. irritans* e mostraram que bolus de liberação prolongada podem ser um meio efetivo de controle da emergência de *H. irritans* no esterco.

Miller et al. (1979) utilizaram bolus de liberação prolongada contendo metoprene a 3 % em diferentes composições no controle de *H. irritans* no esterco bovino e revelaram um controle de inibição do desenvolvimento da mosca por um período entre 28 e 32 semanas. Em paralelo, utilizaram bolus de liberação prolongada contendo metoprene a 10 % para o controle de *Musca autumnalis* e obtiveram inibição da emergência de adultos por 10 a 12 semanas, demonstrando que além de eficaz, o bolus de liberação prolongada foi um método prático e efetivo de administração de metoprene para bovinos no controle destes dípteros.

Fincher (1991) avaliou a influência do tratamento com bolus de liberação prolongada de metoprene 3 % utilizado no controle de estágios imaturos de mosca-dos-chifres no esterco em algumas espécies não alvo (*Odontophalus gazela*, *Sishipus rubrus*, *Philonthus flavolimbatus* e *P. longicornis*). Os achados do estudo levaram os autores a concluir que a liberação contínua de metoprene parece não prejudicar as espécies de insetos benéficos.

Nenhum sinal clínico de toxicidade foi observado em quaisquer dos animais tratados com metoprene via oral (HARRIS; FRAZER; YOUNGER, 1973; MILLER et al., 1977; SCOTT; GRISI; COMENDOUROS, 1995).

Ivey et al. (1982) determinaram os resíduos de metoprene na gordura de bovinos resultantes da administração em bolus, a partir de biópsia de aproximadamente 50 g de gordura do omento analisadas por cromatografia de gasosa, com detecção mínima de 0,02 ppm da molécula. Metade dos animais recebeu apenas um bolus e a outra metade recebeu dois, ambos contendo 1 % de metoprene, assim como descrito e utilizado por Miller et al. (1979), somente com a redução da percentagem de 3 % para 1 % de metoprene. Pode-se perceber, a partir dos resultados da primeira avaliação, 30 dias pós tratamento, que o valor médio do nível de resíduos nas amostras foi o mesmo independentemente se os animais tinham recebido um ou dois bolos (0,05 ppm). Em análises posteriores, 60 e 90 dias, metoprene foi detectado no limite do método analítico (0,02 ppm) ou não foi detectado, levando a sugerir que metoprene administrado em bolus a 1 % para o controle de *H. irritans* pode ser utilizado com segurança em bovinos graças aos baixos níveis de resíduos observados na gordura.

Schmidt e Kunz (1980) determinaram as doses letais de metoprene para as formas imaturas de *H. irritans*. A dose letal 50 (DL50) foi 1 ppb e dose letal 90 (DL90) foi 6 ppb, com slope de 1,89.

Thomas (1984) determinou os efeitos do metoprene (1 ppm ou 10 ppm) adicionado à dieta sanguínea de moscas normais e rádio esterilizados com relação à fecundidade, viabilidade de ovos e sobrevivência de adultos de *H. irritans* e pode concluir que não houve diferença significativa na sobrevivência de moscas adultas entre os grupos tratados e controle, assim como à produção de ovos, onde os grupos tratados colocaram quantidade maior de ovos que o grupo controle, além da oviposição ter começado mais cedo nos grupos tratados. Apesar das fêmeas dos grupos tratados terem colocados mais ovos, a viabilidade destes com relação à eclodibilidade fora reduzida em de 30 a 35 %, quando comparadas ao grupo controle, onde apenas 20 a 25 % dos ovos falharam em eclodir. Ainda, os autores utilizaram moscas irradiadas no tratamento com metoprene na tentativa de recuperar a fecundidade que fora comprometida

com radiação. Porém, ao contrário do que se esperava, o análogo do hormônio falhou em recuperar a fertilidade das fêmeas irradiadas, indicando que o dano retrocerebral pode não ter sido o único ou o responsável primário pela esterilidade dessas moscas.

Em geral, metoprene é muito ativo contra espécies de dípteros, principalmente *H. irritans*, *M. domestica*, *S. calcitrans* e *M. autumnalis*, e tem sido desenvolvido para o controle de muitas espécies dessas moscas que se desenvolvem no esterco dos bovinos. Além dessa efetividade, metoprene ainda é utilizado de forma bastante satisfatória no controle de *C. felis*, inibindo a eclosão dos ovos, prevenindo o desenvolvimento e a emergência de adultos (HENRICK, 2007).

Moléculas desenvolvidas mais recentemente mostram bastante diferenças estruturais, mas ainda exibem uma atividade análoga ao do hormônio juvenil, como o Fenoxicarb que, quimicamente é um carbonato e estruturalmente não está relacionado os hormônios juvenis, porém exibe atividade análoga ao do hormônio (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998; GRAF, 1993; GRENIER; GRENIER, 1993).

Diversas formulações contendo fenoxicarb têm sido desenvolvidas para diferentes grupos de parasitos (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998). Grenier e Grenier (1993) após leitura e sistematização de informações sobre fenoxicarb em aproximadamente 200 artigos científicos concluíram que, aproximadamente 22 % dos estudos concentram-se na Ordem Lepidoptera, mas também há outras ordens de insetos e até mesmo ácaros, em menor volume (Lepidoptera, Himenoptera não parasito, Coleoptera, Diptera não parasito, Dictioptera, Homóptera, outras ordens, parasitoides e predadores, acari e outros). Ainda, menos de 5 % dos estudos são concentrados nos danos causados em insetos benéficos, com a justificativa de que os estudos são principalmente conduzidos por companhias químicas que produzem, promovem ou dão suporte financeiros aos produtos.

Aproximadamente 100 vezes mais potente que o metoprene, fenoxicarb tem seus efeitos obtidos com uma dose bastante baixa, alta eficiência e excelente persistência de ação, afetando de forma dose dependente o desenvolvimento de muitos insetos, com efeitos clássicos induzidos na maioria dos insetos estudados, como as perturbações morfogenéticas dos embriões e o desenvolvimento pós embrionário; mudanças na diferenciação de classes em formigas e cupins; controle na reprodução de adultos; redução descendentes após o tratamento de machos de baratas; distúrbios na síntese de gema em formigas do fogo; perturbações sexuais ou na produção de feromônio; interrupção da diapausa; perturbação no RNAm e incorporação da timidina em alguns insetos; e ainda efeitos não específicos, de acordo com o sexo ou efeitos citotóxicos, como toxicidade direta do embrião e larva de pulga especialmente no trato digestivo e efeito colateral e/ou bioacumulação no peixe, que pode desenvolver perturbações do comportamento após ingestão de larvas de mosquitos tratadas com fenoxicarb, acarretando em sua proibição em alguns países como a Itália. Parasitoides e predadores também podem ser afetados, assim como muitos outros insetos benéficos, como as abelhas (GRENIER; GRENIER, 1993).

Hinkle et al. (1995) determinaram a atividade residual de fenoxicarb no controle de pulgas dos gatos quando aplicado no carpete e mostraram que a sobrevivência das larvas de *C. felis* no grupo tratado foi significativamente menor que no grupo controle, com diferenças significativas até o sétimo mês após o tratamento, indicando que fenoxicarb possui uma atividade residual extensa quando aplicado no carpete. Os autores determinaram também a atividade residual de metoprene e mostraram que a sobrevivência das larvas de *C. felis* no grupo tratado foi significativamente menor que no grupo controle, com diferenças significativas variando de 0 % no primeiro mês até 70 % entre o quinto e o sétimo mês, porém sem diferença significativa entre os grupos de tratamento no terceiro mês.

Rajapakse et al. (2002) em estudo realizado em 1992 para avaliar a eficácia e atividade residual metoprene e fenoxicarb contra pulgas no ambiente. Os achados revelaram que

fenoxicarb permaneceu ativo até o dia + 63 eliminando próximo de 100 % das pulgas, enquanto que metoprene teve sua efetividade declinada significativamente a partir do dia + 49. Quando comparado com metoprene, fenoxicarb foi altamente efetivo em concentrações mais baixas durante todo o período de testes, sem apresentar diferenças significativas até o dia 42 do estudo, mostrando pouca mudança na atividade no período inteiro de teste com doses variando de 8,07 a 64,56 mg/m<sup>2</sup>. Já o metoprene, variou suas concentrações de 8,07 a 32,28 mg/m<sup>2</sup>, tendo sido significativamente menos efetivo em reduzir a emergência de adulto, comparativamente.

Marchiondo et al. (1990) determinaram o modo de ação de fenoxicarb na embriogênese de ovos de pulgas e obtiveram os seguintes achados: 97,3 a 100 % de ovos provenientes de pulgas expostas ao fenoxicarb por mais de 24 horas pararam de eclodir, apresentando uma extensiva inibição do desenvolvimento embrionário, interrupção do tecido previamente organizado, com interrupção e lise de células, núcleos picnóticos com heterocromatina coalescente e amontoada, plasma e membrana nuclear lisados e mitocôndria inchada e rompida, além de terem se tornado descoloridos e enrugados. Exposição de ovos de pulgas de diferentes idades por diferentes períodos de tempo confirmaram a atividade ovicida de fenoxicarb, ao longo da eclosão larval independentemente da idade do ovo e do tempo de exposição. As larvas expostas ao fenoxicarb morreram antes de fazer a muda para o estágio de pupa. Fenoxicarb atua, ainda, no intestino de larvas recém eclodidas, exibindo dois diferentes modos de ação contra larvas de pulgas: interrupção do intestino delgado e inibição da muda larval.

#### 2.4.6. Piriproxifen

O nome IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) de piriproxifen é 4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether (SULLIVAN; GOH, 2008). Classificado como regulador do crescimento de insetos, de amplo espectro, com atividade inseticida contra insetos de saúde pública, como *M. domestica*, mosquitos e baratas, e categorizado por WHO (2006) como improvável de apresentar perigos em uso normal. Como análogo do hormônio juvenil, interfere com a metamorfose (crescimento, desenvolvimento e maturação) dos insetos por prevenir que alcancem a maturidade e reprodução (WHO, 2008). É um fenil éter de piridina não classificado e derivado de outro análogo do hormônio juvenil, o fenoxicarb em que a parte da cadeia alifática foi substituída por piridil oxietileno (SULLIVAN; GOH, 2008).

Piriproxifen é o único inseticida juntamente com o larvicida bacteriano *Bacillus thuringiensis israelenses* recomendado pela WHO para a adição em água com propósitos de saúde pública. (SULLIVAN; GOH, 2008). A dosagem recomendada é de 0,01 mg/l (ppm).

Juntos, FAO/WHO concluíram que piriproxifen não representa risco carcinogênico, não é genotóxico em humanos e os animais jovens não parecem ser mais sensíveis que os adultos (WHO, 2008).

Quanto às suas características físico-químicas de piriproxifen, quando liberado no ar, não é rapidamente disperso na atmosfera devido ao seu baixo vapor de pressão e constante de Henry's law. Praticamente insolúvel em água, tem uma propensão a adsorver na superfície do solo, particularmente àquelas com argila ou matéria orgânica. Se liberado em água, piriproxifen adsorve em sólidos suspensos e matéria orgânica, mantendo uma atividade biológica por pelo menos três meses. É altamente susceptível a fotodegradação na água, com meia vida de fotólise menor que 20 dias em água de rio. No solo, a degradação ocorre muito lentamente, com meias vidas entre 10 a 20 semanas. (SULLIVAN; GOH, 2008).

Crustáceos e larvas de insetos aquáticos são sensíveis ao piriproxifen, apesar dos efeitos adversos serem reversíveis, produzindo concentração letal média (LC<sub>50</sub>) de 0,098 ppm contra o camarão *Lianema tenuicornis*, valor aproximadamente 12 vezes maior que a concentração de campo. Por sorte, não há nenhum efeito marcado em moscas, libélulas, ostracodes, cladoceros, copépodes ou besouros. Organismos planctônicos também não mostraram nenhum efeito

adverso acerca do tratamento com 0,01 ppm de piriproxifen em aquário. E, mesmo piriproxifen tendo produzido deformidades severas na muda de muitos insetos predatórios, é praticamente inofensivos para abelhas, que foram encontradas em colônias, desenvolvendo-se normalmente após se alimentarem em solução açucarada de piriproxifen (SULLIVAN, 2000).

A baixa solubilidade, o alto coeficiente de partição e a hidrofobicidade de piriproxifen são adjetivos consistentes com químicos conhecidos por serem persistentes no meio ambiente. Entretanto, sua susceptibilidade para fotodegradação aquática, degradação metabólica em solos aeróbicos e água, juntamente com sua aparente curta meia-vida de depuração na fauna aquática, leva a rápida dissipação em matrizes bióticas e ambientais. Em anaerobiose, como em águas salobras ou sedimentos, piriproxifen é muito mais estável, imutável e tóxico para invertebrados aquáticos. Dado esse potencial para persistir, prudência deve ser levada em consideração quando aplicar piriproxifen perto de corpos d'água e precauções devem ser tomadas para evitar ou mitigar o acúmulo e o escoamento para as águas de superfície (SULLIVAN; GOH, 2008).

A toxicidade oral aguda de piriproxifen é baixa, com valores de DL50 acima de 5000mg/kg de peso corporal em ratos, camundongo e cães. A toxicidade dermal aguda é também baixa, com DL50 acima de 2000 mg/kg peso corporal em ratos e camundongos. Após exposição por inalação, valores de DL50 acima de 1,3 mg/l de ar foram encontrados em camundongos e ratos. Piriproxifen foi moderadamente irritante para os olhos, porém não para peles de coelhos (WHO, 2008).

Em estudos dos efeitos de piriproxifen em camundongos, ratos e cães à curto e à longo prazo, o fígado foi o principal órgão alvo, com aumento de seu tamanho e mudanças em concentrações lipídicas plasmáticas, como o colesterol, quando empregado na dose de 120mg/kg de peso vivo por dia em ratos. Efeitos adicionais incluem aumento da mortalidade, alterações histopatológicas nos rins e redução no ganho de peso corporal, com NOAEL (nível de efeito adverso não observado) de 150 mg/kg em camundongo, 23 mg/kg em ratos e 100 mg/kg em cães, alimentados diariamente com piriproxifen durante 3 meses. Piriproxifen também causou aumento da ocorrência de amiloidose sistêmica, de forma dose dependente, associada ao aumento da mortalidade e perturbações no sistema imune, com NOAEL de 120 mg/kg, equivalente a 16 mg/kg de peso corporal, por dia. Em ratos, o único efeito adicional foi o reduzido ganho de peso corporal, com NOAEL de 600 mg/kg, equivalente a 27 mg/kg de peso corporal por dia (WHO, 2008).

Em dois estudos de 1 ano em cães, piriproxifen foi administrado em capsulas com a NOAEL média de 10 mg/kg de peso vivo por dia, aumentando o tamanho do fígado e concentração de colesterol no plasma, com evidências de que piriproxifen possa atuar como um indutor de enzimas hepáticas, pelo menos em cães. Não houve sinais de toxicidade quando administrado topicamente em ratos por 21 dias em doses acima de 1000 mg/kg de peso vivo por dia. A inalação de piriproxifen por 4 horas por dia durante 28 dias causou efeitos menores em ratos (salivação, esporadicamente reduzido ganho de peso corporal, intimamente ligado com o aumento da atividade lactato desidrogenase no soro) na dose de 10.000 mg/m<sup>3</sup>. O NOAEL foi de 480mg/cm<sup>3</sup> (WHO, 2008).

Avaliou-se o metabolismo de piriproxifen em ratos através da excreção de C14 e seus resíduos nos tecidos após administração oral em dose única de 2 mg/kg (baixa dose) ou 1000 mg/kg (alta dose) de [C14-piriproxyfen]. Recuperou-se de 96 a 98 % do C14 dosado em fezes e urina durante 7 dias, com excreção fecal de 89 a 92 % e urinária de até 8 % e a maior parte (93 a 96 %) foi excretada em até dois dias após a administração. Avaliou-se também fezes, urina e bile nos dois primeiros dias, com excreção de 43, 3 e 34 %, respectivamente de C14 dosado em machos e, 52, 2 e 37 %, respectivamente em fêmeas, levando a concluir que a rota principal de excreção de piriproxifen em ratos foram as fezes, sem diferenças entre sexo ou dose. O pico de concentração de C14 no sangue, rins e fígado ocorreu de 4 a 8 horas após administração e na gordura, de 12 a 24 horas após administração e [C14] no sangue foi

significativamente maior em machos que em fêmeas, 24 horas após a administração. Os metabolitos principais encontrados foram 4-OH-pyr; 5'',4' -OH pyr e 4' -OH-POPA, este último somente nas fezes e sulfatos em alta dose (MATSUNAGA et al., 1995).

Os resíduos no sangue e tecidos foram avaliados no 70º dia e os níveis de C14 na gordura foram os mais altos encontrados, 0,010 a 0,013 µg de piriproxifen equivalentes/g de tecido (ppm) para baixa dose e 8,0- 9,5 µg para a alta dose; já os níveis nos outros tecidos foram no máximo 0,001 ppm (baixa dose) e 2,6 ppm (alta dose) com uma soma de C14 residual corporal de 0,3 %. Com isso, mostrou-se que Piriproxifen oralmente administrado em ratos é excretado rápida e completamente do organismo de machos e fêmeas, sem persistência em nenhum tecido (MATSUNAGA et al., 1995).

Em estudo análogo com administração oral em ratos, [14C] piriproxifen foi lentamente (pico de concentração plasmática de 8 h) e incompletamente absorvido ( $\leq 50$  % da dose), e então rapidamente eliminado, predominantemente nas fezes (90 %), com somente 4 a 11 % na urina, após 48 horas, sendo excretado principalmente via bile (34–37 % da dose administrada em 48h). A concentração de piriproxifen em outros tecidos, assim como a gordura, foi muito baixa (geralmente  $<0.01$  µg equivalente por grama após 72 horas; gordura,  $<0.1$  µg equivalente por grama). A meia-vida de radiomarcadores nos tecidos, incluindo sangue e gordura, foram de 8 até 36 horas. Absorção dermal não foi estudada (WHO, 2008).

Em outro estudo, realizado por (YOSHINO; NAKATSUKA; YAMADA, 1995), desta vez comparando o metabolismo de piriproxifen em ratos e camundongos, utilizou-se as mesmas doses (2mg/kg ou 1000mg/kg) e via de administração (oral) de Matsunaga et al. (1995). Desta vez, os animais foram avaliados somente até sete dias após o tratamento e o ar expirado também foi avaliado. Em ratos, o total de C14 recuperado foi de 92 a 99 %, com 84 a 94 % através excreção fecal, 5 a 12 % por excreção urinária e 0,5 % ou menos pelo ar expirado. Em camundongos, o total de C14 recuperado foi de 100 % (fezes 90,3 % e urina 9,7 %) em machos e 104,8 % (fezes 78,1 % e urina 26,7 %) em fêmeas na da menor dose administrada e 101,6 % (fezes 64,4 % e urina 37,2 %) em machos e 100 % (fezes 64,7 e urina 35,3 %) em fêmeas, para a maior dose.

De acordo com este estudo, os resíduos de C14 na gordura dos ratos foram de 0,014 a 0,015 microgramas equivalente/g (ppm) para a menor dose, e 6 a 6,3 ppm para maior dose e em outros tecidos, 0,009 ppm ou menos para o grupo de menor dose e 4,5 ppm ou menos para o outro grupo. O metabólico mais largamente encontrado nas excretas foi o 4'-OH-pyr e os outros principais metabólitos fecais foram: 5'',4-OH-pyr E 2'-OH-pyr e, DHP-pyr e um sulfato de 4'-OH-pyr (4'-oh-pyr-sul) em altas doses, além de 32,5 % a 34,8 % de [C14] piriproxifen, em machos e, 21,2 a 21,9 %, em fêmeas. O principal metabólito urinário foi PYPAC. Em camundongos, o metabólito encontrado em maior quantidade nas fezes foi 4'-OH-pyr. Os outros principais metabólitos fecais foram DPH-pyr e POPA além de 12,2 a 19,8 % de [C14] piriproxifen em baixas doses e 22,5 % a 25,4 % em altas doses. Os principais metabólitos encontrados na urina de camundongos foram 4'-OH-pyr; sulfato de POPA (POPA-sul) e glucorinide de 4'-OH-pyr (4'-OH-pyr-glu) (YOSHINO; NAKATSUKA; YAMADA, 1995).

Como pode-se perceber, C14 foi rápida e completamente excretado nas fezes, urina e pelo ar expirado com rota principal de excreção fecal, assim como no estudo de Matsunaga et al. (1995), e assim como em camundongos. A excreção urinária tendeu a ser maior, especialmente para machos de camundongos quando comparados com ratos. Os resíduos de C14 nos tecidos foram mais altos no grupo de maior dose que para o grupo de menor dose, sem diferenças marcantes do perfil qualitativo de metabólitos entre o sexo, a dose ou espécie, mas com alguma diferença encontrada do ponto de vista quantitativo.

Com relação aos metabólitos encontrados, com exceção da 4'-hidroxilação em ratos que foi significativamente maior em fêmeas do que em machos e a 5''-hidroxilação que foi significativamente maior em machos, não houve diferenças significativas relatadas ao sexo em



outras reações. Uma extensa glucuronidação foi muito maior em camundongos do que em ratos, principalmente detectada pela urina do camundongo e nas fezes do rato, o que leva a pensar que esta diferença deve estar relacionada com alta e excreção urinária de C14 em camundongos (YOSHINO; NAKATSUKA; YAMADA, 1995).

A toxicidade reprodutiva de piriproxifen em ratos tem sido investigada em estudos com duas gerações, um estudo envolvendo machos e fêmeas antes e nos estágios iniciais de gestação e outro estudo de tratamento durante o período pré-natal e lactacional. O NOAEL (nível de efeito adverso não observado) para toxicidade materna foi de 1000 mg/kg, equivalente a 98 mg/kg de peso corporal por dia, nas duas gerações estudadas e 100 mg/kg de peso vivo por dia pós gestação. A toxicidade reprodutiva foi observada, com um número aumentado de natimortos na geração F0 e redução no número de implantações e número médio de fetos na geração F1. O NOAEL para toxicidade reprodutiva foi de 300 mg/kg de peso corporal por dia. Piriproxifen causou pequena toxicidade desenvolvimental e não teratogênica (WHO, 2008).

No estudo pós-gestacional e lactacional, a progênie foi submetida à séries de testes para observação de possíveis efeitos neurotóxicos, incluindo índices físicos, testes de comportamento, funções motoras e sensoriais e habilidade de aprendizagem. Apesar de ter havido alguns efeitos no crescimento nas doses de 300 mg/kg de peso vivo por dia, não houve desenvolvimento de neurotoxicidade experimental na dose de 500 mg/kg por dia, a maior dose testada. Anormalidades viscerais (dilatação da pelve renal) foram encontradas nas doses maiores que 300 mg/kg de peso corporal. O NOAEL para o desenvolvimento de toxicidade foi de 100 mg/kg de peso corporal por dia, que retardou o desenvolvimento físico e causou anormalidades viscerais em altas doses. Em estudo convencional de toxicidade em ratos, não houve retardo no crescimento nem desenvolvimento de neurotoxicidade em doses maiores ou iguais a 1000 mg/kg peso vivo por dia, a mais alta dose utilizada. Houve aumento da frequência de variações no esqueleto (abertura de forame da sétima vertebra cervical) em fetos com 300 mg/kg de peso vivo por dia. A frequência de anormalidades viscerais foi significativamente aumentada descendência da geração F1 algumas semanas após o nascimento. O NOAEL para aumento da frequência de variações no esqueleto e variações viscerais foi de 1000 mg/kg de peso vivo por dia.

Em estudo para desenvolvimento de toxicidade em coelhos, sinais de toxicidade materna (aborto e parto prematuro) foram evidentes em doses acima de 300 mg/kg de peso corporal, a mais alta dose testada, com NOAEL de 100 mg/kg de peso corporal por dia. Não foi alcançada toxicidade desenvolvimental, com NOAEL sendo 1000 mg/kg de peso vivo por dia, a dose mais alta alcançada (WHO, 2008).

Bull e Meola (1993) conduziram avaliações laboratoriais da eficácia de piriproxifen contra *H. irritans* usando diferentes métodos de tratamento para caracterizar a absorção e o metabolismo *in vivo*. Nos testes de toxicidade tópica de piriproxifen, fêmeas com três dias de vida foram tratadas (0,5 µl/inseto) com solução acetônica contendo piriproxifen (2,5; 5; 10 e 20 µg/inseto) administrado topicamente no dorso torácico de cada inseto. Após 24 horas, houve apenas uma pequena mortalidade. Nos testes para determinação do tempo máximo de susceptibilidade para aplicações tópicas de piriproxifen, moscas fêmeas foram tratadas topicamente com 5 µl/inseto de piriproxifen nos dias 1, 2, 3 ou 4 após emergência e, no quarto dia após a emergência, os ovos provenientes dessas moscas foram colocados em dieta larval sem tratamento até o desenvolvimento do estágio pupal, onde observou-se, pela média de redução da emergência de adultos, que a susceptibilidade máxima ocorreu no segundo dia após a emergência.

Os autores ainda determinaram a resposta da fêmea adulta de *H. irritans* a concentrações graduais de piriproxifen aplicados topicamente, no período de máxima susceptibilidade do IGR, ou seja, moscas fêmeas adultas com dois dias pós emergência, tratadas topicamente de 0,25 a 5 µl/inseto de piriproxifen, indicando uma concentração letal 50 (CL50) de 0,96 µg/inseto, com

slope de 1,44. Piriproxifen foi avaliado também no desenvolvimento dos estágios imaturos da mosca-dos-chifres utilizando concentrações que variaram de 0,00625 até 0,05ppm misturado a dieta larval, até o desenvolvimento do estágio pupal, exibindo excelente atividade de IGR, indicando a concentração letal 50 (CL50) como sendo 9,3 ppb, com slope de 3,5.

Os autores observaram ainda os efeitos da exposição de adultos em superfícies com resíduos de piriproxifen, com o auxílio de grandes globos de vidro impregnados com solução de piriproxifen no interior das paredes e insetos adultos expostos continuamente a esses resíduos por 4 dias (1 a 25 mg/globo) ou por diferentes períodos de tempo durante os primeiros 4 dias (25 mg/globo) além dos efeitos nos ovos que foram coletados dessas moscas e colocados em dieta larval não tratada para avaliação da emergência de adultos. A CL50 para porcentagem de redução da emergência de adultos expostos continuamente foi de 12,83  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de superfície tratada (9,0 mg/globo) com slope de 1,66. Para os insetos expostos em dias diferentes, houve marcadas diferenças, com a média de porcentagem de inibição da emergência no primeiro dia de 12,3 % aumentando diariamente até 81,5 %, no quarto dia.

Adicionalmente, realizou-se também um teste sem replicação para saber o quanto de IGR foi absorvido por moscas dos chifres mantidas em globos tratados, fazendo uso de piriproxifen marcado com C14 e posterior processamento de moscas para quantificação de material radioativo nos extratos internos, que foi excretado em sua maior parte na forma de metabolito radioativo do piriproxifen.

Em mais uma avaliação, ovos de moscas dos chifres não tratadas foram expostos a soluções aquosas de piriproxifen imediatamente após a postura, permanecendo parcialmente submersos em almofadas úmidas com solução de piriproxifen de 0,1 a 0,5 ppm durante aproximadamente 18 horas, posteriormente rinsados com água e colocados em dieta normal não tratada, onde observou-se um efeito mínimo de piriproxifen na eclosão dos ovos assim como na emergência desses adultos advindos de ovos tratado.

No estudo do destino de [C14] -piriproxifen, fêmeas foram tratadas topicamente (0,015 ou 0,09  $\mu\text{L}/\text{mosca}$ ) e mantidas vivas e alimentadas por 24 horas após o tratamento, para a quantificação de possíveis resíduos radioativos internos ou externos e observou-se que a penetração cuticular foi extremamente rápida, especialmente em insetos tratados com a concentração mais baixa (90 % em 1h). Em moscas tratadas, não se recuperou mais do que 5 % na superfície externa da mosca após 8h além de piriproxifen ter sido absorvido, metabolizado e excretado mais rapidamente por moscas tratadas com 0,015 $\mu\text{g}$ .

Após os resultados, os autores puderam concluir que, piriproxifen, sob condições laboratoriais, é rapidamente absorvido e possui excelente atividade IGR contra *H. irritans* quando fêmeas adultas são tratadas por exposição de resíduos na superfície ou por aplicações tópicas.

Utilizou-se larvas de primeiro segundo e terceiro ínstars de *M. domestica* para avaliar o efeito residual de piriproxifen (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg/L) em laboratório e pode-se observar que piriproxifen inibiu de 98,5 a 100 % da emergência de adultos com o tratamento de larvas de primeiro instar e, de 97 a 100 % a emergência de adultos em larvas de segundo e terceiro ínstars, mostrando que piriproxifen é efetivo na inibição da emergência de adultos de *M. doméstica* (SULAIMAN; MUSTAFFA; JEFFERY, 2008).

Em estudo para avaliar o potencial de piriproxifen utilizado topicamente no controle de *M. domestica* em bezerreiros, pode-se observar que o efeito mais pronunciado de piriproxifen foi alcançado depois da aplicação tópica na pupa branca, onde a mortalidade alcançou 87,2 % de média e, relativamente alta mortalidade (68,8 a 74,8 %) foi observada após a sua aplicação na pupa escura. Já o tratamento dos ovos e larvas resultou numa mortalidade variando de 27,6 a 32,8 % e a redução mais pronunciada de moscas foi observada entre a quarta e a sexta semana onde o número de moscas foi reduzido de 45 a 61 % (KOCISOVA et al., 2004).

Conduziu-se um estudo para avaliar a atividade de piriproxifen na reprodução de *M. domestica* e a possibilidade da transmissão de esterilidade com a aplicação tópica de piriproxifen na parte dorsal do tórax (machos e fêmeas) e aplicação por contato em machos em superfícies tratadas com piriproxifen.

No tratamento tópico de fêmeas, a eclodibilidade foi de apenas 5,8 % dos ovos produzidos por fêmeas tratadas com 20 µg de piriproxifen, mostrando uma inibição da reprodução de mais de 98 % com 10 ou 20 µg e a dosagem requerida para causar 90 % da inibição da reprodução foi de 5 para 6 µg/fêmea. Em machos, os efeitos foram menores que nas fêmeas tratadas e, nesse caso, a dosagem requerida para causar a 90 % da inibição variou em torno de 20 µg/macho ou mais.

No tratamento por contato, avaliou-se a quantidade de ovos produzidos por fêmeas não tratadas na presença de machos tratados e observou-se que a quantidade de ovos produzidos foi similar aos valores do grupo controle na primeira semana, mas diminuíram para menos de 50 % durante as duas semanas seguintes. E, com relação às fêmeas tratadas e machos não tratados, estas produziram menos ovos do que as fêmeas não tratadas com machos tratados, mostrando que piriproxifen não causa somente o decréscimo do número de ovos, mas também uma redução da eclodibilidade de ovos ovipostos por fêmeas tratadas.

Em outra observação, a similaridade do desenvolvimento dos ovos nos ovários de fêmeas tratadas comparativamente às fêmeas não tratadas, sugerem que piriproxifen não cause redução da produção ovariana. Mais ainda, a diferença entre machos tratados e fêmeas seria por causa da espermatogênese que geralmente tem o seu início mais cedo na larva do que a oogênese e, por isso, os efeitos fisiológicos dos análogos do hormônio Juvenil em machos são considerados menos efetivos e a esterilização de fêmeas por machos tratados com análogos do hormônio pode ser meramente o resultado da transmissão mecânica do hormônio juvenil através da interação sexual (KAWADA; SENBO; ABE, 1992).

Em estudo realizado com *M. doméstica* para observar os efeitos de piriproxifen na progênie F1 de fêmeas expostas à superfícies tratadas e iscas, o impacto de diferentes formulações como superfície de tratamento e uso de fêmeas adultas para auto disseminar piriproxifen nos sítios de desenvolvimento larval, mostrou-se que na progênie F1 de fêmeas que tiveram contato voluntário com papel tratado por 7 dias houve efeito significativo na produção pupal na dose de 3,75 % de piriproxifen (38 % de controle de produtividade), mas houve pouco efeito na emergência de adultos. Fêmeas alimentadas com açúcar tratado com piriproxifen por três dias produziram aproximadamente 35 % de pupas e, na concentração de 0,1 % de piriproxifen, a formação de Pupas foi somente 14 % quando comparado ao grupo controle, porém, novamente o sucesso da emergência de adultos que se desenvolveram foi aproximadamente 90 % em todos os tratamentos com iscas de Açúcar (GEDEN; DEVINE, 2012).

Quando se analisou piriproxifen aplicado em solução aquosa no meio larval contendo ovos de *M. domestica*, não houve efeito no número de pupas produzidas em nenhuma dose. Mas, dessa forma, houve Inibição da emergência de adultos de quase 100 % em todas as doses. Quanto a autodisseminação de piriproxifen por fêmeas grávidas, a fecundidade não foi afetada pelo tratamento com a formulação de piriproxifen em pó, uma vez que os ovos das moscas tratadas foram tão viáveis quanto os controles e não houve significativa diferença na sobrevivência das pupas ou adultos da progênie de moscas tratadas que foram criadas em meio não tratado e, quando utilizou-se piriproxifen a 5 %, as moscas disseminaram piriproxifen no meio já contendo ovos de moscas não tratadas tendo como resultado quase nenhuma mosca emergida. Este resultado mostra que a mosca é capaz de carregar uma grande quantidade de piriproxifen na forma de pó e transferir uma suficiente quantidade para as moscas em desenvolvimento até onde os ovos são depositados (GEDEN; DEVINE, 2012).

WHO (2006, 2008) avaliou piriproxifen para o uso como larvicida de mosquitos na água de beber armazenada e, apesar de ser um pesticida relativamente novo, pode-se observar que há um potencial para direta exposição através da água de beber quando diretamente aplicado em um recipiente de armazenamento de água potável (WHO, 2008). A dose recomendada de piriproxifen em água potável não deve exceder 0,01mg/l, que poderia ser equivalente a menos que 1 % de consumo diário aceitável para um adulto de 60kg que ingere 2 litros de água por dia. Para uma criança de 10kg, bebendo 1 litro de água por dia, a exposição poderia ser de 0,01mg, de no máximo 1mg de consumo diário aceitável. Dessa forma, piriproxifen é utilizado no controle de *A. aegypti* em diversos países, inclusive no Brasil.

Em estudo designado para avaliar a eficácia residual de piriproxifen contra o vetor da dengue, sob condições laboratoriais e de campo na Malásia, utilizou-se duas dosagens (0,01 e 0,02 mg de ingrediente ativo/litro) em larvas de terceiro instar de *A. aegypti* mostrando uma mortalidade na larva que pode ocorrer imediatamente após a aplicação mas que, com o tempo, frequência maior da mortalidade é observada durante a emergência de adultos, completamente inibida por 4 meses, parecendo que piriproxifen tem alta especificidade contra a larva do mosquito (VYTHILINGAM et al., 2005).

Seccacini et al. (2008) em estudo na Argentina, compararam os efeitos de piriproxifen com o temefós, atualmente amplamente utilizado no controle de *A. aegypti*, concluindo que o uso de 0,1 % ou 0,2% de piriproxifen em grânulos de areia foi capaz de promover um controle altamente efetivo nos estágios imaturos nos sítios de criação, com completa inibição da emergência de adultos por 150 dias e 80 % de inibição por mais de 180 dias, dando uma boa alternativa ao temefós para aplicação em grãos de areia em lugares onde o mosquito resistente já foram reportados.

Bioensaios no Peru mostraram que piriproxifen, quando aplicado nos últimos instares larvais de *A. aegypti*, inibe a emergência de adultos em concentrações extremamente baixas (LC50 0.012 ppb) não tendo havido emergência de adultos nas amostras de águas tratadas com o equivalente a 50 a 83 ppb de piriproxifen, que foram analisadas cinco meses depois do tratamento e continuavam sendo letais para larvas e pupas (SIHUINCHA et al., 2005).

Estudo a respeito de formulação contendo piriproxifen 5 %, liberação controlada, que foi testada em caixas d'água domésticas, visando a inibição da emergência de adultos das populações de campo de *A. aegypti*, mensurada a cada duas semanas, durante 34 semanas, foi conduzido no Camboja. Os índices de inibição da emergência excederam 90 % por até 20 semanas e permaneceram acima de 80 % até o fim do estudo, com 34 semanas, sem que houvesse alteração no paladar nem efeitos indesejáveis relatados pelas famílias que consumiram a água tratada (SENG et al., 2008).

Em última análise, piriproxifen, atualmente utilizado no controle de larvas de *A. aegypti* em inúmeros municípios do Brasil, foi recentemente incriminado como possível agente causal da recente epidemia de microcefalia ocorrida no país, levantando-se a hipótese de que o tratamento da água dos reservatórios domésticos seria o responsável pela doença (ALBUQUERQUE et al., 2016). A microcefalia congênita é associada com fatores genéticos e muitos agentes causais e, uma vez que a incidência de microcefalia no Brasil em 2015 foi 20 vezes maior que nos anos anteriores, Calvet et al. (2016) realizaram um estudo de detecção e sequenciamento do Zika vírus proveniente de fluidos amnióticos de dois fetos diagnosticados com microcefalia e os achados, como a detecção do genoma viral no fluido amniótico, sequenciamento do genoma completo do vírus isolado do paciente além da sugestão de que o Zika vírus possa cruzar a barreira placentária, podendo ser considerado um potente agente infeccioso para fetos humanos, fortalecem a suposta associação entre Zika vírus e casos de microcefalia em neonatos no Brasil. Mais ainda, Albuquerque et al. (2016) realizaram um estudo com abordagem ecológica para explorar a possível associação entre a prevalência da microcefalia com a utilização de piriproxifen no estado de Pernambuco, primeiro Estado do

Brasil a detectar um aumento do número de casos de microcefalia, comparado aos anos anteriores. Foram avaliados dois grupos de municípios, onde um grupo de 11 municípios estava exposto ao piriproxifen e outro, com 3 municípios, expostos ao *Bacillus thuringiensis israelensis* (controle biológico). Pode-se notar que a média de prevalência de microcefalia nos municípios controlados com *Bacillus thuringiensis israelensis* foi de 82 a cada 10.000 nascidos vivos e a prevalência de microcefalia nos municípios onde utilizou-se piriproxifen foi de 69 para cada 10,000 nascidos vivos, valores que não diferem estatisticamente entre si, mostrando que a prevalência de microcefalia não foi tão alta em áreas com o piriproxifen. Na abordagem ecológica, não há nenhuma evidencia de correlação entre o uso do larvicida nos municípios e a microcefalia, porém, o argumento de que melhorias no manejo ambiental para prevenir e controlar doenças pode ser uma escolha melhor do que generalizar o uso de larvicida na água de consumo.

Piriproxifen também é utilizado no controle de pulgas *C. felis* em cães e gatos. Meola et al. (1996) expuseram continuamente adultos e ovos de *C. felis* ao piriproxifen e mostraram alterações histopatológicas, como degeneração do corpo gordo, túbulos de malpighi, glândulas acessórias do Macho, epitélio do intestino, glândulas salivares e oócitos com destruição correspondente do núcleo celular causada por piriproxifen. Além disso, muitas dessas células foram ausentes em pulgas tratadas com piriproxifen até o sétimo dia após tratamento ou então foram sofrendo autólise, efeito não encontrado nas pulgas do grupo controle, concluindo que a morte celular e degeneração de tecidos internos parece ser a causa da morte eventual de pulgas expostas ao piriproxifen.

Meola et al. (2000) avaliaram os efeitos de piriproxifen oferecido em dieta sanguínea para *C. felis* adultos quanto à sobrevivência, viabilidade dos ovos e desenvolvimento larval, com resultados mostrando que piriproxifen foi ineficaz para o controle de pulgas adultas quando administrado juntamente com a alimentação. Apenas aproximadamente 28 % de pulgas alimentadas com dose contendo 100 ppm de piriproxifen morreram num período acima de 10 dias, comparado com 8 % de mortalidade do grupo controle. Apesar desse resultado, muitos ovos coletados de adultos alimentados com piriproxifen na dieta eram escurecidos e colapsadas. E, quando avaliou-se o desenvolvimento larval através da alimentação de larvas com sangue excretado (fezes) proveniente de adultos alimentados com piriproxifen, pode-se perceber que as fezes mataram as larvas das pulgas, uma vez que nenhuma destas larvas completou a metamorfose com um tempo necessário para provocar a morte dependente da concentração na dieta do adulto, sendo eficaz em todos os estágios larvais, indicando que altas concentrações nas fezes das pulgas são tóxicas para as larvas ou ainda prevenindo a metamorfose de larva-pupa ou pupa-adulto.

Rajapakse et al. (2002) em estudo realizado em 1992 para avaliar a eficácia e atividade residual de metoprene, fenoxicarb e piriproxifen contra Pulgas no solo, revelaram que fenoxicarb e piriproxifen permaneceram ativos até o dia + 63, eliminando próximo de 100 % das pulgas testadas, enquanto que metoprene teve sua efetividade declinada significativamente a partir do dia + 49. Quando comparados com metoprene, fenoxicarb e piriproxifen foram altamente efetivos em concentrações mais baixas durante todo o período de testes, sem diferenças significativas até o dia + 42 do estudo, mostrando pouca mudança na atividade no período inteiro de teste com doses variando de 8,07 a 64,56 mg/m<sup>2</sup>. Já o metoprene, variou suas concentrações de 8,07 a 32,28 mg/m<sup>2</sup>, tendo sido significantemente menos efetivo em reduzir a emergência de adulto comparativamente.

Atualmente, estudos de desenvolvimento de produtos ectoparasiticidas estão voltados para as combinações de diferentes produtos, visando melhorar a terapêutica da velocidade de letalidade do parasito (speed of kill), frequentemente considerada uma performance marcante do parasiticida. Varloud e Fourie (2015) avaliaram o início da eficácia utilizando uma combinação tópica de dinotefuran-permetrina-piriproxifen (Vectra 3D) e a performance

residual 2 e 6 horas pós tratamento e após, em reinfestações por mais de um mês, contra *C. felis* em cachorros na forma de “spot on” e mostraram que, duas horas após a administração de dinotefuran-permetrina-piriproxifen, já havia uma eficácia de 23 % que, em seis horas, subiu para 96,5 %. Com relação às reinfestações, de 7 a 28 dias, o composto matou 96,8 % das pulgas 2h depois de cada reinfestação e que, dos 7 aos 21 dias pós tratamento, dinotefuran-permetrina-piriproxifen foi capaz de matar 98,6 % das pulgas, sem que nenhum efeito adverso fosse observado nos animais tratados.

Rust e Hemsarth (2016) avaliaram o sinergismo da combinação dos IGR's metoprene e piriproxifen contra larvas de pulgas *C. felis* e puderam mostrar que as concentrações de metoprene podem ser reduzidas em até três vezes, quando piriproxifen for utilizado sinergicamente.

Pouco estudos tem sido conduzidos para avaliar a atuação de piriproxifen contra *H. irritans*, apesar da literatura dispor de informações relevantes em relação à ação deste IGR no controle de *A. aegypti*, *M. domestica*, *C. felis*. A segurança para a utilização desse IGR tem sido demonstrada também através do seu emprego sistemático no controle de *A. aegypti*, através do tratamento da água das caixas d'água das residências, sem notificações de eventos adversos. No mundo e no Brasil são inúmeros os reportes de populações resistentes de *H. irritans* contra os grupamentos dos piretróides e organofosforados, o que remete à necessidade de buscar por alternativas atualmente eficazes para o controle deste parasito. Os IGR's tem se mostrado uma ferramenta eficaz para o controle da *H. irritans*, conforme estudos conduzidos com metoprene e diflubenzuron. Deste modo, estudos para avaliar o potencial de outros IGR's para o controle desta praga são necessários.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a determinação do potencial do piriproxifen empregado por via oral em bovinos no controle das formas evolutivas presentes no bolo fecal, realizou-se, inicialmente, um ensaio *in vitro* para a determinação das concentrações letais. Nesta etapa, diferentes concentrações de piriproxifen foram adicionadas às fezes coletadas de bovinos mantidos sem tratamento (animais doadores) e, posteriormente, ovos de *H. irritans* foram incubados. Avaliou-se o desenvolvimento de ovo a adulto, estabelecendo-se o gradiente de concentrações letais. Posteriormente, realizou-se, de modo inédito, um estudo *in vivo* para a confirmação das concentrações letais 50 e 99 de piriproxifen nas fezes, quando empregadas por via oral em bovinos. Neste estudo foram utilizados bovinos, divididos em três grupos (controle, CL50 e CL99). Os grupos medicados foram tratados diariamente com piriproxifen por via oral nas dosagens correspondentes à CL50 ou CL 99. Ovos de *H. irritans* foram expostos às fezes destes animais, possibilitando assim a comparação entre os achados *in vitro* e *in vivo*.

Concomitantemente, uma alíquota de aproximadamente 250 g de fezes de cada bovino foi coletada nos mesmos dias de incubação, acondicionada e posteriormente enviada ao laboratório Labfor para detecção e quantificação de piriproxifen.

Para auxiliar no entendimento do comportamento de piriproxifen no sangue de bovinos, realizou-se um estudo onde utilizou-se bovinos jovens e adultos divididos em dois grupos (CL50 e CL99), os quais foram medicados em dose única e submetidos às coletas de sangue seriadas para obtenção da curva plasmática.

#### **3.1. Teste *in vitro* para Determinação das Concentrações Letais – Concentração Letal 50 (CL50) e Concentração Letal 99 (CL99)**

##### **3.1.1. Animais doadores de *H. irritans* e fezes**

Dez bovinos adultos, entre machos e fêmeas, mestiços de raças leiteiras, GirXHolandês, pelagem predominantemente escura, entre quatro e dez anos de idade, provenientes do Plantel de bovinos do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, vinculado ao Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LQEPV/UFRRJ) foram utilizados exclusivamente como doadores de adultos de *H. irritans* para obtenção de ovos e de fezes para a confecção dos substratos que foi utilizado nos testes *in vitro*. Esses animais foram mantidos sem qualquer tipo de tratamento contra ectoparasitos durante todo o período de coleta de material.

O estudo completo foi aprovado pela CEUA FAPUR sob o número 70/13.

##### **3.1.2. Acomodação e alimentação dos animais**

Os doadores de moscas e fezes foram acomodados em um mesmo piquete localizado na Área de Campo Experimental – LQEPV/UFRRJ durante o período de coleta de moscas e alimentaram-se de pasto nativo e água potável proveniente da rede de abastecimento urbana de Seropédica *ad libitum*.

##### **3.1.3. Coleta de *H. irritans* a campo para obtenção de ovos**

Com auxílio de puçá entomológico, confeccionado com tecido organza, ideal para o tamanho da mosca, foram coletados exemplares de *H. irritans* diretamente da superfície

corporal dos bovinos doadores (Figura 1A). Imediatamente após a coleta, os adultos foram acondicionados em gaiola plástica de tamanho 26 x 25 x 24 cm, com tampa telada pelo mesmo tecido e abertura frontal para eventuais manipulações (Figura 1B). O fundo da gaiola foi forrado com papel tipo absorvente umedecido com água, para auxiliar na manutenção da umidade e servir de leito para que as massas de ovos fossem depositadas. A técnica utilizada para o armazenamento de adultos e posterior recuperação de ovos foi semelhante a de (LIMA; PERRI; PRADO, 2010), com duas adaptações: uma quanto ao tamanho da gaiola, que necessitou ser reduzido para que coubesse no interior da estufa climatizada; e a outra, quanto ao tipo de papel utilizado para forrar o fundo da gaiola, em que o papel filtro umedecido foi substituído por papel do tipo absorvente, igualmente umedecido.

Após a coleta de quantidade suficiente de adultos no campo, a gaiola foi imediatamente conduzida ao LQEPV e acondicionada em Estufa Incubadora tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D) com Temperatura de  $35,0 \pm 2$  °C, Umidade Relativa (UR) de  $80 \pm 5$  % e fotoperíodo positivo, por aproximadamente seis horas, para posterior coleta de ovos.

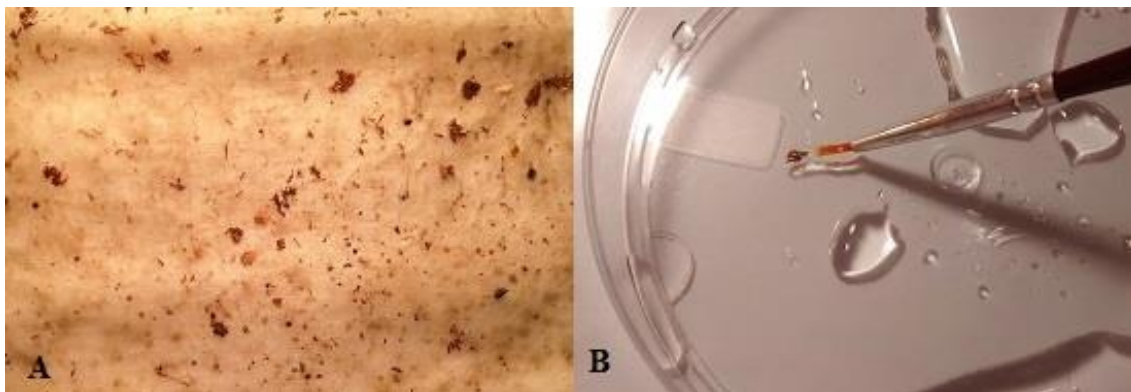


**Figura 1-** (A) Puçá entomológico de Organza com exemplares de *H. irritans* recém-capturados; (B) Gaiolas de acondicionamento de *H. irritans* para oviposição.

#### 3.1.4. Coleta de ovos de *H. irritans*

Aproximadamente seis horas após o acondicionamento das gaiolas em Estufa incubadora, estas foram retiradas, transferidas para temperatura ambiente por cinco minutos e então acondicionadas em freezer com temperatura  $-20 \pm 5$  °C, por um período médio de 10 minutos, para que houvesse a redução da movimentação dos adultos e, dessa forma, facilitasse a retirada do papel absorvente úmido do fundo das gaiolas juntamente com as massas de ovos (Figura 2A). Nesse momento, os adultos foram descartados e os ovos, coletados com o auxílio de pincel n° 0 umedecido com água para auxiliar na retirada de massas de ovos depositadas sobre o papel (Figura 2B) e posterior colocação direta dos ovos no papel filtro depositado sobre o substrato de cada repetição.





**Figura 2** – (A) Papel filtro após ter sido retirado da gaiola, contendo ovos depositados por *H. irritans*; (B) Pincel número zero e massa de ovos de *H. irritans*.

### 3.1.5. Coleta de fezes para confecção dos substratos

Os bovinos destinados a doação de fezes foram contidos em tronco Coimma<sup>®</sup> para coleta das fezes direto da ampola retal. Uma vez coletado, os animais foram soltos e o material encaminhado para o LQEPV. Com este material foi preparado um pool de fezes, denominado substrato.

### 3.1.6. Montagem das repetições das unidades experimentais

Cada unidade experimental consistia em aproximadamente 20g de substrato, pesado em Balança de precisão da marca Marte<sup>®</sup> com três casas decimais no grama (g), acondicionado em copo descartável com capacidade para 100 mL. O teste *in vitro* para a determinação das concentrações letais foi realizado em triplicata para cada concentração empregada e grupo controle. O teste *in vivo* para a avaliação da eficácia do tratamento com piroproxifen administrado por via oral em bovinos no controle das formas imaturas de *H. irritans* foi realizado em duplicata.

Sobre o substrato, depositava-se um quadrado de papel filtro úmido medindo 2,0cm de lado e então pincelava-se 30 ovos, provenientes das massas obtidas no papel absorvente, em cada unidade experimental (Figura 3A). As amostras eram individualmente fechadas com tecido sintético TNT preto, envoltas por elástico amarelo de borracha natural para vedar a boca do copo (Figura 3B). e acondicionadas dentro de Estufa Incubadora, com temperatura de  $27 \pm 2$  °C e umidade relativa entre  $75 \pm 5$  %, monitoradas por Datalog, observado diariamente. A metodologia utilizada para a recuperação de ovos e montagem das unidades experimentais foi adaptada de (MOCHI, 2009).



**Figura 3** – (A) Unidade experimental com ovos de *H. irritans* depositados no papel filtro sobre o substrato; (B) Unidades experimentais fechadas com TNT e elástico.

### 3.1.7. Preparo das soluções experimentais

Antes da incubação dos ovos nas unidades experimentais, foi preparada uma solução estoque de piriproxifen (101,48 %) de 1mg/mL utilizando acetona como diluente para a determinação das concentrações letais. A partir desta solução, foram preparadas 21 diluições com volume de 2mL em água com as seguintes concentrações: 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600 e 1700 ng/mL (ppb) além do placebo, que foi preparado apenas com a solução acetônica no volume utilizado para a diluição da maior concentração de piriproxifen e o controle, apenas com água. Estas diluições foram preparadas em triplicata e adicionadas aos substratos com auxílio de palito de sorvete com bordas distais quadradas, de forma circular e homogênea, homogeneizando quinze vezes no sentido horário e quinze, no anti-horário para garantir que a solução ficasse bem distribuída em todo o substrato.

### 3.1.8. Definição e fórmulas das taxas utilizadas:

Taxa de sobrevivência de larvas (TxSobrevivência<sub>(Larvas)</sub>): define o percentual de larvas que sobreviveram e se tornaram pupas, a partir das larvas eclodidas.

Taxa de sobrevivência de pupas (TxSobrevivência<sub>(Pupas)</sub>): define o percentual de pupas que foram capazes de finalizar o ciclo e emergir como adultos.

Taxa de sobrevivência total (TxSobrevivência<sub>(total)</sub>): define o percentual de adultos emergidos no final do ciclo a partir de larvas eclodidas.

$TxSobrevivência_{(Larvas)} = 100 - (100 \times \text{número total de larvas mortas}) / \text{número total de larvas eclodidas}$

$TxSobrevivência_{(Pupas)} = 100 - (100 \times \text{número total de pupas mortas}) / \text{número total de pupas formadas}$

$TxSobrevivência_{(total)} = 100 - (100 \times \text{número total de indivíduos mortos}) / \text{número total de larvas eclodidas}$

Eficácia = % de emergência de adultos do Grupo Controle - % de emergência de adultos do Grupo Medicado/% de emergência de adultos do Grupo Controle X 100

### 3.1.9. Avaliação da eclodibilidade das larvas

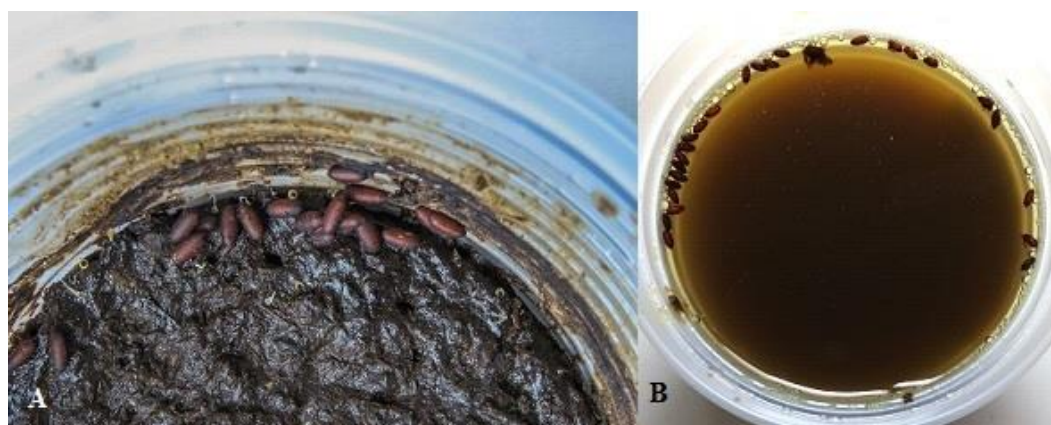
Após 48 horas da incubação das amostras, o papel filtro com os ovos foi retirado do substrato para a realização da avaliação da eclodibilidade das larvas.

O procedimento foi realizado com o auxílio lupa estereoscópica e luminária, além de estilete parasitológico confeccionado com agulha de calibre 25 X 0,7 mm presa ao palito tipo de churrasco. A eclodibilidade consistiu em pressionar cada ovo que fora depositado sobre o papel filtro anteriormente com a ponta do estilete parasitológico e, uma vez eclodidos, observou-se apenas a casca facilmente amassável e, muitas vezes, a abertura opercular. Da mesma forma, quando os ovos pressionados não estavam eclodidos, poderia ou não haver som de estalo característico de ruptura da casca ou somente o extravasamento de conteúdo embrionário, caracterizado macroscopicamente como uma larva morfológicamente bem formada morta ou apenas conteúdo de aspecto viscoso leitoso esbranquiçado ou amarelado. A técnica utilizada para a avaliação da eclodibilidade das larvas foi semelhante à descrita por (MOCHI, 2009).

### 3.1.10. Separação de pupas

Ovos de *H. irritans* mantidos sob a temperatura de  $27 \pm 2$  °C e umidade de 50 a 55 %, podem ter suas pupas recolhidas após o oitavo dia da incubação. (BEADLES et al., 1975; SCHMIDT; HARRIS; HOFFMAN, 1967). Dessa forma, as pupas permaneceram nas placas de petri do oitavo ao décimo quinto dia, para observação da emergência de adultos e, caso isso não acontecesse no tempo esperado, as pupas eram dadas como mortas.

No oitavo dia após a incubação, as unidades experimentais foram retiradas da estufa e manipuladas para a separação das pupas (Figura 4A). Após abertas, foram preenchidas com aproximadamente 50 mL de água potável proveniente da rede de abastecimento urbana de Seropédica, para auxiliar a solubilização do substrato e, conseqüentemente, à retirada das pupas sem que fossem danificadas por ação mecânica. O substrato foi misturado até que se tornasse diluído e a maioria das pupas boiassem, facilitando a coleta (Figura 4B).



**Figura 4** – (A) Pupas formadas sobre o substrato; (B) Pupas flutuando sobre substrato diluído em água no momento da catação, no oitavo dia.

Com auxílio de pinça entomológica flexível, as pupas foram retiradas do substrato solubilizado, este foi coado com auxílio de peneira comum e as pupas, que por algum motivo não flutuaram, puderam ser encontradas nesse momento, no interior do material fibroso restante do substrato, com auxílio de colher descartável.

Todas as pupas encontradas foram delicadamente acomodadas sobre almofada de algodão prensado, umedecida com 2 mL de água destilada, dentro de placas plásticas de petri 10 x 10 x 2 cm previamente preparadas e, posteriormente fechadas com fita crepe com 4 cm de largura afim de ocluir totalmente qualquer brecha da placa (Figura 5A). As amostras retornaram para a estufa após o término da separação das pupas e o substrato foi descartado.

### 3.1.11. Observação da emergência de adultos

De acordo com o modelo de predição para a emergência das últimas moscas a partir da temperatura ambiental obtido pela equação de regressão DNUM (dia de nascimento das últimas moscas) =  $67,4 - 2 \times \text{Temperatura (em } ^\circ\text{C)}$  (COLLARES, 1990), em criação mantida a uma temperatura de  $27^\circ\text{C}$  todas as moscas deverão ter emergido em menos de 13,4 dias. Dessa forma, no décimo quinto dia, as placas de petri contendo as pupas foram retiradas da estufa (Figura 5C) abertas e os adultos que emergiram das pupas foram observados para confirmação da espécie e contados, finalizando o estudo.

### 3.1.12. Cálculo das concentrações letais

As doses letais foram calculadas a partir dos resultados do estudo *in vitro* pelo Programa IBM SPSS Statistics através de Análise de Probit.



**Figura 5** – (A) Pupas acomodadas em almofada de algodão, após catação; (B) Exemplar de pupa e adulto de *H. irritans* (Aumento de 12x); (C) Placas de petri (R1 e R2) abertas no décimo quinto dia de estudo para observação da emergência de adultos.

### **3.2. Avaliação da Eficácia de piriproxifen administrado por via Oral no Controle *H. irritans* – Teste *in vivo***

#### **3.2.1. Animais**

Foram utilizados 21 bovinos adultos, 6 machos castrados e 15 fêmeas não prenhes, raça Red Angus, com idades entre 25 a 120 meses, com pesos variando entre 229 a 501kg, pertencentes ao Plantel de bovinos LQEPV.

#### **3.2.2. Acomodação e alimentação dos animais**

Os animais foram acomodados em piquete localizado na área de Campo Experimental – LQEPV não havendo separação física entre os grupos experimentais e alimentados com silagem de sorgo, pasto nativo e água potável proveniente da rede de abastecimento urbana de Seropédica *ad libitum*.

#### **3.2.3. Cálculo das doses a serem administradas por via oral em forma de cápsula aos bovinos**

Após a determinação *in vitro* das concentrações letais para as formas imaturas de *H. irritans* delineou-se um pensamento para o cálculo estimativo das doses utilizadas no tratamento dos bovinos. Considerando-se um bovino adulto, os seguintes parâmetros foram utilizados: até 150 litros de capacidade máxima dos estômagos e excreção de 30 a 50 kg de fezes pastosas por dia, divididas de 10 a 24 vezes (DIRKSEN; GRÜNDER; STÖBER, 2008). A partir destes parâmetros, pode-se considerar que bovinos possuem dois compartimentos de diluição de amostra, conceito utilizado para determinar o que ocorre com o fármaco em função do tempo, desde o momento de sua administração até não ser mais encontrado no organismo (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2013) onde uma seria o rúmen e a outra, as fezes. Sabendo-se também que a principal via de excreção de piriproxifen administrado por via oral em ratos são as fezes, que em estudo de metabolismo mostrou ser excretado de 89 a 92 % via fecal (MATSUNAGA et al., 1995) e, estimando que comportamento semelhante também ocorra no organismo de bovinos, ou seja, com excreção quase total de piriproxifen nas fezes, pode-se considerar que quase totalidade da dose administrada seria diluída em até 150 L de estômagos e 50kg de fezes. Segundo Colucci et al. (1982) o tempo de passagem total da digesta de bovinos, para forragens, varia de 43,3 a 79,7 horas, dependendo da quantidade consumida e da qualidade da forragem oferecida ao animal. Dessa forma, adotou-se o tempo de 72 horas para o esvaziamento total do trato digestivo de um bovino adulto. A mediana da quantidade de fezes produzidas por dia foi de 17 porções de fezes e, considerou-se um valor máximo de 24 porções por dia, totalizando 50 kg de fezes produzidas por dia. Assim, calculando-se a média de peso por defecação, calculou-se a média 17 e 24 porções de fezes produzidas, e encontrou-se um peso médio de 2,0 e 3,0kg de fezes por porção. Então, os cálculos estimativos da CL 50 e da CL99, em miligramas (mg/ml), estão expostos abaixo:

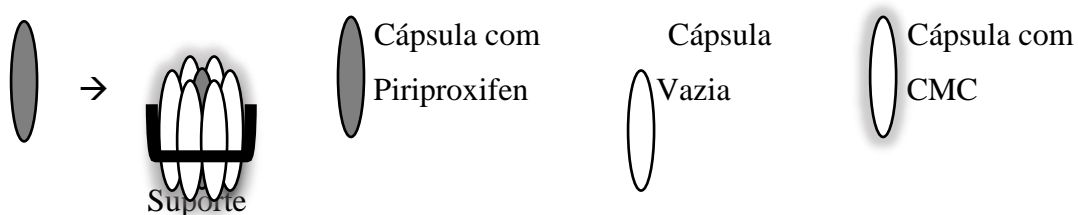
$$\text{CL50 ou CL99(teste in vivo)} = (\text{CL50 ou CL99(teste in vitro)} \text{ em ppb} \times \text{peso das fezes em mg}) \times 3$$

Multiplicou-se por 3 para representar o conteúdo total do rúmen em relação à quantidade máxima de fezes que um bovino adulto pode excretar por dia.

Para o cálculo da CL50 (teste *in vivo*) utilizou-se o valor médio aproximado entre as CL50 calculadas para 2,0 e 3,0 kg de fezes. Para o cálculo da CL99 (teste *in vivo*) utilizou-se somente peso de 3,0 kg para as fezes.

### 3.2.4. Confeção e preenchimento das cápsulas

Com o objetivo de possibilitar administração oral de piriproxifen nos bovinos de forma prática e segura foram confeccionadas cápsulas, número zero, contendo piriproxifen (Figura 6). de acordo com a dosagem estabelecida para cada grupo e preenchidas da seguinte maneira: as cápsulas do grupo G2,5 foram preenchidas com 2,5 mg de piriproxifen. Estas capsulas foram confeccionadas pela equipe de farmacometria do LQEPV/UFRRJ e possuíam teor de 115 %. As cápsulas do grupo G40 possuíam 40 mg de piriproxifen e teor de 101,48 %. Cada cápsula foi unida a seis cápsulas vazias de mesmo tamanho, com o auxílio de uma solução carboximetilcelulose (CMC) e um suporte para mantê-las no formato ideal até completa secagem. O processo de secagem foi realizado em capela de exaustão por, no mínimo, 12 horas. Após esse período, as cápsulas unidas assumiram um formato cilíndrico semelhante a um bolus, com comprimento reduzido, tendo sido então administradas para os bovinos de forma acoplada ao aplicador de bolus.



**Figura 6** – Esquema de montagem das cápsulas administradas por via oral em bovinos.

### 3.2.5. Pesagem dos animais

Os animais foram pesados em Balança Coimma<sup>®</sup> modelo KM3-N no dia anterior ao tratamento, considerado D -1.

### 3.2.6. Avaliação da Eficácia do Tratamento no controle de *H. irritans*

Afim de avaliar a atividade de piriproxifen eliminado no bolo fecal sobre as formas imaturas de *H. irritans*, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais por sorteio, realizado de três em três animais, que previamente foram pré-selecionados pelo sexo e pelo peso, começando com os três machos mais pesados, distribuindo um em cada grupo, seguidos pelos três machos restantes, garantindo assim, dois machos por grupo experimental. Em seguida, repetiu-se o mesmo procedimento para as fêmeas do estudo, completando cada grupo com sete animais, dois machos e cinco fêmeas. A proporção entre machos e fêmeas foi estabelecido em função da disponibilidade de animais no plantel. Os grupos foram denominados Grupo Controle (GC), onde os animais foram mantidos sem tratamento; Grupo G2,5 onde os bovinos receberam a dose de piriproxifen necessária para matar 50 % dos insetos submetidos às suas fezes, correspondente à CL50; e Grupo G40, no qual os bovinos receberam a dose extrapolada de piriproxifen necessária para matar 99 % dos insetos submetidos às fezes deles, correspondente ao dobro da CL99. A partir do dia zero (D 0) até o dia + 12 (D + 12), os animais foram contidos em tronco Coimma<sup>®</sup> e tratados diariamente (SID) com piriproxifen, administrado por via oral sob a forma de cápsulas (Figuras 7A e 7B) especialmente confeccionadas para bovinos, com o auxílio de aplicador de bolus, conforme

pode ser observado nas Figuras 7C e 7D.



**Figura 7** – (A) Cápsula pronta, visão superior; (B) Cápsula pronta, visão lateral; (C) Aplicador de bolus utilizado para a administração das cápsulas; (D) Momento da introdução da cápsula por via oral em bovino contido em tronco de contenção.

Houve incubação de ovos de *H. irritans* em cinco momentos do estudo: antes do tratamento (Dia zero), primeira incubação após o tratamento (Dia + 3), segunda incubação após o tratamento (Dia + 6), terceira incubação após o tratamento (Dia + 10) e quarta incubação (Dia + 13) após o tratamento. Foram coletadas fezes diretamente da ampola retal de cada animal de todos os grupos experimentais, identificadas individualmente e utilizadas para avaliação *in vitro* da atividade de piriproxifen presente nas fezes.

### 3.2.7. Quantificação de piriproxifen nas fezes dos bovinos tratados por via oral

Parte do material fecal dos animais dos grupos tratados (G2,5 e G40) coletado nos dias zero, +3, +6, +10 e +13 foi armazenado separadamente, congelado em freezer com temperatura  $-20 \pm 5$  °C e encaminhado ao laboratório Labfor® para determinação da concentração de piriproxifen que, juntamente com os resultados de eficácia do teste *in vivo*, foram utilizados para análise de farmacocinética e farmacodinâmica, comparando os valores de eficácia a partir das doses administradas (G2,5 e G40) com as concentrações de piriproxifen encontradas nas fezes dos animais tratados.

### 3.2.8. Validação do método analítico para amostras fecais

A validação da metodologia foi realizada conforme a norma Vich GL49 (VICH GL49, 2016) avaliando-se os seguintes itens: identificação; *carry-over*; seletividade; linearidade; exatidão; precisão; limite de quantificação e efeito de matriz.

A identificação foi realizada através da infusão direta de uma solução de piriproxifen no detector de massas. A solução utilizada foi de concentração 1000 µg/kg sendo selecionadas as transições 322>96 e 322>227Da para quantificação e qualificação, respectivamente.

O teste de *Carry-over* avaliou o carreamento de interferentes ou contaminantes de uma injeção para outra. Para isto, foram realizadas análises cromatográficas na seguinte ordem: branco, piriproxifen a 200 µg/kg, branco, 5 µg/kg. Este teste é considerado satisfatório quando não é observado presença de sinal superior a 20% do valor observado do limite de quantificação.

A seletividade, que é a capacidade do método em diferenciar e quantificar o analito na presença de outras substâncias que possam existir no sistema teste, foi avaliada através da análise de seis sistemas de teste sem a presença do analito, chamados “brancos”, que foram extraídos e comparados com sistema teste fortificado.

A linearidade, que é a capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais, relacionando as concentrações de um analito dentro de uma determinada faixa de concentração, foi avaliada com o preparo de três curvas de calibração matrizadas com oito pontos cada uma, injetadas em duplicata, abrangendo as concentrações entre 3, 5, 15, 25, 50, 100, 150 e 200µg/Kg. Este teste é considerado satisfatório quando as seguintes condições são atendidas: o coeficiente de correlação linear for maior do que 0,98; os resíduos forem homocedásticos (teste de Cochran); os resíduos forem homogêneos (teste de ANOVA); a dispersão dos resíduos for aleatória.

A faixa de trabalho, que é definida pelo intervalo de aplicação do método analítico que compreende desde o limite de quantificação do método, limite inferior, até o maior ponto da curva de calibração avaliada no teste de linearidade, limite superior, foi testada através da linearidade.

A Precisão é definida como a capacidade de um método em apresentar resultados próximos, obtidos através de repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz. Já a exatidão é definida como a capacidade de um método em gerar resultados em concordância com o valor de referência. Os testes para precisão e exatidão foram realizados através da análise de 5 amostras independentes, variando-se a data de análise e/ou analista executor, nas concentrações de 5 µg/Kg (Baixo) e 150µg/Kg (Alto). Os resultados foram avaliados quanto ao coeficiente de variação em cada nível de concentração e o percentual de exatidão em relação a concentração teórica, sendo considerado satisfatório quando atendidos os critérios de aceitação descritos na tabela 1. Para o calculo da exatidão foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Exatidão (\%)} = (\text{concentração experimental individual}/\text{concentração teórica}) \times 100.$$

**Tabela 1** – Critérios de exatidão e precisão utilizados.

Concentração (µg/kg)	Exatidão (%)		Precisão – CV (%)	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
<1	50	120	30	45
>=1 e <10	60	120	25	32
>=10 e <100	70	110	15	23
>=100	80	110	10	16

Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração do analito de interesse, que pode ser quantificado com precisão e exatidão durante as análises.

O efeito matriz, que é definido como incremento ou supressão no fator de resposta do detector frente a um analito presente na matriz quando comparado ao mesmo analito em solvente, foi utilizado para determinar se a matriz pode ou não ser substituída por solvente no preparo da curva de calibração, tendo sido realizado em duas etapas.



Na primeira etapa, realizou-se o cálculo do fator matriz (FM), razão entre as curvas de calibração matrizada e no solvente, tendo considerado como resultado para ausência de efeito matriz valores próximos a 1 com variação de até 15%.

Na segunda etapa, comparou-se precisão e exatidão nas quantificações teste, utilizando a curva de calibração matrizada e no solvente. Neste segundo teste, valores de exatidão e precisão dentro dos critérios de aceitação já descritos na tabela 1 indicaram que não havia efeito de matriz e a curva de calibração pode ser construída em solvente. Caso contrário a curva deveria ser realizada em matriz.

A substância de referência de piriproxifen foi adquirida pelo Labfor®, lote BCBT3748 com pureza de 98,7% do fabricante Sigma Aldrich®. Utilizou-se um cromatógrafo líquido HPLC Shimadzu LC – 30 AD (LC.07) acoplado a um Detector de massas AB Sciex/API 3200 (API.03) e coluna cromatográfica Supelco, Discovery HS C18 (3,0µm x 4,6mm x 50mm).

A cromatografia foi realizada em sistema gradiente, com uma vazão de 700µL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 5,00µL e forno a 55°C. Sob essas condições, o tempo de retenção de piriproxifen foi de 2,39 minutos. As extrações das amostras foram realizadas utilizando o sistema QuEChERS.

Foi preparado uma solução estoque de piriproxifen de 1mg/mL. Esta solução foi armazenada em freezer com temperatura monitorada de ≤ -10°C. As soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque através de diluição simples, utilizando acetonitrila até as concentrações 3; 5; 15; 25; 50; 100; 150 e 200ng/mL.

A fase móvel foi composta de ácido fórmico 0,1% (fase A) e uma mistura de água: acetonitrila:ácido fórmico de 1:1:0,001 (fase B). O gradiente foi realizado conforme tabela 2:

**Tabela 2** – Gradientes de concentração de B de acordo com o tempo.

Tempo (minutos)	Concentração de B (%)
0,3	20
0,5	100
2,6	100
2,8	20
3,5	20

O QuEChERS era composto de 300g de sulfato de magnésio e 50g de sílica C18 homogeneizados e alíquotados em amostras de 175mg. A extração foi realizada adicionando-se 2 mL de acetonitrila e 0,5 g de cloreto de sódio em cada microtubo contendo 1g de sistema previamente fortificado. Depois, agitou-se os tubos por cinco minutos em agitador mecânico, seguido de centrifugação por cinco minutos a 4500rpm. Após, transferiu-se uma alíquota de 1mL do sobrenadante para novos tubos de 2mL contendo sal de clean up. Agitou-se os tubos por aproximadamente 25 segundos e, na sequência, centrifugou-se durante cinco minutos a 14000rpm. O sobrenadante final foi filtrado e essas alíquotas provenientes do processo de extração/clean up foram analisadas no LC-MS/MS.

### 3.2.9. Metodologia para criação *in vitro* de *H. irritans*

A metodologia para a Coleta de *H. irritans* à campo para obtenção de ovos, assim como a coleta de ovos de *H. irritans*, a montagem das repetições das unidades experimentais e a avaliação *in vitro* da atividade de piriproxifen sobre as formas imaturas de *H. irritans*, seguiram a mesma metodologia descrita nos subitens 3.1.4 a 3.1.11, com apenas uma modificação referente aos animais doadores de fezes para substrato, que nessa fase do estudo foram os animais tratados, cujas fezes foram coletadas individualmente, identificadas e submetidas a avaliação da eficácia; e exclusão da realização do item 3.1.8, que se refere ao preparo das soluções experimentais, uma vez que nesse momento, não se aplica já que os animais tratados

desempenharam esse papel.

### **3.2.10. Estatística**

Todo o cálculo de eficácia foi realizado sobre percentuais e, neste caso, como os valores ficariam restritos de 0 a 100 %, além do desvio padrão apresentar valores que levariam a variações fora deste intervalo (0 a 100 %) em torno da média, para qualquer grupo experimental, em qualquer das datas, os dados foram submetidos a transformação angular usando-se  $\text{Arcsen } \sqrt{X}$ , onde X foi expresso em % / 100, ou seja,  $X \leq 1$ . Posteriormente à transformação, os dados foram comparados através de análise de variância, seguida de Teste de LSD de Fisher.

A homocedasticidade, que se refere a avaliação da existência de *outliers* entre dados de cada concentração, foi realizada através do teste de Cochran.

A homogeneidade, que avalia a semelhança entre as médias obtidas entre as curvas de calibração, foi realizada pelo ANOVA, Teste F.

A equação da reta e coeficientes de correlação linear (r), foram obtidos automaticamente pelo *software Analyst*®.

A exatidão foi calculada automaticamente pelo *software Analyst*®.

## **3.3 Construção da Curva Plasmática do Piriproxifen**

### **3.3.1. Animais**

Foram utilizados 20 bovinos jovens, 6 machos e 14 fêmeas, raça Red Angus, com idades entre 6 a 22 meses, com pesos variando entre 116 a 255 kg, pertencentes ao Plantel de bovinos Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, vinculado ao Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LQEPV/UFRRJ).

### **3.3.2. Acomodação e alimentação dos animais**

Os animais foram acomodados em piquete experimental localizado na Área de Campo Experimental – LQEPV/UFRRJ não havendo separação física entre os grupos experimentais e alimentados com silagem de sorgo, pasto nativo e água potável proveniente da rede de abastecimento urbana de Seropédica disponibilizada em de cochos com boia “*ad libitum*”.

### **3.3.3. Tratamento em dose única**

Afim de avaliar a atividade de Piriproxifen no plasma dos bovinos, os animais foram divididos em dois grupos experimentais compostos por dez animais em cada grupo, denominados G2,5U (grupo 2,5 mg dose única) e G40U (grupo 40 mg dose única).

Os animais foram contidos em tronco Coimma® e tratados com Piriproxifen administrado da mesma forma e dose do estudo de eficácia. Após o tratamento, os animais foram novamente contidos para realização da coleta de sangue via punção de veia jugular, com auxílio de adaptador de coleta a vácuo e agulha para coleta múltipla de sangue a vácuo, medindo 25x8 (21G), nos seguintes momentos: 4 h, 6 h, 10 h, 18 h, 24 h e 48 h após o tratamento. O material foi armazenado em tubo com anticoagulante heparina sódica e encaminhado ao LQEPV para obtenção do plasma, através da centrifugação dos tubos heparinizados a 756xG por 15 minutos. Separou-se duas amostras de 1 mL de plasma que foram congeladas a -20 °C e encaminhadas ao Laboratório Labfor® para quantificação de piriproxifen, afim de construir a curva plasmática em bovinos.

### 3.3.4. Validação do método analítico para amostras de plasma

A validação para quantificação de piroxicam em plasma seguiu os mesmos moldes e metodologia utilizados para as amostras de fezes, com alguns ajustes:

Para verificação da exatidão e precisão foram utilizadas as concentrações de 2,50 µg/kg (Baixo) e 150 µg/kg (Alto);

A faixa de trabalho foi de 1,5; 2,5; 10; 25; 50; 100; 150 e 200 µg/L; o *carry-over* foi realizado com a seguinte sequência: branco, piroxicam 200 µg/kg, branco, piroxicam a 2,5 µg/kg;

A extração foi realizada adicionando-se 500 µL de uma mistura acetonitrila:ácido acético 95:5 em cada microtubo contendo 250 µL de amostra, agitando por 25 segundos, seguido de centrifugação por 5 minutos a 14000rpm, sem controle de temperatura. Após a centrifugação, todo o sobrenadante contido nos microtubos foi filtrado. As alíquotas finais, foram analisadas por LC-MS/MS.

A cromatografia foi realizada a uma vazão de 500 µL.min<sup>-1</sup> com volume de injeção de 3 µL e tempo de retenção do piroxicam de 2,36 minutos.

Os demais parâmetros foram idênticos aos aplicados para análise de fezes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Teste *in vitro* para Determinação das Concentrações Letais

Os três maiores percentuais de eclodibilidade do teste *in vitro* foram de 97,78 % para a concentração 1400 ppb; 96,67 % para as concentrações 500 e 1500 ppb e, 95,56 % para 20 ppb, em contraste com as três menores taxas, que foram 73,33 % para 30 ppb; 75,56 % para as concentrações 40 e 100 ppb e, 80,00 % para as concentrações 50 e 900 ppb, com os grupos controle e placebo apresentando um percentual de 86,67 % e 90,00 % de eclodibilidade, respectivamente. Para a concentração 300 ppb, houve um percentual de eclodibilidade de 85,56 % e para 1700 ppb, a maior concentração, um percentual de 82,2 %.

Os valores médios de eclodibilidade encontrados neste estudo estão compreendidos entre os valores médios encontrados em outros estudos como, por exemplo, no estudo de Bay e Harris (1978) que estabeleceram uma pequena colônia de criação de *H. irritans* e obtiveram uma eclodibilidade variando de 86 a 91 %. Lima et al. (2010), em estudo para determinação do percentual de eclosão de ovos de *H. irritans*, conseguiu uma eclodibilidade compreendida entre 60 e 100 % em dois anos de estudo. Lima et al. (2014) obtiveram valores entre 83 e 100 % para a eclodibilidade de *H. irritans* em laboratório.

Ainda, em estudo proposto por Bull e Meola (1993), afim de testar a atividade ovicida de piriproxifen, utilizou-se concentrações que variaram de 10; 100 e 500 ppb e, como resultado, observaram efeitos mínimos sobre a eclodibilidade, quase não afetando-a, assim como a emergência de adultos advindos desses ovos tratados. As concentrações utilizadas no presente estudo foram, em sua grande maioria, mais elevadas que as utilizadas pelos autores e, mesmo assim, piriproxifen demonstrou não possuir atividade ovicida *in vitro* em ovos de *H. irritans*.

Sendo assim, todos os percentuais de eclodibilidade do teste *in vitro* para as 23 concentrações propostas encontraram-se dentro dos valores médios de eclodibilidade de *H. irritans* considerados normais e cuja oscilação foi de 73,33 a 97,78 %. Adicionalmente, pode-se observar que, frequentemente, percentuais de eclodibilidade determinados para as concentrações superiores foram iguais ou maiores que os percentuais encontrados para os grupos controle e placebo.

Então, a partir dos resultados expostos acima, que podem ser melhor observados na Tabela 3, pode-se afirmar que piriproxifen, nas concentrações compreendidas entre 20 e 1700 ppb, não exerce atividade ovicida *in vitro* em ovos de *H. irritans*.

A taxa de sobrevivência de larvas, que representa aquelas larvas que completaram esta etapa do ciclo e transformaram-se em pupas a partir de larvas recém eclodidas, variou de 95,95 % para a concentração 1700 ppb, a maior taxa de sobrevivência, até 65,28 % na concentração 900 ppb, a menor taxa de sobrevivência.

Mais uma vez, concentrações elevadas apresentaram uma taxa de sobrevivência de larvas, muitas vezes, superiores às encontradas nos grupos controle e placebo e, até mesmo, em concentrações menos elevadas. Os resultados para sobrevivência de larvas compreenderam desde encontrados por Bay e Harris (1978), que foram de 72 a 79 % até alguns mais elevados, como por exemplo 88,51 % para a concentração 1500 ppb, observada neste estudo. Dessa forma, com percentuais de sobrevivência de larvas frequentemente acima de 70 %, pode-se afirmar que piriproxifen não atuou como larvicida, nestas concentrações, *in vitro*, uma vez que piriproxifen não impediu a formação de pupas e inclusive, a maior taxa de sobrevivência de larvas foi apresentada para a concentração 1700 ppb, maior dose do estudo, conforme pode ser visto na Tabela 3.

**Tabela 3** - Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1, R2 e R3), percentual de eclodibilidade, taxa de mortalidade de larvas, de pupas e de mortalidade total, taxa de sobrevivência de larvas, de pupas e de sobrevivência total referentes à incubação *in vitro* de ovos de *Haematobia irritans* em fezes bovinas para determinação das doses letais DL50 e DL99 para as formas imaturas de *Haematobia irritans*.

Grupos <sup>a</sup>	Larvas eclodidas				Pupas formadas				Adultos emergidos				Eclodibilidade (%)	Sobrevivência Larvas (%)	Sobrevivência Pupas (%)	Sobrevivência Total (%)
	R1	R2	R3	R1+R2+R3	R1	R2	R3	R1+R2+R3	R1	R2	R3	R1+R2+R3				
<b>Controle</b>	26	26	--- <sup>b</sup>	52	23	26	--- <sup>b</sup>	49	23	15	--- <sup>b</sup>	38	86,67	94,23	77,55	73,08
<b>Placebo</b>	25	29	--- <sup>b</sup>	54	19	29	--- <sup>b</sup>	48	16	21	--- <sup>b</sup>	37	90,00	88,89	77,08	68,52
<b>20</b>	29	29	28	86	23	29	23	75	20	22	16	58	95,56	87,21	77,33	67,44
<b>30</b>	17	22	27	66	13	22	18	53	10	17	14	41	73,33	80,30	77,36	62,12
<b>40</b>	26	19	23	68	22	19	12	53	14	9	10	33	75,56	77,94	62,26	48,53
<b>50</b>	27	24	21	72	23	24	11	58	21	17	8	46	80,00	80,56	79,31	63,89
<b>100</b>	23	25	20	68	14	25	16	55	11	14	12	37	75,56	80,88	67,27	54,41
<b>200</b>	29	27	17	73	22	27	16	65	10	22	12	44	81,11	89,04	67,69	60,27
<b>300</b>	28	23	26	77	25	23	15	63	13	9	6	28	85,56	81,82	44,44	36,36
<b>400</b>	24	22	29	75	15	22	19	56	5	8	5	18	83,33	74,67	32,14	24,00
<b>500</b>	30	28	29	87	25	28	25	78	6	10	8	24	96,67	89,66	30,77	27,59
<b>600</b>	18	28	27	73	10	28	22	60	0	3	5	8	81,11	82,19	13,33	10,96
<b>700</b>	27	24	22	73	22	24	11	57	1	3	4	8	81,11	78,08	14,04	10,96
<b>800</b>	27	28	26	81	15	28	21	64	0	7	4	11	90,00	79,01	17,19	13,58
<b>900</b>	21	23	28	72	13	23	11	47	1	0	0	1	80,00	65,28	2,13	1,39
<b>1000</b>	24	29	30	83	20	29	23	72	0	6	3	9	92,22	86,75	12,50	10,84
<b>1100</b>	27	26	28	81	22	26	20	68	0	1	3	4	90,00	83,95	5,88	4,94
<b>1200</b>	22	28	23	73	17	28	19	64	0	9	1	10	81,11	87,67	15,63	13,70
<b>1300</b>	25	30	29	84	14	30	20	64	0	0	0	0	93,33	76,19	0,00	0,00
<b>1400</b>	30	30	28	88	20	30	24	74	0	2	2	4	97,78	84,09	5,41	4,55
<b>1500</b>	29	30	28	87	24	30	23	77	0	1	1	2	96,67	88,51	2,60	2,30
<b>1600</b>	27	29	28	84	16	29	25	70	0	2	1	3	93,33	83,33	4,29	3,57
<b>1700</b>	24	23	27	74	21	23	27	71	0	0	0	0	82,22	95,95	0,00	0,00

<sup>a</sup> Concentrações expressas em ppb.

<sup>b</sup> Repetição não realizada.

No que diz respeito à pupação, houve a formação de pupas em todas as concentrações do estudo. A maior taxa de sobrevivência de pupas encontrada foi de 79,31 % para a concentração 50 ppb, seguida de 77,55 % para o grupo controle e 77,36 % para a concentração 30 ppb. As menores taxas de sobrevivência foram de 0 % para as concentrações 1300 e 1700 ppb, 2,13 % para a concentração 900 ppb e 2,60 para a concentração 1500 ppb. Pode-se observar que, a partir de 600 ppb, as taxas de sobrevivência foram menores que 20 %. A taxa de sobrevivência das pupas para a concentração 300 ppb foi de 44,44 %.

Lima et al. (2014) encontraram valores que variaram de 40 a 100 % de sobrevivência de pupas em estudo para criação *in vitro* de *H. irritans*. Desta forma, pode-se afirmar que, nas concentrações avaliadas, *in vitro*, piriproxifen manifestou efeitos sobre as pupas de *H. irritans*, causando mortalidade e conseqüentemente, não emergência de adultos.

Esses efeitos puderam ser também demonstrados através do percentual de sobrevivência total, representado pela emergência de adultos a partir das larvas eclodidas, onde o controle obteve o maior percentual com 73,08 % de sobrevivência, seguido pelo grupo placebo com 68,52 % e pela concentração 20 ppb, com 67,44 %. A partir da concentração 300 ppb, as taxas de sobrevivência foram inferiores a 40 %, a partir da concentração 600ppb foram inferiores a 10 % e a partir de 1300ppb, não houve emergência de adultos até a concentração 1700ppb, onde as taxas foram menores de 10 % chegando a 0 %, novamente, na maior concentração do estudo (Tabela 3).

Dell' Porto et al. (2012) em estudo de eficácia *in vitro* de diflubenzuron 25 %, com uma média de consumo diário de aproximadamente 30 g por animal, nos estágios imaturos de *H. irritans*, encontraram um percentual de sobrevivência de adultos de 86 % para o grupo controle. Já Sahagún et al. (2005) em estudo de susceptibilidade dos estágios biológicos de *H. irritans* à fungos entomopatogênicos, houve 72 % de emergência de adultos no grupo controle. Já Lima et al. (2014), em estudo de criação em laboratório, obtiveram uma taxa de emergência de adultos de 76,7 %. Bay e Harris (1978), em pequena criação de *H. irritans* em laboratório, recuperaram cerca de 67 a 75 % de adultos. Após esse comparativo, pode-se observar que o percentual encontrado para o grupo controle neste estudo, 73,08 %, mostrou-se bastante semelhantes aos encontrados anteriormente.

Do mesmo modo, Bull e Meola (1993), em teste *in vitro*, observaram que piriproxifen exibiu excelente atividade IGR, quando incorporado à dieta larval, nas concentrações que variaram de 0,00625 a 0,05 ppm (6,25 ppb a 50 ppb), porém, não detalhou em que fase do ciclo de vida de *H. irritans* o piriproxifen de fato atuou, somente relatando a excelente atividade IGR com conseqüente inibição da emergência de adultos. Então, presumiu-se que tenha havido o desenvolvimento do inseto até a formação de pupa, assim como no presente estudo em que as concentrações foram misturadas no substrato, porém, com concentrações variando de 20ppb a 1700 ppb (0,02 ppm a 1,7 ppm), a maioria delas superiores às testadas anteriormente. Nota-se que a maior concentração utilizada pelos autores equivale a de 50 ppb, também testada no presente estudo e, que apresentou os seguintes resultados: 80 % de eclodibilidade, 80,56 % de sobrevivência de larvas, 79,31 % de sobrevivência de pupas e 63,89 % de sobrevivência total onde, comparativamente aos resultados com concentrações mais elevadas, observou-se um comportamento mediano no controle de *H. irritans*, com somente 36,11 % de mortalidade total, percentual que pode ser considerado baixo para um controle efetivo parasitológico.

Gingrich e Hopkins (1977) utilizaram metoprene, também do grupo dos IGR igualmente pertencente à classe de análogos do hormônio juvenil, em avaliação dos estágios de *H. irritans* que seriam susceptíveis e observaram que metoprene, além de possuir excelente atividade IGR, atuou nas larvas de terceiro estágio, não impediu a formação de pupas e a principal ação demonstrada foi a inibição da emergência de adultos, em conseqüência da morte pupal.

Adicionalmente observou-se que piriproxifen, no presente estudo, exibiu *in vitro* a mesma atividade inibitória da emergência de adultos anteriormente demonstrada para o

metoprene. Dessa forma, podemos afirmar que, *in vitro*, piriproxifen possui excelente atividade IGR em pupas de *H. irritans*, demonstrado principalmente através da mortalidade das pupas, com consequente inibição da emergência de adultos de forma dose-dependente.

A análise de probitos dos resultados do teste *in vitro* para as 23 concentrações de piriproxifen utilizadas neste estudo (20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 110, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600 e 1700 ppb) estimou uma CL50 de 321,251ppb, com limites de confiança a 95 % de 123,368 a 502,615ppb e uma CL99 de 1959,491ppb foi estimada, com limites de confiança a 95 % de 1111,035 a 9893,593ppb, ambas com slope = 2,962 e Desvio padrão = 0,291 (Tabela 4).

**Tabela 4** - Análise probitos das 23 concentrações de piriproxifen utilizadas (20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 110, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600 e 1700ppb) e determinação da CL50 e CL99.

Dose Letal (CL)	Dose de piriproxifen (Em ppb)	Limites de confiança 95 % (Em ppb)	Slope	Desvio padrão
50	321,251	123,368 a 502,615	2,962	0,291
99	1959,491	1111,035 a 9893,593		

Bull e Meola (1993) determinaram *in vitro* a CL50 de piriproxifen em 9,3 ppb para estágios imaturos de *H. irritans*. Este resultado foi bastante discrepante do encontrado no presente estudo, apesar da metodologia empregada ter sido bastante semelhante. As duas únicas diferenças observadas foram o tipo de dieta larval utilizada onde, no estudo de Bull e Meola (1993) utilizou-se 500 g de fezes bovinas, 100 g de mistura seca (50 partes de bagaço de cana-de-açúcar, 9 partes de farinha de trigo, 4 partes de farinha de carne e ossos e 1 parte de bicarbonato de sódio) e 300 ml de água (BAY; HARRIS, 1978) em oposição à que foi utilizada neste estudo, composta apenas por fezes bovinas sem adição de nenhum ingrediente para compor a dieta; e a quantidade de substrato e ovos desafiados, onde Bull e Meola (1993) utilizaram 500g de meio larval com 0,5ml de ovos de *H. irritans*, em contraste com os 20g de substrato e 30 ovos, neste estudo.

Como a base de dados comparativa em relação à concentração letal de piriproxifen é bastante deficitária, necessita-se de mais estudos para enrobustecer e solidificar o conhecimento acerca do valor da CL50 para as formas imaturas. Então, como as únicas diferenças encontradas na metodologia do estudo foram estas, pode-se suspeitar, talvez que algum dos componentes utilizados na mistura da dieta larval desenvolvida por Bay e Harris (1978) possa ter potencializado os efeitos de piriproxifen quando adicionado à dieta larval no estudo de Bull e Meola (1993) e, conseqüentemente, reduzido a valor da CL50.

Schmidt e Kunz, (1980), utilizando metoprene, testaram a susceptibilidade das larvas de *H. irritans* e encontraram uma CL50 de 0,001 ppm (1 ppb) e a uma CL90 de 0,006 ppm (6 ppb) com análise de probitos. Os autores utilizaram como substrato larvar a mesma dieta proposta por Bay e Harris (1978), assim como Bay e Boyd (1987) em avaliação do efeito da densidade larval na toxicidade de metoprene.

Como substrato larval, utilizaram alíquotas de 100 g da mistura semelhante à utilizada por Schmidt e Kunz, 1980 e testaram as concentrações de 0,0025; 0,005; 0,01 e 0,02 ppm (2,5; 5; 10; 20 ppb) de metoprene no meio larval em 25, 50, 100, 200 ou 400 ovos de *H irritans*. Os resultados demonstraram uma relação inversa entre a densidade larval e a toxicidade das larvas em todas as concentrações avaliadas. Ou seja, quanto maior a densidade larval no substrato, menor a efetividade de metoprene.

A redução da efetividade foi bastante sutil, onde na maior concentração utilizada, os resultados foram de 100 % de inibição da emergência de adultos para todas as densidades utilizadas, à exceção da amostra com densidade de 400 larvas, onde metoprene demonstrou ser

96,7 % eficaz. Os autores não souberam explicar tal fato, mas especularam dizendo que poderia haver uma alta concentração de metoprene nas fezes, mesmo que administrado em uma mínima dosagem, devido ao alto potencial de absorção e metabolismo do animal assim como a possibilidade de degradação química e biológica no sistema digestivo do bovino.

Talvez piriproxifen comporte-se de forma similar ao metoprene e a discrepância entre as CL50 seja devido à toxicidade do substrato parecer ser inversamente proporcional à densidade larvar, uma vez que a utilização de 20g de fezes para 30 ovos pode ter determinado uma densidade populacional muito grande para a quantidade de substrato utilizada, reduzindo desta forma a toxicidade de piriproxifen adicionado nas fezes dos bovinos.

Em última análise, a partir dos resultados dos estudos citados acima que utilizaram a dieta proposta por Bay e Harris (1978) e, coincidentemente, dispuseram de baixíssimos valores de CL50, assim como as concentrações utilizadas para avaliar a densidade larval e a toxicidade foram, de igual maneira, baixíssimas também. O que levaria a sugerir que, no presente estudo, por ter utilizado somente fezes bovinas frescas retiradas diretamente da ampola retal dos bovinos, obteve-se um valor de CL50 de piriproxifen mais alto do que o encontrado no estudo de Bull e Meola (1993).

Quando comparado ao estudo de Schmidt e Kunz (1980) que obteve a CL50 de metoprene, apesar de não devermos comparar os valores de CL50, pois cada uma das duas moléculas possui um potencial inseticida único e distinto, o valor da CL50 foi igualmente baixo mesmo assim, reforçando as suspeitas quanto aos ingredientes adicionados na dieta larvar potencializando os efeitos dos IGR. E, como já se sabe, piriproxifen é praticamente insolúvel em água ( $0,367 \pm 0.004$  mg/l a 25 °C), mas se nela liberado, adsorve em sólidos suspensos e matéria orgânica, mantendo uma atividade biológica por pelo menos três meses; possui também a propensão a adsorver na superfície do solo, particularmente àquelas com argila ou matéria orgânica. E, em condições anaeróbicas, como em águas salobras ou sedimentadas, piriproxifen é muito mais estável, imutável e tóxico para vertebrados aquáticos (SULLIVAN; GOH, 2008), o que fortalece o pensamento que a dieta utilizada por Bay e Harris (1978) poderia conter algum ingrediente capaz de potencializar os efeitos de piriproxifen e, desta forma, reduzindo o valor da CL50.

Aplicou-se os valores encontrados para a CL50 na fórmula  $CL50 \text{ (teste } in \text{ vivo)} = (CL50 \text{ (teste } in \text{ vitro)} \text{ em ppb} \times \text{ peso das fezes}) \times 3$ , para 2,0 e 3,0 kg de fezes/defecação, encontrando 1,8mg e 2,7mg de piriproxifen, respectivamente. Obteve-se um valor médio de 2,4 mg de piriproxifen, então, utilizou-se o valor de 2,5 mg de piriproxifen na CL50 calculada para o teste *in vivo*, que foi empregado por via oral diariamente para os animais deste grupo.

Para o cálculo da CL99, utilizou-se a mesma fórmula, porém calculou-se apenas para 3,0 kg de fezes por defecação e obteve-se um valor de aproximadamente 17,6 mg de piriproxifen, que foi extrapolado para 40mg, uma vez que o intervalo de confiança de 95 % para CL99 encontra-se entre 1111,035ppb e 9893,593ppb permitindo utilizar uma CL99 de aproximadamente 4445ppb. A extrapolação da CL99 teve por objetivo assegurar que uma dose maior, mais próxima do limite máximo de confiança, pudesse ser capaz de expressar mais claramente seus efeitos sobre as formas imaturas de *H. irritans*.

#### **4.2. Teste *in vivo***

A incubação de ovos de *H. irritans* em fezes coletadas no teste *in vivo* para avaliação da eficácia de piriproxifen, administrado por via oral no controle de formas imaturas presentes no bolo fecal de bovinos no dia zero, antes do tratamento, teve por objetivo certificar a viabilidade e qualidade das fezes dos bovinos utilizadas nos testes em servir como substrato de criação e desenvolvimento de formas imaturas de *H. irritans*. A incubação antes do tratamento, cujos dados encontram-se expostos na Tabela 5, permitiram, adicionalmente, descartar de modo



prático a presença de resíduos de medicamentos que pudessem interferir no desenvolvimento das formas evolutivas.

Também permitiu conferir a qualidade dos ovos obtidos a partir da técnica empregada, uma vez que os adultos de mosca-dos-chifres foram aleatoriamente capturados em razão do estudo e poderia haver desproporcionalidade quanto à população de indivíduos relacionadas ao sexo, idade e maturação sexual. O animal 15006, pertencente ao Grupo G2,5, apesar de ter obtido uma eclodibilidade de 50 larvas ( $R_1=26$ ;  $R_2=24$ ) de um total de 60, não teve pupas formadas a partir do seu material fecal, alcançando 100 % de mortalidade tendo sido, dessa forma, excluído do estudo.

Como as fezes do referido animal eram normalmente bastante úmidas (quase líquidas) com pouca quantidade de material fibroso e, apesar dos ovos terem eclodido, não houve a continuidade do ciclo. Algumas explicações para este fato podem ter sido encontradas por Kunz et al. (1970) em estudo acerca da biologia de *H. irritans*, onde afirmaram que o tipo de bolo fecal mais adequado para oviposição seria de consistência mais firme e mais bem formado, enquanto que o bolo fecal aquoso seria inadequado para a oviposição, reforçando a afirmação acerca da umidade excessiva no substrato, o que o tornaria inapropriado para o desenvolvimento das larvas, uma vez que esse tipo de fezes perde a consistência e tende a assumir uma forma fina, que seca antes do total desenvolvimento larval. Sanders e Dobson (1969) também contribuíram para esse entendimento quando constataram que *H. irritans* não tem por hábito depositar seus ovos em fezes muito líquidas (SANDERS; DOBSON, 1969), assim como também descrito por Collares (1990) citando Palmer e Bay (1982), que afirmaram que larvas de *H. irritans* não se desenvolvem completamente em substrato com mais de 85 % de umidade, enquanto que fezes com baixa umidade não influenciam significativamente no desenvolvimento e dinâmica da população, mostrando que a consistência das fezes é um fator bastante relevante para a manutenção do ciclo de vida de *H. irritans*. E também, normalmente, há bovinos fisiologicamente sadios que apresentam fezes mais úmidas que as da maioria e, conseqüentemente, desfavoráveis à manutenção do ciclo.

Assim, para que a homogeneidade dos grupos experimentais fosse garantida, optou-se também pela exclusão de um animal do grupo controle e um animal do grupo G40, adotando o percentual de sobrevivência como critério de exclusão e, dessa forma, excluindo o animal de cada grupo com a menor taxa de sobrevivência de adultos antes do tratamento (animal 14027 do grupo controle, com 35,2 % e o animal 322, do grupo G40, com 59,3 % de sobrevivência de adultos), conforme pode ser visto na Tabela 6.

Primeiramente, procedeu-se à avaliação da eclodibilidade do material incubado antes do tratamento (Dia zero) e um percentual médio de eclodibilidade de 82,17 % foi encontrado para o grupo controle, 81,67 % para o grupo G2,5 e 68,00 % para o grupo G40, além de um percentual médio geral, de 77,28 % (Figura 8).

Na primeira incubação de ovos de *H. irritans* pós tratamento (Dia +3), obteve-se uma eclodibilidade média de 71,67 % para o grupo controle, 74,67 % para o grupo G2,5 e 80,00 % para o grupo G40, todas com valores próximos aos encontrados para o dia zero, antes do tratamento.

Na segunda incubação após o tratamento (Dia+6), os percentuais de eclodibilidade obtidos foram de 87,00 % para o grupo controle, 92,00 % para o grupo G2,5 e 78,83 % para o grupo G40, novamente bastante similares quando comparados entre os percentuais dos grupos e também entre os obtidos nas incubações anteriores.

**Tabela 5** - Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1 e R2) e somatório (R1+R2), taxa de sobrevivência de larvas, de pupas e de sobrevivência total, médias e desvio padrão referentes à incubação de ovos de *Haematobia irritans* em fezes bovinas antes do tratamento (Dia zero) com piriproxifen por via oral.

Grupo	Id <sup>1</sup>	Larvas eclodidas			Pupas formadas			Adultos emergidos			Sobrevivência	Sobrevivência	Sobrevivência
		R1	R2	R1+R2	R1	R2	R1+R2	R1	R2	R1+R2	Larvas (%)	Pupas (%)	Total (%)
CONTROLE	314	29	26	55	26	15	41	25	10	35	74,5	85,4	63,6
	316	24	27	51	20	17	37	18	16	34	72,5	91,9	66,7
	337	24	20	44	20	12	32	15	12	27	72,7	84,4	61,4
	455	24	25	49	8	18	26	8	15	23	53,1	88,5	46,9
	500	26	27	53	15	13	28	12	13	25	52,8	89,3	47,2
	15002	22	22	44	17	17	34	11	15	26	77,3	76,5	59,1
	<b>Média</b>	<b>24,8</b>	<b>24,5</b>	<b>49,3</b>	<b>17,7</b>	<b>15,3</b>	<b>33,0</b>	<b>14,8</b>	<b>13,5</b>	<b>28,3</b>	<b>67,2 a</b>	<b>86,0 a</b>	<b>57,5 a</b>
<b>Desvio</b>	<b>2,2</b>	<b>2,6</b>	<b>4,2</b>	<b>5,5</b>	<b>2,2</b>	<b>5,1</b>	<b>5,5</b>	<b>2,1</b>	<b>4,5</b>	<b>10,2</b>	<b>4,9</b>	<b>7,7</b>	
G2,5 (2,5 mg/animal)	471	22	29	51	20	28	48	18	26	44	94,1	91,7	86,3
	473	25	25	50	14	9	23	5	6	11	46	47,8	22
	474	29	22	51	25	14	39	24	12	36	76,5	92,3	70,6
	14013	25	14	39	22	8	30	18	8	26	76,9	86,7	66,7
	14014	20	28	48	19	21	40	18	18	36	83,3	90	75
	14033	26	29	55	21	16	37	12	10	22	67,3	59,5	40
	<b>Média</b>	<b>24,5</b>	<b>24,5</b>	<b>49,0</b>	<b>20,2</b>	<b>16,0</b>	<b>36,2</b>	<b>15,8</b>	<b>13,3</b>	<b>29,2</b>	<b>74,0 a</b>	<b>78,0 a</b>	<b>60,1 a</b>
<b>Desvio</b>	<b>2,9</b>	<b>5,3</b>	<b>4,9</b>	<b>3,3</b>	<b>6,9</b>	<b>7,9</b>	<b>6,0</b>	<b>6,8</b>	<b>10,8</b>	<b>14,9</b>	<b>17,6</b>	<b>22</b>	
G40 (40 mg/animal)	318	19	29	48	12	22	34	12	19	31	70,8	91,2	64,6
	339	21	26	47	18	17	35	17	14	31	74,5	88,6	66
	13005	22	23	45	19	19	38	18	17	35	84,4	92,1	77,8
	14023	6	10	16	6	9	15	6	9	15	93,8	100	93,8
	14034	28	26	54	16	18	34	16	17	33	63	97,1	61,1
	14037	24	11	35	22	7	29	21	7	28	82,9	96,6	80
	<b>Média</b>	<b>20,0</b>	<b>20,8</b>	<b>40,8</b>	<b>15,5</b>	<b>15,3</b>	<b>30,8</b>	<b>15,0</b>	<b>13,8</b>	<b>28,8</b>	<b>78,2 a</b>	<b>94,2 a</b>	<b>73,9 a</b>
<b>Desvio</b>	<b>6,9</b>	<b>7,5</b>	<b>12,5</b>	<b>5,2</b>	<b>5,4</b>	<b>7,6</b>	<b>4,8</b>	<b>4,4</b>	<b>6,5</b>	<b>10</b>	<b>3,9</b>	<b>11,3</b>	

<sup>1</sup> Refere-se ao número de identificação individual dos animais.

Valores seguidos da mesma letra nas colunas significativamente entre si, com nível de significância de 5 % (p=0,3416, para sobrevivência de larvas; p=0,8738, para sobrevivência de pupas; p=0,1992, para sobrevivência total).

**Tabela 6** – Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1 e R2), taxa de mortalidade e de sobrevivência total referentes à incubação de ovos de *Haematobia irritans* em fezes bovinas dos animais excluídos do estudo no dia zero.

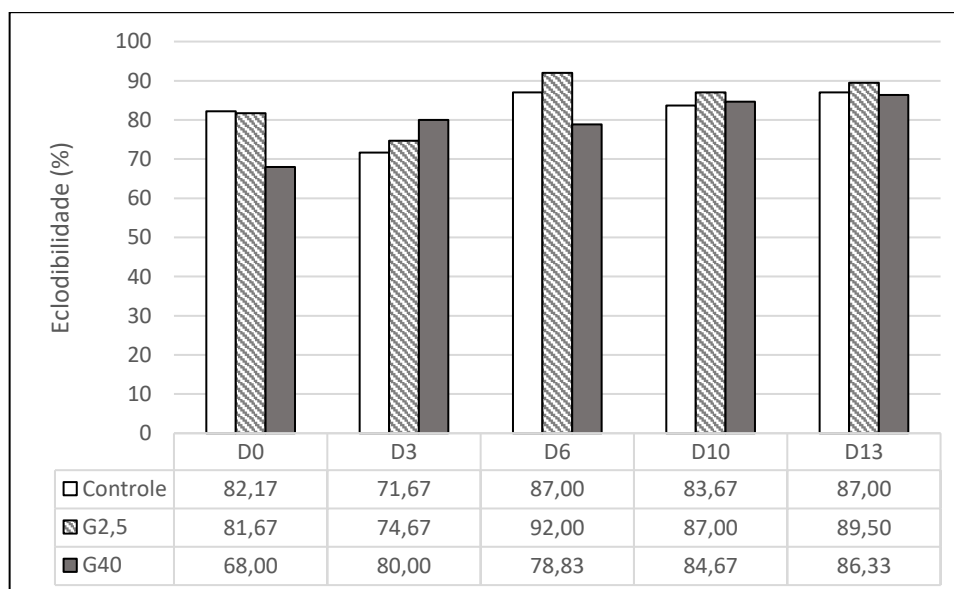
Grupo	Id <sup>1</sup>	Larvas eclodidas		Pupas formadas		Adultos emergidos		Sobrevivência larvas (%)	Sobrevivência pupas (%)	Sobrevivência Total (%)
		R1	R2	R1	R2	R1	R2			
<b>G40</b> (40mg/animal)	322	28	26	21	16	18	14	68,5	86,5	59,3
<b>Controle</b>	14027	28	26	11	9	10	9	37,0	95,0	35,2
<b>G2,5</b> (2,5mg/animal)	15006	26	24	0	0	0	0	0	0	0,0

<sup>1</sup> Refere-se ao número de identificação individual dos animais.

Na terceira incubação, após dez dias do início do tratamento (Dia +10), as eclodibilidades médias foram de 83,67 %, 87,00 % e 84,67 % para o grupo controle, G2,5 e G40, respectivamente, e na quarta e última incubação, estes valores foram de 87,00 % no grupo controle, 89,50 % no grupo G2,5 e 86,33 %, no grupo G40.

A partir do Dia +6, com exceção do grupo G40, que obteve média discretamente abaixo neste dia, até a última incubação (Dia +13), as eclodibilidades médias de todos os grupos deste estudo ultrapassaram os 83,3 % de eclodibilidade encontrados por Lima et al. (2010) em estudo de avaliação do ciclo de vida de *H. irritans* onde observou-se, por um período de dois anos, o percentual de eclodibilidade *in vitro* de ovos de *H. irritans* incubados em fezes bovinas mestiços sem tratamento com ectoparasiticidas.

Bay e Harris (1978) desenvolveram o ciclo de vida de *H. irritans* em pequena escala em laboratório e encontraram taxas de eclodibilidade variando de 86 a 91 %. Kunz (1989) em estudo comparando a dieta padrão oferecida em colônia de *H. irritans* à novas dietas elaboradas, observou taxas de eclodibilidade variando de 76,5 a 79,3 % em todas as dietas, inclusive na dieta padrão já estabelecida, percentuais similares aos encontrados neste estudo.



**Figura 8** - Percentuais de eclodibilidade de ovos de *Haematobia irritans* em teste in vivo que foram inoculados em fezes de bovinos medicados ou não, com diferentes dosagens diárias de piriproxifen. O grupo G2,5 corresponde ao grupo medicado com 2,5mg de piriproxifen; o grupo G40 corresponde ao grupo medicado com 40mg de piriproxifen; grupo controle mantido sem tratamento.

Com isso, a partir dos resultados expostos para eclodibilidade dos ovos no presente estudo, comparativamente aos dados de eclodibilidade do teste *in vitro* para determinação das doses letais e aos dados de eclodibilidade encontrados por outros autores, pode-se afirmar que piriproxifen administrado por via oral diariamente em bovinos, nas doses de 2,5mg e 40mg, também não exerce ação ovicida em ovos de *H. irritans* quando incubados em fezes de animais tratados, apesar do íntimo contato entre os ovos depositados sobre o papel filtro úmido embebido por fluidos fecais contendo piriproxifen. Os nossos resultados assemelham-se também aos de Bull e Meola (1993) que testaram os efeitos diretos de piriproxifen sobre os ovos de *H. irritans* parcialmente submersos em almofadas úmidas com solução de piriproxifen de 0,1 a 0,5ppm durante aproximadamente 18 horas e observaram um efeito mínimo na eclosão dos ovos que foram tratados com piriproxifen.

A baixa atividade ovicida de piriproxifen já era de se esperar, uma vez que na maioria dos insetos, assim que o desenvolvimento embrionário se completa, a larva força mecanicamente sua saída pela casca do ovo por movimentos de contração e distensão do corpo. Algumas estratégias são utilizadas como, por exemplo, aumento do volume corporal através da ingestão de líquidos extra-embrionários. Alguns insetos, ainda, possuem estruturas tegumentares próprias para romper o cório do ovo, e outros, uma fragilidade natural deste cório ocorre (LANDIM, 2009). E, normalmente os JH não estão envolvidos neste processo, agindo, na maioria dos insetos, durante a vida larval impedindo a metamorfose a cada muda, ou seja, quando a larva atinge o tamanho específico, os níveis de JH diminuem, permitindo que a metamorfose ocorra. Os análogos do hormônio juvenil podem prolongar o tempo de vida larval, usualmente permitindo estágios extra larvais (RIDDIFORD, 2008). Dessa forma, a exposição dos ovos de *H. irritans* ao piriproxifen dificilmente causaria a morte desses ovos.

O próximo passo foi avaliar o percentual de sobrevivência das larvas de *H. irritans*, ou seja, o percentual de larvas que foram capazes completar esta etapa da metamorfose e se transformar em pupa.

No dia zero (antes do tratamento), a média de larvas eclodidas variou de  $40,8 \pm 12,5$  a  $49,3 \pm 4,2$  entre os grupos e o percentual médio de sobrevivência destas foi de  $67,2 \pm 10,2$  % para o grupo controle,  $74,0 \pm 14,9$  % para o grupo G2,5 e  $78,2 \pm 10,0$  % para o grupo G40, sem diferença significativa ( $p=0,3416$ ) entre os grupos, assim como esperado. Resultados similares aos de Bay e Harris (1978) que desenvolveram o ciclo de vida de *H. irritans* em pequena escala em laboratório e obtinham taxas de sobrevivência de larvas de 72 a 79 %. Em outra análise, a taxa de mortalidade média de larvas variou de  $21,8 \pm 10,0$  % até  $32,8 \pm 10,2$  % entre os grupos e a menor taxa de mortalidade individual alcançada foi de 5,9 %, chegando a máxima de 54 % nesse primeiro período do estudo. Lima et al. (2010) em estudo de avaliação de eclosão de ovos de *H. irritans in vitro* obtiveram uma taxa de mortalidade média de larvas que variou de 16,7 a 40 %, nos dois anos do estudo, valores semelhantes aos encontrados no presente estudo, antes do tratamento.

No dia + 3, a média de larvas eclodidas dos grupos G2,5 e G40 foi de  $44,8 \pm 5,2$  e  $48,0 \pm 5,4$  larvas, respectivamente, bastante semelhantes à média de  $43,0 \pm 8,7$  larvas eclodidas no grupo controle e às médias apresentadas em todos os grupos experimentais antes do tratamento. Os dados completos referentes à esta incubação estão dispostos na Tabela 7.

A taxa média de sobrevivência de larvas foi de  $76,5 \pm 9,0$  % para o grupo controle,  $68,3 \pm 14,4$  % para o grupo G2,5 e  $66,6 \pm 17,3$  % para o grupo G40 e não se observou diferenças significativas ( $p=0,5883$ ) nos grupos de tratamento quando comparados entre si, como pode ser observado na Tabela 7. A eficácia de piriproxifen sobre as larvas de *H. irritans* foi de apenas 10,7 % para o grupo G2,5 e de 12,9 % para o grupo G40, na primeira incubação após o tratamento.

No dia + 6, a média de larvas eclodidas no grupo controle foi de  $52,2 \pm 2,3$ , semelhante às médias de larvas eclodidas nos grupos G2,5 e G40, que foram  $55,2 \pm 3,0$  e  $47,3 \pm 6,0$ , respectivamente e também, nos outros dias experimentais. Os dados completos referentes à incubação do dia +6 estão disponibilizados na Tabela 8.

No dia +10 (terceira incubação após o tratamento), a média de larvas eclodidas foi novamente bastante semelhante entre os grupos, com valor médio de  $50,2 \pm 3,8$  larvas no grupo controle,  $52,2 \pm 4,1$  no grupo G2,5 e  $50,8 \pm 4,7$  no grupo G40, valores similares aos anteriormente descritos neste estudo. Os dados completos para a incubação referente ao dia + 10 podem ser analisados na Tabela 9. A taxa de sobrevivência de larvas foi de  $88,1 \pm 7,1$  % para o grupo controle, a maior taxa de sobrevivência de larvas encontrada para este grupo, desde a primeira incubação. Já para o grupo G2,5, a taxa de sobrevivência de larvas foi de  $51,8 \pm 28,0$  %, a menor taxa de sobrevivência de larvas encontrada para este grupo desde a primeira incubação no dia zero e, estatisticamente diferente ( $p=0,0088$ ) da taxa encontrada para o grupo controle, o que garante que houve uma atuação de piriproxifen sobre essa fase do ciclo, mesmo que de forma pontual. Dessa forma, a eficácia de piriproxifen sobre as larvas foi de 41,3 % para o grupo G2,5, a maior eficácia sobre larvas desde o início do estudo neste grupo. Pela primeira vez neste estudo, observou-se eficácia de piriproxifen sobre as larvas de *H. irritans* desenvolvidas em fezes provenientes dos animais do grupo G2,5.

A taxa de sobrevivência de larvas do grupo G40 foi de  $63,3 \pm 28,2$  %, uma das mais baixas para este grupo, mas sem diferenças significativas quando comparada entre os outros grupos do estudo. E a eficácia foi de 28,2 %, a segunda maior eficácia encontrada para este grupo experimental. Para o grupo G40, apesar de haver uma tendência de diminuição dos percentuais de sobrevivência, que faz com que os níveis de eficácia se elevem, e que começou a ser observado na segunda incubação após o tratamento, ainda não se pode observar eficácia significativa de piriproxifen sobre as larvas deste grupo.

Na última incubação (Dia + 13), os três grupos do estudo obtiveram uma média de larvas eclodidas superior a 50, assim como observado na incubação anterior, com médias bastante similares em todos os momentos experimentais. Os dados completos para a incubação referente ao dia + 10, encontram-se descritos na Tabela 10. No grupo controle, a taxa de sobrevivência de larvas foi de  $87,8 \pm 4,3$  %, no grupo G2,5 essa taxa foi de  $66,9 \pm 23,8$  % e no grupo G40 de  $77,0 \pm 18,3$  % e apesar de ter havido uma eficácia de 23,8 % da ação de piriproxifen sobre as larvas no grupo G2,5 e 12,2 % no grupo G40, não houve diferenças significativas ( $p=0,1753$ ) entre as taxas de sobrevivência entre os grupos, quando comparados entre si, como pode ser verificado na Tabela 10.

O tempo médio de desenvolvimento da larva de terceiro instar pode variar mas, sob temperatura média de  $26,7 \pm 2$  °C, o tempo médio tem sido de 71,04h, distribuídos de modo que a média de tempo do primeiro estágio é de 12,96h e a média de tempo do segundo estágio, de 26,10h. (GINGRICH; HOPKINS, 1977; SCHMIDT; HARRIS; HOFFMAN, 1967) na rotina de colônia de *H. irritans*, mantida sob a temperatura de  $26,5 \pm 2$  °C e umidade de 50 a 55 %, recolhem as pupas do substrato no oitavo dia após a oviposição, assim como realizado no presente estudo. Dessa forma, não deve haver larvas, vivas ou mortas, na superfície do substrato no dia da coleta de pupas.

No dia zero, não se encontrou larvas, vivas ou mortas, em nenhuma das amostras avaliadas. Porém, a partir da primeira incubação pós tratamento, no dia + 3, observou-se que os grupos G2,5 e G40 apresentaram larvas mortas ou que estavam vivas, porém movimentando-se vagarosamente (letárgicas), na superfície do substrato. No grupo G2,5, apenas um animal apresentou 5 larvas mortas na superfície do substrato, enquanto que no grupo G40, três animais apresentaram um somatório de 10 larvas mortas na superfície dos substratos. Mesmo assim, a eficácia de piriproxifen foi de apenas 10,7 % para o grupo G2,5 e de 12,9 % para o grupo G40, sem diferenças significativas entre os grupos.

**Tabela 7** - Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1 e R2) e somatório (R1+R2), taxa de sobrevivência de larvas, de pupas e de sobrevivência total, eficácia nos grupos tratados, médias e desvio padrão referentes à incubação de ovos de *Haematobia irritans* em fezes bovinas no terceiro dia de tratamento (Dia + 3) com piriproxifen por via oral.

Grupo	Id <sup>1</sup>	Larvas eclodidas			Pupas formadas			Adultos emergidos			Sobrevivência	Sobrevivência	Sobrevivência
		R1	R2	R1+R2	R1	R2	R1+R2	R1	R2	R1+R2	Larvas (%)	Pupas (%)	Total (%)
CONTROLE	314	14	20	34	8	13	21	8	13	21	61,8	100	61,8
	316	19	24	43	16	13	29	16	11	27	67,4	93,1	62,8
	337	29	26	55	28	20	48	25	19	44	87,3	91,7	80
	455	20	12	32	17	9	26	17	7	24	81,3	92,3	75
	500	23	30	53	24	20	44	22	17	39	83	88,6	73,6
	15002	20	21	41	16	16	32	16	16	32	78	100	78
	<b>Média</b>	<b>20,8</b>	<b>22,2</b>	<b>43,0</b>	<b>18,2</b>	<b>15,2</b>	<b>33,3</b>	<b>17,3</b>	<b>13,8</b>	<b>31,2</b>	<b>76,5 a</b>	<b>94,3 c</b>	<b>71,9 c</b>
	<b>Desvio</b>	<b>4,5</b>	<b>5,6</b>	<b>8,7</b>	<b>6,4</b>	<b>4,0</b>	<b>9,6</b>	<b>5,3</b>	<b>4,0</b>	<b>8,2</b>	<b>9</b>	<b>4,3</b>	<b>7,1</b>
G2,5 (2,5mg/animal)	471	15	28	43	11	20	31	2	2	4	72,1	12,9	9,3
	473	20	17	37	9	7	16	0	4	4	43,2	25	10,8
	474	28	19	47	20	14	34	11	1	12	72,3	35,3	25,5
	14013	29	25	54	29	20	49	10	2	12	90,7	24,5	22,2
	14014	22	24	46	18	15	33	4	1	5	71,7	15,2	10,9
	14033	22	20	42	12	13	25	1	0	1	59,5	4	2,4
	<b>Média</b>	<b>22,7</b>	<b>22,2</b>	<b>44,8</b>	<b>16,5</b>	<b>14,8</b>	<b>31,3</b>	<b>4,7</b>	<b>1,7</b>	<b>6,3</b>	<b>68,3 a</b>	<b>19,5 b</b>	<b>13,5 b</b>
	<b>Desvio</b>	<b>4,7</b>	<b>3,8</b>	<b>5,2</b>	<b>6,8</b>	<b>4,5</b>	<b>10,0</b>	<b>4,3</b>	<b>1,2</b>	<b>4,2</b>	<b>14,4</b>	<b>10,1</b>	<b>7,9</b>
<b>Eficácia</b>										<b>10,7</b>	<b>79,3</b>	<b>81,2</b>	
G40 (40mg/animal)	318	19	21	40	10	10	20	0	0	0	50	0	0
	339	25	23	48	18	16	34	0	0	0	70,8	0	0
	13005	30	26	56	25	19	44	0	0	0	78,6	0	0
	14023	25	28	53	7	15	22	0	0	0	41,5	0	0
	14034	25	23	48	25	20	45	0	0	0	93,8	0	0
	14037	20	23	43	8	20	28	0	0	0	65,1	0	0
	<b>Média</b>	<b>24,0</b>	<b>24,0</b>	<b>48,0</b>	<b>15,5</b>	<b>16,7</b>	<b>32,2</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>66,6 a</b>	<b>0,0 a</b>	<b>0,0 a</b>
	<b>Desvio</b>	<b>3,7</b>	<b>2,3</b>	<b>5,4</b>	<b>7,6</b>	<b>3,5</b>	<b>9,8</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>17,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Eficácia</b>										<b>12,9</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	

<sup>1</sup> Refere-se ao número de identificação individual dos animais.

Valores seguidos da mesma letra na coluna de sobrevivência não diferem significativamente entre si, com nível de significância de 5 % (p=0,5883, para sobrevivência de larvas; p=0,0025, entre GC e G2,5; p<0,0001, entre o GC e G40; p=0,0455, entre G2,5 e G40, para sobrevivência de pupas; p<0,0001, para sobrevivência total)

**Tabela 8** - Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1 e R2) e somatório (R1+R2), taxa de sobrevivência de larvas, de pupas e de sobrevivência total, eficácia nos grupos tratados, médias e desvio padrão referentes à incubação de ovos de *Haematobia irritans* em fezes bovinas no sexto dia de tratamento (Dia + 6) com piriproxifen por via oral.

Grupo	Id <sup>1</sup>	Larvas eclodidas			Pupas formadas			Adultos emergidos			Sobrevivência	Sobrevivência de	Sobrevivência
		R1	R2	R1+R2	R1	R2	R1+R2	R1	R2	R1+R2	Larvas (%)	Pupas (%)	Total (%)
CONTROLE	314	26	27	53	24	16	40	20	15	35	75,5	87,5	66
	316	24	28	52	0	23	23	0	21	21	44,2	91,3	40,4
	337	29	26	55	27	26	53	27	25	52	96,4	98,1	94,5
	455	24	24	48	20	17	37	20	17	37	77,1	100	77,1
	500	23	28	51	19	28	47	15	19	34	92,2	72,3	66,7
	15002	29	25	54	24	19	43	22	19	41	79,6	95,3	75,9
	<b>Média</b>	<b>25,8</b>	<b>26,3</b>	<b>52,2</b>	<b>19,0</b>	<b>21,5</b>	<b>40,5</b>	<b>17,3</b>	<b>19,3</b>	<b>36,7</b>	<b>77,5 a</b>	<b>90,8 c</b>	<b>70,1 b</b>
<b>Desvio</b>	<b>2,4</b>	<b>1,5</b>	<b>2,3</b>	<b>8,9</b>	<b>4,5</b>	<b>9,3</b>	<b>8,5</b>	<b>3,1</b>	<b>9,2</b>	<b>16,8</b>	<b>9,2</b>	<b>16,3</b>	
G2,5 (2,5mg/animal)	471	29	28	57	21	22	43	16	8	24	75,4	55,8	42,1
	473	27	30	57	9	8	17	1	1	2	29,8	11,8	3,5
	474	25	27	52	20	20	40	11	8	19	76,9	47,5	36,5
	14013	27	30	57	21	24	45	7	16	23	78,9	51,1	40,4
	14014	30	28	58	27	26	53	4	1	5	91,4	9,4	8,6
	14033	21	29	50	21	24	45	7	16	23	90	51,1	46
	<b>Média</b>	<b>26,5</b>	<b>28,7</b>	<b>55,2</b>	<b>19,8</b>	<b>20,7</b>	<b>40,5</b>	<b>7,7</b>	<b>8,3</b>	<b>16,0</b>	<b>73,8 a</b>	<b>37,8 b</b>	<b>29,5 a</b>
<b>Desvio</b>	<b>2,9</b>	<b>1,1</b>	<b>3,0</b>	<b>5,4</b>	<b>6,0</b>	<b>11,2</b>	<b>4,8</b>	<b>6,1</b>	<b>9,0</b>	<b>20,6</b>	<b>19,4</b>	<b>16,9</b>	
	<b>Eficácia</b>									<b>4,8</b>	<b>58,4</b>	<b>57,9</b>	
G40 (40mg/animal)	318	22	23	45	0	19	19	0	0	0	42,2	0	0
	339	28	24	52	20	16	36	0	0	0	69,2	0	0
	13005	17	19	36	4	0	4	0	0	0	11,1	0	0
	14023	25	23	48	20	18	38	0	0	0	79,2	0	0
	14034	23	25	48	14	14	28	2	0	2	58,3	7,1	4,2
	14037	26	29	55	8	6	14	0	0	0	25,5	0	0
	<b>Média</b>	<b>23,5</b>	<b>23,8</b>	<b>47,3</b>	<b>11,0</b>	<b>12,2</b>	<b>23,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>47,6 a</b>	<b>1,2 a</b>	<b>0,7 c</b>
<b>Desvio</b>	<b>3,5</b>	<b>3,0</b>	<b>6,0</b>	<b>7,6</b>	<b>6,9</b>	<b>12,1</b>	<b>0,7</b>	<b>0,0</b>	<b>0,7</b>	<b>23,9</b>	<b>2,7</b>	<b>1,6</b>	
	<b>Eficácia</b>									<b>38,6</b>	<b>98,7</b>	<b>99</b>	

<sup>1</sup> Refere-se ao número de identificação individual dos animais.

Valores seguidos da mesma letra na coluna de sobrevivência não diferem significativamente entre si, com nível de significância de 5 % (p=0,0646, para sobrevivência de larvas; p<0,0001, para sobrevivência de pupas; p<0,0001, entre GC e G2,5 e entre GC e G40 e p=0,0012, entre G2,5 e G40, para sobrevivência total)

**Tabela 9** – Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1 e R2) e somatório (R1+R2), taxa de sobrevivência de larvas, de pupas e sobrevivência total, eficácia nos grupos tratados, médias e desvio padrão referentes à incubação de ovos de *Haematobia irritans* em fezes bovinas no décimo dia de tratamento (Dia + 10) com piriproxifen por via oral.

Grupo	Id <sup>1</sup>	Larvas eclodidas			Pupas formadas			Adultos emergidos			Sobrevivência	Sobrevivência	Sobrevivência
		R1	R2	R1+R2	R1	R2	R1+R2	R1	R2	R1+R2	Larvas (%)	Pupas (%)	Total (%)
CONTROLE	314	21	24	45	19	23	42	17	17	34	93,3	81	75,6
	316	24	22	46	19	15	34	19	15	34	73,9	100	73,9
	337	24	28	52	20	27	47	18	22	40	90,4	85,1	76,9
	455	22	28	50	21	25	46	20	18	38	92	82,6	76
	500	30	22	52	28	16	44	26	13	39	84,6	88,6	75
	15002	28	28	56	27	26	53	25	25	50	94,6	94,3	89,3
	<b>Média</b>	<b>24,8</b>	<b>25,3</b>	<b>50,2</b>	<b>22,3</b>	<b>22,0</b>	<b>44,3</b>	<b>20,8</b>	<b>18,3</b>	<b>39,2</b>	<b>88,1 b</b>	<b>88,6 c</b>	<b>77,8 b</b>
	<b>Desvio</b>	<b>3,2</b>	<b>2,7</b>	<b>3,8</b>	<b>3,7</b>	<b>4,8</b>	<b>5,7</b>	<b>3,4</b>	<b>4,1</b>	<b>5,4</b>	<b>7,1</b>	<b>6,7</b>	<b>5,2</b>
G2,5 (2,5mg/animal)	471	28	26	54	25	21	46	16	8	24	85,2	52,2	44,4
	473	28	27	55	4	7	11	2	2	4	20	36,4	7,3
	474	22	25	47	10	15	25	8	7	15	53,2	60	31,9
	14013	27	29	56	22	23	45	3	4	7	80,4	15,6	12,5
	14014	23	23	46	14	14	28	2	3	5	60,9	17,9	10,9
	14033	28	27	55	2	4	6	0	0	0	10,9	0	0
	<b>Média</b>	<b>26,0</b>	<b>26,2</b>	<b>52,2</b>	<b>12,8</b>	<b>14,0</b>	<b>26,8</b>	<b>5,2</b>	<b>4,0</b>	<b>9,2</b>	<b>51,8 a</b>	<b>30,3 b</b>	<b>17,8 a</b>
	<b>Desvio</b>	<b>2,5</b>	<b>1,9</b>	<b>4,1</b>	<b>8,5</b>	<b>6,8</b>	<b>15,2</b>	<b>5,4</b>	<b>2,8</b>	<b>8,0</b>	<b>28</b>	<b>21,2</b>	<b>15,3</b>
<b>Eficácia</b>										<b>41,3</b>	<b>65,8</b>	<b>77,1</b>	
G40 (40mg/animal)	318	29	27	56	8	6	14	0	0	0	25	0	0
	339	26	27	53	12	17	29	0	0	0	54,7	0	0
	13005	21	25	46	18	21	39	0	0	0	84,8	0	0
	14023	21	22	43	16	9	25	1	0	1	58,1	4	2,3
	14034	28	27	55	21	22	43	0	0	0	78,2	0	0
	14037	23	29	52	18	23	41	0	0	0	78,8	0	0
	<b>Média</b>	<b>24,7</b>	<b>26,2</b>	<b>50,8</b>	<b>15,5</b>	<b>16,3</b>	<b>31,8</b>	<b>0,2</b>	<b>0,0</b>	<b>0,2</b>	<b>63,3 ab</b>	<b>0,7 a</b>	<b>0,4 c</b>
	<b>Desvio</b>	<b>3,2</b>	<b>2,2</b>	<b>4,7</b>	<b>4,3</b>	<b>6,6</b>	<b>10,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,0</b>	<b>0,4</b>	<b>20,4</b>	<b>1,5</b>	<b>0,9</b>
<b>Eficácia</b>										<b>28,2</b>	<b>99,2</b>	<b>99,5</b>	

<sup>1</sup> Refere-se ao número de identificação individual dos animais.

Valores seguidos da mesma letra na coluna de sobrevivência não diferem significativamente entre si, com nível de significância de 5 % (p=0,0088, para sobrevivência de larvas; p<0,0001, para sobrevivência de pupas; p<0,0001, entre GC e G2,5 e entre GC e G40 e p=0,0118, entre G2,5 e G40, para sobrevivência total)



Na segunda incubação pós tratamento, no dia + 6, o grupo G2,5 apresentou 12 larvas mortas e 13 larvas vivas e letárgicas distribuídas entre 3 animais e no grupo G40, cinco animais apresentaram um somatório de 2 larvas mortas e cinco larvas vivas e letárgicas.

Na terceira incubação após o tratamento, no dia + 10, os números de larvas encontradas aumentaram e no grupo G2,5, um total de cinco animais apresentaram um somatório de 47 larvas mortas e 5 larvas vivas e letárgicas na superfície dos substratos. Já no grupo G40, dois animais apresentaram um somatório de 14 larvas mortas e 5 larvas vivas sobre os substratos. Na última incubação, quatro animais do grupo G2,5 apresentaram um total de 14 larvas mortas e 17 larvas vivas e letárgicas e o grupo 40, também teve quatro animais apresentando um total de 13 larvas mortas e 3 larvas vivas letárgicas na superfície do substrato. As larvas que ainda estavam vivas, eram grandes, rastejavam sobre o substrato de forma bastante lenta e possuíam coloração amarelada, opaca.

Na Figura 9, pode-se observar, comparativamente, larvas de terceiro estágio de coloração transparente, comumente encontradas bastante ativas no momento da verificação de eclodibilidade, realizada 48 horas após a incubação dos ovos. Porém, no dia da coleta de pupas, oitavo dia após a incubação dos ovos, foram encontradas larvas vivas, letárgicas, de coloração amarelada opaca, no momento em que não se costuma encontrar larvas no material, somente pupas.



**Figura 9** – (A) Larvas de terceiro estágio (L3) de *H. irritans*, transparentes, encontradas frequentemente no momento da verificação de eclodibilidade; (B) Larvas que não se transformaram em pupa, de coloração amarelada, algumas vivas e letárgicas, outras mortas.

Stall (1975) chamou atenção para o fato de que algumas espécies, em resposta aos IGR's, produzem formas extra larvais e ninfais, podendo tornar-se gigantes, mas com formas quase perfeitas em uma escala intermediária entre forma imatura e adulta. O autor salienta ainda que as larvas, quando expostas aos análogos do hormônio juvenil, teriam maior sensibilidade para inibição da metamorfose no último estágio larval ou ninfal e a pupa, em holometabólicos. Estes, em especial, parecem possuir uma grande habilidade para compensar suas super larvas através de uma rediferenciação mais extensa e com capacidade variável para postergar temporariamente a pupação quando expostas ao hormônio juvenil.

**Tabela 10** - Número de larvas eclodidas, pupas formadas e adultos emergidos em cada repetição (R1 e R2) e somatório (R1+R2), taxa de sobrevivência de larvas, de pupas e de sobrevivência total, eficácia nos grupos tratados, médias e desvio padrão referentes à incubação de ovos de *Haematobia irritans* em fezes bovinas no primeiro dia após o término do tratamento (Dia + 13) com piriproxifen por via oral.

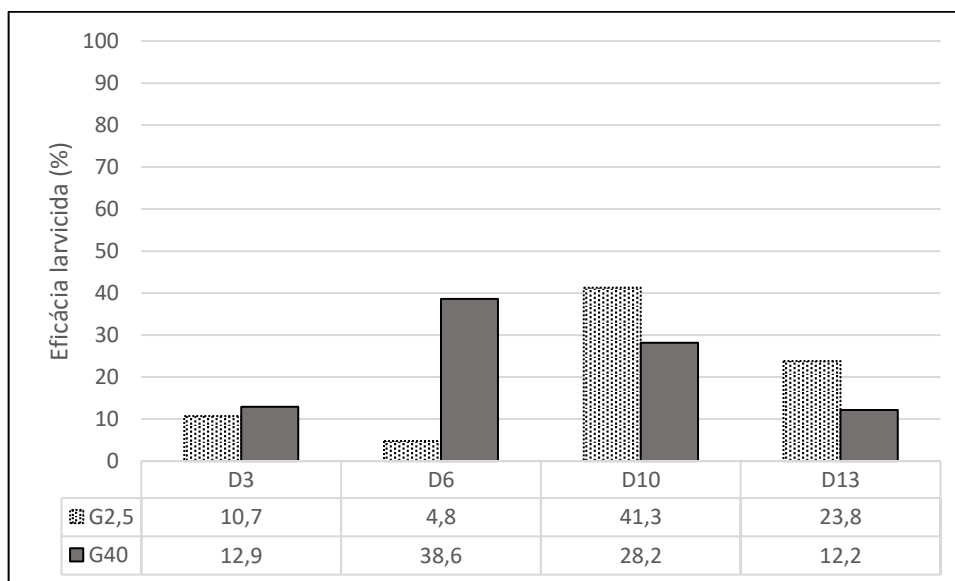
Grupo	Id <sup>1</sup>	Larvas eclodidas			Pupas formadas			Adultos emergidos			Sobrevivência	Sobrevivência	Sobrevivência
		R1	R2	R1+R2	R1	R2	R1+R2	R1	R2	R1+R2	Larvas (%)	Pupas (%)	Total (%)
CONTROLE	314	24	27	51	24	18	42	22	17	39	82,4	92,9	76,5
	316	24	29	53	21	24	45	25	16	41	84,9	91,1	77,4
	337	24	27	51	20	24	44	18	23	41	86,3	93,2	80,4
	455	26	28	54	24	26	50	24	23	47	92,6	94	87
	500	28	26	54	27	24	51	25	16	41	94,4	80,4	75,9
	15002	22	28	50	18	25	43	15	11	26	86	60,5	52
	<b>Média</b>	<b>24,7</b>	<b>27,5</b>	<b>52,2</b>	<b>22,3</b>	<b>23,5</b>	<b>45,8</b>	<b>21,5</b>	<b>17,7</b>	<b>39,2</b>	<b>87,8 a</b>	<b>85,3 b</b>	<b>74,9 b</b>
<b>Desvio</b>	<b>1,9</b>	<b>1,0</b>	<b>1,6</b>	<b>3,0</b>	<b>2,6</b>	<b>3,4</b>	<b>3,8</b>	<b>4,2</b>	<b>6,4</b>	<b>4,3</b>	<b>12</b>	<b>10,9</b>	
G2,5 (2,5mg/animal)	471	30	28	58	16	29	45	1	9	10	77,6	22,2	17,2
	473	29	29	58	15	9	24	0	0	0	41,4	0	0
	474	27	30	57	22	25	47	5	2	7	82,5	14,9	12,3
	14013	30	16	46	27	14	41	8	2	10	89,1	24,4	21,7
	14014	25	23	48	22	18	40	11	5	16	83,3	40	33,3
	14033	28	27	55	8	7	15	0	0	0	27,3	0	0
	<b>Média</b>	<b>28,2</b>	<b>25,5</b>	<b>53,7</b>	<b>18,3</b>	<b>17,0</b>	<b>35,3</b>	<b>4,2</b>	<b>3,0</b>	<b>7,2</b>	<b>66,9 a</b>	<b>16,9 a</b>	<b>14,1 a</b>
	<b>Desvio</b>	<b>1,8</b>	<b>4,8</b>	<b>4,9</b>	<b>6,1</b>	<b>8,0</b>	<b>11,7</b>	<b>4,2</b>	<b>3,2</b>	<b>5,7</b>	<b>23,6</b>	<b>14,1</b>	<b>11,8</b>
<b>Eficácia</b>										<b>23,8</b>	<b>80,2</b>	<b>81,2</b>	
G40 (40mg/animal)	318	20	24	44	17	0	17	0	0	0	38,6	0	0
	339	30	26	56	27	22	49	0	0	0	87,5	0	0
	13005	26	21	47	21	16	37	0	0	0	78,7	0	0
	14023	30	25	55	28	20	48	0	0	0	87,3	0	0
	14034	29	27	56	27	26	53	0	0	0	94,6	0	0
	14037	27	26	53	22	18	40	0	0	0	75,5	0	0
	<b>Média</b>	<b>27,0</b>	<b>24,8</b>	<b>51,8</b>	<b>23,7</b>	<b>17,0</b>	<b>40,7</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>77,0 a</b>	<b>0 a</b>	<b>0a</b>
<b>Desvio</b>	<b>3,5</b>	<b>2,0</b>	<b>4,7</b>	<b>4,0</b>	<b>8,2</b>	<b>11,9</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>18,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>Eficácia</b>										<b>12,2</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	

<sup>1</sup> Refere-se ao número de identificação individual dos animais.

Valores seguidos da mesma letra na coluna de sobrevivência não diferem significativamente entre si, com nível de significância de 5 % (p=0,1753, para sobrevivência de larvas; p<0,0001, entre GC e G2,5 e entre GC e G40 e p=0,0139, entre G2,5 e G40, para sobrevivência de pupas; p<0,0001, entre GC e G2,5 e entre GC e G40, para sobrevivência total)

Assim, eficácia larvicida de piriproxifen para as formas imaturas de *H. irritans* estão expressas na Figura 10, onde pode-se observar que o grupo G2,5 apresentou uma eficácia larvicida máxima pontual no décimo dia de tratamento, ratificada pela diferença significativa apresentada entre a taxa de sobrevivência de larvas deste grupo quando comparada à do grupo controle porém, nos outros momentos, a eficácia larvicida máxima encontrada foi de 23,8 %, no último dia de incubação, sem que houvesse diferença significativa entre os percentuais de sobrevivência entre os grupos. Enquanto que o grupo G40 apresentou eficácia máxima de 38,6 % sobre as larvas incubadas no material fecal do sexto dia de tratamento, sem que tivesse havido diferença significativa entre os percentuais de sobrevivência deste grupo, quando comparado aos outros nos mesmos momentos durante todo o estudo.

Sendo assim, a partir dos resultados encontrados para a sobrevivência das larvas, comparativamente aos resultados encontrados no teste *in vitro* para a determinação das doses letais, juntamente com a escassez de dados disponíveis na literatura, pode-se dizer que houve ação de piriproxifen sobre as larvas de *H. irritans* durante todo o estudo, mesmo com a baixa eficácia larvicida observada em quase todos os momentos, uma vez que as larvas de *H. irritans* encontradas sobre o substrato, no dia da separação de pupas, manifestaram um comportamento semelhante ao de muda extra larval provavelmente induzido por piriproxifen, assim como o observado em larvas expostas aos análogos do hormônio juvenil. Ou seja, embora de modo bastante sutil, houve influência de piriproxifen sobre as larvas de *H. irritans*, comprovada apenas no décimo dia de estudo e somente para o grupo G2,5. A presença de larvas mortas em quantidades variáveis entre os grupos, também sugere ação de piriproxifen, já que isso não ocorreu no teste *in vitro* para determinação das doses letais, para nenhuma das concentrações avaliadas.



**Figura 10** – Percentuais de eficácia de piriproxifen em larvas de *Haematobia irritans* em teste *in vivo* a partir de ovos que foram inoculados em fezes de bovinos medicados ou não, com diferentes dosagens diárias de piriproxifen. O G2,5 corresponde ao grupo medicado com 2,5mg de piriproxifen; O G40 corresponde ao grupo medicado com 40mg de piriproxifen; grupo controle mantido sem tratamento.

Após a avaliação das larvas de *H. irritans*, procedeu-se àquelas relacionadas à formação e sobrevivência de pupas. Os dados completos de incubação para o dia zero estão dispostos na Tabela 5.

Na incubação antes do tratamento, a média de pupas formadas variou de  $30,8 \pm 7,6$  a  $36,2 \pm 7,9$  entre os grupos, com uma taxa de sobrevivência, que corresponde ao número médio de pupas que completaram o ciclo e emergiram como adultos, de  $86,0 \pm 4,9$  % para o grupo controle com média correspondente de  $28,3 \pm 4,5$  adultos emergidos,  $78,0 \pm 17,6$  % para o grupo G2,5, com uma média de  $29,2 \pm 10,8$  adultos recuperados e  $94,2 \pm 3,9$  % para o grupo G40, com média de  $28,8 \pm 6,5$  adultos, sem diferença significativa ( $p=0,8738$ ) entre as taxas de sobrevivência de pupas dos grupos, com um intervalo de mortalidade oscilando entre  $6,5 \pm 3,9$  % e  $19,4 \pm 17,6$  % que pode ser visto na Tabela 5.

Mochi (2009) em estudo com fungos entomopatogênicos utilizados no controle de *H. irritans*, observou uma taxa de mortalidade média de pupas formadas *in vitro*, em fezes o grupo controle, variando de 11,7 a 14,1 %, valores próximos aos encontrados neste estudo para as pupas.

No dia + 3, cujos dados completos podem ser observados na Tabela 7, observou-se que o processo de formação de pupas ocorreu em todos os grupos experimentais, com uma média de  $33,3 \pm 9,6$  pupas formadas no grupo controle, cuja taxa média de sobrevivência foi de  $94,3 \pm 4,3$  %, resultando em uma média de  $31,2 \pm 8,2$  adultos emergidos. No grupo G2,5, uma média de  $31,3 \pm 10,0$  pupas foram formadas, número bastante similar ao de pupas formadas no grupo controle, porém, a taxa média de sobrevivência dessas pupas foi de apenas  $19,5 \pm 10,1$  %, diferente significativamente ( $p=0,0025$ ) das taxas médias de sobrevivência das pupas do grupo controle. No grupo G40, apesar da média de  $32,2 \pm 9,8$  pupas formadas, comportamento bastante similar aos dos outros grupos, a taxa de sobrevivência foi de 0 %, ou seja, não houve emergência de adultos e foi estatisticamente bastante diferente quando comparada à taxa de sobrevivência do grupo controle ( $p<0,0001$ ) e, apesar de também ter diferido estatisticamente da taxa de sobrevivência do grupo G2,5 ( $p=0,0455$ ), percebe-se que essa diferença foi bem menos acentuada, pois, enquanto que, no grupo controle houve a emergência média de  $31,2 \pm 8,2$  adultos, no grupo G2,5 essa média foi de apenas  $6,3 \pm 4,2$  adultos, como pode ser verificado na Tabela 7.

Traçando um comparativo entre os percentuais de mortalidade de pupas, houve apenas  $6,5 \pm 4,3$  % de mortalidade no grupo controle, enquanto que nos grupos G2,5 e G40, a taxa média de mortalidade foi de  $79,8 \pm 10,1$  % e  $100,0$  %, respectivamente. Com uma eficácia de ação de 79,3 % sobre as pupas do grupo G2,5 e de 100,0 % sobre as pupas do grupo G40, pode-se, de forma pioneira, demonstrar os efeitos de piriproxifen administrado por via oral em bovinos sobre a fase de pupa de *H. irritans*, ocasionando morte e, conseqüentemente, a inibição da emergência de adultos, observados já no terceiro dia após o início do tratamento por via oral e, notoriamente, de forma dose dependente.

No sexto dia de tratamento com piriproxifen, observou-se novamente a formação de pupas em todos os grupos experimentais, porém, dessa vez, com uma média menor de pupas formadas no grupo G40, que foi de  $23,2 \pm 12$  pupas e deveu-se à menor taxa de sobrevivência de larvas desse grupo neste dia experimental, enquanto que nos grupos controle e G2,5, uma média semelhante de  $40,5 \pm 9,3$  e  $40,5 \pm 11,2$  pupas, respectivamente foram formadas. Com isso, as taxas médias de sobrevivência de pupas foram de  $90,8 \pm 9,2$  % para o grupo controle, com a recuperação média de  $36,7 \pm 9,2$  adultos;  $37,8 \pm 19,4$  % para o grupo G2,5, com a emergência de  $16 \pm 9,0$  adultos e apenas  $1,2 \pm 2,7$  % para o grupo G40, por ter havido a emergência de 2 adultos de um total de 48 larvas eclodidas provenientes das fezes do animal 14034, com diferenças significativas em todas as comparações ( $p<0,0001$ ) como pode ser observado na Tabela 8.

Uma eficácia de piriproxifen na sobrevivência das pupas de 58,4 % para o grupo G2,5 e 98,7 %, para o grupo G40, comportamento semelhante ao encontrado na primeira incubação após o terceiro dia do início deste estudo e que reforça os achados referentes aos efeitos de

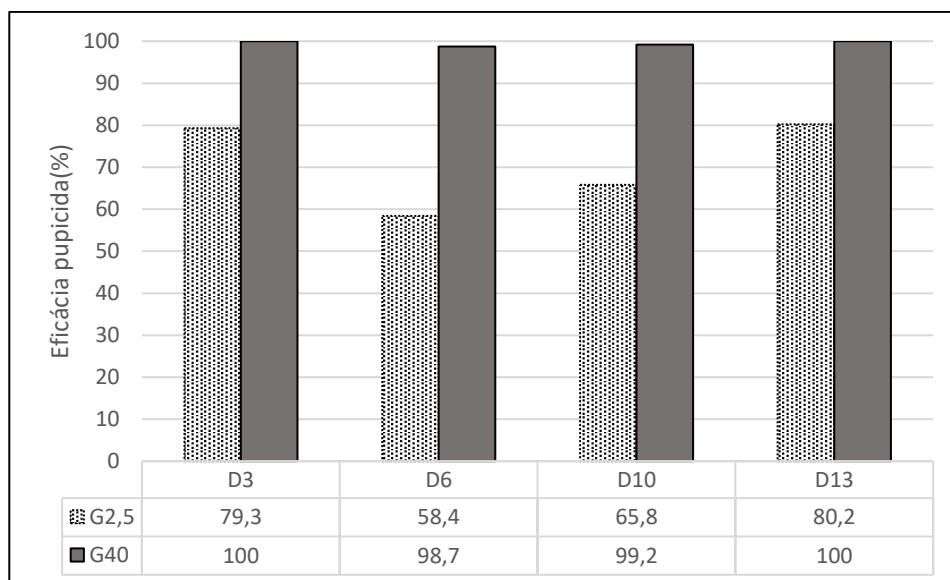
piriproxifen evidenciados na fase de pupa, causando mortalidade e influenciando diretamente na emergência de adultos.

No dia + 10, cujos dados completos podem ser avaliados na Tabela 9, verificou-se que as médias de formação de pupas encontradas para cada grupo foram bastante parecidas às aquelas encontradas em momentos anteriores, com o grupo controle obtendo média de  $44,3 \pm 5,7$  pupas, taxa média de sobrevivência de  $88,6 \pm 6,7$  % e emergência de  $39,2 \pm 5,4$  adultos, seguido do grupo G2,5, que obteve uma média de  $26,8 \pm 15,2$  pupas formadas, percentual menor devido à uma mortalidade maior de larvas neste dia, taxa de sobrevivência de pupas de  $30,3 \pm 21,2$  % e apenas  $9,2 \pm 8,0$  adultos emergidos e o grupo G40, com média de  $31,8 \pm 10,3$  pupas formadas, taxa de sobrevivência de pupas de apenas  $0,7 \pm 1,5$  %, com a emergência de um único adulto proveniente da incubação das fezes do animal 14023. Observou-se mais uma vez que, mesmo com uma elevada formação de pupas nos grupos de tratamento, que pode ser verificado na Tabela 9, a taxa de sobrevivência destas diferiu significativamente ( $p < 0,001$ ) entre todos os grupos do estudo. Com isso, mais uma vez pode-se verificar que houve eficácia de piriproxifen manifestada sobre as pupas dos grupos tratados, dessa vez de 65,8 % para o grupo G2,5 e 99,2 %, para o grupo G40.

No dia + 13, último dia de incubação, assim como uma média de  $45,8 \pm 3,4$  pupas foram formadas no grupo controle, com um percentual médio de  $85,3 \pm 12,0$  % de sobrevivência, resultando em uma média de  $39,2 \pm 6,4$  adultos emergidos. No grupo G2,5, uma média de  $35,3 \pm 11,7$  pupas foram formadas, porém, com apenas  $16,9 \pm 14,1$  % de sobrevivência, ou seja, média de apenas  $7,2 \pm 5,7$  adultos emergidos. No grupo G40, houve média de  $40,7 \pm 11,9$  pupas formadas com 0 % de sobrevivência de pupas, e consequentemente, sem emergência de adultos, conforme pode ser observado na Tabela 10. Assim, a eficácia de piriproxifen sobre as pupas de *H. irritans* foi de 80,2 % para o grupo G2,5 e 100,0 % para o grupo G40 e pela primeira vez, houve diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) na sobrevivência de pupas entre os grupos de tratamento comparativamente ao grupo controle, mas não houve diferença significativa ( $p = 0,0139$ ) entre os grupos de G2,5 e G40. Sendo assim, diante de efeitos tão expressivos de piriproxifen exibidos sobre as pupas de *H. irritans*, pode-se dizer que a eficácia de piriproxifen sobre as pupas, variou de 58,4 a 80,2 % no grupo G2,5 e, de 98,7 a 100,0 %, conforme pode ser observado na Figura 11. Gingrich e Hopkins (1977) encontraram uma emergência de *H. irritans* variando de 85 a 100 % no grupo controle a partir de pupas formadas, assim como encontrados no presente estudo para o grupo controle.

Bull e Meola (1993) testaram os efeitos de piriproxifen sobre as larvas de *H. irritans* e puderam observar, de forma bem menos detalhada, que piriproxifen exibiu excelente atividade quando incorporado ao substrato larval, onde o principal efeito observado foi de redução na emergência de adultos, mas a ausência de informações sobre percentuais de sobrevivência entre as fases do ciclo de vida de *H. irritans* impossibilitaram-nos de saber e comparar em que momento o efeito inibitório na emergência de adultos ocorreu, se ainda na fase de larva ou, assim como no presente estudo, na fase de pupas.

O comportamento das pupas deste estudo em presença de piriproxifen assemelha-se também em estudo para avaliação *in vitro* dos estágios de *H. irritans* susceptíveis ao metoprene, inseticida IGR igualmente pertencente à classe dos análogos do hormônio juvenil, onde Gingrich e Hopkins (1977) utilizaram uma solução acetônica contendo 0,2ppm (equivalente à 200ppb) de metoprene em fezes bovinas. Larvas provenientes de fezes sem tratamento foram recuperadas e, diariamente, coletadas e colocadas em fezes tratadas no 1 °, 2 °, 3 ° e 4 ° dias e, a partir do 5 ° dia, seguindo o ciclo de vida natural de *H. irritans*, utilizaram as pupas formadas. O contrário também foi feito, colocando larvas provenientes de fezes tratadas nas fezes não tratadas.



**Figura 11** – Percentuais de eficácia de piriproxifen em pupas de *Haematobia irritans* em teste *in vivo* a partir de ovos que foram inoculados em fezes de bovinos medicados ou não, com diferentes dosagens diárias de piriproxifen. O G2,5 corresponde ao grupo medicado com 2,5mg de piriproxifen; O G40 corresponde ao grupo medicado com 40mg de piriproxifen; grupo controle mantido sem tratamento.

Então, observou-se que, quando a larva foi transferida em qualquer dia de desenvolvimento para as fezes tratadas com metoprene, a emergência de adultos foi totalmente inibida. Entretanto quando foi transferida na fase de pupa, não houve efeito na emergência de adultos. Em outra observação, quando as larvas foram transferidas para as fezes sem tratamento no primeiro e no segundo dia, a emergência de adultos foi considerada alta (83 a 100 %), enquanto que, quando transferidas no terceiro dia, houve inibição da emergência de 94,5 % e, no quarto dia, essa inibição foi de 100,0 %. Pode-se então, afirmar que metoprene atuou afetando o desenvolvimento da mosca-dos-chifres nos terceiros e quartos dias de desenvolvimento larval, ou seja, nas larvas de terceiro instar. A partir disso, poder-se-ia também sugerir que piriproxifen atuasse de forma similar ao metoprene, sobre as larvas de terceiro estágio, porém, por mais que os resultados sejam semelhantes aos do presente estudo em outros aspectos, outros estudos deverão ser conduzidos nessa direção, para saber realmente se esse comportamento se repete de modo idêntico em larvas tratadas com piriproxifen.

Em outro estudo, dessa vez com larvas de *M. domestica*, avaliou-se os efeitos de piriproxifen em concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5mg/L, adicionando-o ao meio larval e pode-se observar que os efeitos para as larvas de 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> instares expostas ao piriproxifen foram a inibição da emergência de adultos variando de 97 a 100 % contra apenas 8,5 a 18 % de falha da emergência de adultos no grupo controle (SULAIMAN; MUSTAFFA; JEFFERY, 2008). Apesar do estudo ter sido realizado em larvas de *Musca domestica* e não em larvas de *H. irritans*, ambas pertencem à Família Muscidae e, conseqüentemente, espera-se um padrão de comportamento semelhante, com sutis diferenças entre as famílias em resposta a inseticidas, como parece ter ocorrido no presente estudo comparativamente a este, em que houve excelente atividade de inibição da emergência de adultos.

Em última análise, observou-se a taxa média de sobrevivência total, representada pelo percentual de adultos que emergiram a partir de larvas eclodidas e a eficácia total de piriproxifen sobre as formas imaturas de *H. irritans*. Os dados completos referentes à incubação para o dia zero podem ser observados na Tabela 5. Na incubação antes do tratamento, observou-se uma

média de sobrevivência total de  $57,5 \pm 7,7$  % para o grupo controle,  $60,1 \pm 22,0$  % para o grupo G2,5 e  $73,9 \pm 11,3$  % para o grupo G40, sem diferenças significativas ( $p=0,1992$ ) entre os grupos de estudo, e similares à média encontrada por Lima et al. (2014), que foi de 76,7 % de moscas emergidas em estudo de avaliação do ciclo de vida de *H. irritans in vitro*.

No dia + 3, primeira incubação após tratamento, encontrou-se um percentual de sobrevivência total de  $71,9 \pm 7,1$  % no grupo controle, apenas  $13,5 \pm 7,9$  % no grupo G2,5 e 0 % no grupo G40, com diferenças significativas ( $p<0,0001$ ) entre todos os grupos, quando comparados entre si e que podem ser observados na Tabela 7. A eficácia total de piriproxifen no controle das formas imaturas de *H. irritans* foi de 81,2 % para o grupo G2,5 e 100,0 % para o grupo G40, excelentes percentuais já no terceiro dia de administração de piriproxifen por via oral. Esses resultados comprovam também a viabilidade do raciocínio que foi utilizado para definir de que forma piriproxifen seria administrado por via oral e a partir de que momento estaria plenamente disponível nas fezes, uma vez que, segundo Colucci et al. (1982) o tempo de passagem total da digesta de bovinos, a depender da quantidade consumida e da qualidade da forragem oferecida ao animal, varia de 43,3 a 79,7 horas. Dessa forma, 72 horas após o início do tratamento, ratificado pelos resultados encontrados para os grupos tratados, piriproxifen já se encontrava disponível em concentração adequada a oferecer um controle efetivo contra as formas imaturas de *H. irritans* nas fezes.

No dia + 6, uma taxa média de sobrevivência total de  $70,1 \pm 16,3$  % para o grupo controle; já no grupo G2,5, uma taxa média de apenas  $29,5 \pm 16,9$  % foi encontrada e, o grupo G40 obteve uma taxa de sobrevivência total de  $0,7 \pm 1,6$  %, que pode ser visualizada na Tabela 8. A eficácia total foi de 57,9 % para o grupo G2,5 e de 99,0 % para o grupo G40, valores próximos aos alcançados na incubação anterior e que fortalecem a atividade de piriproxifen na inibição da emergência de adultos.

No dia + 10 procedeu-se à terceira incubação, onde uma taxa de sobrevivência total de  $77,8 \pm 5,2$  % foi alcançada no grupo controle,  $17,8 \pm 15,3$  % para o grupo G2,5 e apenas  $0,4 \pm 0,9$  % para o grupo G40, que podem ser verificadas na Tabela 9. Nesse momento, a eficácia de piriproxifen desde larva até adulto foi de 77,1 % para o grupo 2,5 e de 99,5 % para o grupo G40.

No último desafio, dia + 13, a taxa de sobrevivência total foi de  $74,9 \pm 10,9$  % para o grupo controle, apenas  $14,1 \pm 11,8$  % para o grupo G2,5 e 0 % para o grupo G40, com diferença significativa ( $p<0,0001$ ) somente entre os grupos de tratamento, comparativamente ao grupo controle e que podem ser vistas na Tabela 10.

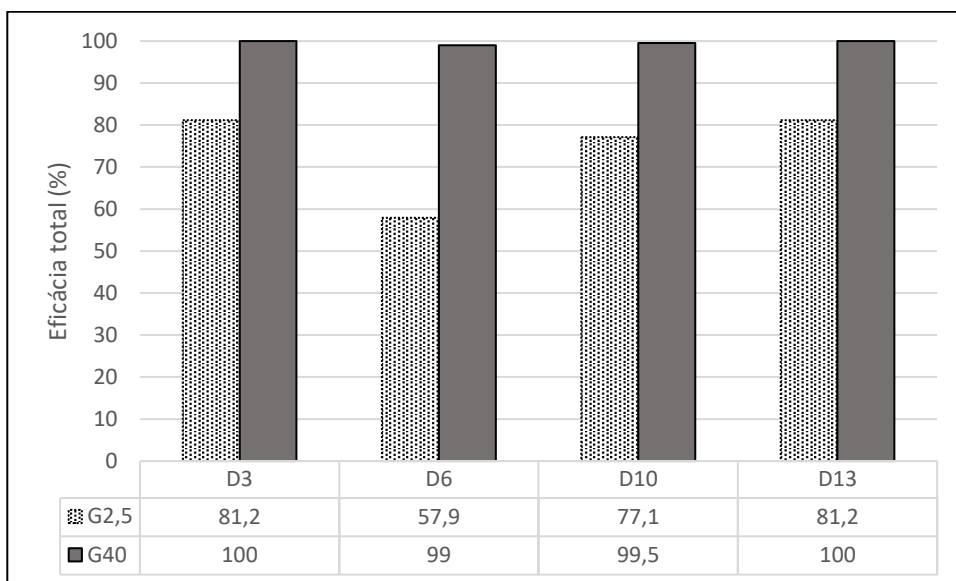
Assim, eficácia total de piriproxifen contabilizada desde larva até a emergência de adultos foi de 81,2 % para o grupo G2,5 e 100,0 % para o grupo G40, percentual semelhante ao encontrado na primeira incubação após o tratamento.

Sendo assim, piriproxifen exibiu uma eficácia total no controle das formas imaturas de *H. irritans* que variou de 57,9 a 81,2 % no grupo G2,5 e de 99,0 a 100,0 % no grupo G40 durante todo o estudo, que pode ser apreciada na Figura 12.

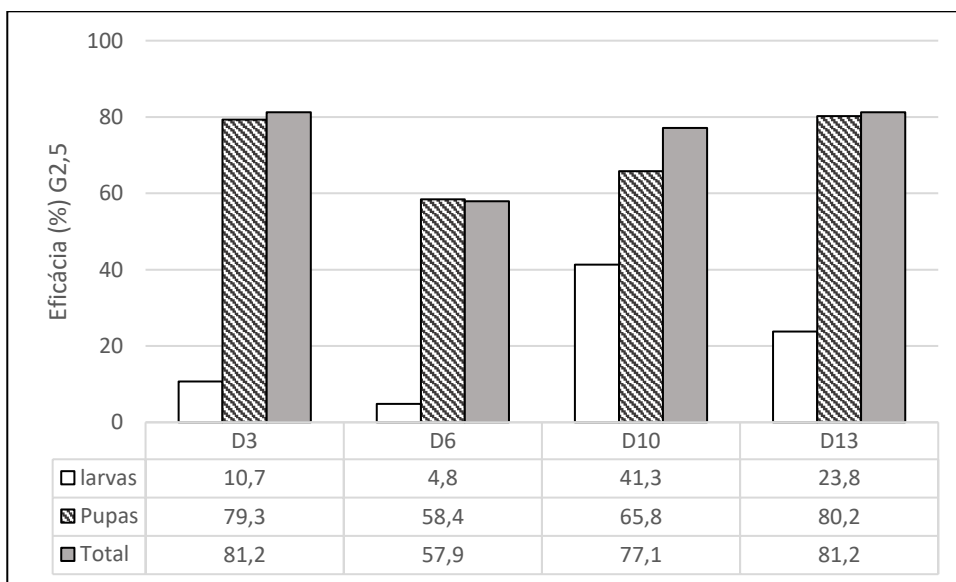
A comparação da eficácia do tratamento por via oral com piriproxifen em cada etapa do ciclo de vida de *H. irritans* pode ser melhor observado nas Figuras 13 e 14, para o G2,5 e o G40, respectivamente.

Durante toda a execução do estudo, a taxa média de sobrevivência total do grupo controle se comportou de forma homogênea e similar aos percentuais encontrados por vários autores. Kunz (1989) em estudo realizado afim de comparar novas dietas à dieta padrão oferecida em colônia de *H. irritans*, onde observou-se uma emergência de adultos variando de 76,7 a 77,9 %, sem diferenças significativas relacionadas às diferentes dietas fornecidas. Bay e Harris (1978) também desenvolveram o ciclo de vida de *H. irritans* em pequena escala em laboratório e encontraram um percentual de emergência de adultos de 67 a 75 %. Sahagún et al. (2005) em estudo de avaliação da susceptibilidade de estágios biológicos de *H. irritans* à

fungos entomopatogênicos encontraram 72 % de emergência de adultos para o grupo controle do estudo.

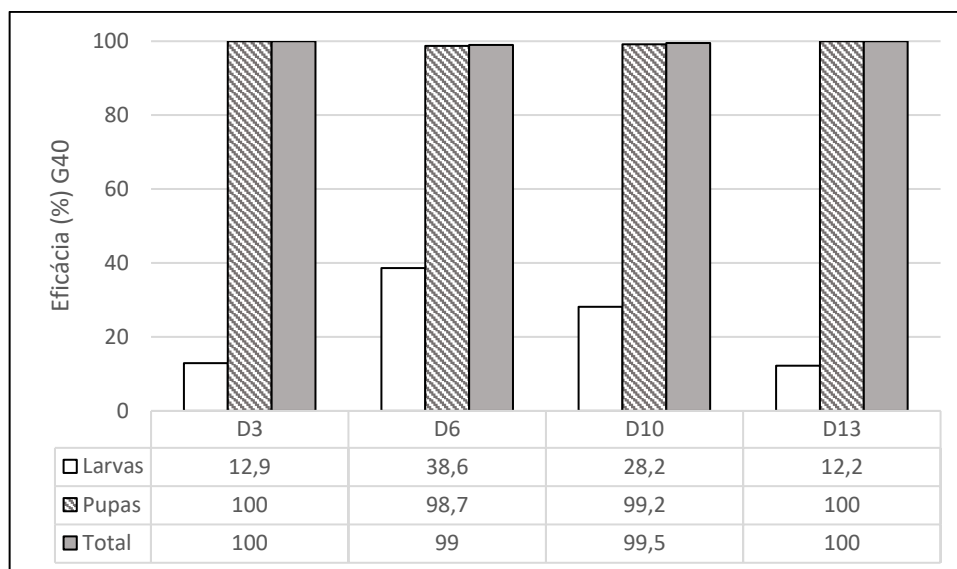


**Figura 12** – Percentuais de eficácia total de piriproxifen dos grupos G2,5 e G40, ao longo do tempo, em teste *in vivo* a partir de ovos de *Haematobia irritans* que foram inoculados em fezes de bovinos medicadas ou não, com diferentes dosagens diárias de piriproxifen. O G2,5 corresponde ao grupo medicado com 2,5mg de piriproxifen; O G40 corresponde ao grupo medicado com 40mg de piriproxifen; grupo controle mantido sem tratamento.



**Figura 13** – Percentuais de eficácia de piriproxifen do grupo G2,5, ao longo do tempo, sobre larvas e pupas de *Haematobia irritans* em teste *in vivo*, a partir de ovos que foram inoculados em fezes de bovinos medicadas com a dosagem diária de 2,5mg/animal.





**Figura 14** - Percentuais de eficácia de piriproxifen do grupo G40, ao longo do tempo, sobre larvas e pupas de *Haematobia irritans* em teste *in vivo*, a partir de ovos que foram inoculados em fezes de bovinos medicados com a dosagem diária de 40mg/animal.

Dell' Porto et al. (2012) em estudo de avaliação da eficácia *in vitro* de Diflubenzuron 25 % encontraram um percentual de emergência de adultos de 86 % para o grupo controle. Já Lohmeyer e Kammlah (2006) em estudo para melhorar a técnica de criação de *H. irritans*, encontraram taxas ótimas de sobrevivência total de 85 %, um pouco superiores às encontradas neste estudo para o grupo controle, que variou de  $57,5 \pm 7,7$  % a  $77,8 \pm 5,2$  %, cabendo considerar que no estudo comparativo, tratava-se de uma colônia já estabelecida, onde as moscas já estariam adaptadas às condições laboratoriais, diferente deste estudo, onde aleatoriamente, as moscas eram capturadas sobre os doadores no campo e forçadas a ovipor em poucas horas, de uma única vez e depois descartadas. Anderson (1995) encontrou uma taxa de sobrevivência total de 73 a 87 % em *Haematobia irritans exígua*, parasita habitual de bovinos e bubalinos, criada *in vitro* para estabelecimento de colônia.

Por último, com relação à atividade IGR de piriproxifen nas fezes dos bovinos, no grupo G2,5, representado pela dose de 300ppb/animal, piriproxifen comportou-se rigorosamente da forma esperada, tendo sido capaz de matar pelo menos 50 % dos animais testados, mantendo uma eficácia mínima de 57,9 % e máxima de 81,2 %. No grupo G40, representado pela dose de 2000ppb/animal, o comportamento de piriproxifen também se expressou precisamente da forma esperada, tendo sido capaz de matar pelo menos 99 % dos insetos testados, mantendo uma eficácia mínima de 99 % e máxima de 100 % durante todo o período do estudo.

Os resultados apresentados para todo o ciclo de vida de *H. irritans* no dia zero, antes do tratamento, reiteram a viabilidade da maioria dos ovos obtidos e incubados, assim como a efetividade da técnica utilizada para a captura e criação *in vitro* de *H. irritans* de ovo a adulto e a qualidade do substrato (fezes bovinas sem tratamento) utilizado para a criação no que se refere à ausência de residuais fecais de antiparasitários, que poderiam comprometer os resultados.

Adicionalmente, pode-se notar que o período de maior fragilidade do ciclo de vida de *H. irritans* foi o período que compreendeu desde as larvas eclodidas até a formação de pupas, onde as perdas observadas foram maiores do que no período compreendido entre a formação de pupas até emergência de adultos.

Em todas as incubações, utilizou-se 20g de fezes bovinas por amostra para a criação de 30 ovos de *H. irritans* em copo descartável com 4 cm de diâmetro de fundo e, obteve-se excelentes resultados na emergência de adultos dos grupos sem tratamento, em todos os testes.

Schmidt et al. (1967) criavam de 4000 a 5000 larvas em bandejas contendo 2,25kg de fezes bovinas. Ajustando a quantidade de fezes proporcionais a apenas 30 ovos de *H. irritans*, obteve-se um valor próximo a 17g de fezes necessárias para a criação, similar à quantidade de fezes utilizada no presente estudo.

Mochi (2009) utilizou apenas 5g de fezes bovinas por amostra contendo também 30 ovos de *H. irritans* em copo com 3cm de diâmetro, que apesar de parecer uma quantidade muito pequena para cultivar 30 ovos até a formação de pupas, obteve ótimos resultados na criação. Já Lima et al. (2010) e Lima et al. (2014) utilizaram a quantidade abundante de 500g de fezes bovinas para a criação de 30 ovos de *H. irritans* e também obtiveram taxas de sucesso na criação. Assim sendo, parece que as formas imaturas de *H. irritans* conseguem se adaptar bem às quantidades de fezes variadas, conseguindo completar o ciclo de vida satisfatoriamente, assim como observado neste estudo em todas as incubações.

Com relação à toxicidade aguda associada a ingestão de piriproxifen nos bovinos, em nenhum momento observou-se qualquer manifestação clínica que sugerisse algum tipo de intoxicação assim como foi demonstrado com metoprene, , administrado por via oral em bovinos (HARRIS; FRAZER; YOUNGER, 1973; MILLER et al., 1977; SCOTT; GRISI; COMENDOUROS, 1995). Piriproxifen juntamente com *Bacillus thuringiensis israelenses* são os únicos larvicidas recomendados por WHO para adição em água para consumo humano (SULLIVAN; GOH, 2008) numa dosagem recomendada de 0,01mg/L, além de não apresentar riscos de carcinogênese e genotoxicidade em humanos.

O comportamento das formas imaturas de *H. irritans* no teste *in vivo* foi bastante similar ao observado no teste *in vitro*, realizado para obter as doses letais. Isto sugere que piriproxifen, administrado por via oral nas doses utilizadas no estudo *in vivo*, atingiu concentração adequada nas fezes dos bovinos e, conseqüentemente, desempenhou excelente função IGR com a inibição da emergência de adultos.

Nunca anteriormente havia sido demonstrada a efetividade de piriproxifen de forma prática, administrado por via oral em bovinos no controle de *H. irritans*. Os resultados apresentados neste estudo ampliam os horizontes para uma nova alternativa de controle de *H. irritans*, direcionada para as formas imaturas, com a expectativa de controle de forma prolongada e de modo seguro para todas as partes envolvidas, uma vez que os análogos do hormônio juvenil, em especial piriproxifen, são muito menos tóxicos e mais seguros que os produtos químicos utilizados atualmente para controle da mosca.

Além do mais, o controle das formas imaturas de *H. irritans* nas fezes dos bovinos teoricamente levaria a uma redução significativa na população de adultos a longo prazo, por causa do tratamento do substrato utilizado para o desenvolvimento da mosca. Como pode-se observar neste estudo, já a partir do terceiro dia de tratamento dos animais, momento da primeira incubação pós tratamento - onde julgou-se que o fluxo de piriproxifen no trato gastrointestinal dos animais já estivesse constante, ou seja, após 72 horas da primeira capsula ingerida - a efetividade de piriproxifen foi de praticamente 100 % no G40. Desta forma, o controle de *H. irritans* realizado sobre as formas imaturas, além de prático seria muito eficaz, com redução crescente da população de adultos, proporcionando melhores índices produtivos, além de bem-estar animal.

### **4.3 Análise de Piriproxifen nas Fezes dos Bovinos Tratados com Piriproxifen por Via Oral no Teste *in vivo***

#### **4.3.1. Validação da Metodologia para Análise de Fezes.**

Os resultados obtidos para seletividade puderam demonstrar que o método de avaliação foi seletivo para piriproxifen, uma vez que no tempo de retenção do piriproxifen não foram

observados picos cromatográficos significativos e os sinais cromatográficos observados apresentaram valores  $\leq 20\%$  em relação ao sinal obtido no limite de quantificação do método (LQ).

Com relação a avaliação cromatográfica, não houve variação significativa do tempo de retenção do analito, as pequenas variações não ultrapassaram 5% quando comparados o tempo de retenção de piriproxifen na curva de calibração e nos sistemas teste.

Determinou-se o *carry-over* e encontrou-se apenas ruídos nas linhas de base dos cromatogramas avaliados. Os sinais cromatográficos apresentaram valores  $\leq 20\%$  em relação ao sinal obtido no limite de quantificação do método, onde pode-se afirmar que não ocorreu o *carry-over*.

Os resultados de linearidade obtidos nessas curvas de calibração apresentaram exatidão, onde mais de 75% dos valores apresentaram-se de acordo com as faixas de aceitação, entre 60% e 120% para as concentrações de 3,00 e 5,00 $\mu\text{g/Kg}$ , entre 70% e 110% para as concentrações de 15,0 a 50,0 $\mu\text{g/Kg}$  e, entre 80% e 110% para as concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/Kg}$ .

Adicionalmente, observou-se que mais de 75% dos valores dos coeficientes de variação atenderam aos critérios de aceitação,  $\leq 25\%$  para as concentrações de 3,00 e 5,00 $\mu\text{g/Kg}$ ,  $\leq 15\%$  para as concentrações de 15,0 a 50,0  $\mu\text{g/Kg}$  e 10% para as concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/Kg}$ . A homocedasticidade e a homogeneidade dos dados foram comprovadas. Os coeficientes de correlação linear (r) observados apresentaram-se  $\geq 0,98$ .

O método apresentou exatidão, uma vez que as médias apresentaram-se dentro das faixas aceitáveis para todas as concentrações analisadas, entre 60 e 120% para o nível baixo (LQ) e entre 80 e 110% para o nível alto. Da mesma forma, o método demonstrou precisão nas avaliações e pode-se observar que a metodologia proposta mostrou-se exata e precisa.

Através da metodologia proposta nesse estudo, o limite de quantificação (LQ), definido pela menor concentração do analito de interesse, foi de 5,00  $\mu\text{g/Kg}$ .

A faixa de trabalho apresentou-se entre 5,00 e 200 $\mu\text{g/Kg}$  onde, para concentrações acima desta faixa, o sistema teste foi diluído e reinjetado; e para concentrações abaixo dessa faixa, a quantificação não foi possível de ser realizada.

Os resultados encontrados para o efeito matriz na primeira etapa mostraram-se fora do critério de aceitação de  $\pm 15\%$ , variando de 0,22 a 0,39 para o fator de matriz. Quando comparadas as áreas das curvas matrizadas com as da curva em solvente observou-se que todos os valores de FM apresentaram-se fora da faixa de aceitação, de 0,85 a 1,15, indicando que houve efeito matriz. Na segunda etapa deste teste foi possível observar valores de exatidão médio fora da faixa aceitável para os níveis baixo e alto, de 60 a 120% e de 80 a 110%, respectivamente nas curvas em solvente. Os resultados apresentados nas duas etapas indicam a existência de efeito de matriz determinando que a reprodução da metodologia para quantificação de amostras desconhecidas deve ser realizada utilizando curvas matrizadas.

Um resumo dos resultados do processo de validação podem ser visualizados na tabela 11.

**Tabela 11** – Resumo dos resultados da validação da metodologia para análise de fezes.

<b>Etapas da Validação</b>	<b>Crítérios</b>	<b>Avaliação</b>			
<b>Carry-over</b>	<=20% LQ	Ausência de sinais interferentes			
<b>Seletividade</b>	<=20% LQ	Método seletivo			
<b>Linearidade</b>	---	Fator peso = 1/x y=205x+103 r= 0,9980			
	Coeficiente de correlação linear r>=0,98	y=242x-0,867 r=0,9985			
	Ccalculado <= Ctabelado	y=213x+540 r=0,9975			
	Fcalculado <= Ftabelado Dispersão dos resíduos	Ccal = 0,1800 / Ctab = 0,3595 Fcalc = 0,3692 / Ftab = 2,438 Dispersão aleatória			
<b>Faixa de trabalho</b>	Do LQ ao maior ponto da curva de calibração	5,00 a 200 µg/kg			
<b>Exatidão</b>	>= 1 µg/kg e <10 µg/kg: 60 a 120%	96,5% 108% 87,2%			
	>=100 µg/kg: 80 a 110%	108% 99,1% 103%			
	>= 1 µg/kg e <10 µg/kg:	Intra	Inter	Intra	Inter
		<=25%	<=32%	6% 7% 8%	11%
>=100 µg/kg:	<=10%	<=16%	2% 5% 7%	6%	
<b>LQ</b>	Menor concentração com exatidão e precisão	5,00µg/kg 0,22 a 0,39			
<b>Efeito matriz</b>	1) FM: 0,85 a 1,15	Exatidão			
	2) >= 1 µg/kg e <10 µg/kg:	Precisão	60 a 120%	Precisão	5 µg/kg: matriz = 108% Solvente = 51,8%
	>=100 µg/kg:	<=10%	80 a 110%	Solvente = 3% 150 µg/kg: Matriz = 5% Solvente = 5%	150 µg/kg: Matriz = 99,1% Solvente = 23,6%

#### 4.3.2. Detecção de piriproxifen nas fezes dos bovinos

Demonstrou-se, de modo inédito, a eliminação de piriproxifen nas fezes dos bovinos tratados por via oral, em ambos os grupos, em quantidades suficientes para ter sido quantificado desde a primeira avaliação após o tratamento, no d + 3, até o último dia de avaliação, no d + 13. Os dados referentes às concentrações de piriproxifen encontradas em cada amostra de fezes, por animal e por dia experimental, estão disponibilizados na Tabela 12. Piriproxifen foi disponibilizado em maior quantidade nas fezes dos animais do grupo G40, sugerindo de maneira prática que a eliminação de piriproxifen nas fezes ocorre de forma dose-dependente. No grupo G2,5 a concentração média de piriproxifen nas fezes foi de 13,4 ± 4,6ng/g no dia + 3, elevando-se para 22,6 ± 19,9 ng/g no dia + 6, mantendo-se em 22,6 ± 12,6 ng/g no dia + 10 e reduzindo discretamente para 19,5 ± 7,6 ng/g no dia + 13. Os animais do G40 eliminaram maiores concentrações de piriproxifen nas fezes, com uma média de 268,5 ± 145,4ng/g no dia

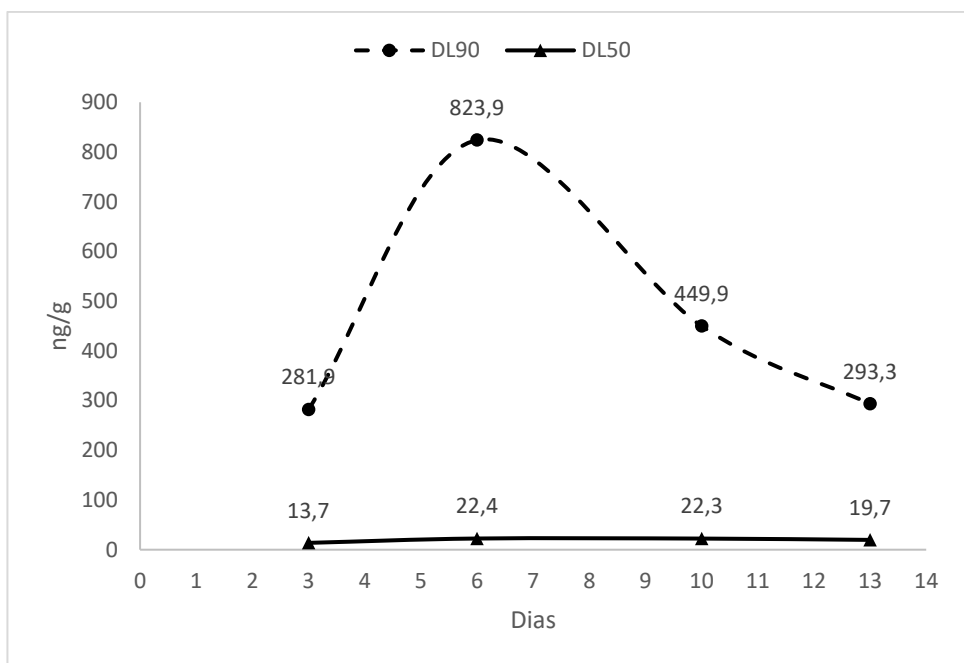
+ 3, que se elevou acentuadamente para  $865,8 \pm 951,4$ ng/g no dia + 6, fato ocorrido em consequência da elevação pontual da concentração de piroxicam nas fezes de dois animais, discrepante das concentrações encontradas para os outros animais do grupo no mesmo momento. Os animais anteriormente referidos eram machos, o que apresentou 2650 ng/g de piroxicam nas fezes pesava 309 kg e o que apresentou 1230 ng/g, pesava 353 kg. No dia + 10, a concentração média de piroxicam nas fezes dos bovinos reduziu-se para  $426,5 \pm 367,8$  ng/g, mesmo com um animal, dessa vez uma fêmea pesando 416 kg, apresentando 1120ng/g de piroxicam nas fezes, discrepante do restante do grupo no mesmo momento. Nesse momento, a concentração de piroxicam nas fezes dos dois animais que destoaram do grupo pelo aumento exacerbado no D + 6 já havia sido reduzido. No dia + 13, a concentração média de piroxicam nas fezes dos bovinos foi de  $272,2 \pm 60,9$  ng/g.

**Tabela 12** – Concentração de piroxicam (em ng/g) nas fezes de cada bovino tratado por via oral no teste *in vivo*, média e desvio padrão das duas doses de tratamento.

Grupo	Id <sup>1</sup>	Sexo	Peso (Kg)	Concentração de piroxicam nas fezes (ng/g)			
				Dia +3	Dia +6	Dia +10	Dia +13
G2,5	471	F	400	15,3	11,1	15,6	15,6
	473	F	501	11,7	9,83	14,8	15,3
	474	F	436	6,12	12,3	20,4	10,9
	14013	F	316	18,2	15,5	18,2	21,3
	14014	M	275	17,9	25	47,9	21
	14033	F	292	11,3	61,7	18,9	32,7
	<b>Média</b>	-	-	13,4	22,6	22,6	19,5
	<b>Desvio</b>	-	-	4,6	19,9	12,6	7,6
G40	318	F	426	187	243	150	185
	339	F	416	214	192	1120	269
	13005	F	340	183	390	540	339
	14023	M	309	423	2650	320	338
	14034	M	353	125	1230	263	276
	14037	F	309	479	490	166	226
	<b>Média</b>	-	-	268,5	865,8	426,5	272,2
	<b>Desvio</b>	-	-	145,4	951,4	367,8	60,9

<sup>1</sup> Refere-se ao número de identificação individual dos animais.

Na Figura 15 pode-se observar a representação gráfica da concentração de piroxicam nas fezes dos bovinos, ao longo do tempo, para ambos os grupos de tratamento (G2,5 e G40) representando a variação da concentração de piroxicam nas fezes. O grupo G2,5 manteve uma concentração média de piroxicam ascendente sem pico de elevação formando quase um platô, diferentemente do grupo G40 que, conforme dito, apresentou um pico de elevação da concentração no dia + 6, seguido de queda e estabilização a partir do dia + 10, até a última avaliação no dia + 13.

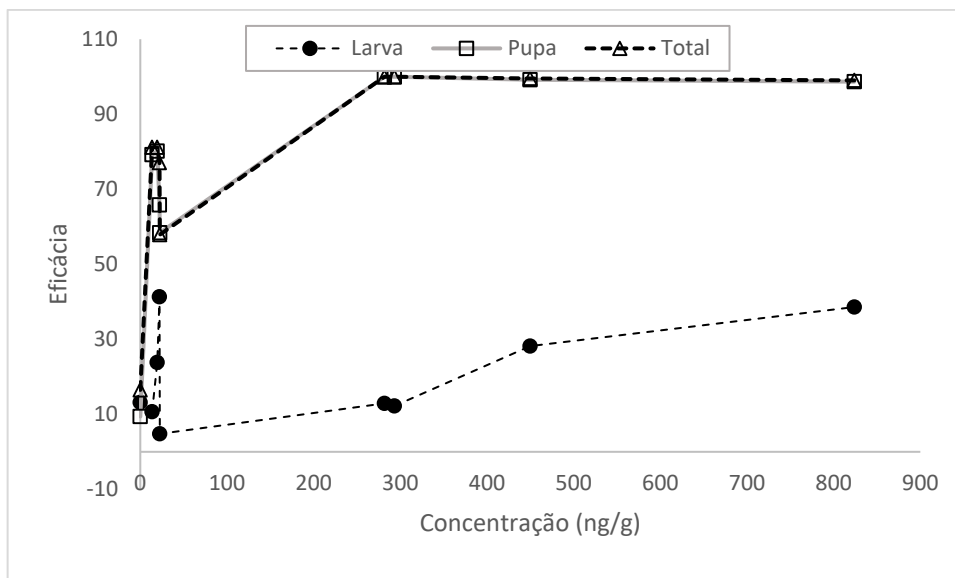


**Figura 15** – Representação gráfica da concentração de piriproxifen (em ng/g) nas fezes dos bovinos ao longo do tempo nas duas doses utilizadas no teste *in vivo* (2,5mg e 40mg) para controle de formas imaturas de *H. irritans* no bolo fecal.

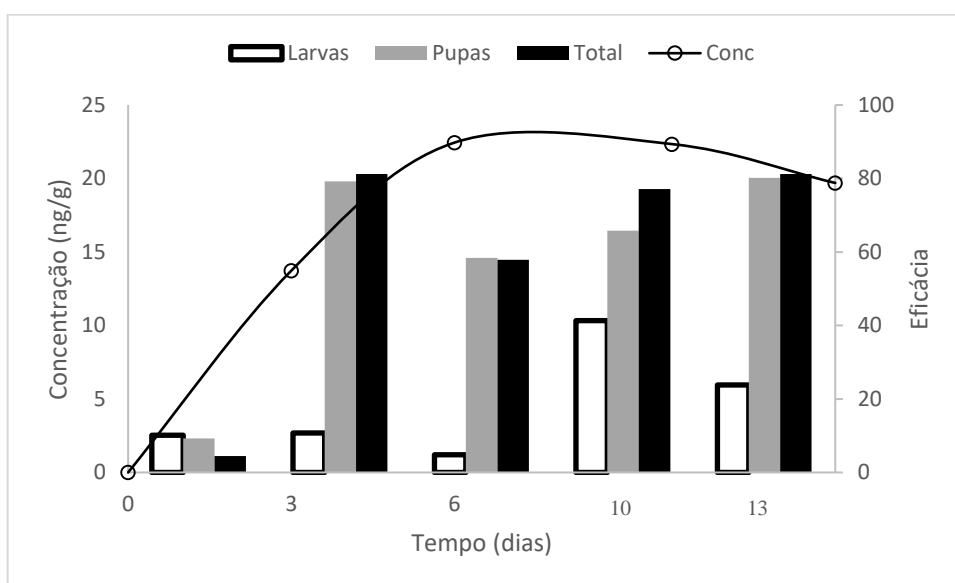
Na Figura 16 está representada a relação entre a concentração de piriproxifen nas fezes (ng/g) e a sua eficácia sobre as formas imaturas de *H. irritans*, destacando-se a eficácia sobre as larvas, sobre as pupas e sobre todo o ciclo da mosca. O gráfico demonstra que o intervalo de concentração de piriproxifen nas fezes entre 200 e 300ng/g foi suficiente para promover uma eficácia de acima de 99 % no controle das formas imaturas de *H. irritans* no bolo fecal.

Nas Figuras 17 e 18, pode-se observar os gráficos relacionados à interação farmacocinética e farmacodinâmica de piriproxifen, que correlacionou a concentração de piriproxifen com a eficácia demonstrada no teste *in vivo* para as formas imaturas de *H. irritans* ao longo do tempo de tratamento, para os dois grupos (G2,5 e G40). Na Figura 17, construída a partir dos dados do G 2,5, onde administrou-se a quantidade de 2,5mg de piriproxifen por animal, pode-se observar que, já no primeiro dia de avaliação (Dia + 3), a concentração média de piriproxifen nas fezes dos bovinos era de  $13,4 \pm 4,6$ ng/g e obteve-se uma eficácia total e máxima de 81,2 %, com uma mortalidade média de 86,5 % de pupas. Nota-se também que apesar da concentração de piriproxifen ter atingido valores superiores nos dias que se sucederam, a concentração de piriproxifen não ultrapassou 22,6ng/g de fezes, assim como a eficácia, que também não ultrapassou os 81,2 % até o último do estudo, no dia +13.

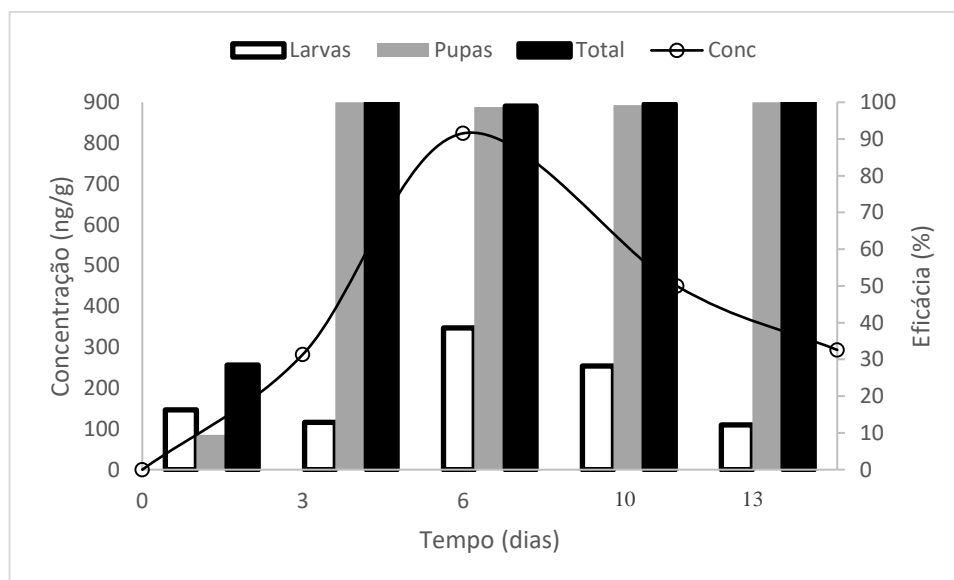
Na Figura 18, construída a partir dos dados do grupo G40, onde administrou-se a quantidade de 40mg de piriproxifen por animal, pode-se igualmente observar que, já no primeiro dia após o tratamento (Dia + 3), a concentração de piriproxifen nas fezes ( $268,5 \pm 145,4$ ng/g) foi capaz de proporcionar uma eficácia máxima de 100 % que se manteve durante todas avaliações posteriores até o dia + 13, último dia de avaliação. Apesar da concentração de piriproxifen ter aumentado no dia + 6 e no dia + 10, não haveria a possibilidade de elevação significativa da eficácia, uma vez que esta se manteve cima de 99 % até o dia + 13.



**Figura 16** – Representação gráfica da eficácia e da concentração de piriproxifen (em ng/g) nas fezes dos bovinos nas duas doses utilizadas no teste *in vivo* (2,5mg e 40mg) para controle de formas imaturas de *H. irritans* no bolo fecal.



**Figura 17** – Farmacocinética e farmacodinâmica de piriproxifen para o G2,5U. Concentração (ng/g) em fezes bovinas, percentual de eficácia para larvas, pupas e eficácia total de piriproxifen sobre as formas imaturas de *H. irritans* incubadas em fezes de bovinos tratados por via oral em teste *in vivo* na dose de 2,5mg de piriproxifen por animal.



**Figura 18** - Farmacocinética e farmacodinâmica de piriproxifen para o G40U. Concentração (ng/g) em fezes bovinas, percentual de eficácia para larvas, pupas e eficácia total de piriproxifen sobre as formas imaturas de *H. irritans* incubadas em fezes de bovinos tratados por via oral em teste *in vivo* na dose de 40mg de piriproxifen por animal.

Em observação à tudo isso, pode-se interpretar que piriproxifen é, de fato, eliminado pelas fezes dos bovinos e sugerir que uma concentração estabelecida entre 22,6ng/g e 268ng/g de piriproxifen nas fezes dos bovinos seja suficiente para controlar, de modo eficaz, prático e seguro as formas imaturas de *H. irritans* no bolo fecal de bovinos tratados diariamente com piriproxifen por via oral.

A possibilidade inédita de detecção e quantificação de piriproxifen nas fezes dos bovinos tratados diariamente por via oral nos conduz ao entendimento inicial de que o metabolismo de piriproxifen em bovinos possa ser semelhante ao metabolismo em ratos e camundongos, anteriormente estudados por Matsunaga et al. (1995) e Yoshino, Nakatsuka e Yamada (1995) que determinaram que piriproxifen, quando administrado por via oral, é eliminado pelas fezes em quantidades superiores a 90 %, sendo vastas as oportunidades neste campo de pesquisa, sobretudo para estudos metabólicos aprofundados, onde há inclusive a utilização de gaiolas metabólicas que possibilitam a obtenção de resultados mais detalhados e que ajudem a elucidar o metabolismo desta molécula em bovinos.

#### 4.4 Construção da Curva Plasmática de Piriproxifen Administrado por Via Oral em Dose Única em Bovinos.

##### 4.4.1. Validação da metodologia para análise em plasma.

Os resultados obtidos para seletividade puderam demonstrar que o método de avaliação foi seletivo para piriproxifen, uma vez que no tempo de retenção do piriproxifen não foram observados picos cromatográficos significativos e os sinais cromatográficos observados apresentaram valores  $\leq 20\%$  em relação ao sinal obtido no limite de quantificação do método (LQ).

Com relação a avaliação cromatográfica, não houve variação significativa do tempo de retenção do analito, as pequenas variações não ultrapassaram 5% quando comparados o tempo de retenção de piriproxifen na curva de calibração e nos sistemas teste.



Determinou-se o *carry-over* e encontrou-se apenas ruídos nas linhas de base dos cromatogramas avaliados. Os sinais cromatográficos apresentaram valores  $\leq 20\%$  em relação ao sinal obtido no limite de quantificação do método, onde pode-se afirmar que não ocorreu o *carry-over*.

Os resultados de linearidade obtidos nessas curvas de calibração apresentaram exatidão, onde mais de 75% dos valores apresentaram-se de acordo com as faixas de aceitação, entre 60% e 120% para as concentrações de 1,50 e 2,50  $\mu\text{g/L}$ , entre 70% e 110% para as concentrações de 10,0 a 50,0  $\mu\text{g/L}$  e, entre 80% e 110% para as concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g/L}$ . Adicionalmente, observou-se que mais de 75% dos valores dos coeficientes de variação atenderam aos critérios de aceitação,  $\leq 25\%$  para as concentrações de 1,50 e 2,50  $\mu\text{g/L}$ ,  $\leq 15\%$  para as concentrações de 10,0 a 50,0  $\mu\text{g/L}$  e 10% para as concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g/L}$ . A homocedasticidade e a homogeneidade dos dados foram comprovadas. Os coeficientes de correlação linear ( $r$ ) observados apresentaram-se  $\geq 0,98$ .

O método apresentou exatidão, uma vez que as médias apresentaram-se dentro das faixas aceitáveis para todas as concentrações analisadas, entre 60 e 120% para o nível baixo (LQ) e entre 80 e 110% para o nível alto. Da mesma forma, o método demonstrou precisão nas avaliações e pode-se observar que a metodologia proposta mostrou-se exata e precisa.

Através da metodologia proposta nesse estudo, o limite de quantificação (LQ), definido pela menor concentração do analito de interesse, foi de 2,50  $\mu\text{g/L}$ .

A faixa de trabalho apresentou-se entre 2,50 e 200  $\mu\text{g/L}$ , onde para concentrações acima desta faixa o sistema teste foi diluído e reinjetado e para concentrações abaixo dessa faixa, a quantificação não foi possível de ser realizada.

Os resultados encontrados para o efeito matriz na primeira etapa mostraram-se fora do critério de aceitação de  $\pm 15\%$ , variando de 1,04 a 1,25 para o fator de matriz. Quando comparadas as áreas das curvas matrizadas com as da curva em solvente observou-se que todos os valores de FM apresentaram-se fora da faixa de aceitação, de 0,85 a 1,15, indicando que houve efeito matriz. Na segunda etapa deste teste foi possível observar valores de exatidão médio fora da faixa aceitável para os níveis baixo e alto, de 60 a 120% e de 80 a 110%, respectivamente, nas curvas em solvente. Os resultados apresentados nas duas etapas indicam a existência de efeito de matriz determinando que a reprodução da metodologia para quantificação de amostras desconhecidas deve ser realizada utilizando curvas matrizadas.

Um resumo dos resultados pode ser visualizado na Tabela 13.

**Tabela 13** - Resumo dos resultados da validação da metodologia para análise de fezes.

<b>Etapas da Validação</b>	<b>Crítérios</b>	<b>Avaliação</b>		
<b>Carry-over</b>	$\leq 20\%$ LQ	Ausência de sinais interferentes		
<b>Seletividade</b>	$\leq 20\%$ LQ	Método seletivo		
<b>Linearidade</b>	---	Fator peso = $1/x$ $y=591x+52,5$ $r= 0,9992$ $y=657x+32,4$ $r=0,9995$		
	Coefficiente de correlação linear $r \geq 0,98$	$y=766x+139$ $r=0,9983$		
	$C_{calculado} \leq C_{tabelado}$ $F_{calculado} \leq F_{tabelado}$ Dispersão dos resíduos	$C_{cal} = 0,3024 / C_{tab} = 0,3595$ $F_{calc} = 0,0905 / F_{tab} = 2,438$ Dispersão aleatória		
<b>Faixa de trabalho</b>	Do LQ ao maior ponto da curva de calibração	2,50 a 200 $\mu\text{g/L}$ 76,6% 103% 98,7%		
<b>Exatidão</b>	$\geq 1 \mu\text{g/L}$ e $<10 \mu\text{g/L}$ : 60 a 120% $\geq 100 \mu\text{g/L}$ : 80 a 110%	89,7% 91,3% 100%		
<b>Precisão</b>	$\geq 1 \mu\text{g/L}$ e $<10 \mu\text{g/L}$ :	Intra $\leq 25\%$ Inter $\leq 32\%$	Intra 20% 16% 7% 6%	Inter 19%
		$\geq 100 \mu\text{g/L}$ :	$\leq 10\%$ $\leq 16\%$	3% 3%
<b>LQ</b>	Menor concentração com exatidão e precisão	2,50 $\mu\text{g/L}$		
<b>Efeito matriz</b>	1) FM: 0,85 a 1,15	1,04 a 1,25	Exatidão 2,55 $\mu\text{g/L}$ : matriz = 98,7% Solvente = 122%	
	2) $\geq 1 \mu\text{g/L}$ e $<10 \mu\text{g/L}$ :	Precisão $\leq 25\%$		2,5 $\mu\text{g/L}$ : matriz = 7% Solvente = 6%
	$\geq 100 \mu\text{g/L}$ :	$\leq 10\%$	150 $\mu\text{g/L}$ : Matriz = 3% Solvente = 3%	150 $\mu\text{g/L}$ : Matriz = 100% Solvente = 112%

#### 4.4.2. Detecção de piriproxifen no plasma dos bovinos

A concentração de piriproxifen no plasma dos bovinos ficou abaixo dos limites mínimos de quantificação ( $<2,5\text{ng/ml}$ ) em todos os momentos analisados, nos dois grupos experimentais, com exceção de apenas três animais em três momentos distintos, conforme pode ser observado na Tabela 14. Em consequência disso, não houve a possibilidade de construir uma curva plasmática que representasse o comportamento de piriproxifen no plasma dos bovinos.

No estudo de Matsunaga et al. (1995) avaliou-se o metabolismo de piriproxifen em ratos através da excreção de piriproxifen marcado com e C14 nos tecidos, após administração oral em dose única e recuperaram de 96 a 98 % do piriproxifen em fezes e urina durante 7 dias, com excreção fecal de 89 a 92 % e urinária de até 8 %, onde uma pequena parte foi distribuída ainda para a bile e para as gorduras corporais. Em outro estudo com ratos, encontrou-se resíduos de

piriproxifen na gordura e também se observou que piriproxifen foi rápida e completamente excretado nas fezes, urina e pelo ar expirado, tendo como rota principal de eliminação a via fecal (YOSHINO; NAKATSUKA; YAMADA, 1995).

Em uma analogia acerca do metabolismo de piriproxifen em ratos e bovinos, pode-se perceber que a principal rota de eliminação de piriproxifen em bovinos também seria por via fecal, comprovada pela quantificação desta molécula nas fezes dos bovinos tratados e, juntamente com a concentração de piriproxifen abaixo dos limites mínimos para quantificação, sugerindo que haja mínima absorção sistêmica de piriproxifen no organismo de bovinos assim como nos ratos. Porém, estudos de resíduos de piriproxifen na carcaça e nos tecidos de bovinos, além de resíduos no leite, são necessários para garantir a segurança alimentar.

**Tabela 14** - Concentração de piriproxifen (em ng/ml) no plasma de cada bovino tratado por via oral no teste *in vivo* para as duas doses de tratamento (2,5mg e 40mg)

Grupo	Id <sup>1</sup>	Sexo	Peso (kg)	Concentração de piriproxifen no plasma bovino (ng/ml) ao longo do tempo (horas)				
				4h	10h	16h	24h	48h
G-2,5U	15009	M	218	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	15016	F	255	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16004	M	166	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16006	F	182	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16011	F	137	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16017	F	207	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16018	F	169	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16022	M	187	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16028	F	147	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16037	F	126	<2,5	<2,5	5,49	<2,5	<2,5
G-40U	15008	M	218	<2,5	<2,5	<2,5	5,35	<2,5
	15012	F	189	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	15020	M	140	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	15023	M	199	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16009	F	133	<2,5	2,97	<2,5	<2,5	<2,5
	16013	F	179	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16015	F	189	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16023	F	142	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16027	F	129	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
	16038	F	116	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5

<sup>1</sup> Refere-se ao número de identificação individual dos animais.

O fato de piriproxifen não ter sido encontrado em concentrações mínimas de quantificação no plasma não garante que não houvesse piriproxifen circulante, pois talvez a concentração estivesse realmente muito baixa e, dessa forma, indetectável pela sensibilidade do método utilizado.

Sendo assim, a comprovação da eliminação de piriproxifen nas fezes de bovinos por métodos analíticos assim como a concentração de piriproxifen abaixo dos limites mínimos de quantificação no plasma foram duas particularidades encontradas no metabolismo de bovinos que possibilitaram um excelente controle das formas imaturas de *H. irritans* no bolo fecal. Em primeiro lugar, destaca-se a administração de uma dose baixíssima de piriproxifen por animal, que foi quase totalmente direcionada para as fezes de forma a controlar com eficácia máxima o ciclo de vida de *H. irritans* no bolo fecal e em segundo lugar, houve uma baixíssima absorção

sistêmica, ratificada pela ausência de piroxicam no plasma dos animais em todos os momentos avaliados, exceto em três animais durante o período avaliado, tornando a molécula bastante segura para o animal e, muito provavelmente, levando ao baixo resíduo nos tecidos dos bovinos, que ainda precisa ser melhor estudado.

Por fim, fica comprovado o excelente potencial de piroxicam no controle das formas imaturas de *H. irritans* no bolo fecal, quando administrado por via oral em bovinos.

## 5 CONCLUSÕES

- A técnica *in vitro* empregada foi capaz de determinar o potencial deste regulador de crescimento dos insetos para o controle das formas evolutivas de *H. irritans*, que se desenvolvem no bolo fecal;
- Foi possível estabelecer uma correlação terapêutica entre as DL50 e DL99 obtidas no estudo *in vitro* quando extrapolados para dosagens, em miligramas, de piriproxifen administrado por via oral diariamente para bovinos;
- Piriproxifen não possui atividade ovicida para ovos de *H. irritans* nas doses empregadas neste estudo.
- Piriproxifen apresentou discreta atividade larvicida, com a formação de estágios extra larvais ao longo do teste *in vivo*, nos dois grupos de tratamento, mas que não foi observado no teste *in vitro* para determinação das doses letais.
- Piriproxifen manifestou atividade IGR sobre as pupas de *H. irritans*, causando mortalidade de pupas e resultando em inibição da emergência de adultos, tanto no Teste *in vitro* quanto *in vivo*.
- Piriproxifen possui elevada atividade IGR *in vitro* e *in vivo* sobre as formas imaturas de *H. irritans* acarretando, principalmente para o estágio de pupa, inibição da emergência de adultos, quando empregado por via oral nas doses de 2,5 e 40mg/animal, diariamente.
- Destaca-se a importância da via fecal para eliminação de piriproxifen em bovinos, comprovada por análise química das fezes dos animais tratados no teste *in vivo*.
- A concentração de piriproxifen no plasma de bovinos, administrada nas doses de 2,5mg e 40mg por animal, ficou abaixo dos limites mínimos de detecção para o método empregado.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados favoráveis encontrados neste estudo para o teste *in vitro* foram de extrema importância para a formação do conhecimento acerca do comportamento de piriproxifen adicionado em fezes bovinas sobre as formas imaturas de *H. irritans*, proporcionando o estabelecimento das doses letais (DL50 e DL99) que, de forma pioneira, puderam ser administradas por via oral em bovinos em teste *in vivo* para comprovar a hipótese de que piriproxifen seria excretado nas fezes dos bovinos em quantidade suficiente afim de promover o controle de formas imaturas de *H. irritans* presentes no bolo fecal, o que foi constatado de modo irrefutável em teste *in vitro* do teste *in vivo*.

O desenvolvimento de cápsulas para a administração oral de piriproxifen foi idealizado para que não houvesse desperdício do material, tampouco falha na eficácia motivada pela falta de padronização do método de administração do produto em teste. Há de se salientar que, apesar de bastante eficaz, o método de administração escolhido necessita de um mínimo aparato para o manejo do gado, como por exemplo, um tronco de contenção e um aplicador de bolus, além de pessoal treinado para administrar as cápsulas. Por isso, outros métodos de administração oral de piriproxifen, como administrado junto ao sal mineral ou como bolus de liberação lenta, também devem ser explorados afim de facilitar ainda mais o tratamento dos animais.

O teste *in vivo* foi conduzido por apenas 12 dias no presente estudo, que apesar de ter sido breve, nos possibilitou observar, analisar e tirar conclusões ímpares a respeito desta nova proposição de tratamento. Mas, indubitavelmente, novos estudos deverão ser conduzidos afim de determinar outros parâmetros importantes que não foram elucidados nesse estudo, como por exemplo por quanto tempo após o término do tratamento dos bovinos, as fezes mantêm concentrações de piriproxifen capazes de promover um controle efetivo sobre as formas imaturas de *H. irritans* ou, em estudo mais prolongado, se piriproxifen mantêm a efetividade de forma constante ou ainda, se haverá sinais de intoxicação crônica nos animais tratados. Outras vias de administração de piriproxifen também necessitam ser estudadas. Assim como a efetividade sobre as formas imaturas de outros ectoparasitos, como carrapatos, larvas de *Dermatobia hominis* ou larvas de *Cochliomyia hominivorax*.

Necessita-se ponderar que múltiplos fatores estão envolvidos para que haja pleno sucesso na criação de *H. irritans* e alguns deles podem ser minimizados com a criação *in vitro*, como por exemplo, a oferta de um ambiente favorável no que se refere à temperatura, umidade e substratos considerados ideais para a criação, mas que mesmo assim tornam-se limitados se as condições do ambiente onde os adultos foram capturados tiverem em condições extremas de falta de temperatura e/ou umidade adequadas, interferindo diretamente na quantidade e qualidade dos ovos que serão postos pelas fêmeas e, conseqüentemente, nas taxas ótimas de todo o ciclo de vida de *H. irritans in vitro*. Além disso, por ser uma ação indispensável aos estudos *in vitro*, a manipulação incorreta dos ovos com pincel poderia danificar os ovos, contribuindo para uma maior perda devido ao erro de técnica empregada, que no presente estudo parece não ter influenciado no resultado final.

A situação da resistência de *H. irritans* no Brasil e no mundo frente aos inseticidas convencionais é alarmante e, por mais que haja esforços, dedicação, investimentos financeiros e de tempo para o desenvolvimento de um novo produto, devemos cada dia mais estar consciente de que sem que haja a conscientização coletiva quanto à necessidade de utilização correta do produto, respeitando a dosagem a ser utilizada, assim como a frequência estipulada para o tratamento, dificilmente haverá um produto que atenda às necessidades atuais de controle parasitário de forma efetiva por muito tempo. Os IGR são, atualmente, uma ferramenta extremamente útil no controle de populações resistentes, de forma bastante segura para todos

os envolvidos na atividade (meio ambiente, animal-alvo, seres humanos, animais não-alvo) mas, como o uso em larga escala dessa classe de parasiticidas é relativamente recente, ainda não se sabe quais consequências relacionadas ao uso indiscriminado e a longo prazo vão se apresentar, o que justifica a preocupação e a necessidade de monitoramento constante e pesquisas científicas pela comunidade acadêmica.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC. **Relatório Anual da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC) - Perfil da Pecuária no Brasil.** Disponível em: <[http://www.newsprime.com.br/img/upload2/2016\\_FolderPerfil\\_PT.pdf](http://www.newsprime.com.br/img/upload2/2016_FolderPerfil_PT.pdf)>. Acesso em: 12 jun. 2017.
- ACEVEDO, G. R.; ZAPATER, M.; TOLOZA, A. C. Insecticide resistance of house fly, *Musca domestica* (L.) from Argentina. **Parasitology Research**, v. 105, n. 2, p. 489–493, 2009.
- ALBUQUERQUE, M. F. P. M. et al. Pyriproxyfen and the microcephaly epidemic in Brazil - an ecological approach to explore the hypothesis of their association. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. December, p. 774–776, 2016.
- ALVES-BRANCO, F. DE P. J.; PINHEIRO, A. DA C.; SAPPER, M. DE F. M. Instrução Técnica para o Produtor: Orientação básica para o controle da mosca-dos-chifres “*Haematobia irritans*”. **EMBRAPA Pecuária Sul**, 2000.
- ANDERSON, J. M. E. Culturing *Haematobia exigua* de Meijere (Diptera: Muscidae) in the Laboratory. **J Aust Ent Soc**, v. 34, n. 1, p. 17–21, 1995.
- ANDREOTTI, R. et al. Diflubenzuron Effectiveness in Cattle Tick (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) Control in Field Conditions. **Pharm Anal Acta**, v. 6, n. 6, p. 7, 2015.
- ANZIANI, O. S.; GUGLIELMONE, A. A.; SCHMID, H. Efficacy of dicyclanil in the prevention of screwworm infestation (*Cochliomyia hominivorax*) in cattle castration wounds. **Veterinary Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 229–232, 1998.
- BAKLI, D. et al. Methoxyfenozide, an Ecdysteroid Agonist Insecticide, Alters Oocyte Growth During Metamorphosis of *Ephestia kuehniella* Zeller. **African Entomology**, v. 24, p. 453- 459, 2016.
- BARROS, A. et al. Susceptibility of the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae), to insecticides in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 125–132, 2012.
- BARROS, A. T. M. et al. Susceptibility to diazinon in populations of the horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in Central Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 905–907, 2002.
- BARROS, A. T. M. Situação da resistência da *Haematobia irritans* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, p. 109–110, 2004.
- BARROS, A. T. M. DE. Aspectos do Controle da Mosca- dos-chifres e Manejo de Resistência. **Embrapa Documentos 77**, p. 23, 2005.
- BAY, D. E.; BOYD, L. S. Effect of horn fly larval density on methoprene toxicity. **The Southwestern Entomologist**, v. 12, n. 3, p. 259–261, 1987.
- BAY, D. E.; HARRIS, R. L. Small scale laboratory rearing of the horn fly. **The Southwestern Entomologist**, v. 3, n. 4, p. 276–278, 1978.
- BEADLES, M. L. et al. The Horn Fly Methoprene in Drinking Water of Cattle for Control. **Journal of Economic Entomology**, v. 68, n. 6, p. 781–785, 1975.
- BEL, Y.; WIESNER, P.; KAYSER, H. Candidate target mechanisms of the growth inhibitor



- cyromazine: Studies of phenylalanine hydroxylase, puparial amino acids, and dihydrofolate reductase in dipteran insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 45, n. September, p. 69–78, 2000.
- BELL, H. A.; ROBINSON, K. A.; WEAVER, R. J. First report of cyromazine resistance in a population of UK house fly (*Musca domestica*) associated with intensive livestock production. **Pest Management Science**, v. 66, n. 7, p. 693–695, 2010.
- BIANCHIN, I. et al. Efeito da mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) no ganho de peso de bovinos Nelore. **Revista Ciência Rural, Santa Maria**, v.34, n.3, p.885-890, 2004.
- BIANCHIN, I.; ALVES, R. G. DE O. Comunicado Técnico: Mosca-dos-chifres: comportamento e danos em bovinos nelores. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 55, p. 1–8, 1997.
- BIANCHIN, I.; ALVES, R. G. O. Mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*: Comportamento e danos em vacas e bezerros Nelore antes da desmama. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 109–113, 2002.
- BLAGBURN, B. et al. Dose titration of an injectable formulation of lufenuron in cats experimentally infested with fleas. **American Journal Veterinary Research**, v. 60, n. 12, p. 1513–1515, 1999.
- BLOOMCAMP, C. L.; PATTERSON, R. S.; KOEHLER, P. G. Cyromazine resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). **Journal of economic entomology**, v. 80, n. 2, p. 352–357, 1987.
- BORGES, R. A. et al. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE). **Revista de Patologia Tropical**, 2004. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/view/3248>> Acesso em: 10 mai 2017.
- BOWEN, F. L. et al. Long-lasting prevention against blowfly strike using the insect growth regulator dicyclanil. **Australian veterinary journal**, v. 77, n. 7, p. 454–60, 1999.
- BOWERS, W. S. Juvenile Hormone: Activity of Natural and Synthetic Synergists. **Science**, v. 161, p. 895–897, 1968.
- BRASIL. **Portal Brasil - Economia e Emprego**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/10/fmi-brasil-volta-ao-posto-de-8-maior-economia>>. Acesso em: 1 jan 2016.
- BRITO, L. G. et al. Mosca-dos-chifres: aspectos bio-ecológicos, importância econômica, interações parasito-hospedeiro e controle. **Comunicado Técnico 302 EMBRAPA**, 2005.
- BRITO, L. G. et al. Avaliação da susceptibilidade de populações da mosca-dos-chifres a pesticidas organofosforados em rebanhos de corte no Estado de Rondônia, Brasil. **comunicado técnico - EMBRAPA**, p. 6, 2014.
- BULL, D. L.; MEOLA, R. W. Effect and Fate of the Insect Growth-Regulator Pyriproxyfen After Application to the Horn Fly (Diptera, Muscidae). **Journal of economic entomology**, v. 86, n. 6, p. 1754–1760, 1 dez. 1993.
- BULL, M. et al. Suppression of *Boophilus microplus* populations with fluazuron: an acarine growth regulator. **Australian Veterinary Journal**, v. 74, n. 6, p. 468–470, 1996.
- BYFORD, R. L.; CRAIG, M. E.; CROSBY, B. L. A review of ectoparasites and their effect on cattle production. **Journal of animal science**, v. 70, n. 2, p. 597–602, 1992.

- CALLIGARIS, I. B. et al. Action of the insect growth regulator fluazuron, the active ingredient of the acaricide Acatak®, in *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 11, p. 1177–1185, 2013.
- CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.
- CAMPBELL, J. B. Effect of Horn Fly Control on Cows as Expressed by Increased Weaning Weights of Calves. **Journal Of Economic Entomology**, v. 69, n. 6, p. 711–712, 1976.
- CAMPBELL, J. B. et al. Efficacy of Several Insecticide Ear Tags for Control of Horn Flies (Diptera : Muscidae ) on Nebraska Beef Cattle. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 79, n. 2, p. 113–118, 2006.
- CAMPBELL, J. B.; THOMAS, G. D. The History, Biology, Economics and Control of The Horn Fly, *Haematobia irritans*. **Agri-Practice - Parasitology**, v. 13, n. 4, p. 31–36, 1992.
- CHEN, Z. et al. Positional cloning of a cyromazine resistance gene in *Drosophila melanogaster*. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 2, p. 181–186, 2006.
- COHEN, E. Chitin Biochemistry: Synthesis And Inhibition. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 71–93, 1987.
- COLLARES, N. C. P. **Alguns Aspectos Etológicos da Haematobia irritans em Roraima**. 1990. 57p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia). Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1990.
- COLUCCI, P. E.; CHASE, L. E.; VAN SOEST, P. J. Feed Intake, Apparent Diet Digestibility, and Rate of Particulate Passage in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 8, p. 1445–1456, 1982.
- DA SILVA, L. V; DE LA RUE, M. L.; GRAÇA, L. D. Lesões da mosca dos chifres (*Haematobia irritans* Linnaeus, 1758) na pele de bovinos e impacto na indústria do couro lesions of the horn fly (*Haematobia irritans* Linnaeus, 1758) on the bovine skin and their impact in leather industry). **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 1039–1043, 2002.
- DE CASTRO, M. B. et al. Intoxicação aguda por diazinon em bovinos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1498–1501, 2007.
- DE MACEDO, D. M.; BRITO, L. G.; BORJA, G. E. M. Emergência de *Haematobia irritans* em fezes bovinas no município de Seropédica, Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 77–80, 2001.
- DEAN, S. R. et al. Mode of action of lufenuron on larval cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 720–4, 1998.
- DEAN, S. R. et al. Mode of action of Lufenuron in adult *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 36, n. 4, p. 486–492, 1999.
- DEBOUN, M.; FRANCES, S. P.; STRICKMAN, D. Insect Reppellents Handbook. Segunda ed., **CRC Press**, 2014.
- DELL' PORTO, A. et al. Eficácia Do Diflubenzuron 25% No Controle Da *Haematobia Irritans* (Diptera: Muscidae): Desafio *in Vitro* E a Campo. **Arq. Inst. Biol**, v. 79, n. 4, p. 617–620, 2012.
- DEROUEN, S. M. et al. Horn fly (Diptera: Muscidae) control and weight gains of yearling beef cattle. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, n. 3, p. 666–668, 1995.
- DHADIALLA, T. S. Insect growth Disruptors. In: DHADIALLA, T. S. *Advances in Insect*

Physiology. **Academic Press**, v. 43, p. 531, 2012.

DHADIALLA, T. S.; CARLSON, G. R.; LE, D. P. New Insecticides With Ecdysteroidal and Juvenile Hormone Activity. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 545–569, 1998.

DHADIALLA, T. S.; LLC, D. A. Insect growth and Development-Disrupting Insecticides. **Elsevier**, 2005.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.-D.; STÖBER, M. **Rosenberger, Exame clínico dos bovinos**. Terceira ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

DRUMMOND, R. O.; GEORGE, J. E.; KUNZ, S. E. **Control of Arthropod Pests of Livestock: A Review of Technology**. Boca Raton, Florida, 1988

E OWENS, W. et al. Role of horn flies (*Haematobia irritans*) in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in dairy heifers. **American journal of veterinary research**, v. 59, p. 1122–1124, 1998.

EDWARDS, J. F. E. et al. Bovine Teat Atresia Associated with Horn Fly (*Haematobia irritans irritans* (L.)) - induced Dermatitis. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 4, p. 360–364, 2000.

EL-OSHAR, M. A. et al. Studies on Cyromazine in the House Fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 78, n. 6, p. 1203–1207, 1985.

ERIKSSON, M. L. OCH M. **Linné online**. Disponível em: <[http://www2.linnaeus.uu.se/online/animal/1\\_1.html](http://www2.linnaeus.uu.se/online/animal/1_1.html)>. Acesso em: 11 jul. 2017.

FAO. **Live animals**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

FARKAŠ, R.; SLÁMA, K. Effect of bisacylhydrazine ecdysteroid mimics (RH-5849 and RH-5992) on chromosomal puffing, imaginal disc proliferation and pupariation in larvae of *Drosophila melanogaster*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 11, p. 1015–1027, 1999.

FERREIRA, L. C. F. **Avaliação do Efeito de Novaluron, um inibidor da síntese de quitina, sobre a formação de larvas de Aedes Aegypti (Linnaeus, 1762)**. 2009. 76f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

FINCHER, G. T. sustained release bolus for horn fly control effects of methoprene and diflubenzuron on some nontarget species.pdf. **Environmental Entomology**, v. 20, n. 1, p. 77–82, 1991.

FLORES, A. V. et al. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 111–125, 2004.

FRANC, M.; CADIERGUES, M. C. Use of injectable lufenuron for treatment of infestations of *Ctenocephalides felis* in cats. **American Journal Veterinary Research**, v. 58, n. 2, p. 140–142, 1997.

GEDEN, C. J.; DEVINE, G. J. Pyriproxyfen and house flies (Diptera: Muscidae): Effects of direct exposure and autodissemination to larval habitats. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 606–613, 2012.

GINGRICH, A. R.; HOPKINS, D. E. Stages of the Horn Fly Susceptible to Methoprene. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n. 1, p. 107–108, 1977.

GRAF, J. F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today**, v. 9, n. 12, p. 471–474, 1993.

GRENIER, S.; GRENIER, A. -M. Fenoxycarb, a fairly new Insect Growth Regulator: review of

- its effects on insects. **Annals of Applied Biology**, v. 122, n. 2, p. 369–403, 1993.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8–10, 2002.
- GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.
- GRISI, L.; SCOTT, F. B. Susceptibilidade de populações da mosca do chifre *Haematobia irritans* à inseticidas no Estado de São Paulo. **Anais do II Simpósio sobre a mosca-dos-chifres *Haematobia Irritans***, p. 150–152, set. 1991.
- GUGLIELMONE, A. A. et al. Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, n. 3, p. 324–329, 1999.
- GUGLIELMONE, A. A. et al. Cattle breed-variation in infestation by the horn fly *Haematobia irritans*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, n. 3, p. 272–276, 2000.
- HARRIS, R. L.; CHAMBERLAIN, W. F.; FRAZAR, E. D. Horn flies and stable flies: free-choice feeding of methoprene mineral blocks to cattle for control. **Journal of economic entomology**, v. 67, n. 3, p. 384–6, 1974.
- HARRIS, R. L.; FRAZER, E. D.; YOUNGER, R. L. Horn flies, Stable flies and house flies: development in feces of Bovines Treated Orally with Juvenile Hormone Analogues. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 5, p. 1099–1102, 1973.
- HARRIS, R. L.; MILLER, J. A.; FRAZAR, E. D. Eclosion of horn flies Diptera-Muscidae under laboratory conditions. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 64, n. 1, p. 224–228, 1971.
- HARVEY, T. L.; BRETHOUR, J. R. Effect of Horn Flies on Weight Gains of Beef Cattle. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, n. 4, p. 516–518, 1979.
- HARVEY, T.; LAUNCHBAUGH, J. Effect of Horn Flies on behavior of cattle. **Journal of Economic Entomology**, v. 27, p. 25–27, 1982.
- HENRICK, C. A. Methoprene. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 2, p. 225-239, 2007.
- HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. **Fisiologia Animal**. Segunda ed., Arted Editora, 2012.
- HINKLE, N. C.; KOEHLER, P. G.; PATTERSON, R. S. Residual effectiveness of insect growth regulators applied to carpet for control of cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) larvae. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, n. 4, p. 903–906, 1995.
- HONER, M. R.; BIANCHIN, I.; GOMES, A. Mosca-dos-chifres: Histórico, biologia e controle. **Embrapa - CNPGC**, 34p, Campo Grande, 1990.
- HONER, M. R.; BIANCHIN, I.; GOMES, A. Programa de Controle de Mosca-dos-chifres. **Comunicado Técnico Embrapa**, p. 3, 1990b.
- IBGE. **Contas Nacionais - Indicadores de Volumes e Valores Correntes**. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Contas\_Nacionais/Contas\_Nacionais\_Trimestrais/Fasciculo\_Indicadores\_IBGE/pib-vol-val\_201604caderno.pdf>. Acesso em: 4 abr. 2017.
- IBGE. **Abate de animais**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/abate/brasil>. Acesso em: 11 jul. 2017a.

- IBGE. **Efetivo de bovinos em estabelecimentos agropecuários**. Disponível em: <<http://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=281&z=t&o=24&i=P>>. Acesso em: 5 abr. 2017b.
- IBGE. **Efetivo de bovinos em estabelecimentos agropecuários**. Disponível em: <<http://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=281&z=t&o=24>>. Acesso em: 8 abr. 2017c.
- IBGE. **Indicadores IBGE - Estatística da Produção Pecuária**. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/abate-leite-couro-ovos\\_201604caderno.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201604caderno.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2017d.
- IVEY, M.; MILLER, J. A.; WAYNE IVIE, G. Methoprene Residues in Fat of Cattle Treated With Methoprene Boluses. **Journal of Economic Entomology**, v. 75, n. 2, p. 254–256, 1982.
- J. MENN, J.; A. HENRICK, C. Rational and Biorational Design of Pesticides. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, v. 295, 1981.
- JR, L. V. A.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9a. ed., Editora Grupo A, 2013.
- KAWADA, H.; SENBO, S.; ABE, Y. Effects of Pyriproxyfen on the reproduction of the house fly, *Musca domestica*, and the German cockroach, *Blattella germanica*. **Jpn. J. Sanit. Zool.**, v. 43, n. 3, p. 169–175, 1992.
- KOCISOVA, A. et al. The potential of some insect growth regulators in housefly (*Musca domestica*) control. **Biologia**, v. 59, n. 5, p. 661–668, 2004.
- KOTZE, A. C. Effects of cyromazine on reproduction and offspring development in *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n. 5, p. 1614–1617, 1992.
- KUNZ, S. E. et al. Biological and Ecological Investigations of Horn Flies in Central TEXAS: Influence of Time of Manure Deposition on Oviposition. **Journal of Economic Entomology**, v. 63, n. 3, p. 930–933, 1970.
- KUNZ, S. E. et al. Some Bionomical Aspects Of Horn Fly Populations In Central Texas. **Environmental Entomology**, v. 1, n. 5, p. 565–568, 1972.
- KUNZ, S. E. et al. Inhibition of development in a field population of horn flies treated with diflubenzuron. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n. 3, p. 298–300, 1977.
- KUNZ, S. E. et al. Economics of Controlling Horn Flies (Diptera : Muscidae) in Range Cattle Management **Journal of Economic Entomology**, v 77, n 3, p. 657-660, 1984.
- KUNZ, S. E. Alternative diets for rearing horn fly, *Haematobia irritans*. **Southwestern Entomologist**, v. 14, n. 4, p. 375–378, 1989.
- KUNZ, S. E.; SCHMIDT, C. D. THE PYRETHROID RESISTANCE PROBLEM IN THE HORN FLY. **Journal Agric. Entomol.**, v. 4, n. 4, p. 358–363, 1985.
- LANDIM, CA. DA C. **Abelhas**. 1a. ed. [s.l.] UNESP, 2009.
- LEVOT, G. W. Cyromazine resistance detected in Australian sheep blowfly. **Australian Veterinary Journal**, v. 90, n. 11, p. 433–437, 2012.
- LIMA, L. et al. Raising of Horn Fly *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) in Laboratory by Means of Egg and Larva Inoculation. **Advances in Entomology**, v. 2, n. April, p. 76–80, 2014.

LIMA, L. G. F. **Influência do tratamento endectocida (ivermectina) e da ação biológica coprófila no desenvolvimento da “mosca-dos-chifres” (Haematobia irritans) (L.) (Diptera: Muscidae) e na entomofauna no município de Araçatuba - São Paulo, Brasil.** 2005. 180p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

LIMA, L. G. F.; PERRI, S. H. V.; PRADO, Â. P. Porcentagem de eclosão de ovos de *Haematobia irritans* ( L . ) ( diptera : muscidae ) em laboratório egg hatch percentage of *Haematobia irritans* ( L . ) ( diptera : muscidae ) in laboratory. **Biosci. J.**, v. 23, n. 3, p. 478–483, 2010.

LIMA, L. G. F.; PRADO, Â. P.; PERRI, S. H. V. Localização preferencial e índices diferenciados de infestação da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em bovinos da raça Nelore. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 25–32, 2002.

LOHMEYER, K. H.; KAMMLAH, D. M. **Improved mass rearing techniques for the horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae)**, p 83 - 85, 2006.

LOHMEYER, K.; POUND, J. Laboratory Evaluation of Novaluron as a Development Site Treatment for Controlling Larval Horn Flies, House Flies, and Stable Flies (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 647–651, 2012.

MACIEL, W. G. et al. Effects of *Haematobia irritans* infestation on weight gain of Nelore calves assessed with different antiparasitic treatment schemes. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 118, n. 1, p. 182–186, 2015.

MARCHIONDO, A. A. et al. Ovicidal and Larvicidal Modes of Action of Fenoxycarb Against the Cat Flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 5, p. 913–921, 1990.

MARQUES, F. A. C.; YAMAMURA, M. H.; VIDOTTO, O. Lesões no couro bovino causadas pelos principais ectoparasitas nas regiões noroeste do estado do Paraná e sudoeste do estado do Mato Grosso. **Semina: Ci. Agrárias**, v. 21, n. 1, p. 33–39, 2000.

MARTINS, F.; DA SILVA, I. G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 135–138, 2004.

MARTINS, J. RI.; CORRÊA, B. L.; CERESÉR, VI. H. Ação carrapaticida do fluazuron, formulação “pour-on”, sobre o carrapato bovino *Boophilus microplus*. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 1, n. 2, p. 257–261, 1995.

MATSUNAGA, H. et al. Metabolism of Pyriproxyfen in Rats. 1. Absorption, Disposition, Excretion, and Biotransformation Studies with [phenoxyphenyl-14C]Pyriproxyfen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 235–240, 1995.

MENESCAL, R. DE A. et al. Mosca do chifre: difícil controle resulta em perdas econômicas. **A Lavoura**, p. 14–16, 1990.

MEOLA, R. et al. Effect of Pyriproxyfen in the Blood Diet of Cat Fleas on Adult Survival , Egg Viability , and Larval Development Effect of Pyriproxyfen in the Blood Diet of Cat Fleas on Adult Survival , Egg Viability , and Larval Development. **Journal of medical entomology**, v. 37, n. 4, p. 503–506, 2000.

MEOLA, R. W.; PULLEN, S.; MEOLA, S. M. Toxicity and histopathology of the growth regulator Pyriproxyfen to adults and eggs of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of medical entomology**, v. 33, n. 4, p. 670–679, 1996.

MILLER, J. A. et al. Methoprene for Control of Horn Flies : Application to Drinking Water of

- Cattle Via a Tablet Formulation. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 3, p. 330–332, 1976.
- MILLER, J. A. et al. Methoprene for Control of the Horn Fly: 1 a Sustained-Release Bolus Formulation for Cattle. **Journal Of Economic Entomology**, v. 70, n. 5, p. 589–591, 1977.
- MILLER, J. A. et al. Sustained-release boluses containing methoprene for control of the horn fly and face fly. **The Southwestern Entomologist**, v. 4, n. 3, p. 195–200, 1979.
- MILLER, R. W.; PICKENS, L. G. Evaluation of Methoprene Formulations for Horn FLY Control. **Journal of Economic Entomology**, v. 68, n. 6, p. 810–812, 1975.
- MOCHI, D. A. **Fungos Entomopatogênicos para o controle da mosca-dos-chifres Haematobia irritans em laboratório e campo**. 2009. 93f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, 2009.
- MOON, R. D.; NOETZEL, D. M.; JOHNSTON, L. J. **Intake and Efficacy of Methoprene and Stirofos Mineral Blocks for Control of Horn Flies (Diptera: Muscidae) on Pastured Beef Cattle** **Journal of Economic Entomology**, 1993. Disponível em: <<http://jee.oxfordjournals.org/content/86/6/1738%5Cnhttp://jee.oxfordjournals.org/content/86/6/1738.abstract>>
- NAKAGAWA, Y. Nonsteroidal Ecdysone Agonists. **Vitamins and Hormones**, v. 73, n. 05, p. 131–173, 2005.
- NISHIDA, Y. et al. Desinfestation of experimentally infested cat fleas, *Ctenocephalides felis*, on Cats and Dogs by oral Lufenuron. **Journal Vet Sci**, v. 57, n. 4, p. 655–658, 1995.
- NOTTINGHAM, R. M. et al. Prevention of blowfly strike on lambs with the insect growth regulator dicyclanil. **The Veterinary record**, v. 79, n. 1, p. 51–57, 2001.
- OLIVEIRA, A. A. A. D. E.; AZEVEDO, H. C.; MELO, C. B. D. E. Suscetibilidade da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) Inseticidas Nos Tabuleiros Costeiros De Alagoas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 70, p. 65–70, 2006.
- OLIVEIRA, M. C. DE S. et al. Resistência aos pesticidas piretróides em populações de *Rhipicephalus microplus* e aos piretróides e organofosforados em *Haematobia irritans* colhidas em rebanhos de corte no Estado de São Paulo. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - EMBRAPA**, p. 34, 2015.
- OLIVEIRA, P. R. et al. Fluazuron-induced morphophysiological changes in the cuticle formation and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs. **Parasitology Research**, v. 112, n. 1, p. 45–58, 2013.
- PINTO, M. C.; PRADO, A. P. Resistance of *Musca domestica* L. populations to cyromazine (insect growth regulator) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 729–32, 2001.
- RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária Um tratado de doenças de Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- RAJAPAKSE, C. N. K.; MEOLA, R.; READIO, J. Comparative Evaluation of Juvenoids for Control of Cat Fleas (Siphonaptera: Pulicidae) in Topsoil. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 889–894, 2002.
- RIDDIFORD, L. Hormonal control of insect epidermal cell commitment *in vitro*. **Nature**, v. 259, p. 115–117, 1976.
- RIDDIFORD, L. M. Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the

- tobacco hornworm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 34, n. 4, p. 438–446, 1978.
- RIDDIFORD, L. M. Juvenile hormone action: A 2007 perspective. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, n. 6, p. 895–901, 2008.
- ROHRER, S. P.; ARENA, J. P. Ivvertmectin interations with invertebrate ion channels. In: CLARK (Ed.). . **Molucular action of inseticides on Ion Channels**. Vol. 591 ed. Washington DC: ACS Symposium Series, p. 264–283, 1995.
- RUST, M. K.; HEMSARTH, W. L. H. Vector Control , Pest Management , Resistance , Repellents Synergism of the IGRs Methoprene and Pyriproxyfen Against Larval Cat Fleas ( Siphonaptera : Pulicidae ). **Journal of Medical Entomology** v. 53, n. March, p. 629–633, 2016.
- RYMAN, V. E. et al. Research in Veterinary Science Influence of horn flies ( *Haematobia irritans* ) on teat skin condition , intramammary infection , and serum anti- *S . aureus* antibody titres in holstein heifers. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 343–346, 2013.
- SAHAGÚN, C. A. A. et al. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hypomycetes). **Journal of insect science (Online)**, v. 5, n. 50, p. 8p, 2005.
- SALOKHE, S. G.; DESHPANDE, S. G.; MUKHERJEE, S. N. Evaluation of the insect growth regulator Lufenuron (Match®) for control of *Aedes aegypti* by simulated field trials. **Parasitology Research**, v. 111, n. 3, p. 1325–1329, 2012.
- SANDERS, D. P.; DOBSON, R. C. Contributions to the Biology of the Horn Fly. **Journal Of Economic Entomology**, v. 62, n. 6, p. 1362–1366, 1969.
- SAUERESSING, T. M.; BARROS, A. T. Diagnóstico da Susceptibilidade de Populações de MOsca-dos-chifres a Inseticidas em Goiás, Tocantins e Distrito Federal. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento numero 82 - Embrapa**, p. 16, 2003.
- SCHMID, H. R.; VAN TULDER, G.; JUNQUERA, P. Field efficacy of the insect growth regulator dicyclanil for flystrike prevention on lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 86, n. 2, p. 147–151, 1999.
- SCHMIDT, C. D.; HARRIS, R. L.; HOFFMAN, R. A. Mass rearing of the horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in the laboratory . **Annals of the Entomological Society of America**, v. 60, n. 3, p. 508–510, 1967.
- SCHMIDT, C. D.; KUNZ, S. E. Testing immature laboratory-reared stable flies and horn flies for susceptibility to insecticides. **Journal of economic entomology**, v. 73, n. 5, p. 702–3, 1980.
- SCHREIBER, E. T.; CAMPBELL, J. B. Horn fly (Diptera: Muscidae) distribution on cattle as influenced by host color and time of day. **Environmental Entomology**, v. 15, n. 6, p. 1307–1309, 1986.
- SCOTT, F.; COUMENDOUROS, K.; GRISI, L. Avaliacao *in vitro* da susceptibilidade da h. irritans a alguns inseticidas no estado de são paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 83–85, 1994.
- SCOTT, F.; GRISI, L.; COMENDOUROS, K. avaliação a Nivel de Campo do Uso de Methoprene, Adicionado ao Sal MIneral, no Controle de *Haematobia irritans* em Bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 85–88, 1995.
- SCOTT, J. G. et al. Insecticide resistance in house flies from caged-layer poultry facilities. **Pest Management Science**, v. 56, p. 147–153, 2000.



- SECCACINI, E. et al. Effectiveness of pyriproxyfen and diflubenzuron formulations as larvicides against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 24, n. 3, p. 398–403, 2008.
- SENG, C. M. et al. Six months of *Aedes aegypti* control with a novel controlled-release formulation of pyriproxyfen in domestic water storage containers in Cambodia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 39, n. 5, p. 822–826, 2008.
- SIHUINCHA, M. et al. Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Perú. **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 4, p. 620–630, 2005.
- SINDAN. **Mercado veterinário por classe terapêutica**. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>>. Acesso em: 21 jun. 2017.
- SOUZA, G. S. DE. **Avaliação da atividade do novaluron, sobre *Boophilus microplus* (Canestrini) em bovinos de corte naturalmente infestados**. 2009. 44f. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica) Universidade Católica de Goiás, Goiania, 2009.
- STAAL, G. B. Insect Growth Regulators with Juvenile Hormone Activity. **Annual Review of Entomology**, v. 20, n. 21, p. 417–460, 1975.
- STELMAN, C. D. et al. The effects of hair density of beef cattle on *Haematobia irritans* horn fly populations. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 257–264, 1997.
- STOTZER, E. S. et al. Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 08, n. 3, p. 198–221, 2014.
- SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUM, D. W. **Alternatives to Pesticides in Stored-product IPM**. Ilustrada ed. Springer Science & Business Media, 2012.
- SULAIMAN, S.; MUSTAFFA, S. H. M. S.; JEFFERY, J. Effect of Triflumuron and Pyriproxyfen on *Musca domestica* L. Larval Stages in the Laboratory. **Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2008.
- SULLIVAN, J. Environmental fate of pyriproxyfen. p. 9, 2000.
- SULLIVAN, J. J.; GOH, K. S. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. **Journal of Pesticide Science**, v. 33, n. 4, p. 339–350, 2008.
- SUTHERLAND, I. H. Veterinary use of ivermectin. **Acta Leidensia**, v. 59, n. 1–2, p. 211–216, 1990.
- TAYLOR, M. A. Recent Developments in Ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 3, p. 253–268, 2001.
- TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. Terceira ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- TFOUNI, S. A. V et al. Determination of diflubenzuron residues in milk and cattle tissues. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 1, p. 301–307, 2013.
- THOMAS, D. B. Influence of a Juvenile Hormone Analog on Reproduction of Normal and Sterilized Adult Horn Flies (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 77, p. 666–669, 1984.
- TRUMAN, J. W. et al. Juvenile Hormone Is Required to Couple Imaginal Disc Formation with Nutrition in Insects. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1385–1388, 2006.
- TRUMAN, J. W.; RIDDIFORD, L. M. The origins of insect metamorphosis. **Nature**, v. 401,

n. 6752, p. 447–452, 30 set. 1999.

VALÉRIO, J. R.; GUIMARÃES, J. H. Sobre a ocorrência de uma nova praga, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae), no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 4, p. 417–418, 1983.

VARLOUD, M.; FOURIE, J. J. Onset of efficacy and residual speed of kill over one month of a topical dinotefuran-permethrin-pyriproxyfen combination (Vectra<sup>®</sup>3D) against the adult cat flea (*Ctenocephalides felis felis*) on dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 211, n. 1–2, p. 89–92, 2015.

VICH GL49. Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs In Studies to Establish Product Withdrawal Periods, **Guidance for industry**, 2016.

VYTHILINGAM, I. et al. Laboratory and field evaluation of the insect growth regulator pyriproxyfen (Sumilarv 0.5G) against dengue vectors. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 21, n. 3, p. 296, 2005.

WHO. **WHO specifications and evaluations for public health pesticides pyriproxyfen**. p. 1–19, 2006.

WHO. **Pyriproxyfen in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers**. p. 5, 2008.

WIGGLESWORTH, V. B. The juvenile hormone effect of farnesol and some related compounds - Quantitative experiments. **Journal of Insect Physiology**, v. 9, n. 1, p. 105–119, 1963.

WILLIAMS, C. M. Third-Generation Pesticides. **Scientific American**, v. 217, p. 13–17, 1967.

WING, K. RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line. **Science**, v. 241, n. 4864, p. 467–469, 1988.

WING, K. D.; SLAWECKI, R. A.; CARLSON, G. R. RH 5849, a Nonsteroidal Ecdysone Agonist: Effects on Larval Lepidoptera. **Science**, v. 241, n. 4864, p. 470–472, 1988.

YOSHINO, H.; NAKATSUKA, I.; YAMADA, H. Metabolism of Pyriproxyfen. 2. Comparison of in Vivo Metabolism between Rats and Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 2681–2686, 1995.