



**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Desenvolvimento de Tabletes Mastigáveis de Fipronil, Farmacocinética  
Descritiva e Eficácia no Tratamento de Cães Naturalmente Infestados  
por *Cochliomyia hominivorax***

**ISABELLE VILELA BONFIM**

**2024**



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

**DESENVOLVIMENTO DE TABLETES MASTIGÁVEIS DE**  
**FIPRONIL, FARMACOCINÉTICA DESCRITIVA E EFICÁCIA NO**  
**TRATAMENTO DE CÃES NATURALMENTE INFESTADOS POR**  
*Cochliomyia hominivorax*

**ISABELLE VILELA BONFIM**

*Sob a orientação da Professora*  
**Yara Peluso Cid**

*Sob a coorientação de*  
**Debora Azevedo Borges**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2024

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

B 713d

Bonfim, Isabelle Vilela, 1996-  
Desenvolvimento de Tabletes Mastigáveis de  
Fipronil, Farmacocinética Descritiva e Eficácia no  
Tratamento de Cães Naturalmente Infestados por  
Cochliomyia hominivorax / Isabelle Vilela Bonfim. -  
Seropédica, 2024.  
88 f.

Orientadora: Yara Peluso Cid.  
Coorientadora: Debora Azevedo Borges.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em  
Ciências Veterinárias, 2024.

1. Parasitologia. 2. Ectoparasiticidas. 3. Miíases.  
4. Biodisponibilidade plasmática. 5. Fenilpirazóis. I.  
Cid, Yara Peluso, 1982-, orient. II. Borges, Debora  
Azevedo, 1988-, coorient. III Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em  
Ciências Veterinárias. IV. Título.



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



ATA N° 314/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.008848/2024-95

Seropédica-RJ, 23 de fevereiro de 2024.

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

**ISABELLE VILELA BONFIM**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23/02/2024

*(Assinado digitalmente em 23/02/2024 14:39)*

YARA PELUSO CID  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)  
Matricula: 80000487

*(Assinado digitalmente em 23/02/2024 12:21)*

ISABELLA VILHENA FREIRE MARTINS  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 888.888.547-88

*(Assinado digitalmente em 29/02/2024 18:55)*

DIEGO FONTANA DE ANDRADE  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 888.888.500-88

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 314, ano: 2024, tipo: ATA, data de emissão: 23/02/2024 e o código de verificação: 242315b4ec

*“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas.  
Muito conhecimento, que se sintam humildes.”*

*- Leonardo da Vinci*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família, por sempre me acolherem e proporcionarem muitos momentos de alegria. Obrigada aos meus pais, Rogerio Bonfim e Marcia Beatriz Silva, por me incentivarem a estudar ao longo dos últimos anos e por terem abdicado tanto pela nossa criação. Aos meus irmãos, Rogerio Vilela Bonfim e Beatriz Vilela Bonfim, por serem bons ouvintes e darem sempre os melhores conselhos. Vocês são o que tenho de mais importante na vida e nós sempre estaremos juntos. À minha sobrinha Manuela, por me lembrar de como devemos viver com leveza. Às minhas primas Karin Thamiris e Alexa Cantos pelas boas risadas sempre que nos encontramos.

À Fernando Miranda, pela companhia ao longo de todo mestrado, por ter comemorado minhas conquistas e ajudado nos momentos difíceis. Obrigada pela ajuda em todas as etapas da dissertação. Agradeço também aos meus filhos de quatro patas Loren, Rico, Granola e Lobinha.

À Debora Borges, minha irmã de coração, por todos os ensinamentos, desde quando eu era sua estagiária de iniciação científica. Você é uma das melhores pessoas que conheço e é uma inspiração diária. Obrigada por me lembrar sempre que podemos ser o que quisermos.

À Anna Julia, minha colega de turma da graduação e grande amiga do mestrado. Obrigada por todos os momentos felizes e por sempre me estender a mão. À Fernanda Campos, Beatriz Fuzii e Clara Dutra, não só por terem me ajudado na execução da dissertação, mas pela amizade e por serem sempre tão empáticas e gentis.

À professora Yara Cid, por toda orientação e parceria. Você é um exemplo como profissional e agradeço imensamente pela forma como trabalha e se relaciona com seus alunos.

Ao professor Fabio Scott, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com o que gosto desde a graduação. Agradeço também por toda ajuda em muitas etapas da dissertação.

À Karen Kuhfuss, Ingrid Jesus, Taynara Monsores e Thais Paes por toda dedicação nas etapas que realizamos no setor de farmacometria e por tornarem esses dias leves. Aos outros “orientados da mãe Yara”: Mathias, Matheus, Giovanna e Alice, pelos momentos felizes e por toda ajuda na execução desse trabalho.

À professora Katherina Comendouros, que foi quem me acolheu como aluna de IC em 2018 e que me cumprimenta até hoje com um abraço pelos corredores. À professora Thaís Azevedo, por ter me ajudado e acolhido sempre que precisei. À Viviane Magalhães, Carlos Eduardo, Andressa Reis, Guilherme Motta, Gustavo Álvaro, Liz Waltenberg, Jéssica D'avilla e Monique Medeiros, também por terem nos ajudado no trabalho e aos demais estagiários, residentes, mestrandos, doutorandos, técnicos administrativos, funcionários da limpeza e administradores da equipe, por todos os ensinamentos.

À todos os beagles do LQEPV, por serem um grande incentivo para aperfeiçoar meus conhecimentos. É um prazer trabalhar pelos “meus filhos” e tenho um carinho especial por cada um deles. Agradeço especialmente à Nala, Xena, Vicente, Valentina, Jamil, Vaquinha, Nacho, Peperoni, Maui, Fiorela, Winny, Sorriso, Raul, Cauã, Pipoca e Carlos Daniel, que foram as crianças que participaram dos estudos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço também o financiamento desta pesquisa à Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica da UFRRJ (FAPUR) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À UFRRJ, minha casa desde 2016, por acolher tantas pessoas e permitir que muitos sonhos sejam concretizados.

## **BIOGRAFIA**

Isabelle Vilela Bonfim, filha de Marcia Beatriz Silva e Rogerio Bonfim, nasceu no dia 11 de novembro de 1996, na cidade de Tremembé, no interior do estado de São Paulo. cursou o ensino fundamental no Centro Educacional Sesi 033, em Tremembé - SP e o ensino médio no Colégio Doutor Alfredo Pujol, em Pindamonhangaba – SP, concluindo no ano de 2013. Em 2016 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – RJ. Durante a graduação realizou estágios nas áreas de clínica médica e cirúrgica de pequenos animais e foi aluna de iniciação científica do LQEPV – Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, localizado nas dependências da UFRRJ, orientada em 2018 pela professora Katherina Coumendouros e de 2019 a 2021 pelo professor Fabio Barbour Scott. Gradou-se em Medicina Veterinária no ano de 2021 e em março de 2022 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UFRRJ, bolsista de Pós-graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob a orientação da professora Yara Peluso Cid. Desde 2022 é responsável pelo Setor de Clínica de Cães do LQEPV. Durante este período foi orientadora de duas bolsistas de iniciação científica e supervisora de mais de 15 alunos de vivência acadêmica no setor.

## RESUMO

BONFIM, Isabelle Vilela. **Desenvolvimento de tabletes mastigáveis de fipronil, farmacocinética descritiva e eficácia no tratamento de cães naturalmente infestados por *Cochliomyia hominivorax***. 2024. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Dentre os principais ectoparasitos de importância em animais de companhia, destacam-se as moscas *Cochliomyia hominivorax*, espécie comumente responsável por causar miíases primárias em cães. Diversas classes de inseticidas são utilizados para o manejo das infestações. O fipronil (FIP) é um inseticida pertencente à classe dos fenilpirazóis, utilizado na medicina veterinária pela via tópica. Devido à dados de exposição humana do ativo utilizado a partir dessa via de administração, somado à tendência no mercado veterinário no desenvolvimento de ectoparasiticidas por via oral, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma formulação sob a forma farmacêutica de tabletes mastigáveis contendo fipronil, com avaliação da farmacocinética descritiva do tratamento por via oral e eficácia em cães naturalmente infestados por larvas de *C. hominivorax*. Os tabletes foram desenvolvidos por moldagem, seguindo as etapas de preparo do diluente, aglutinante, mistura dos componentes e incorporação do ativo. O estudo farmacocinético foi realizado após a administração oral de uma unidade de tablete mastigável de fipronil a 72 mg, correspondente à 6 mg/kg. O estudo de eficácia foi conduzido através da administração por via oral de uma unidade de tablete mastigável de fipronil a 72 mg, conforme a ocorrência natural de cães infestados por *C. hominivorax*. A caracterização dos tabletes foram aceitáveis em relação aos critérios de controle de qualidade, com peso médio, doseamento e uniformidade de dose dentro dos limites aceitáveis. Quando administrado por via oral, foi absorvido e atingiu a concentração sistêmica rapidamente, com C<sub>max</sub> de 3126,53 ng/mL em 2,22 h (T<sub>max</sub>). O estudo de eficácia clínica *in vivo* com o tratamento de uma unidade do tablete mastigável de fipronil a 72 mg promoveu a eliminação de 97,76% das larvas *C. hominivorax* após 24h de tratamento, com eficácia global de 100% em cães infestados naturalmente.

**Palavras-chave:** Parasitologia, Ectoparasiticidas, Miíases, Biodisponibilidade plasmática, Fenilpirazóis.

## ABSTRACT

BONFIM, Isabelle Vilela. **Development of fipronil chewable tablets, descriptive pharmacokinetics and efficacy in the treatment of dogs naturally infested by *Cochliomyia hominivorax***. 2024. 88p. Dissertation (Master's in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Among the main ectoparasites of importance in companion animals, the flies *Cochliomyia hominivorax* stand out, a species commonly responsible for causing primary myiasis in dogs. Several classes of insecticides are used to manage infestations. Fipronil (FIP) is an insecticide belonging to the phenylpyrazoles class, used in veterinary medicine topically. Due to data on human exposure of the active ingredient used through this route of administration, coupled with the trend in the veterinary market towards the development of oral ectoparasiticides, the present study aimed to develop a formulation in the pharmaceutical form of chewable tablets containing fipronil, with evaluation of the descriptive pharmacokinetics of oral treatment and efficacy in dogs naturally infested with *C. hominivorax* larvae. The tablets were developed by molding, following the steps of preparing the diluent, binder, mixing the components and incorporating the active ingredient. The pharmacokinetic study was carried out after oral administration of one unit of fipronil chewable tablet at 72 mg, corresponding to 6 mg/kg. The efficacy study was conducted through the oral administration of one unit of fipronil chewable tablet at 72 mg, according to the natural occurrence of dogs infested by *C. hominivorax*. The characterization of the tablets was acceptable in relation to quality control criteria, with average weight, dosage and dose uniformity within acceptable limits. When administered orally, it was absorbed and reached systemic concentration quickly, with a  $C_{max}$  of 3126.53 ng/mL in 2.22 h ( $T_{max}$ ). The *in vivo* clinical efficacy study with the treatment of one unit of the 72 mg fipronil chewable tablet promoted the elimination of 97.76% of *C. hominivorax* larvae after 24 hours of treatment, with an overall efficacy of 100% in naturally infested dogs.

**Keywords:** Parasitology, Ectoparasiticides, Myiasis, Plasma bioavailability, Phenylpyrazoles.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>Cochliomyia hominivorax</i> . Fonte: Arquivo pessoal. ....	4
<b>Figura 2.</b> <i>Cochliomyia hominivorax</i> em seus diferentes estágios. (A) Mosca adulta; (B): Massa postural; (C): Larva; (D): Par de peritrema contendo três fendas espiraculares; (E): Pupa. Fonte: Arquivo pessoal.....	6
<b>Figura 3.</b> Lesões por larvas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> em cães. (A): lesão em região de orelha esquerda; (B) Lesão em região perianal. Fotos: arquivo pessoal. ....	8
Figura 4. Estrutura química do fipronil (NCBI, 2022).....	17
<b>Figura 5.</b> Preparação dos tabletes de fipronil. (A) incorporação do fipronil na ração seca; (B) mistura componentes secos homogeneização utilizando graal e pistilo de cerâmica; (C) adição dos agentes aglutinantes e umectantes à massa; (D) massa finalizada. ....	26
<b>Figura 6.</b> (A). Preenchimento das formas com a massa de fipronil; (B): Moldes preenchidos com massa de fipronil; (C): Tabletes mastigáveis de fipronil desenhados.....	27
<b>Figura 7.</b> Tabletes mastigáveis de fipronil acondicionados em duas embalagens distintas. (A): embalagem primária em sachê de plástico polietileno de alta densidade transparente e uma face picotada; (B): sachês compostos de alumínio com 3 soldas e abre-fácil, com face interior em polietileno, seladas com seladora de 10 mm.....	30
<b>Figura 8.</b> (A) Coleta de sangue realizada pela punção da veia jugular com agulha 21G e tubo vacuntainer em cão da raça beagle tratado com um tablete mastigável de fipronil 72 mg para posterior determinação dos parâmetros farmacocinéticos. (B) Tubos identificados com o microchip de cada animal e os tempos de avaliação correspondente. ....	32
<b>Figura 9.</b> Variação de peso de 20 tabletes mastigáveis de fipronil. Faixa azul representando o peso médio e faixa vermelha indicando o limite de variação mínimo e máximo de 5% a partir do peso médio .....	38
<b>Figura 10.</b> Variação de peso de 20 tabletes mastigáveis de fipronil. Faixa azul representando o peso médio e faixa vermelha indicando o limite de variação mínimo e máximo de 5% a partir do peso médio .....	39
<b>Figura 11.</b> Curva padrão, obtida a partir de diluições de fipronil em concentrações conhecidas. ....	39

<b>Figura 12.</b> Curva de concentração plasmática média (n= 8) em plasma canino após administração por via oral de tabletes mastigáveis de fipronil na dose de 6 mg/kg.....	43
<b>Figura 13.</b> Comparativo do percentual de larvas (vivas e mortas) de <i>Cochliomyia hominivorax</i> eliminadas para cada tempo de avaliação com o percentual acumulativo após tratamento por via oral em dose única de tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães. ....	42
<b>Figura 14.</b> Comparação entre o percentual de larvas eliminadas vivas e mortas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> expelidas em cada tempo de avaliação experimental após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados .....	45
<b>Figura 15.</b> Comparação entre o percentual de larvas eliminadas vivas e mortas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> expelidas em cada tempo de avaliação experimental após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados .....	45
<b>Figura 16.</b> Número médio de larvas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> presentes antes e após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados .....	47
<b>Figura 17.</b> Eficácia na eliminação das larvas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> e eficácia terapêutica global após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados.....	48
<b>Figura 18.</b> Representação comparativa entre o percentual médio acumulado de expulsão das larvas (vivas e mortas) após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil e a concentração plasmática média de fipronil de acordo com as diferentes tomadas de tempo .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Peso médio, doseamento e uniformidade de dose obtidos de dois lotes de tabletes mastigáveis de fipronil .....	40
<b>Tabela 2.</b> Doseamento dos tabletes mastigáveis de fipronil armazenados pelo período de 6 meses em embalagens de plástico ou alumínio, sob as condições de armazenamento em temperatura de geladeira ou prateleira.....	41
<b>Tabela 3.</b> Dados dos cães participantes do estudo de avaliação da farmacocinética descritiva de tabletes mastigáveis de fipronil 72 mg.....	42
<b>Tabela 4.</b> Valores individuais de concentração plasmática de fipronil nas amostras de plasma coletadas dos cães tratados por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil.....	1
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros farmacocinéticos do fipronil após administração por via oral de tablete mastigável na dose de 6 mg/kg em cães. ....	36
<b>Tabela 6.</b> Dados dos cães participantes do estudo de avaliação da eficácia na eliminação de larvas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> contidas em feridas naturais, tratados em dose única tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil por unidade pela via oral .....	38
<b>Tabela 7.</b> Número de larvas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> expelidas (vivas + mortas), de larvas removidas da ferida após 24h e número total de larvas recuperadas por animal para cada tempo de avaliação após tratamento em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil pela via oral em cães naturalmente infestados .....	39
<b>Tabela 8.</b> Percentual de larvas expelidas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> para cada tempo de avaliação experimental após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72 mg de fipronil em cães naturalmente infestados.....	41
<b>Tabela 9.</b> Percentual acumulado de larvas expelidas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> para cada tempo de avaliação experimental após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados.....	41
<b>Tabela 10.</b> Comparação entre o percentual de larvas vivas e mortas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> expelidas em cada tempo de avaliação experimental após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados .....	44
<b>Tabela 11.</b> Número total e médio de larvas vivas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> presentes nos cães antes e após 24h do tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil .....	46

**Tabela 12.** Identificação de instares larvais de *Cochliomyia hominivorax* expelidos de cães após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados ..... 49

## LISTA DE ABREVIATÖES

FIP – Fipronil

AChE - Acetilcolinesterase

ACh - Acetilcolina

GABA - Ácido gama-aminobutírico

C<sub>max</sub> - Concentração plasmática máxima

T<sub>max</sub> - Tempo correspondente ao pico plasmático

AUC - Área sobre a curva

T1/2 - Meia-vida de eliminação

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

IV – Instituto de Veterinária

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

LQEPV - Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária

ACN – Acetonitrila

CLAE-UV - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

SM - Solução-mãe

SE - Solução estoque

PI - Padrão interno

EFS - Extração em fase sólida

UV – Ultravioleta

DP – Desvio padrão

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 A mosca <i>Cochliomyia hominivorax</i> .....	3
2.2. Controle de <i>Cochliomyia hominivorax</i> .....	8
2.2.1 Manejo e fatores de risco:.....	8
2.2.2 Controle químico .....	10
2.2.2.1 Carbamatos e organofosforados .....	10
2.2.2.2 Piretróides .....	11
2.2.2.3 Neonicotinóides .....	13
2.2.2.4 Lactonas macrocíclicas.....	13
2.2.2.5 Reguladores/Disruptores do Crescimento de Insetos .....	14
2.2.2.6 Spinosinas.....	15
2.2.2.7 Isoxazolinas .....	16
2.2.2.8 Fenilpirazóis .....	17
2.4 Formas farmacêuticas do fipronil na medicina veterinária .....	19
2.5 Farmacocinética clínica .....	21
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 Desenvolvimento dos tabletes mastigáveis de fipronil.....	24
3.1.1 Preparo do diluente.....	25
3.1.2 Preparo do aglutinante .....	25
3.1.3 Mistura dos componentes e incorporação do ativo .....	25
3.1.4 Obtenção dos tabletes mastigáveis de fipronil por moldagem .....	26
3.2. Caracterização físico-química dos tabletes mastigáveis de fipronil.....	27
3.2.1. Determinação do peso .....	27
3.2.2. Doseamento .....	28
3.2.3. Uniformidade de dose unitárias .....	29
3.2.3. Estudo de estabilidade de curta duração.....	29
3.1. Farmacocinética descritiva dos tabletes mastigáveis de fipronil.....	30
3.2.1. Animais, tratamento e coleta de amostra.....	30
3.2.2 Preparo das amostras e análise cromatográfica .....	33
3.2.3 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos .....	34
3.1. Estudo de eficácia clínica .....	34
3.1.1. Análise estatística .....	36
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
4.1 Desenvolvimento e caracterização dos tabletes mastigáveis de fipronil.....	38
4.2. Estudo de estabilidade de curta duração.....	40
4.3 Farmacocinética descritiva dos tabletes mastigáveis de fipronil.....	41
4.4. Estudo de eficácia clínica .....	37
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A preocupação dos tutores quanto aos aspectos sanitários dos seus animais de companhia foi aumentando gradualmente ao longo dos anos. Atualmente, os cães preenchem os lares como membros da família ou ainda exercendo outros tipos de atividades, como cães guia ou cães terapeutas, fatores que proporcionaram maior preocupação com a sanidade e bem-estar destes animais que, inclusive, desenvolveram habilidades únicas de comunicação com o homem. Atrelado a este maior interesse em animais de companhia pela sociedade, eleva-se também a preocupação por doenças, dentre as quais se destacam as enfermidades transmitidas por ectoparasitos, pois estas são responsáveis por causar danos diretos indiretos ao hospedeiro.

Apesar de pulgas e carrapatos serem responsáveis pela maioria das infestações de ectoparasitos em cães e gatos, as moscas possuem também grande importância parasitológica para animais domésticos. No Brasil, a mosca *Cochliomyia hominivorax* (*C. hominivorax*) é um dos principais ectoparasitos de animais, sendo frequentemente relatada como causadora de miíases cutâneas primárias em diferentes hospedeiros. As lesões ocasionadas pelas larvas são também conhecidas popularmente como “bicheiras” em diferentes espécies. As enfermidades ocasionadas pela infestação promovem importantes lesões nos hospedeiros, que frequentemente são acompanhadas de afecções sistêmicas, que quando não diagnosticadas e tratadas precocemente, podem causar morbidade e levar o hospedeiro à óbito.

A eliminação das larvas de uma lesão é realizada através da remoção mecânica, associada ao uso de fármacos com o potencial larvicida, e dentre estes fármacos destaca-se o fipronil (FIP), inseticida de amplo espectro, pertencente à classe dos fenilpirazóis. O composto já apresenta resultados positivos quando usado *in vivo*, em apresentações tópicas, principalmente pelo seu mecanismo de ação, que elimina o parasito por hiperexcitação. Porém, apesar da eficácia, as apresentações contendo fipronil no mercado, são apenas de uso externo, como *sprays*, *spot-on*, *pour-on* e coleiras.

Além do uso na medicina veterinária, o fipronil é amplamente utilizado na agricultura, onde é gerado grande parte dos resíduos do ativo e seus metabólitos, os quais são considerados uma importante fonte de contaminação ambiental. O uso de ectoparasitos por via tópica na medicina veterinária também contribuem para a exposição não ocupacional do ativo e com sua eliminação em águas residuais, fator que

aumenta o risco de dano aos tutores que entrarão em contato com os animais tratados. Estes dados evidenciam a importância de estudos que busquem diminuir a exposição em seres humanos e animais, além de minimizar os resíduos ambientais gerados.

Nesse contexto, a ascensão de formulações pela via de administração oral vêm se tornando uma tendência no mercado veterinário, com classes que mostram eficácia comprovada em ectoparasitos e que, ao serem administradas pela via oral, promovem maior sustentabilidade por diminuírem a exposição dos tutores aos ativos. Além disso, há a tendência no desenvolvimento de produtos que são aceitos voluntariamente pelos animais de companhia, sendo chamados de palatáveis ou mastigáveis. Essa forma de administração permite maximizar a adesão ao tratamento devido à facilidade de administração por parte dos tutores, os quais se mostram mais confortáveis em tratar as enfermidades de seus animais com produtos que são de administração mais prática.

Recentemente a biodisponibilidade sistêmica do FIP em cães foi relatada por Dos Santos *et al.* (2020) e Dos santos *et al.*, (2021) por meio de administração oral de comprimidos, na qual o FIP apresentou perfil farmacocinético de rápida absorção, biotransformação e eliminação lenta, indicando seu potencial para uso sistêmico oral no controle de pulgas e carrapatos em cães. No entanto, dados em relação a eficácia pela via oral em miíases causadas por *C. hominivorax* em cães ainda não foram explorados, estimulando estudos para essa finalidade.

Desta forma, objetivou-se o desenvolvimento e caracterização de tabletes mastigáveis de fipronil com posterior avaliação de sua farmacocinética e eficácia da formulação em cães naturalmente infestados por larvas de *C. hominivorax*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A mosca *Cochliomyia hominivorax*

O filo Arthropoda representa uma grande diversidade de invertebrados, presente em todos os habitats conhecidos, englobando mais de 80% de todas as espécies de animais descritas, incluindo carrapatos, pulgas, aranhas, caranguejos e moscas. Uma classe importante pertencente ao filo Arthropoda são os insetos, que constituem cerca de 90% de todos os artrópodes conhecidos (Wall; Shearer, 1997).

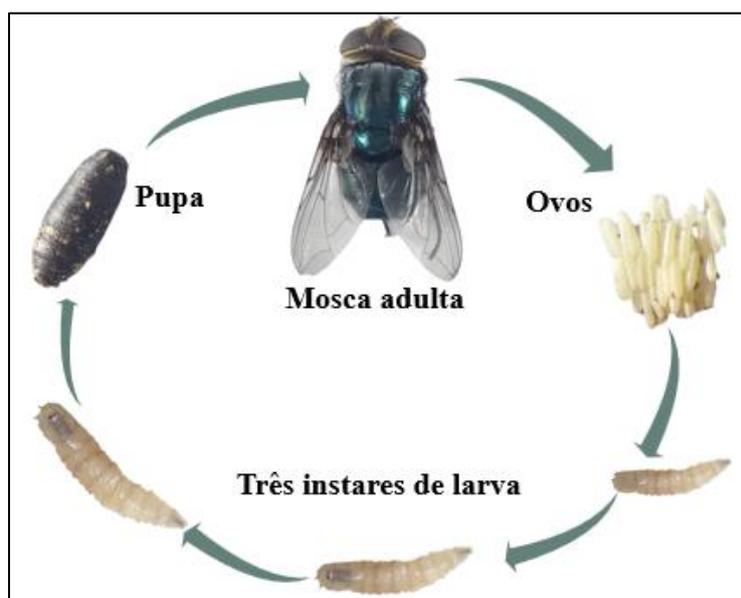
Dentre os insetos, destacam-se as moscas, que pertencem a ordem Díptera, cujo ciclo biológico envolve as fases de ovo, larva, pupa e adulto. As moscas adultas são caracterizadas morfologicamente pela presença de um par de asas funcionais na região de mesotórax, com três subordens de importância: os conhecidos popularmente como mosquitos e pernilongos, pertencentes à Nematocera, as mutucas e butucas, classificadas em Brachycera, e as moscas varejeiras, moscas domésticas, moscas das carcaças, moscas do berne, moscas tsé-tsé e moscas hipoboscídeas, correspondentes à subordem Cyclorrhapha (Bowman *et al.*, 2010).

Dentre as moscas pertencentes à subordem Cyclorrhapha, destaca-se a família Calliphoridae, cujas larvas podem invadir tecidos e causar uma condição patológica denominada miíase (Bowman *et al.*, 2010). O termo miíase é derivado da palavra grega “*myia*”, que significa mosca. O termo foi citado pela primeira vez por Hope (1940), para se referir à infestação de animais humanos e vertebrados vivos por larvas de dípteros, que durante um período se alimentam de tecido morto ou vivo do hospedeiro.

As miíases podem ser classificadas como primárias, onde o inseto necessita de um hospedeiro obrigatório para que as larvas possam se alimentar de tecido vivo, e são chamadas biontófagas. Podem também ser classificadas como miíases secundárias, cujas moscas se alimentam geralmente de tecido morto ou em decomposição, denominadas necrobiontófagas (Hall; Wall, 1995; Sheikh *et al.*, 2011).

A família Calliphoridae é considerada grande, com mais de 1000 espécies distribuídas em 150 gêneros, sendo ao menos 80 espécies com relatos de miíase traumática, dentre as quais se destaca a mosca da bicheira do Novo Mundo, de espécie denominada *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858), cuja taxonomia a classifica, reiterando ao exposto acima, no reino animal, filo Arthropoda, subfilo Hexapoda, classe Insecta, subclasse Pterigota, infraclasse Neoptera, ordem Díptera, subordem

Cyclorrhapha, infraordem Muscomorpha, superfamília Oestroidea, família Calliphoridae, subfamília Chrysomiinae, tribo Chrysomiini e gênero *Cochliomyia* (Bowman *et al.*, 2010; Hosni *et al.*, 2019). Além do gênero *Cochliomyia*, os gêneros *Chrysomya*, *Cordylobia*, *Lucilia* e *Calliphora* também são de importante relevância em infestações (Taylor *et al.*, 2017). A mosca *C. hominivorax* é uma espécie de ectoparasito obrigatório, cujo ciclo biológico está representado na Figura 1.



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Cochliomyia hominivorax*. Fonte: Arquivo pessoal.

Para a ocorrência das infestações, é necessário que o hospedeiro tenha uma lesão estabelecida, a qual pode ser provocada por diversos fatores, como traumas, distúrbios dermatológicos ou infestações por carrapatos e pulgas (Guimarães; Papavero, 1983). Assim, na presença de uma ferida, a mosca adulta fêmea é atraída para se alimentar dos exsudatos e para realizar a oviposição, caracterizada pela deposição dos ovos. O tempo para a alimentação da mosca na lesão pode variar entre cinco a seis minutos (Guillot *et al.*, 1977b; Thomas; Mangan, 1989) e pode ocorrer antes ou imediatamente após a oviposição. Estima-se que o tempo médio de vida da fêmea é de 33 dias, com a realização de ao menos 8 oviposições com aproximadamente de 200 ovos por lote depositados de uma a quatro massas nas bordas de lesões ou orifícios corporais (Thomas; Mangan, 1989). Segundo os autores, em comparação com as visitas para alimentação, estima-se que a deposição da massa de ovos pode levar até 15 minutos. Os ovos são depositados em uma massa plana também conhecida como postura, de forma oval a irregular, com ovos orientados na mesma direção.

Após o período de incubação, geralmente entre 12 e 24 horas, a eclosão das larvas é iniciada, dando origem à larva de primeiro instar (L<sub>1</sub>). A larva desenvolve o estágio posterior de segundo instar (L<sub>2</sub>) dois dias após a eclosão dos ovos e passa para o terceiro instar (L<sub>3</sub>) após 24h (Guimarães; Papavero, 1983). As larvas completam seu desenvolvimento no hospedeiro durante 4 a 8 dias, momento em que causa importante destruição tecidual e, após esse período, deixam a ferida e caem no solo.

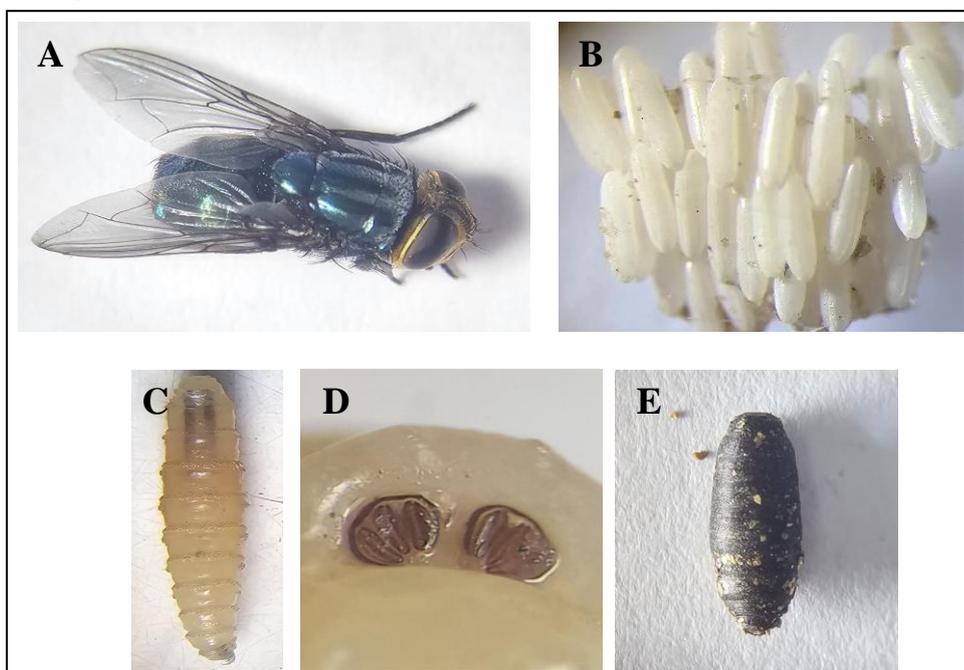
Para atingir a forma adulta, a larva deve sofrer metamorfose completa, durante a qual todo corpo é reorganizado e reconstruído. Essa fase é possível devido à incorporação de um instar pupal, responsável pela ponte entre os instares juvenis e adultos (Wall; Shearer, 1997). Para isso, a cutícula do estágio larval final contrai e assume uma coloração mais escura para formar uma concha protetora, conhecida como o pupário, com a pupa em seu interior. A transição entre a larva L<sub>3</sub> e a formação da pupa é também conhecida como pupação, sendo que o tempo para esse processo ocorrer depende da temperatura. Em temperatura média de 32°C, pode ocorrer a transição em até quatro dias. Contudo, em temperaturas mais baixas, de 15°C aproximadamente, pode levar até 11 dias (Byrd; Butler, 1996). A pupa não se alimenta e é imóvel, mas é metabolicamente muito ativa, pois nesse momento os tecidos e órgãos larvais antigos são remodelados ou substituídos por órgãos adultos para assumirem a forma adulta (Wall; Shearer, 1997).

O tempo para a mosca adulta emergir é variável e pode ocorrer de uma semana até dois meses, dependendo, sobretudo, das características climáticas da região (Guimarães; Papavero, 1999). Há uma tendência para redução do período pupal em temperaturas mais elevadas, com período médio de sete a 13 dias a uma temperatura média de 37°C (Elwaer; Elowni, 1991). O período pode durar mais tempo, mas no geral, climas quentes e úmidos são associados à diminuição do tempo de emergência, ao contrário de climas secos e frios, que tendem a aumentar o período pupal (Fresia *et al.*, 2021).

As moscas da família Calliphoridae compreendem indivíduos de quatro a seis mm de comprimento, abdômen arredondado ou oval, de coloração escura e corpo com reflexo metálico, que pode variar de coloração esverdeada a cúprico (Rodrigues-guimarães *et al.*, 2004). Além de apresentar essas características, as moscas de *C. hominivorax* possuem três listras escuras na superfície dorsal do tórax (Figura 2A). Os ovos apresentam coloração branca em tons creme, alongados e ligeiramente afilados, de comprimento e largura média de 0,98 mm e 0,24 mm, respectivamente (Peterson *et al.*,

1991). Estes são mantidos unidos por uma fina camada de adesivo composta de mucoproteínas secretadas pela glândula acessória da mosca adulta, formando a conhecida massa postural (Figura 2B) (Degrugillier; Grosz., 1981).

Já as larvas de *C. hominivorax* apresentam aspecto espiralado, dividido em 12 segmentos, sendo o segmento anterior mais estreito e o posterior mais largo, coberto por três a quatro fileiras de espinhos em cada segmento. Além disso, as larvas de segundo e terceiro ínstar de *C. hominivorax* podem ser identificadas através da pigmentação escura de seus troncos traqueais dorsais nos três ou quatro últimos segmentos (Figura 2C) (Taylor *et al.*, 2017; Guimarães; Papavero, 1999). As larvas L<sub>1</sub> tem entre 0,2 e 0,3 cm de comprimento e 0,1 e 0,2 cm de largura. As larvas L<sub>2</sub> são um pouco maiores, com 0,2 a 0,5 cm e 0,1 a 0,3 cm de largura. Por fim, as larvas de L<sub>3</sub> são de tamanho maior, variando de 1 a 1,6 cm de comprimento e 0,2 a 0,4 cm de largura. Além do tamanho, a diferenciação dos ínstares larvares é feita através da observação do par de espiráculos posteriores da larva, onde está localizado um par de peritrema contendo uma, duas ou três fendas espiraculares (Figura 2D), que correspondem ao primeiro, segundo e terceiro estágio larval, respectivamente (Díaz; Arteta, 2017; Guimarães; Papavero, 1999). Por fim, a pupa assume coloração mais escura, em formato de barril, e geralmente é menor que a larva L<sub>3</sub> (figura 2E) (Barros *et al.*, 2016). A figura 2 mostra o parasito em seus diferentes estágios.



**Figura 2.** *Cochliomyia hominivorax* em seus diferentes estágios. (A) Mosca adulta; (B): Massa postural; (C): Larva; (D): Par de peritrema contendo três fendas espiraculares; (E): Pupa. Fonte: Arquivo pessoal.

A distribuição da mosca originalmente compreendia o sul dos Estados Unidos até a América Central e das ilhas do Caribe ao norte do Chile, Argentina e Uruguai (Hall; Wall, 1995). Em 1988, *C. hominivorax* foi descrita pela primeira vez fora das Américas, na Líbia, África Mediterrânea, momento marcado pela rápida distribuição e aumento dos casos de miíase na região (Gabaj *et al.*, 1989).

Um programa de erradicação das moscas iniciou-se no sudeste dos Estados Unidos em 1957 através de uma série de tecnologias e ferramentas (Wyss, 2000). Dentre os métodos empregados, o uso da técnica do inseto estéril, que envolve a liberação aérea periódica de moscas sexualmente esterilizadas criadas sobre áreas infestadas (Vargas-terán, 2021), teve significativa importância no controle do inseto. A proposta expandiu para o México e posteriormente para a América Central continental (Mastrangelo; Welch, 2012). Assim, após 55 anos de campanha, a erradicação foi alcançada nos EUA, México, Belize, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicarágua, Costa Rica, Panamá ao norte do Canal, algumas ilhas do Caribe e Líbia (Vargas-Terán *et al.*, 2021).

Posteriormente ocorreram surtos em áreas não endêmicas e previamente erradicadas (Alexander 2006; Lindquist; Abusowa, 1992; Snow *et al.*, 1978). Por conta disso, o Serviço de Inspeção Sanitária Animal e Vegetal, sigla USDA, do inglês *Animal and Plant Health Inspection Service*, e o Serviço de Pesquisa Agrícola, sigla ARS, do inglês *Agricultural Research Service*, desenvolveram protocolos de ações frente a novos surtos (USDA, 2018).

Sendo assim, a distribuição atual da mosca compreende os países do Caribe e da América do Sul, com exceção do Chile (Fresia *et al.*, 2011). No Brasil, *C. hominivorax* é amplamente distribuída em todo território, com registro em todos os biomas do país (Costa-Júnior, 2019).

No Brasil, há o registro de diferentes espécies de animais acometidas. Do ponto de vista econômico, *C. hominivorax* é a espécie mais importante associada à miíases em bovinos (Costa-Júnior *et al.*, 2019). O agronegócio corresponde a 1/3 do valor do PIB brasileiro, de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, em 2018. As enfermidades ocasionadas promovem diminuição da produtividade do rebanho, que somado aos gastos com tratamentos para manutenção da sanidade dos animais, impactam diretamente a economia do país (Vargas-Terán *et al.*, 2005). Outros hospedeiros de animais domésticos acometidos são os caprinos, ovinos, cavalos, cabras, coelhos, cães e gatos, além de diversas espécies de animais silvestres (Costa-Júnior *et*

*al.*, 2019). Humanos também podem ser acometidos por miíases, com relatos que ocorrem em diferentes faixas etárias (Gealh *et al.*, 2009; Coronado; Kowalski, 2009).

Em todas as espécies descritas, as infestações pelos estágios larvais da mosca são frequentemente acompanhadas de infecções bacterianas secundárias, dor, sangramentos no local e anemias de origem inflamatória (Safdar *et al.*, 2003). As larvas produzem um exsudato que impede a cicatrização da ferida e o odor da miíase é atraente para outras moscas, resultando em infestações recorrentes que podem conter centenas ou milhares de larvas (Figura 3), que quando não diagnosticadas e tratadas precocemente, podem levar o hospedeiro à óbito (Thomas; Mangan, 1989).



**Figura 3.** Lesões por larvas de *Cochliomyia hominivorax* em cães. (A): lesão em região de orelha esquerda; (B) Lesão em região perianal. Fotos: arquivo pessoal.

## 2.2. Controle de *Cochliomyia hominivorax*:

### 2.2.1 Manejo e fatores de risco:

Na rotina de animais de produção, o manejo das infestações é realizado de forma preventiva e/ou curativa através da aplicação de antiparasitários e remoção das larvas em animais acometidos, associado ao uso de tratamentos tópicos ou injetáveis (Lopes *et al.*, 2017; Nogueira *et al.*, 2020).

Sabe-se que as fêmeas férteis depositam seus ovos na margem de tecidos vivos que foram natural ou acidentalmente danificados (Thomas; Mangan, 1989). Forero-Becerra *et al.* (2009) avaliaram a localização anatômica das lesões provocadas pelas infestações em fazendas de gado, indicando que a região umbilical, genital e os chifres são os locais mais acometidos. Tal fato é associado ao manejo relacionado à cura do

umbigo, castração e descorna dos animais, cujas medidas de prevenção contra moscas tenham sido insuficientes. Por essas atividades serem descritas no manejo de bovinos jovens, as infestações ocorrem, na maioria dos casos, nesta faixa etária.

Outros ectoparasitos também estão diretamente relacionados à ocorrência das infestações. Outros autores já haviam mostrado a relação com infestações por carrapatos *R. microplus* (Corrier *et al.*, 1979), uma vez que os animais acometidos apresentam perda de pelo e lesões cutâneas com exsudato, promovendo um ambiente favorável para a atração da mosca (Hammack; Holt, 1983). Bovinos parasitados por carrapatos tem cerca de quatro vezes mais risco de ocorrência de miíases. Como a região perianal, inserção de cauda e úbere são os locais de predileção pelos carrapatos, frequentemente tanto carrapatos quanto as larvas de *C. hominivorax* podem ser encontrados concomitantemente na mesma lesão (Reck *et al.*, 2014).

Assim como ocorre em animais de produção, em pequenos animais também há fatores predisponentes que propiciam as infestações. Em comparação com os cães, as ocorrências de infestações em gatos são proporcionalmente menores devido ao comportamento de autolimpeza que a espécie apresenta (Pezzi *et al.*, 2019). Porém, em situações em que o animal se encontra debilitado clinicamente, os animais geralmente deixam de manifestar esse comportamento, o que justifica a ocorrência das infestações.

O comportamento de luta competitiva por território e reprodução da espécie é também associado à maiores lesões na região frontal o corpo, aumentando a incidência de infestações nessa região. Há trabalhos que relatam gatos acometidos principalmente em decorrência de feridas causadas por mordedura em animais errantes, cujo manejo das lesões é precário (Mendes-de-Almeida *et al.*, 2007). Outras causas envolvem o manejo inadequado de feridas pós cirúrgicas, tumores e lesões ulcerativas causadas por *Sporothrix schenckii*, fungo dimórfico de grande importância, que geralmente se manifesta através de infecções dermatológicas (De Souza *et al.*, 2010).

As infestações por *C. hominivorax* em cães podem ocorrer pelos mesmos fatores descritos para os gatos, somado ao fato de que, assim como ocorre frequentemente em bovinos, as feridas provocadas por infestações de carrapatos também são favoráveis para a ocorrência das larvas (Rawlins, 1985).

Os locais para infestações por *C. hominivorax* em cães envolvem primariamente a região das orelhas, região perianal e região lombar devido ao prurido causado por otite, inflamação dos sacos perianais e mordedura de outros animais, respectivamente (Cramer-ribeiro *et al.*, 2003). Outras afecções que aumentam os fatores de risco de cães

desenvolverem miíase são: pododermatite, dermatite associada à picada de ectoparasitos e afecções cirúrgicas que não foram tratadas adequadamente (De Souza *et al.*, 2010). Desta forma, o controle das infestações por larvas de *C. hominivorax* em termos de manejo baseia-se em eliminar os fatores de risco associados às infestações.

### **2.2.2 Controle químico**

O controle químico é a alternativa mais comum para o tratamento e, em alguns casos, para a profilaxia das infestações por larvas de *C. hominivorax* (Do Vale *et al.*, 2023). Há diversas classes de compostos químicos que demonstram eficácia de expulsão e mortalidade das larvas, atuando sob diferentes mecanismos de ação, vias de administração e formas farmacêuticas.

Dentre as principais classes de substâncias disponíveis para controle químico das infestações, destacam-se os carbamatos e organofosforados, piretróides, neonicotinoides, lactonas macrocíclicas, reguladores/disruptores do Crescimento de Insetos, spinosinas, isoxazolininas e fenilpirazóis (Anziani *et al.*, 2000; Correia *et al.*, 2010; Cutolo *et al.*, 2021; De oliveira *et al.*, 2019; Do vale *et al.*, 2023; Elownia *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2018; Lopes *et al.*, 2017; Nogueira *et al.*, 2020; De Oliveira *et al.*, 2018).

#### **2.2.2.1 Carbamatos e organofosforados**

Nessas classes estão representados os inibidores da acetilcolinesterase (AChE), inseticidas mundialmente conhecidos para o controle de pragas. Inicialmente os organofosforados foram descobertos, quando a fisostigmina, alcaloide extraído do feijão Calabar, encontrado na África, foi primariamente utilizado com a finalidade medicinal no controle do glaucoma e miastenia gravis em 1877 e 1920, respectivamente (Bardin *et al.*, 1994). O mecanismo de ação dos organofosforados envolve a inibição da enzima acetilcolinesterase, cuja principal função é a hidrólise da acetilcolina (ACh), neurotransmissor do nervo periférico e central. Seu acúmulo nas terminações nervosas leva a estimulação por dessensibilização dos receptores de ACh muscarínicos e nicotínicos, aumentando a atividade do sistema nervoso autônomo parassimpático, o que promove a mortalidade por paralisia flácida (Martín-Reina *et al.*, 2017).

Posteriormente, em 1950, os carbamatos foram sintetizados para apresentar elevado grau de toxicidade, porém inibição reversível da AChE, ao contrário dos organofosforados, que causam inibição irreversível por realizar ligações covalentes nos sítios de ligação iônicos da acetilcolina, transformando-as em proteínas enzimaticamente inativas (Bardin *et al.*, 1994).

Há diversos trabalhos promovendo o uso de carbamatos e organofosforados na profilaxia das infestações em animais de produção. Ahrens *et al.* (1977) mostraram que formulações de liberação controlada contendo propoxur e clorpirifós isoladamente impediram a oviposição das moscas durante o período experimental estipulado. Além disso, os ativos e suas associações já tiveram sua atividade avaliada frente a larvas de *C. hominivorax*. Nogueira *et al.* (2020) avaliaram diferentes formulações disponíveis no mercado frente a bovinos naturalmente infestados. Os animais foram tratados por via tópica com carbamatos (propoxur) e organofosforados, (coumafós e diclorvós), com avaliação das lesões entre 12 e 72 h após o tratamento. Como resultado, ambos os grupos alcançaram 100% de eficácia entre 36 e 48h.

Em pequenos animais, durante décadas houve a extrapolação de terapias utilizadas em animais de produção para o tratamento das infestações. Com exceção de poucos inseticidas que possuem indicação para uso em animais de companhia, como por exemplo o produto de nome comercial Negasunt®, composto de coumafós, propoxur e sulfanilamida, diversos outros sprays contendo os ativos, por vezes associados a outras classes, como os piretróides, foram os principais tratamentos para miíase antes que compostos sistêmicos tivessem sua eficácia comprovada e se tornassem comercialmente disponíveis para cães e gatos (Wall *et al.*, 1997).

#### **2.2.2.2 Piretróides**

Os piretróides são derivados da planta *Chrysanthemum cinerariifolium*, cujas flores contém as chamadas piretrinas, compostos que foram introduzidos como inseticidas na Europa no início do século XIX. São ésteres dos ácidos crisantêmico e pirétrico com os álcoois piretrolona, cinerolona e jasmolona (Head *et al.*, 1973). Seu uso foi introduzido na agricultura como alternativa aos compostos que eram utilizados em pragas de insetos com a prerrogativa de apresentarem baixa toxicidade aguda para mamíferos e o oposto para os insetos, proporcionando maior eficácia inseticida e segurança para seres humanos (Casida *et al.*, 1980).

Contudo, as piretrinas contém substâncias que são reativas à luz e rapidamente perdem sua atividade frente aos artrópodes. Após diversas modificações nas estruturas das piretrinas, foram criados análogos sintéticos, conhecidos como piretróides. A aletrina foi o primeiro piretróide comercializado, o que na época abriu frente para pesquisa de outros potenciais piretróides cujo objetivo era promover alta eficácia inseticida, com efeito *knockdown*, máxima potência como inseticida de amplo espectro, estabilidade para proteção de plantas e custo razoável (Casida *et al.*, 1980). Exemplos de fármacos desta classe utilizados são a cipermetrina, permetrina, deltametrina, flumetrina, entre outros, que inclusive são utilizados em associação com outras classes e apresentam eficácia contra ectoparasitos (Dantas-torres *et al.*, 2014).

Os piretróides são utilizados em animais de produção, com trabalhos que elucidam sua eficácia em tratamentos de uso tópico. O estudo realizado por Nogueira *et al.* (2020) envolveu uma formulação de uso tópico contendo o piretróide cipermetrina, em associação com outros ativos, em bovinos naturalmente infestados por larvas de *C. hominivorax*, comprovando atividade de 100% durante o período de avaliação.

Elownia *et al.*, (2005) avaliaram a atividade de inseticidas de deltametrina, ciflutrina e cipermetrina frente a moscas adultas, as quais foram expostas na cernelha, abdômen e flanco de ovinos tratados, comprovando alta atividade. Em pequenos animais, como dito anteriormente, o uso tópico de *sprays* contendo piretróides foi tradicionalmente extrapolado de terapias utilizadas em grandes animais até a comprovação de ativos e formulações de uso sistêmico.

Atualmente existem diversos produtos de aplicação tópica à base de organofosforados, carbamatos e piretróides, usados de forma isolada ou em associação na prevenção e no tratamento de infestações por larvas *C. hominivorax* em animais de produção. Exemplos são: Mata bicheira calbós®, Biozol Mata Bicheiras®, Matabicheiras forte SV®, Matabicheiras Cooper®, Aerocid®, Silverbac®, Matabicheiras Lab®, Thion C®, Cidental®, Organnact Prata®, Lepecid®, entre outros, disponíveis no mercado de saúde animal. Para a maioria destes, o tratamento consiste na aplicação por via tópica sobre as incisões e/ou lesões.

Para animais de companhia, há diferentes formas farmacêuticas de uso tópico contendo piretróides e associações no controle de carrapatos e pulgas, como coleiras de liberação prolongada e soluções “*pour-on*” e “*spot-on*”. Porém, não há eficácia comprovada destas formas farmacêuticas frente a larvas de *C. hominivorax*.

### **2.2.2.3 Neonicotinóides**

Os neonicotinóides foram introduzidos a partir de 1970, como parte de um programa introduzido na época para proteção de cultivos agrícolas. Neste contexto, é descrito que o composto 2-(dibromonitrometil)-3-metil-piridina originou os estudos para a síntese de novos inseticidas (Kollmeyer *et al.*, 1999). A partir de otimizações e mudanças estruturais, foi então obtida a nitiazina, considerado o primeiro neonicotinóide, o qual nunca foi comercializado devido à sua rápida degradação a condições hidrofílicas e fotolíticas (Kagabu; Medej, 1995).

Posteriormente, com a introdução do imidaclopride em 1991, a classe passou a ser comercializada como alternativa aos piretróides, organofosforados, carbamatos e outras classes químicas de inseticidas utilizadas para o controle de pragas e insetos na agricultura (Nauen; Denholm, 2005). Como mecanismo de ação, os neonicotinóides atuam seletivamente como agonistas dos receptores nicotínicos da acetilcolina pós-sináptica dos insetos, levando a morte dos parasitos por paralisia espástica (Bai *et al.*, 1991).

Em cães e gatos, há formulações no mercado de uso tópico contendo imidaclopride e dinotefuran como ectoparasiticida, porém não há estudos que demonstrem eficácia destes frente a infestações por larvas de *C. hominivorax*. Por outro lado, o nitenpiram é um ativo pertencente à classe, disponível em comprimidos para cães e gatos, com eficácia comprovada quanto à expulsão e mortalidade de larvas após tratamento em duas doses em cães (Correia *et al.*, 2010). Os autores realizaram um estudo sobre a eficácia larvicida do ativo administrado por via oral em cães naturalmente infestados e como resultado, indicaram expulsão das larvas a partir de 2h após o tratamento e calcularam 95,3% de larvas expelidas após 18h. Por este motivo, é amplamente utilizado na rotina clínica em infestações por *C. hominivorax*, uma vez que o tratamento promove expulsão larval em um curto período, considerado por este motivo uma opção terapêutica eficaz.

### **2.2.2.4 Lactonas macrocíclicas**

As lactonas macrocíclicas são subprodutos hidrofóbicos obtidos de microorganismos do gênero *Streptomyces*. A classe é conhecida por seus efeitos de amplo espectro em nematóides e ectoparasitos desde quando apareceu no mercado

veterinário, em 1981, com a inserção da ivermectina (Martin *et al.*, 2002). A classe é subdividida entre as avermectinas, derivadas do fungo *S. avermitilis*, e as milbemicinas, derivadas de *S. cyanogriseus* (Gill, Lacey, 1998).

Como mecanismo de ação, inicialmente foi estabelecido que seu efeito anti-helmíntico é obtido a partir da ligação de canais de cloreto dependente de glutamato, expressos em neurônios e células musculares da faringe de nematóides. Os canais ativados pela ivermectina abrem-se lentamente e levam a hiperpolarização neuronal e de células musculares (Wolstenholme, Rogers, 2005). O efeito inseticida também é relacionado aos receptores GABA através de sua ativação, com consequente influxo de cloro e morte por paralisia (Martin *et al.*, 2002).

Em animais de produção, a ivermectina é aplicada por via subcutânea para o tratamento e profilaxia das miíases. Anziani e Loreficce (1993) avaliaram o efeito preventivo após tratamento com ivermectina aplicada por via subcutânea em bovinos, mostrando que o ativo foi eficaz na prevenção de miíases. Da mesma forma, Anziani *et al.*, 2000 avaliaram a profilaxia de novas infestações, porém utilizando doramectina, a qual proporcionou redução significativa quando comparada ao grupo controle.

Em cães, as lactonas macrocíclicas disponíveis para uso são a ivermectina, milbemicina, moxidectina e selamectina, amplamente utilizadas para o tratamento de infecções por nematóides, infestações por ácaros, pulgas, piolhos e como profilaxia e tratamento da dirofilariose (Nolan e Lok, 2012). Em relação à ocorrência de miíases, por muito tempo foi utilizada a ivermectina de uso injetável em cães, porém são necessárias entre 24 e 48h para a eliminação completa das larvas (Han *et al.*, 2018). Tratando-se de lactonas macrocíclicas disponíveis em formulações para uso oral, os autores avaliaram o efeito da milbemicina oxima isolada e em associação com spinosad em cães acometidos com miíases cutâneas causadas por *Chrysomya bezziana*. No grupo tratado com milbemicina oxima em associação com spinosad, foi obtida eficácia de 100% após 7h de tratamento. Nos cães tratados somente com milbemicina oxima isolada, esse resultado só foi obtido após 24h. Contudo, para larvas de *C. hominivorax*, os compostos ainda não foram avaliados.

#### **2.2.2.5 Reguladores/Disruptores do Crescimento de Insetos**

As benzoilfenilureias, comumente utilizadas na agricultura, foram descobertas na década de 1970, com o desenvolvimento do diflubenzuron. Posteriormente outras

moléculas análogas foram introduzidas para o controle de pragas e artrópodes na agricultura. A atuação da classe se dá pela inibição da síntese de quitina, um aminopolissacarídeo importante, presente na cutícula de artrópodes (Deul *et al.*, 1978).

Não apresentam eficácia adulticida, mas atuam a fim de impedir o desenvolvimento e crescimento dos artrópodes, causando falhas no ciclo biológico dos invertebrados, sendo uma alternativa relevante para infestações de ectoparasitos, como carrapatos e pulgas em pequenos e grandes animais (Badawy *et al.*, 2013).

Em infestações por miíases nos animais, o objetivo dos reguladores de crescimento envolve a interrupção do desenvolvimento larval das moscas produtoras de miíases, a fim de proporcionar um período maior de proteção aos animais, principalmente em áreas endêmicas (Junquera *et al.*, 2019).

Anziani *et al.*, (1998) investigaram a eficácia do fluazuron na prevenção de infestações por larvas de *C. hominivorax* em bovinos. O ativo não apresentou atividade repelente, mas ao permitir que as moscas fêmeas completassem a oviposição nos animais tratados, preveniu o desenvolvimento de miíase por redução do potencial reprodutivo da mosca.

#### **2.2.2.6 Spinosinas**

As spinosinas são macrolídeos derivados da fermentação do fungo *Saccharopolyspora spinhosa*. Seus dois componentes ativos, denominados espinosina A (componente majoritário) e espinosina D (componente menor), formam o spinosad, que é comercializado como inseticida na agricultura e na medicina veterinária (Mertz, Yao, 1990; Waldron *et al.*, 2001).

O spinosad tem seu modo de ação primariamente em receptores nicotínicos para acetilcolina dos insetos, matando-os por paralisia espástica, e secundariamente age em receptores gama-aminobutíricos (GABA), diminuindo o tempo de abertura de canais para cloro ou fechando-os, levando a morte por hiperexcitação (Salgado, 1998; Watson, 2001). Além disso, a especificidade do modo de ação primário garante baixa toxicidade, uma vez que a ação se dá em receptores nicotínicos somente dos insetos, tornando-os seguros para mamíferos (Wolken *et al.*, 2011).

Em animais de produção, o spinosad já demonstrou eficácia ectoparasiticida quando utilizado sob as formas tópicas de pulverização, *pour-on* e spray (Davey *et al.*, 2001; White *et al.*, 2007). Em animais de companhia há formulações sob a forma

farmacêutica de comprimidos, utilizadas no controle da pulga *Ctenocephalides felis* (Paarlberg *et al.*, 2013).

De Oliveira *et al.*, (2018) estudaram a molécula em cães naturalmente infestados por larvas de *C. hominivorax*. Como resultado, os autores mostraram que a expulsão máxima das larvas ocorreu após 6h do tratamento e ao final do estudo, demonstraram 73,3% e 79,7% de média de expulsão larval e eficácia global, respectivamente.

Posteriormente, Han *et al.*, 2018 também avaliaram a eficácia do spinosad, mas em infestações por larvas de *C. bezziana* em cães, comprovando expulsão completa das larvas após 24h de estudo.

### **2.2.2.7 Isoxazolinas**

As isoxazolinas são a classe mais recente de ectoparasiticidas no mercado, introduzidas devido à demanda por moléculas que apresentassem modos de ação diferentes a fim de contornar preocupações relacionadas à resistência de classes já utilizadas no controle de ectoparasitos (Weber e Selzer, 2018).

Sendo assim, o modo de ação das isoxazolinas é exercido sobre os receptores GABA (ácido gama-aminobutírico) e glutamato. Sabe-se que o receptor GABA é o principal neurotransmissor do sistema nervoso central e periférico de insetos e essencialmente é ligado a canais de cloreto. Possuem subunidades transmembrana, contendo hélices, que são o local alvo das isoxazolinas (Weber e Selzer, 2018). Além disso, tem-se o canal de cloreto, dependente de glutamato, que assim como os receptores GABA, atuam estimulando o influxo de cloreto, causando hiperpolarização, impedindo a geração de um potencial de ação. Desta forma, levam a hiperexcitação e consequente morte do parasito (Gassel *et al.*, 2014).

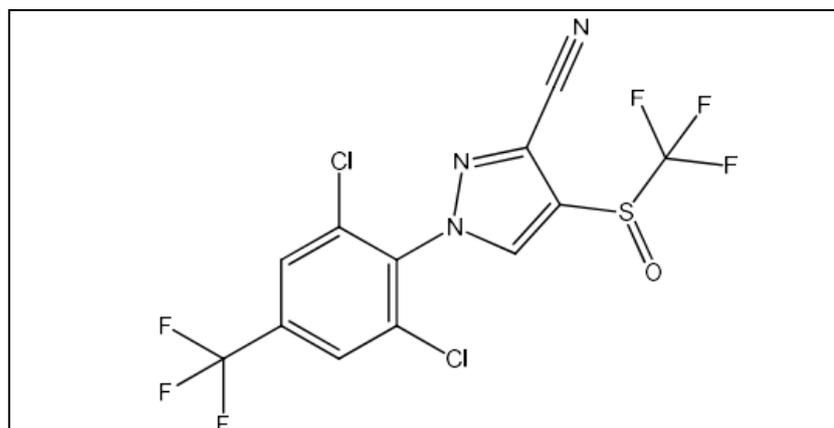
Em animais de companhia, as moléculas afoxolaner, fluralaner, sarolaner e lotilaner são descritas para controle de pulgas, carrapatos e ácaros, disponíveis na forma de comprimidos, além do fluralaner também ser comercializado para uso tópico (Bosco *et al.*, 2019).

De oliveira *et al.*, (2019); Do vale *et al.*, (2023) e Cutolo *et al.*, (2021) publicaram trabalhos envolvendo o uso do tratamento por via oral do sarolaner, lotilaner e afoxolaner, respectivamente, em cães naturalmente infestados por larvas de *C. hominivorax* nas mesmas dosagens recomendadas para pulgas e carrapatos. As isoxazolinas mostraram-se efetivas, com 100% de eficácia após 24h de tratamento.

### 2.2.2.8 Fenilpirazóis

Tem-se como maior representante da classe dos fenilpirazóis o fipronil, que quimicamente se apresenta por [5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]4-[(trifluorometil) sulfinilideno]-1H-pirazol-3-carbonitrila]. Juntamente com os neonicotinóides, é amplamente utilizado como inseticida devido à sua baixa toxicidade para mamíferos, amplo espectro inseticida e versatilidade nos métodos de aplicação (Li *et al.*, 2019). Foi sintetizado pela primeira vez pela empresa francesa Rhône-Poulenc Agro (atual Bayer CropScience) entre 1985 e 1987, registrado nos EUA em 1996 (Bhatt *et al.*, 2021a).

Na década de 1980 foi relatada resistência aos organofosforados, carbamatos e piretróides em diversos insetos de importância na agricultura (Georghiou, Mellon, 1983). Neste contexto, o fipronil foi apresentado como alternativa aos inseticidas comumente utilizados, com características que incluíam toxicidade seletiva para artrópodes, alta persistência e ação sistêmica (Simon-Delso *et al.*, 2015). Sua estrutura química se encontra na Figura 4:



**Figura 4.** Estrutura química da molécula de fipronil (GUPTA; ANADÓN, 2018)

Seu mecanismo de ação se dá pelo bloqueio não competitivo de receptores ionotrópicos do receptor GABA e, apesar do fato de que tanto os invertebrados quanto os vertebrados apresentarem o neurotransmissor, o FIP tem uma afinidade muito maior pelos receptores GABA de insetos (Zhang *et al.*, 2018). Além disso, o ativo tem como alvo os canais de cloreto ativados por glutamato, fator que explica a maior atividade em invertebrados, que têm canais de cloreto ativados por glutamato, diferente dos mamíferos (Narahashi *et al.*, 2010). Desta forma, sua bioatividade é conferida pela inibição das sinapses no sistema nervoso central dos insetos. Nestes receptores, o

fipronil se liga do canal de cloreto, bloqueando a transferência de íons cloreto, levando a óbito por convulsões e hiperexcitação (Perret *et al.*, 1999).

O ativo é registrado para uso em centenas de países, sendo amplamente utilizado na agricultura no controle de pragas de frutas, vegetais e cereais, além de ambientes residenciais e industriais (Okumura *et al.*, 2016).

Na medicina veterinária, diversos trabalhos descrevem a eficácia do FIP frente à diferentes ectoparasitas em muitas espécies de animais, cuja grande maioria das formulações se encontra sob a forma farmacêutica de *spray*, *pour on* ou *spot on*, isolado ou em associação.

O ativo está presente no controle de carrapatos e pulgas em animais de companhia e carrapatos, moscas, berne e piolho em bovinos (Bonneau *et al.*, 2010; Davey *et al.*, 1998). Kužner *et al.*, (2013) propuseram um estudo para confirmação da eficácia de um produto à base de *spot-on* de fipronil para o tratamento e controle dos carrapatos *R. sanguineus* e *Dermacentor reticulatus*, pulgas *Ctenocephalides felis* e piolhos *Trichodectes canis*. Além disso, o fipronil já foi utilizado experimentalmente na forma injetável, de aplicação subcutânea, no controle de *R. microplus* em bovinos, com boa eficácia terapêutica (Cid *et al.*, 2016).

Outros trabalhos já tiveram comprovação da eficácia do ativo em fases imaturas de ectoparasitas, como o trabalho publicado por Young *et al.*, (2004) frente a pulga *Ctenocephalides felis*, em que pesquisadores avaliaram a atividade inibitória da combinação do fipronil 10% com o metoprene 9% em ovos e adultos das pulgas, resultando no controle das pulgas adultas acima de 95%, com atividade ovicida acima de 90% durante 12 semanas. Brianti *et al.*, (2010) publicaram um estudo com infestações artificiais de adultos e das fases imaturas de *R. sanguineus* em cães tratados com formulação *spot-on* de fipronil 10% e metoprene 9%. O ativo proporcionou eficácia acima de 90% durante todo período de avaliação, que foi de 28 dias. Muitos outros trabalhos envolvendo a eficácia de formulações a base de fipronil para uso tópico em adultos e fases imaturas de carrapatos e pulgas mostram resultados promissores, como os estudos realizados por Beugnet *et al.*, (2011), Beugnet *et al.*, (2016) e Franc *et al.*, (2007).

Outras espécies de carrapatos também já foram avaliadas. Bonneau *et al.*, (2010) publicaram sobre o efeito do fipronil em carrapatos *Ixodes ricinus*, com eficácia significativa. Como resultado, os animais ficaram protegidos de reinfestações com

eficácia acima de 90% por até cinco semanas e as duas formulações foram igualmente capazes de erradicar a infestação por carrapatos e prevenir novas infestações.

Muitos trabalhos também demonstram a eficácia do fipronil em diversas espécies de ácaros de importância em cães e gatos, como os do gênero *Cheyletiella* spp, *Neotrombicula* spp, *Otodectes* spp, *Sarcoptes* spp e *Notoedres* spp, com eficácia próxima à 100% em um único tratamento por via tópica (Beugnet *et al.*, 2014; Bordeau e Hubert, 2000; Knaus *et al.*, 2014; Lecru *et al.*, 2019; Scarampella *et al.*, 2005).

Quanto às infestações por larvas de *C. hominivorax*, o ativo está presente sob as formas farmacêuticas de *pour-on* e *spray*. Dentre alguns artrópodes de importância em bovinos, Lopes *et al.*, (2017) estudaram a eficácia do FIP a 1,25% em uma combinação com 2,5% de fluazuron em uma formulação *pour-on* em animais expostos experimentalmente a larvas de *C. hominivorax*, com 100% de eficácia. A atividade do fipronil quanto ao efeito profilático e eficácia curativa do ativo contra infestações em bovinos foi estudada por Lima *et al.*, (2004). Os autores mostraram que o tratamento teve efeito profilático em mais de 95% dos animais tratados por até 17 dias. O efeito seguiu com proteção de até 50% após 28 dias de tratamento, mostrando-se uma alternativa promissora. No mercado veterinário, o spray de nome comercial Topline®, contendo fipronil, sulfadiazina de prata e alumínio, é utilizado para tratamento curativo em miases em bovinos (Junior *et al.*, 2019), com indicação em bula também para ovinos e caprinos.

#### **2.4 Formas farmacêuticas do fipronil na medicina veterinária**

Em animais de produção, o ativo está disponível para uso tópico na forma de solução “*pour-on*” no controle das infestações por carrapatos e no controle e tratamento de infestações por larvas de *Haematobia irritans*, *Dermatobia hominis* e *C. hominivorax* (Guglielmone *et al.*, 2000; Kaltungo *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2017).

No mercado há disponível o ativo de forma isolada (Topline®) ou em associação com o Fluazuron (Fiprotack®), utilizados em infestações por carrapatos *R. microplus*. Além disso, há também a forma de spray (Topline® Spray), amplamente utilizado para *C. hominivorax* de forma preventiva e curativa.

Em cães e gatos, o fipronil é encontrado com indicação para uso em carrapatos e pulgas, também em formulações de uso tópico, nas formas de soluções “spot-on”, contendo o ativo de forma isolada, como o Frontline® Top Spot e Fiprex® Drop Spot

ou em associação com metoprene (Frontline® plus Top Spot). Também há formulações na forma de sprays contendo o ativo de forma isolada (Frontline® Spray).

Em todos esses casos, quando o fipronil é aplicado por via tópica, por ser altamente lipofílico, difunde-se nas glândulas sebáceas dos folículos capilares e lentamente se espalha pela pelagem do animal, conferindo eficácia frente aos ectoparasitos, com atividade residual (Birckel *et al.*, 1998; Jennings *et al.*, 2002). Contudo, não há estudos clínicos indicando o uso das formulações citadas acima frente a infestações por fases imaturas de *C. hominivorax* em pequenos animais.

Como exposto, o uso do FIP no mercado veterinário se restringe às aplicações tópicas, para o controle de diferentes ectoparasitos. Contudo, nos últimos anos foi possível observar a inserção de outras classes que utilizam a via de administração oral, a exemplo dos neonicotinóides, spinosinas e isoxazolininas (Correia *et al.*, 2010; Cutolo *et al.*, 2021, Do Vale *et al.*, 2023; De Oliveira *et al.*, 2018; De Oliveira *et al.*, 2019).

Sabe-se que o desenvolvimento de formulações que permitam maximizar a adesão ao tratamento e a conveniência por parte dos tutores são uma grande tendência no mercado veterinário (Petry *et al.*, 2014). Nesse sentido, os comprimidos vêm sendo cada vez mais prescritos e utilizados, pois em sua grande maioria são fabricados para promover aceitação voluntária pelos animais de companhia, sendo chamados de palatáveis ou mastigáveis. Como consequência, essa facilidade na administração é considerada mais confortável em ser administrado pelos tutores de animais de companhia, promovendo maior adesão ao tratamento (Halos *et al.*, 2015).

Não há nenhuma formulação no mercado veterinário contendo fipronil pela via oral para o controle de ectoparasitos. Contudo, há trabalhos que mostram que essa via de administração apresenta resultados promissores (Dos santos *et al.*, 2021; Melo *et al.*, 2012). Melo *et al.*, (2012) publicaram sobre a atividade do ativo sob a forma farmacêutica de cápsulas de gelatina em cães infestados artificialmente por carrapatos e pulgas, indicando eficácia significativa somente para pulgas. Posteriormente, Dos santos *et al.*, (2021) publicaram o estudo de eficácia de uma formulação de comprimidos contendo fipronil para os mesmos ectoparasitos, com eficácia significativa para ambos.

Sabe-se que ativo e seus metabólitos são relatados em diversas amostras ambientais, como em águas superficiais, águas residuárias e escoamentos residenciais em diversos países, como China, Alemanha, Estados Unidos, Holanda e Vietnã (Budd *et al.* 2015; Li *et al.* 2019; Michel *et al.* 2016; Tennekes 2018; Wan *et al.* 2021). No

Brasil, já foi detectado fipronil e fipronil sulfona em uma das bacias hidrográficas mais importantes do país, com resultados igualmente preocupantes (Ferreira *et al.*, 2022).

Além disso, as aplicações de uso tópico de fipronil utilizadas na medicina veterinária, embora sejam em menor escala, também contribuem para a liberação do ativo e de seus metabólitos no meio ambiente, como evidenciado pela detecção do fipronil em águas residuais municipais após banho em cães tratados topicamente com o ativo (Teerlink *et al.*, 2017) e em escoamentos superficiais residenciais (Gan *et al.*, 2012).

É a chamada “exposição não ocupacional” ao fipronil, em que há exposição humana como consequência à aplicação tópica do antiparasitário, onde o contato com o ativo pode ocorrer durante a aplicação do produto, pelo contato direto após o tratamento, através da interação dos tutores com seus cães ou indiretamente, pelos locais que os animais se abrigam e residem (Cochran *et al.*, 2015). Como consequência, a via de administração oral promove maior sustentabilidade ao minimizar os impactos ambientais gerados pela exposição ao FIP quando comparado com a via tópica.

## **2.5 Farmacocinética clínica**

Entre o momento da administração de um medicamento e o seu efeito terapêutico, o princípio ativo passa por três fases, que compreendem a fase biofarmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica (Le Blanc *et al.*, 1997).

A fase biofarmacêutica envolve a etapa de disponibilização do princípio ativo no organismo, a qual ocorre através da sua liberação e dissolução. A segunda fase, farmacocinética, conceitua-se pelo estudo, em função do tempo, dos diferentes aspectos da transformação de um princípio ativo no organismo, sendo estes a absorção, distribuição e eliminação (Le Blanc *et al.*, 1997).

A absorção ocorre quando o princípio ativo dissolvido atravessa as membranas biológicas do local de absorção e penetra na circulação sanguínea. A exemplo de uma absorção gastrointestinal, o ativo é transportado pela veia porta para o fígado, antes de atingir a circulação sistêmica, sofrendo uma biotransformação pré-sistêmica (Le Blanc *et al.*, 1997).

A porcentagem do princípio ativo encontrado no plasma e a velocidade com que isso ocorre é chamada de biodisponibilidade. Após a absorção, ocorre a distribuição do ativo, seguida da eliminação, que pode ser sob a forma inalterada ou através de

metabólitos inativos. A eliminação é avaliada por meio de três parâmetros farmacocinéticos: constante de velocidade de eliminação, o período de meia-vida de eliminação e o “clearance”. Por fim, a última fase, denominada farmacodinâmica, envolve o estudo dos efeitos bioquímicos e fisiológicos dos princípios ativos, bem como seus mecanismos de ação (Le Blanc *et al.*, 1997).

Os estudos de farmacocinética clínica envolvem a construção de uma curva de concentração plasmática, onde alguns parâmetros farmacocinéticos podem ser calculados, como a concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ), tempo correspondente ao pico plasmático ( $T_{max}$ ), área sobre a curva (AUC) e meia-vida de eliminação ( $T_{1/2}$ ) (Le Blanc *et al.*, 1997).

A  $C_{max}$  significa a concentração máxima de um fármaco no plasma após a sua administração, geralmente diretamente proporcional ao efeito farmacodinâmico. É expressa em unidade de concentração (exemplos: ng/mL, mg/mL) (Winter, 2012).

O  $T_{max}$  representa o tempo necessário para que o ativo atinja sua concentração máxima ( $C_{max}$ ). É expressa em unidades de tempo (h, min) e nesse momento é quando ocorre o pico de absorção do fármaco (Winter, 2012).

A AUC é um cálculo realizado entre as concentrações plasmáticas obtidas em função do tempo, a partir do  $T_0$  (tempo zero, que é o momento da administração do fármaco), até o tempo  $t$  (AUC 0-t) e do  $T_0$  até o infinito (AUC 0- $\infty$ ) (Le Blanc *et al.*, 1997). Em outras palavras, é a medida da extensão da biodisponibilidade do fármaco, que indica a quantidade do ativo presente no plasma em cada tomada de tempo. O cálculo pode ser determinado pelo método dos trapézios, cuja soma é igual a área sobre a curva (Le Blanc *et al.*, 1997, Winter, 2012). É expressa em unidades de concentração por tempo (ng.h/ml<sup>-1</sup>, mg.h/ml<sup>-1</sup>).

O  $t_{1/2}$  representa o tempo requerido para que a concentração plasmática seja reduzida à metade do valor original. É expressa em unidades de tempo (h, min). (Winter, 2012).

Tratando-se da farmacocinética do fipronil, quando administrado por via oral em diferentes espécies, de mamíferos, é rapidamente metabolizado e seus produtos de biotransformação são amplamente distribuídos nos tecidos (Dos Santos *et al.*, 2020; Dos Santos *et al.*, 2021; Woodward, 2012). Em ratos, após administração oral de FIP, o  $C_{máx}$  é atingido em aproximadamente 6 h. Já em cães já foi registrada  $C_{máx}$  de  $3,13 \pm 1,39$  µg/mL a  $1,83 \pm 0,40$  h pós-tratamento (Dos Santos *et al.*, 2020). Além disso, quantidades significativas dos metabólitos do FIP podem persistir nos tecidos,

principalmente nos tecidos adiposos, fazendo com que sua liberação seja mais lenta. Em ratos, por exemplo, estima-se que quantidades significativas de metabólitos podem persistir nos tecidos adiposos em gordurosos por até uma semana após o tratamento. Quanto à eliminação do ativo, tem-se que a maior excreção ocorre nas fezes (45-75%) e pequenas quantidades na urina (5-25%) (Gupta e Anadón, 2018).

Alguns trabalhos sobre a farmacocinética do FIP já foram descritos na literatura em diferentes espécies. Leghait *et al.*, (2009) administraram o ativo na dose de 3 mg/kg em ratos a cada 24h, durante 14 dias, porém os autores encontraram concentrações abaixo do limite de quantificação do método (100 ng/mL). Ainda em ratos, Lacroix *et al.*, (2010) realizaram o tratamento na dose de 3 mg/kg de FIP sob a forma farmacêutica de suspensão, administrados por gavagem intragástrica durante 13 dias. Como resultado, o trabalho detectou a concentração plasmática de FIP variando de 10,7 ng/mL  $\pm$ 8,6 ng/mL a 231,0 ng/mL  $\pm$ 67,3 ng/mL. Posteriormente, Chang *et al.*, (2020) realizaram outro estudo de farmacocinética com o FIP em diferentes concentrações (1 mg/kg por via intravenosa e 3, 10 e 30 mg/kg por via oral) em ratos. Para as doses administradas pela via oral, foram obtidas C<sub>max</sub> e AUC de proporcionais às doses administradas do ativo.

Tratando-se de trabalhos de biodisponibilidade do FIP específicos para a espécie canina tem-se os trabalhos de Dos Santos *et al.*, (2020), que publicaram sobre os parâmetros farmacocinéticos do FIP em cães tratados na dose de 2 mg/kg, assim como Dos Santos *et al.*, (2021), que também propuseram o estudo farmacocinético, mas acrescidas das concentrações de 4 e 6 mg/kg para obtenção de análise comparativa entre as diferentes doses. Em ambos os trabalhos o tratamento foi realizado pela via de administração oral e sob a forma farmacêutica de comprimidos. Os autores mostraram que a dose não alterou o perfil farmacocinético, o qual manteve o padrão de rápida absorção e biotransformação.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos se iniciaram com o desenvolvimento dos tabletes mastigáveis de fipronil, seguindo as etapas de preparo do diluente, aglutinante, mistura dos componentes e incorporação do ativo, resultando em uma massa homogênea, a qual passou pelo processo de moldagem utilizando forma de 2g para obtenção dos tabletes mastigáveis. A formulação passou em sequência pela etapa de caracterização físico-química, através dos ensaios de determinação de peso, doseamento, uniformidade de doses unitárias e estabilidade de curta duração, seguindo as determinações da Farmacopeia Brasileira (2019).

Em seguida foram realizados os ensaios *in vivo*, os quais foram conduzidos em dois momentos distintos, com diferentes animais. Após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IV/UFRRJ), foi realizado primeiramente o estudo de farmacocinética descritiva dos tabletes mastigáveis de fipronil. Para o ensaio, foram selecionados oito cães da raça beagle, pertencentes ao canil experimental do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV/DPA/IV/UFRRJ).

Posteriormente foi realizado o estudo de eficácia clínica, o qual foi conduzido separadamente do estudo de farmacocinética, após a aprovação da CEUA/IV/UFRRJ. Neste caso, para a seleção dos animais, foram selecionados oito cães da raça beagle pertencentes do canil experimental do LQEPV que, durante o período estipulado, apresentaram infestações naturais por larvas de *C. hominivorax*.

#### 3.1 Desenvolvimento dos tabletes mastigáveis de fipronil

Baseado no estudo realizado por Dos Santos *et al.*, (2021), que estudaram comprimidos de FIP sob diferentes doses em infestações por carrapatos e pulgas em cães, foi escolhida a dose de 6mg/kg de fipronil para ser incorporada na formulação do presente estudo, para que pudesse ser posteriormente administrada em cães nos estudos de farmacocinética e eficácia em infestações por larvas de *C. hominivorax*.

Os tabletes mastigáveis foram obtidos por moldagem seguindo quatro etapas a seguir: 1- preparo do diluente, 2- preparo do aglutinante; 3- mistura dos componentes e incorporação do ativo; 4- moldagem em formas de aproximadamente 2g.

### **3.1.1 Preparo do diluente**

Foi utilizada ração seca para cães adultos da marca Must® como diluente. A ração foi triturada no liquidificador e posteriormente passou por processo de secagem em estufa a uma temperatura de 90 °C durante duas horas. A cada 20 min, o material foi inspecionado e homogeneizado com uma espátula para garantir secagem homogênea. Em seguida a ração foi passada em tamis nº 24 para garantir tamanho homogêneo da ração.

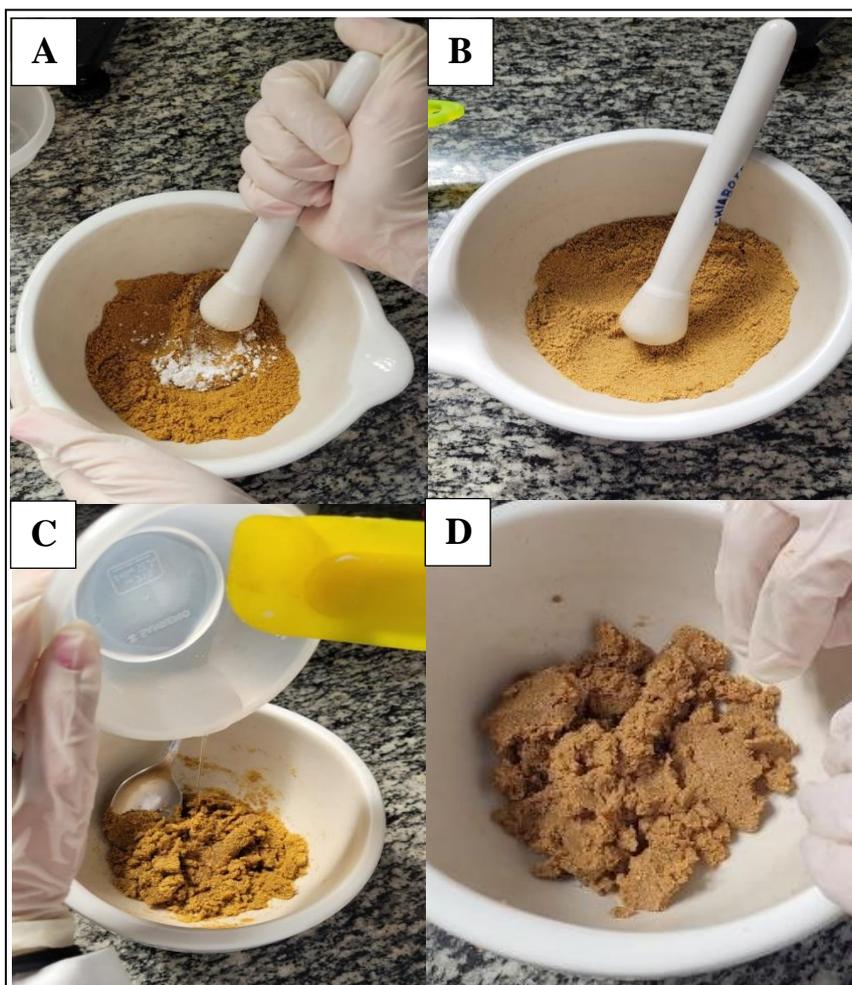
### **3.1.2 Preparo do aglutinante**

Uma goma base foi preparada na proporção de 60:10, utilizando 60g de glicerina pura (Synth®), 10g de gelatina em pó (Synth®) e água destilada até completar a massa de 100g. Utilizando um becker, a glicerina foi inicialmente aquecida em banho maria a uma temperatura de 80 °C. Em seguida a gelatina foi adicionada lentamente com auxílio de agitador magnético, completando com água destilada ao final do processo até atingir a marcação de 100g.

### **3.1.3 Mistura dos componentes e incorporação do ativo**

Para o preparo dos tabletes, levou-se em consideração a proporção de 62,3% da ração previamente seca e triturada, somado à 2,7% da massa do fipronil (teor 99,61%, cedido pela empresa Ceva Saúde animal®), 25% de goma, 5% de crodamol e 5% de propilenoglicol, os quais foram utilizados como umectantes. Os componentes foram previamente pesados utilizando balança analítica (Tecnal®) calibrada.

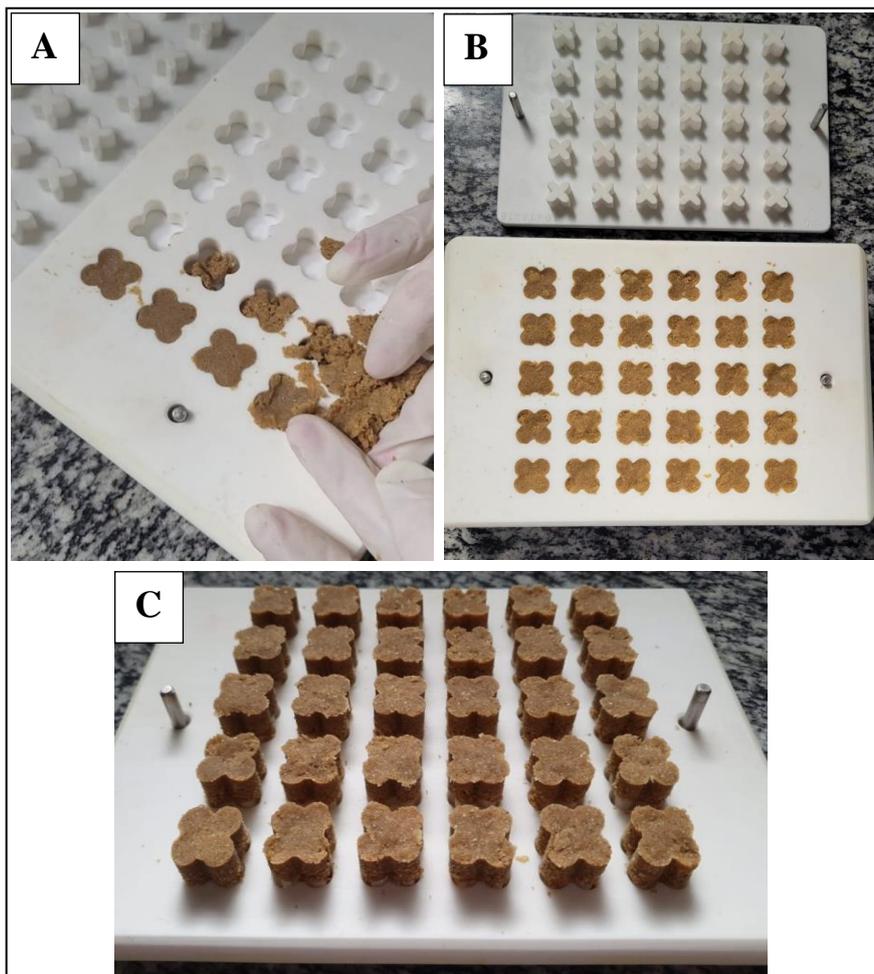
A ração foi colocada em um graal e o fipronil foi adicionado aos poucos, homogeneizando até não se observar as partículas brancas do ativo. Em seguida, a goma e o crodamol e propilenoglicol foram adicionados e a massa foi novamente homogeneizada, finalizando a preparação (Figura 5).



**Figura 5.** Preparação dos tabletes de fipronil. (A) incorporação do fipronil na ração seca; (B) mistura componentes secos homogeneização utilizando graal e pistilo de cerâmica; (C) adição dos agentes aglutinantes e umectantes à massa; (D) massa finalizada.

### 3.1.4 Obtenção dos tabletes mastigáveis de fipronil por moldagem

Foi utilizada forma de 2g para acondicionar os tabletes. Os moldes foram preenchidos com a massa (Figura 6A) e colocados em temperatura de refrigeração ( $5 \pm 3$  °C) por um período de 24 h e então desenformados (Figura 6B).



**Figura 6.** (A). Preenchimento das formas com a massa de fipronil; (B): Moldes preenchidos com massa de fipronil; (C): Tabletes mastigáveis de fipronil desenhados.

### 3.2. Caracterização físico-química dos tabletes mastigáveis de fipronil

Os procedimentos foram realizados com dois lotes (Lote 1 e Lote 2), produzidos em dias distintos.

#### 3.2.1. Determinação do peso

O ensaio se aplica para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária. O procedimento foi realizado com a pesagem individual de 20 tabletes mastigáveis de fipronil em balança analítica. O peso médio foi obtido pelo cálculo da média aritmética das 20 determinações de peso.

A avaliação da determinação de peso foi realizada conforme os critérios de avaliação da determinação de peso para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária especificados na Farmacopeia Brasileira (2019) que estabelece o limite de variação de  $\pm$

5% para comprimidos não revestidos com peso médio acima de 250 mg. Não mais que duas unidades podem estar fora do limite especificado.

### 3.2.2. Doseamento

Este ensaio tem por objetivo quantificar o teor da substância ativa em medicamentos. Neste ensaio foram pesados 10 tabletes mastigáveis e reduzidos a pó fino com auxílio do gral e pistilo para obter uma mistura homogênea. De acordo com o peso médio, foram pesadas três alíquotas desse pó, que foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL, adicionadas de 50 mL de água destilada e submetidas a banho-maria por 20 minutos à 50°C, e posteriormente o balão volumétrico (100 mL) foi avolumado com acetonitrila (ACN). As amostras foram posteriormente acondicionadas em cuba de ultrassom por mais 20 minutos. Os procedimentos de banho-maria e ultrassom foram realizados para garantir a homogeneização e a solubilidade da solução.

Após solubilização, as amostras foram filtradas utilizando papel filtro e uma alíquota de 200 µL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, o qual foi avolumado com ACN.

As amostras preparadas no ensaio de doseamento e a curva padrão foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV) utilizando metodologia adaptada, descrita por CID *et al*, (2012), seguindo seguintes condições cromatográficas:

- Sistema Cromatográfico: CLAE Dionex Ultimate 3000
- Coluna: Sunfire – C18 (5µm) 150 x 4,6 mm
- Fase móvel: Acetonitrila: Água (60:40, v/v)
- Comprimento de onda: 220 nm
- Fluxo: 1,40 mL/min
- Volume de injeção: 10 µL
- Temperatura: 25°C
- Tempo de corrida: 10 minutos

Para o preparo da solução-mãe (SM) de FIP, foram pesados, com precisão analítica, a quantidade equivalente a 25 mg de FIP com teor de 99,5% (Sigma-Aldrich Co.) e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi completado com

ACN, resultando em uma solução de 1000 µg/mL, denominada de solução estoque (SE).

Para o preparo da curva padrão, a partir da SE, foram realizadas diluições nas concentrações finais de 1, 5, 10, 25, 50, 75 µg/mL, para obtenção da curva padrão, utilizando ACN como diluente.

### 3.2.3. Uniformidade de dose unitárias

O ensaio de uniformidade de dose é realizado visando averiguar eficiência do processo de mistura e garantir homogeneidade de dose. Foram pesados individualmente 10 tabletes e as quantidades individuais estimadas ( $x_i$ ) foram calculadas segundo a Equação 1:

$$x_i = p_i \times A/P \dots\dots\dots \text{Equação 1}$$

em que

$p_i$  = pesos individuais das unidades ou dos conteúdos das unidades testadas;

A = quantidade de fármaco, expressa em porcentagem da quantidade declarada, determinada no doseamento;

P = peso médio das unidades utilizadas no doseamento

Calculou-se o valor de aceitação conforme a Equação 2:

$$VA = | M - X | + ks \dots\dots\dots \text{Equação 2}$$

Onde:

M: se  $98,5\% \leq X \leq 101,5\%$ , então  $M = 100\%$

(X:) Média dos conteúdos individuais ( $x_1, x_2, \dots, x_n$ )

k: constante de aceitabilidade = 2,4

s: desvio padrão da amostra

O valor máximo permitido para o valor de aceitação é de 15,0.

### 3.2.3. Estudo de estabilidade de curta duração

Após a produção e estudos de caracterização físico-química, os tabletes restantes do Lote 1 foram acondicionados em diferentes condições de armazenamento e embalagem e submetidos a análise de teor após um período de seis meses.

Para isso, seis amostras foram acondicionadas individualmente em sachês compostos de alumínio com três soldas e abre-fácil, com face interior em polietileno, seladas em seladora de 10 mm de espessura, e seis unidades foram colocadas em embalagem primária em sachê de plástico polietileno de alta densidade transparente e uma face picotada (Figura 7). Os tabletes acondicionados nos dois tipos de embalagens foram submetidos a duas condições de armazenamento: três unidades de cada embalagem em geladeira ( $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e três em prateleira ( $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Após o período de seis meses, as amostras foram submetidas aos procedimentos de doseamento para análise do teor a fim de obter uma análise comparativa com os resultados de teor inicial (pós-produção) do lote.



**Figura 7.** Tabletes mastigáveis de fipronil acondicionados em duas embalagens distintas. (A): embalagem primária em sachê de plástico polietileno de alta densidade transparente e uma face picotada; (B): sachês compostos de alumínio com 3 soldas e abre-fácil, com face interior em polietileno, seladas com seladora de 10 mm.

### 3.1. Farmacocinética descritiva dos tabletes mastigáveis de fipronil

#### 3.2.1. Animais, tratamento e coleta de amostra

O estudo foi conduzido após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IV/UFRRJ), sob o protocolo de número 9627160623. Foram adotadas medidas de enriquecimento ambiental de forma a minimizar o estresse causado pelo confinamento e manejo necessários a condução do ensaio.

Para avaliação dos parâmetros farmacocinéticos, foram selecionados oito cães da raça Beagle, com idade entre 1 e 8 anos, quatro machos e quatro fêmeas, pesando entre

10 e 13 kg, pertencentes ao canil experimental do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV/DPA/IV/UFRRJ).

O estudo se iniciou no dia -14, onde oito animais foram submetidos a pesagem e avaliação clínica, a qual incluiu a avaliação de frequência cardíaca e respiratória, ausculta cardíaca e pulmonar, observação de alterações neurológicas, oftálmicas, dermatológicas, palpação de linfonodos, palpação abdominal, palpação dos membros pélvicos e torácicos e aferição da temperatura retal, visando a inclusão de animais sadios no estudo. Após, os cães selecionados foram alojados individualmente em canis experimentais de alvenaria que contemplavam área fechada, medindo de 2,10 x 1,65m, além de área aberta, de 2,10 x 1,65m.

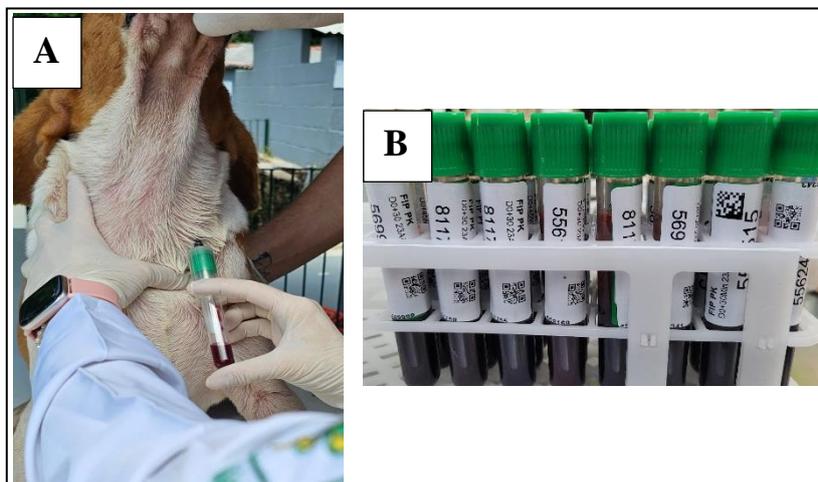
No dia -7 os animais foram submetidos a outro exame clínico para garantir novamente a inclusão de animais sadios no estudo. Como critérios de inclusão, foram selecionados cães que estivessem dentro da faixa de peso estabelecida, que não apresentaram nenhuma alteração nos exames clínicos realizados nos dias -14 e -7 e no caso das fêmeas, que não estivessem prenhas ou lactantes. Os critérios de exclusão envolveram animais que estivessem fora da faixa de peso e/ou que apresentassem quaisquer afecções clínicas e fêmeas prenhas ou lactantes. Como critérios de exclusão pós-tratamento, levou-se em consideração animais que apresentassem algum tipo de enfermidade durante o estudo e/ou apresentassem hipersensibilidade ao princípio ativo e demais constituintes da formulação, critérios que inviabilizariam a continuidade do estudo.

Previamente ao estudo, foi preparado um lote dos tabletes mastigáveis, o qual, após ser submetido e aprovado nos estudos de controle de qualidade (peso médio, doseamento e variação de peso, descritos no item 3.2), foi liberado para a realização do estudo de farmacocinética com no máximo 15 dias após o preparo. Além disso, foi coletado 5 mL de sangue de cada animal através da punção da veia jugular com agulha 21G (25X8) e tubos vacuntainer. O sangue foi acondicionado em tubo heparinizado de 5mL. O plasma foi obtido por centrifugação a 756 g, durante 10min, a 4 °C e aliqotado (1 mL) em microtubos (n= 3), armazenados a -20 °C até o momento da análise.

No dia 0 o tratamento foi realizado em dose única, sendo um tablete mastigável por cão. O tablete foi oferecido ao animal para verificar se haveria aceitação voluntária e, caso não ocorresse, este era administrado diretamente por via oral.

Após o tratamento, para a construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo, foram realizadas coletas de 5 mL de sangue através da punção da veia

jugular com agulha 21G (25X8) e tubos vacuntainer. O sangue foi acondicionado em tubo heparinizado de 5 mL. As coletas foram realizadas nos tempos de 30 min, 45 min, 1, 2, 3, 4, 8, 12 e 24 h após o tratamento (Figura 8A e 8B).



**Figura 8.** (A) Coleta de sangue realizada pela punção da veia jugular com agulha 21G e tubo vacuntainer em cão da raça beagle tratado com um tablete mastigável de fipronil 72 mg para posterior determinação dos parâmetros farmacocinéticos. (B) Tubos identificados com o microchip de cada animal e os tempos de avaliação correspondente.

Do início do estudo, no dia -14, até o dia -1, os animais foram alimentados com ração comercial própria para a espécie, fornecida duas vezes ao dia, em quantidade adequada, de acordo com as instruções do fabricante. No dia 0 os animais ficaram em jejum, uma vez que trabalhos de farmacocinética recentes indicam que a lipemia interfere na avaliação (Tikhomirov *et al.*, 2021).

Decorridas 12 h após o tratamento, todos foram alimentados normalmente, além de serem contemplados com atividade de enriquecimento, envolvendo a oferta de ração seca e úmida. A água foi fornecida *ad libitum* em bebedouros de aço, por ser o material que os animais já estão habituados. Os procedimentos de fornecimento de comida e água, bem como os de limpeza dos canis foram realizados pela equipe de limpeza do próprio biotério. A limpeza foi feita diariamente.

Ao término do estudo, no dia +1, os animais passaram por última avaliação clínica para garantir que não tenham tido nenhum acometimento. Em seguida retornaram ao plantel e o estudo foi finalizado.

### 3.2.2 Preparo das amostras e análise cromatográfica

A metodologia para quantificação do FIP no plasma foi realizada conforme descrito por CID *et al.*, (2012).

Inicialmente foi preparada uma solução mãe (SM) de FIP. Para isso, foram pesados 25 mg de FIP com teor de 99,5% (Sigma-Aldrich Co.) e transferidos para um balão volumétrico de 25mL, cujo volume foi completado com ACN, resultando em uma SM de 1000 µg/mL.

Posteriormente foi realizado o preparo do padrão interno (PI), utilizando o etiprole (Sigma-Aldrich Co.). Foram pesados, com precisão analítica, quantidades equivalentes a 5,0 mg de PI com teor de 98,2% e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado com ACN, resultado em uma solução de 500 µg/mL.

Foi realizado o preparo da curva de calibração em matriz para quantificação das amostras. Para isso, foram coletadas amostras de sangue de quatro cães que não foram submetidos a nenhum tratamento com antiparasitários nos últimos três meses. A coleta foi realizada através de punção venosa da veia jugular, acondicionando o sangue em tubos heparinizados de 10 mL. Em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação a 756 g por 10 min a 4°C para obtenção do plasma.

O plasma foi contaminado com solução contendo FIP para obtenção das concentrações finais de 5, 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng/mL. O etiprole (PI) foi adicionado ao plasma na concentração final de 250 ng/mL. Por fim, o plasma foi aliquotado em volumes de 1 mL em eppendorfs e acondicionado em freezer a -20°C até o momento da análise.

O preparo das amostras foi realizado através de procedimento de extração em fase sólida (EFS). Foram utilizados cartuchos HLB – Oasis (Waters) acoplados a manifold (Supelco®) com capacidade para 12 cartuchos ligados a uma bomba a vácuo (Tecnal®) a 10 mm de Hg. Inicialmente os cartuchos foram acondicionados com 2,0 mL de metanol e 2,0 mL de água. Em seguida foram adicionadas 1,0 mL de amostra (plasma) e depois se procedeu à etapa de lavagem utilizando 1,0 mL de água.

A eluição foi feita com 1,0 mL de metanol. O eluato foi evaporado em concentrador a vácuo e reconstituído em 100µL de ACN. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta (UV)

através da metodologia desenvolvida por CID *et al.*, (2012) e adaptada por Dos Santos *et al.*, (2020) nas seguintes condições:

- Sistema Cromatográfico: CLAE Dionex Ultimate 3000
- Software: Chromeleon 6.8
- Coluna: Kromasil C18 100 x 4,6 mm x 3,5 $\mu$ m
- Pré-coluna: Kromasil C18 (5  $\mu$ m, 4,6  $\times$  10 mm)
- Fase móvel: ACN:Água (60:40, v/v)
- Comprimento de onda: 210 nm
- Fluxo: 1,00 mL.min<sup>-1</sup>
- Volume de injeção: 10  $\mu$ L
- Temperatura: 25°C
- Tempo de corrida: 15 minutos

### **3.2.3 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos**

Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados por meio do programa PK Solver (Microsoft Excel®, Redmond, WA, EUA), analisados por meio do modelo não compartimental de administração extravascular. Todos os parâmetros farmacocinéticos foram calculados usando os dados de concentração plasmática individual versus tempo.

A concentração máxima medida para um determinado animal ( $C_{max}$ ) e o tempo desde a dosagem até a concentração máxima ( $T_{max}$ ) foram medidos individualmente. Os dados dos parâmetros foram utilizados para calcular a média e o desvio padrão. A constante de taxa de eliminação foi calculada usando a regressão com o maior valor de  $R^2$  ajustado com base nos últimos três pontos de dados. A área sob a curva zero até o último tempo  $t$  ( $AUC_{0-t}$ ) foi calculada usando o método trapezoidal linear e extrapolada para o infinito ( $AUC_{0-inf}$ ).

Os outros parâmetros, meia-vida plasmática terminal ( $t_{1/2}$ ), tempo médio de residência (MRT), depuração (Cl) e volume de distribuição com base na inclinação terminal ( $V_z$ ) foram calculados diretamente com PK Solver (Zhang *et al.*, 2010). Os resultados foram expressos como média aritmética  $\pm$  desvio padrão (DP).

### **3.1. Estudo de eficácia clínica**

O estudo foi conduzido após aprovação da CEUA/IV/UFRRJ, sob o protocolo de número 8546110823. Assim como descrito no estudo anterior, para o estudo de eficácia

clínica foram adotadas medidas de enriquecimento ambiental de forma a minimizar o estresse causado pelo confinamento e manejo necessários a condução do ensaio.

Com os parâmetros farmacocinéticos obtidos no primeiro ensaio, foi possível partir para a etapa seguinte. Sendo assim, o estudo de eficácia dos tabletes mastigáveis contendo fipronil foi realizado em animais que, durante o período estipulado, apresentaram infestações naturais por *C. hominivorax*.

Foram selecionados oito cães da raça Beagle, com idade entre 1 e 8 anos, pesando entre 10 e 13kg, pertencentes ao canil experimental LQEPV/DPA/IV/UFRRJ.

Durante o estudo os animais foram alimentados com ração comercial apropriada para a espécie, fornecida duas vezes ao dia, em quantidades de acordo com as instruções do fabricante. A água foi fornecida *ad libitum* em bebedouros de aço, por ser o material que os animais já estão habituados.

Como parte da rotina do LQEPV, os cães eram inspecionados para observações gerais de saúde diariamente. Neste momento, caso fosse detectada alteração dermatológica compatível com lesão provocada por larvas de *C. hominivorax*, a médica veterinária responsável pelo canil era acionada e, caso o animal atendesse aos critérios de inclusão, este era inserido no estudo.

Havendo a confirmação, inicialmente os cães foram submetidos a pesagem para verificar se estavam dentro da faixa de peso estabelecida. Em seguida passaram por avaliação clínica visando a confirmação de infestação e inclusão de animais sadios no estudo. Para isso, os animais foram submetidos à exame clínico para avaliação de frequência cardíaca e respiratória, ausculta cardíaca e pulmonar, observação de alterações neurológicas, oftálmicas, dermatológicas, palpação de linfonodos, palpação abdominal, palpação dos membros pélvicos e torácicos e aferição da temperatura retal.

Como critérios de inclusão, foram selecionados cães que estivessem dentro da faixa de peso estabelecida, que não apresentaram nenhuma alteração em exame clínico e no caso das fêmeas, que não estivessem prenhas ou lactantes. Os critérios de exclusão envolveram animais que estivessem fora da faixa de peso e/ou que apresentassem quaisquer afecções clínicas no momento da avaliação. Como critérios de exclusão pós-tratamento, levou-se em consideração animais que apresentassem algum tipo de enfermidade durante o estudo e/ou apresentassem hipersensibilidade ao princípio ativo e demais constituintes da formulação, critérios que inviabilizariam a continuidade do estudo.

Ao confirmar que o animal atendia aos critérios de inclusão, este foi incluído no estudo e alojado em gaiola individual de aço inoxidável nas dimensões 70 x 120 x 60 cm (altura x largura x profundidade). Cada gaiola contemplava bandejas de aço inoxidável removíveis para recolher as larvas expulsas, evitado que o animal pisasse nas larvas, o que comprometeria a avaliação.

Todos os animais selecionados para o estudo foram tratados com uma unidade do tablete mastigável de fipronil 72mg. A avaliação da eficácia após o tratamento foi realizada através de observações das larvas, avaliando morte ou expulsão. A contagem das larvas expulsas e as avaliações foram adaptadas de Correia *et al.*, (2010), sendo realizadas nos tempos 30 min antes do tratamento e 15, 30 e 45 min, 1, 2, 3, 4, 8, 12 e 24h após o tratamento. As larvas foram classificadas como vivas se apresentassem motilidade no momento da avaliação e como mortas se não estivessem móveis e se estivessem desidratadas, secas ou com mudança em sua coloração (Cutolo *et al.*, 2021).

Após o estudo, os animais que não tiveram as larvas expulsas foram submetidos ao procedimento de sedação para remoção mecânica. Após a remoção, as feridas foram limpas e tratadas. Como tratamento de suporte, além da limpeza da ferida, os cães receberam anti-inflamatório, antibiótico e analgésico, conforme a necessidade de cada lesão.

As larvas expelidas e removidas em todos os tempos de avaliação foram acondicionadas em frascos devidamente identificados contendo quantidade adequada de álcool 70%, para posterior classificação como larvas de primeiro, segundo e terceiro ínstares de *Cochliomya* spp., segundo as chaves taxonômicas de Guimarães e Papavero (1999) e Díaz; Arteta (2017), através da presença de troncos traqueais dorsais pigmentados, observação do tamanho da larva e número de fendas em seus espiráculos posteriores.

Ao término do estudo, no dia +1, os animais passaram por última avaliação clínica para garantir que não havia nenhum outro acometimento, encerrando o estudo. Em seguida retornaram ao plantel, no setor de enfermaria, onde permaneceram internados até que a ferida estivesse completamente cicatrizada.

### **3.1.1. Análise estatística**

Todas as avaliações estatísticas (inferenciais) foram realizadas após a verificação do tipo de distribuição dos dados (paramétricos ou não). Para a verificação da distribuição empregou-se o teste de Shapiro Wilk. Na presença de dados não

paramétricos, os dados foram transformados. Por se tratar, na maioria das vezes, de valores em porcentagem, empregou-se transformação angular. Ao contrário, na presença de dados paramétricos, empregou-se diretamente testes para este tipo de distribuição. Em todas as análises foi considerada significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ). O programa estatístico empregado foi SPSS com base em Field (2020).

Na avaliação dos percentuais de eliminação individual para cada tempo de avaliação, por se tratar de amostras dependentes (pareadas) e cujo objetivo é comparar todos os tempos entre si, empregou-se o Teste de Anova para amostras repetidas. Na avaliação dos percentuais de eliminação acumulado, foi realizado o acréscimo de cada tempo, somado ao valor de eliminação anteriores, seguindo a ordem cronológica de avaliação. Desta forma, o objetivo foi comparar um determinado tempo com o anterior (dois a dois). Por se tratar de amostras dependentes (pareadas) empregou-se Teste T para amostras dependentes.

A impossibilidade de utilizar um grupo controle negativo devido aos princípios bioéticos de animais na pesquisa, somado ao emprego de animais com infestações naturais foram base para justificar que alguns dos resultados fossem transformados em porcentagem. Desta forma, o número de larvas, classificação entre vivas e mortas e instares identificados foram transformados em porcentagem, calculada através do número total de larvas coletadas de cada animal. Este foi o somatório do número de larvas eliminadas nos tempos de 15 minutos a 24h após o tratamento, acrescidos dos espécimes encontrados no desbridamento da ferida. Desta forma, se corrige a distorção pelo número diferenciado de larvas coletadas em cada animal, permitindo assim um tratamento de dados individualizado.

A comparação entre o número total de larvas presentes nas feridas antes do tratamento e o número de larvas vivas após o tratamento foi realizada através do Teste T para duas amostras dependentes (pareadas). O cálculo de eficácia na eliminação de larvas foi realizado pelo somatório da média do percentual total de eliminação das larvas dividido pelo número total de animais.

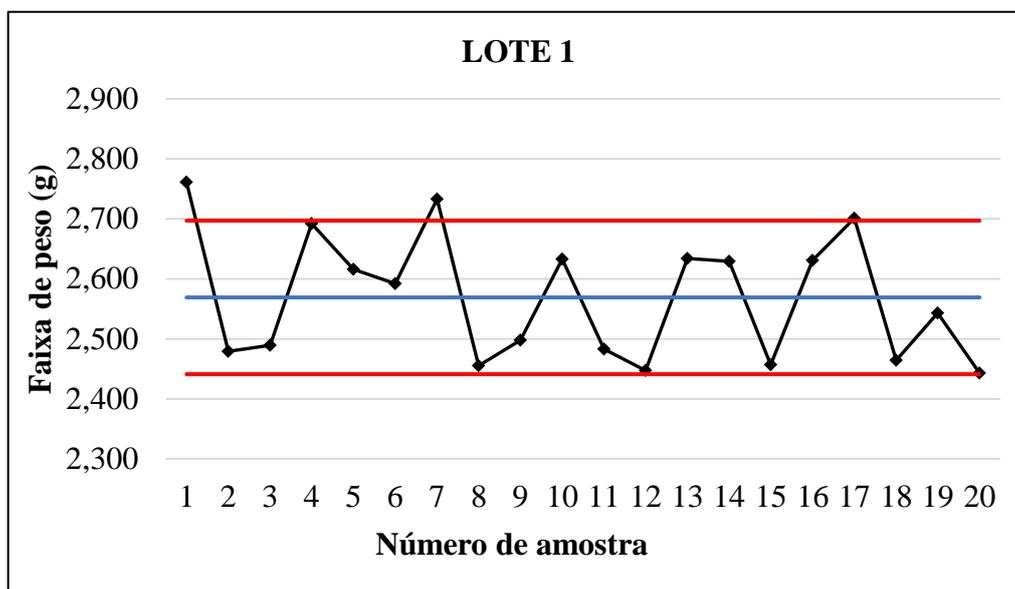
A eficácia terapêutica global foi calculada através do número médio de larvas eliminadas em 24 h somadas ao número total de larvas recuperadas manualmente da ferida após 24 h de tratamento dividido pelo número médio de larvas nos animais antes do tratamento (soma do número médio de larvas vivas e mortas coletadas após o tratamento com as larvas removidas manualmente).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

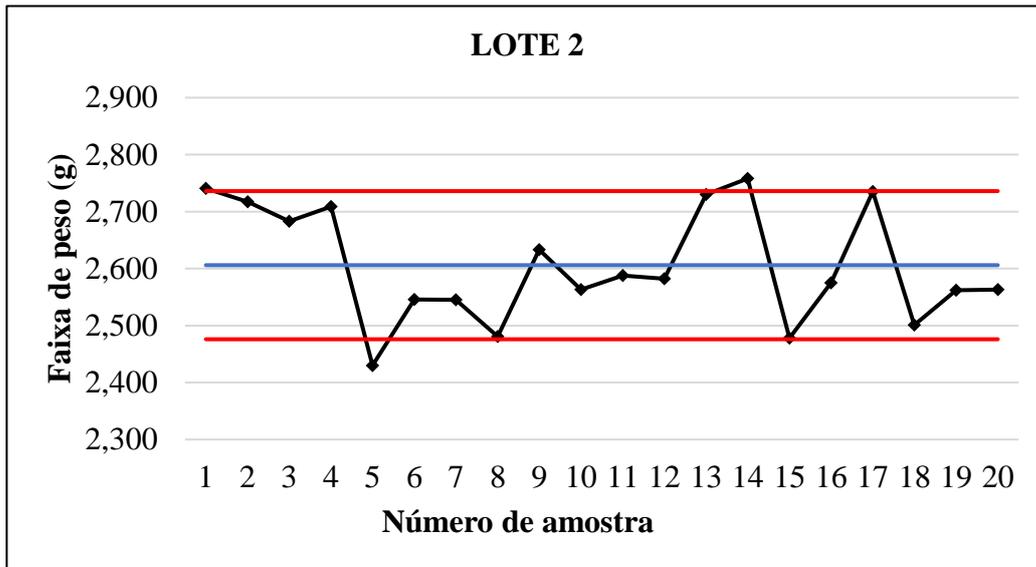
### 4.1 Desenvolvimento e caracterização dos tabletes mastigáveis de fipronil

Foram preparados dois lotes de tabletes mastigáveis, com o peso médio de 2,569 g (2,443 - 2,761 g) para o lote 1 e 2,606 g (2,438 - 2,758 g) para o lote 2. As Figuras 9 e 10 ilustram a variação de peso dos lotes 1 e 2 de fipronil, contendo o peso individual de todos os tabletes mastigáveis.

A faixa azul representa o peso médio e a faixa vermelha ilustra o limite de variação mínimo e máximo de 5% a partir do peso médio.



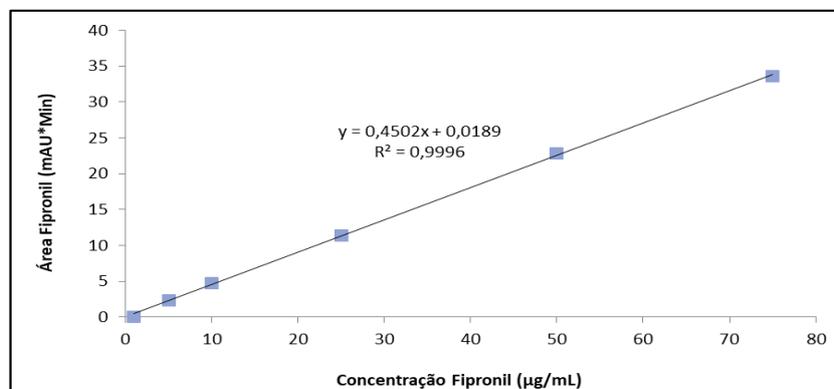
**Figura 9.** Variação de peso do primeiro lote contendo 20 tabletes mastigáveis de fipronil. Faixa azul representando o peso médio e faixa vermelha indicando o limite de variação mínimo e máximo de 5% a partir do peso médio.



**Figura 10.** Variação de peso do segundo lote contendo 20 tabletes mastigáveis de fipronil. Faixa azul representando o peso médio e faixa vermelha indicando o limite de variação mínimo e máximo de 5% a partir do peso médio

Em ambos os lotes, apenas dois dos vinte tabletes encontravam-se fora da faixa de peso estabelecida. No primeiro lote, os tabletes de número 1 e 7 ficaram acima do limite de aceitação, enquanto no segundo lote, os tabletes de número 5 e 14 ficaram abaixo e acima do limite, respectivamente. Os resultados obtidos foram aceitáveis, visto que na Farmacopeia Brasileira (2019) é descrito tolerância de, no máximo, duas unidades fora do limite de variação de  $\pm 5\%$  para formulações que contenham 250 mg ou mais. Além disso, nenhum tablete poderia estar acima ou abaixo do dobro dessa porcentagem e o resultado obtido foi de acordo com o recomendado.

A Figura 11 representa a curva padrão do fipronil, obtida a partir de diluições de FIP em concentrações conhecidas e utilizada no cálculo de doseamento e uniformidade de doses unitárias.



**Figura 11.** Curva padrão, obtida a partir de diluições de fipronil em concentrações conhecidas.

Os resultados referentes ao peso médio, doseamento e uniformidade de dose obtidos nos dois lotes de tabletes mastigáveis de fipronil encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1:** Peso médio, doseamento e uniformidade de dose obtidos de dois lotes de tabletes mastigáveis de fipronil

Lote	Peso médio (g)*	Doseamento**	Uniformidade de dose***	
			Teor (%)	VA
1	2,569	99,12 ± 6,36	100,80 ± 5,48	12,35
2	2,606	102,22 ± 5,53	102,36 ± 4,46	13,05

\* Valores expressos em média (n=20) e valor mínimo e máximo; \*\*% em relação ao declarado. Valores expressos em média ± dp (n=3); \*\*\* % calculado pela variação de peso. Valores expressos em média ± DP (n=10); VA: valor de aceitação

No ensaio de doseamento, observou-se que o teor dos lotes fabricados de tabletes mastigáveis de FIP foram de 99,12% ± 6,36 e 102,22% ± 5,53 para os lotes 1 e 2 ambas dentro do limite aceitável pela Farmacopeia Brasileira (2019).

Na análise de uniformidade de doses unitárias, o teor médio calculado dos lotes foi de 100,80% ± 5,48 e 102,36% ± 4,46, com valor de aceitação de 12,35 e 13,05, respectivamente. Os resultados desse ensaio também se encontravam de acordo com a Farmacopeia Brasileira, que determina o limite máximo de valor de aceitação de 15.

#### 4.2. Estudo de estabilidade de curta duração

A Tabela 2 mostra os valores de doseamento dos tabletes mastigáveis de fipronil que foram armazenados durante o período de seis meses em embalagens distintas e sob as condições de armazenamento em temperatura de geladeira ou prateleira.

**Tabela 2.** Doseamento dos tabletes mastigáveis de fipronil armazenados pelo período de 6 meses em embalagens de plástico ou alumínio, sob as condições de armazenamento em temperatura de geladeira ou prateleira

Condições de armazenamento	Inicial	Estabilidade após 6 meses de preparo			
		Prateleira (25 ± 3 °C)		Geladeira (5 ± 3 °C)	
Embalagem	-	Alumínio	Plástico	Alumínio	Plástico
% Teor*	99,12± 6,42	92,64 ± 4,59	74,99 ± 3,15	89,60 ± 5,72	75,79 ± 2,33
% Perda**	-	6,53	24,34	9,6	23,54

\*% em relação ao declarado. Valores expressos em média ± dp (n=3);

\*\*% perda em relação ao teor inicial.

O teor dos tabletes no momento de fabricação do lote foi de 99,12± 6,42. Ao comparar as duas formas de armazenamento, é possível observar que os tabletes que ficaram acondicionados em embalagem primária em sachê de plástico polietileno tiveram perda considerável de teor, com percentual de 34,34% e 23,54% de perda nas embalagens armazenadas na prateleira e na geladeira, respectivamente. Já as embalagens revestidas em sachês de alumínio armazenadas nas diferentes condições tiveram pouca variação comparada ao teor inicial, com perda de 6,53% e 9,6% para os que ficaram na prateleira e geladeira, respectivamente.

Com isso, pode-se inferir que dentre os dois parâmetros avaliados, a temperatura não interferiu tanto na estabilidade da formulação quanto a forma de armazenamento, onde foi possível observar perda importante de teor em ambas as amostras que ficaram armazenadas em embalagem de plástico polietileno. O armazenamento em sachês de alumínio garantiu maior proteção à luz, fator que pode ser justificado pela característica do ativo em se degradar mais rapidamente na presença de luz solar (Tingle *et al.*, 2000), diminuindo, por este motivo, o percentual de perda.

### 4.3 Farmacocinética descritiva dos tabletes mastigáveis de fipronil

Os dados referentes aos dados dos cães selecionados para o estudo se encontram na Tabela 3.

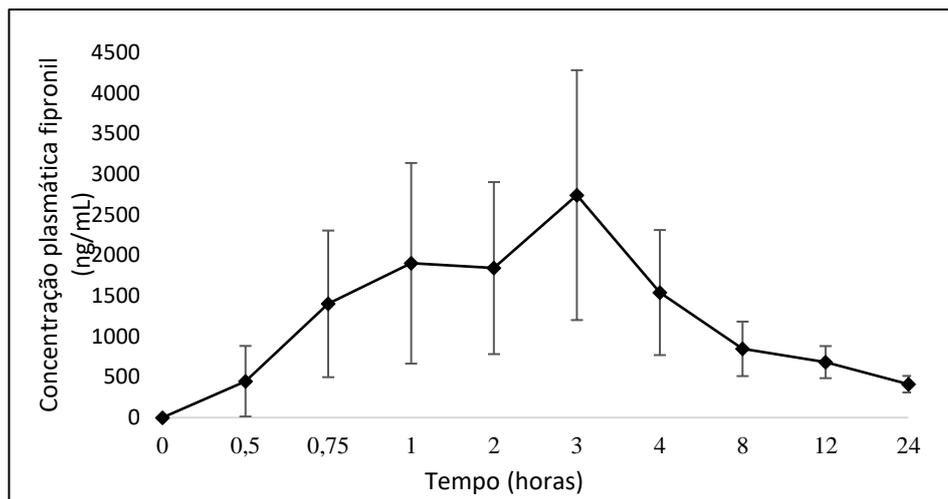
**Tabela 3.** Dados dos cães participantes do estudo de avaliação da farmacocinética descritiva de tabletes mastigáveis de fipronil 72 mg

<b>Animal</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Tabletes Administrados</b>	<b>Dosagem/Kg</b>
1	5	Macho	11,25	1	6,400
2	4	Macho	10,9	1	6,606
3	5	Macho	10,45	1	6,890
4	3	Macho	12,9	1	5,581
5	4	Fêmea	11,75	1	6,128
6	3	Fêmea	10,7	1	6,729
7	3	Fêmea	11,1	1	6,516
8	3	Fêmea	10,55	1	6,825
<b>Média</b>	<b>3,75</b>	<b>---</b>	<b>11,19375</b>	<b>1</b>	<b>6,459</b>
<b>Desvio</b>	<b>0,886</b>	<b>---</b>	<b>0,806</b>	<b>-</b>	<b>0,431</b>

O estudo foi conduzido com quatro machos e quatro fêmeas, com idade entre 3 a 5 anos. O peso médio dos animais que participaram do estudo foi de  $11,193 \pm 0,806$ kg. A dosagem individual foi calculada com base no tratamento por via oral de uma unidade de tablete mastigável de fipronil a 72mg. Com isso, a dosagem do grupo compreendeu a média de  $6,459 \pm 0,431$  mg/kg, com variação mínima e máxima de 5,581 – 6,890mg/Kg.

Na Tabela 4 estão registrados os valores individuais de concentração de FIP nas amostras de plasma coletadas dos cães tratados, bem como a média aritmética e desvio padrão, nos tempos de avaliação previamente descritos.

O estudo foi realizado até o D + 1, no período de 24 h após o tratamento. Na última análise ainda foi possível detectar o fipronil no plasma. As médias dos níveis plasmáticos individuais *versus* tempo estão ilustrados na Figura 12.



**Figura 12.** Curva de concentração plasmática média (n= 8) em plasma canino após administração por via oral de tabletes mastigáveis de fipronil na dose de 6 mg/kg

Após o tratamento dos animais pela via oral com tabletes mastigáveis de fipronil, logo na primeira análise, realizada após 30 min de tratamento, foi possível detectar o ativo no plasma. As concentrações plasmáticas de FIP aumentaram nos períodos de avaliação seguintes e atingiram seu máximo (Cmax) em aproximadamente 2,2 h  $\pm$  0,94 h (Tmax), com valores encontrados de 3126,53  $\pm$  1269,47ng/mL para a dose de 6mg/kg.

Após atingir o Tmax os níveis de FIP declinaram nos tempos de avaliação subsequentes, sendo que decorridas 24 h o valor de FIP obtido foi de 411,92  $\pm$  101,87 ng/mL.

**Tabela 4.** Valores individuais de concentração plasmática de fipronil nas amostras de plasma coletadas dos cães tratados por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil

Tempo (horas)	Concentração plasmática (ng/mL) de fipronil/animal/tempo de avaliação								Média	Desvio Padrão
	1	2	3	4	5	6	7	8		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	406,49	1435,57	389,17	499,75	485,13	47,88	253,76	69,39	448,39	435,18
0,75	1252,27	3044,83	298,27	1429,82	2129,43	1321,99	1457,03	285,53	1402,40	904,39
1	1712,87	3703,59	1406,27	1428,87	479,12	3824,89	1879,16	787,76	1902,82	1237,23
2	1685,49	2364,15	1573,34	1698,92	505,58	4063,07	1892,14	966,08	1843,60	1060,91
3	3346,47	3107,99	3698,49	2197,83	384,25	3561,37	4907,29	743,97	2743,46	1540,93
4	1418,06	2981,40	1535,14	1217,72	632,04	1855,72	2044,46	651,84	1542,05	771,24
8	885,97	636,30	806,83	739,69	498,57	1017,38	1574,78	621,59	847,64	335,93
12	625,87	640,06	756,64	701,60	353,86	740,43	1061,44	590,88	683,85	197,92
24	428,77	521,71	572,13	302,61	270,59	386,47	438,23	374,82	411,92	101,87

Os valores médios e os desvios padrões dos parâmetros farmacocinéticos do FIP, calculados a partir das concentrações plasmáticas, estão dispostos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Parâmetros farmacocinéticos do fipronil após administração por via oral de tablete mastigável na dose de 6 mg/kg em cães.

<b>Parâmetros farmacocinéticos</b>	<b>Média aritmética ± DP</b>
Cmax (ng/ml)	3126,53 ± 1269,47
Tmax (h)	2,22 ± 0,94
AUC 0-t (ng/ml*h)	21483 ± 7236,44
AUC 0-∞ (ng/ml*h)	35193,25 ± 15859,06
T 1/2 (h)	21,06 ± 14,24

Cmax = Concentração plasmática máxima; Tmax = Tempo para atingir a concentração plasmática máxima; ASC0-t = área sob a curva do tempo 0 até a última concentração detectável; ASC0-∞ = área sob a curva de concentração-tempo do tempo 0 ao infinito; T1/2 = tempo necessário para que metade do fármaco seja eliminado;

Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados utilizando o programa Macro PK Solver® a partir de um modelo matemático não-compartimental de administração extravascular. Os resultados do estudo indicam rápida absorção do FIP, com Cmax atingido em aproximadamente 2,22h (Tmax).

Outros autores já realizaram estudos de parâmetros farmacocinéticos do FIP, porém em espécies, concentrações, dosagens e vias de administração distintas (Leghait *et al.*, 2009, Lacroix *et al.*, 2010, Chang *et al.*, 2020, Cid *et al.*, 2016). Essas variáveis impossibilitam estabelecer uma comparação direta dos parâmetros farmacocinéticos com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez se tratando de inúmeras diferenças que influenciam nos parâmetros de biodisponibilidade. Contudo, dentro de 24h de avaliação, os artigos demonstram curvas de concentração semelhantes, com um perfil de rápida absorção, biotransformação e lenta eliminação.

Entretando, tratando-se de trabalhos que foram realizados na mesma espécie animal, sob a mesma via de administração e dose, os resultados permitem uma comparação acerca dos resultados obtidos. Dos Santos *et al.*, (2020) publicaram sobre os parâmetros farmacocinéticos do FIP em cães tratados com comprimidos contendo o ativo, porém na dose de 2mg/kg. Dos Santos *et al.*, (2021), por sua vez, propuseram o mesmo estudo farmacocinético, mas acrescidas das concentrações de 4 e 6 mg/kg para

obtenção de análise comparativa entre as diferentes doses. Por este motivo, o trabalho de Dos Santos *et al.*, (2021) é o que mais se assemelha ao que foi realizado neste ensaio, pois ambos envolveram a mesma dose (de 6mg/kg), administrados por via oral, possibilitando uma análise comparativa.

A curva de concentração plasmática do FIP obtida no presente estudo foi semelhante a observada pelos dois trabalhos citados acima, visto que ambos os autores encontraram o C<sub>max</sub> após 2h de tratamento. Além disso, ao comparar a C<sub>max</sub> média obtida por Dos Santos *et al.*, (2021) na dose de 6mg/kg, nota-se o valor obtido de 5800 ng/mL, maior do que o C<sub>max</sub> deste estudo, que teve média de 3126,53ng/mL.

As diferenças encontradas no C<sub>max</sub> (ng/mL) encontradas nos diferentes trabalhos podem ser explicadas devido à forma farmacêutica empregada nos estudos. Embora os dois trabalhos tenham sido realizados em cães, envolvam a mesma via de administração e com a mesma dose, Dos Santos *et al.*, (2021) realizaram o estudo sob a forma farmacêutica de comprimidos, enquanto este ensaio foi realizado com tabletes mastigáveis. Sabe-se que há diferenças nas propriedades físico-químicas, assim como no desenho e na produção das diferentes formulações, fatores que podem vir a influenciar nos parâmetros avaliados (Hoener *et al.*, 2002).

Dos Santos *et al.*, (2021), para o desenvolvimento dos comprimidos de FIP, usaram a lactose como matriz, diferente da matriz dos tabletes mastigáveis, que foi escolhida razão para cães, que é uma matriz comparativamente mais rica em gordura e, somado à presença de polímeros que formam hidrogéis, pode justificar a mudança de biodisponibilidade das formas farmacêuticas, sobretudo a diminuição do C<sub>max</sub>. Por ser lipofílico, o FIP tende a ficar mais aderido à gordura (Stafford *et al.*, 2018), o que pode diminuir a velocidade de liberação do fármaco a partir de sua forma farmacêutica, levando a diminuição da sua biodisponibilidade.

#### **4.4. Estudo de eficácia clínica**

Os dados referentes aos dados dos cães selecionados para o estudo se encontram na Tabela 6.

**Tabela 6.** Dados dos cães participantes do estudo de avaliação da eficácia na expulsão de larvas de *Cochliomyia hominivorax* contidas em feridas naturais, tratados em dose única pela via oral com tablete mastigável contendo 72mg de fipronil

<b>Animal</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Local da Lesão</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Tabletes administrados</b>	<b>Dosagem (mg/Kg)</b>
1	3	Fêmea	Região interescapular	12,5	1	5,760
2	8	Fêmea	Região interescapular	11,25	1	6,400
3	6	Fêmea	Região perianal	11,4	1	6,316
4	5	Macho	Região de orelha esquerda	12,65	1	5,692
5	5	Macho	Região interescapular	12,5	1	5,760
6	8	Macho	Orelha direita e cavidade oral	12,3	1	5,854
7	3	Macho	Região de orelha direita	12,1	1	5,950
8	8	Macho	Região perianal	11,75	1	6,128
<b>Média</b>	<b>5,750</b>	---	---	<b>12,056</b>	<b>1</b>	<b>5,982</b>
<b>DP</b>	<b>2,121</b>	---	---	<b>0,532</b>	<b>0</b>	<b>0,269</b>

O estudo foi conduzido conforme a ocorrência natural de animais infestados. Todos os cães encontrados puderam participar do estudo por estarem dentro dos critérios de inclusão, que envolvia idade entre 1 a 8 anos, peso entre 11 e 13kg e estado geral de saúde dentro da normalidade, com exceção da infestação.

O peso médio dos animais foi de  $12,056 \pm 0,532$ kg. Através dos dados de peso individual dos animais tratados, foi calculada a dosagem individual com base no tratamento por via oral de uma unidade de tablete mastigável de fipronil a 72mg. Com isso, a dosagem do grupo compreendeu a média de  $5,982 \pm 0,269$  mg/kg com variação mínima e máxima de 5,962 a 6,400mg/Kg.

Além disso, a ocorrência das infestações foi entre cães de 3 a 8 anos, com média e desvio padrão de  $5,750 \pm 2,121$  anos. Com relação ao sexo, os machos foram mais acometidos, com 5 cães, em comparação com as fêmeas, que foram apenas 3. Dos 8 animais avaliados, o local da infestação compreendeu a região dorsal de três cães, especificamente a região interescapular, região perianal em outros dois cães e região de orelha nos demais. Um dos cães acometidos na orelha também apresentou larvas na cavidade oral, em região gengival, acima do dente canino superior direito.

A contagem das larvas expulsas realizadas após 15min, 30min, 45min, 1h, 2h, 3h, 4h, 8h, 12h e 24h após o tratamento se encontram na Tabela 7, bem como o número de larvas removidas mecanicamente após o período de estudo.

**Tabela 7.** Número de larvas de *Cochliomyia hominivorax* expelidas (vivas + mortas), de larvas removidas da ferida após 24h e número total de larvas recuperadas por animal para cada tempo de avaliação após tratamento em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil pela via oral em cães naturalmente infestados

Animal	Número de larvas expelidas (vivas + mortas)										Total	Larvas removidas <sup>1</sup>	Larvas recuperadas <sup>2</sup>
	Tempo de avaliação após o tratamento												
	15 min	30 min	45 min	1h	2 h	3h	4h	6h	12h	24h			
1	0	0	0	0	0	18	15	7	8	7	55	4	59
2	0	0	0	0	0	0	20	17	13	60	110	8	118
3	0	0	0	0	0	0	26	45	19	9	99	0	99
4	0	0	0	0	0	0	15	3	1	9	28	0	28
5	0	0	0	9	3	1	8	25	22	9	77	3	80
6	0	0	0	0	1	12	10	9	6	3	41	0	41
7	0	0	0	0	0	0	7	16	6	9	38	0	38
8	2	0	0	0	0	182	198	167	259	4	812	5	817
<b>Média</b>	<b>0,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1,1</b>	<b>0,5</b>	<b>27</b>	<b>37</b>	<b>36</b>	<b>42</b>	<b>14</b>	<b>158</b>	<b>2,5</b>	<b>160</b>
<b>desvio</b>	<b>0,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3,2</b>	<b>1,1</b>	<b>63</b>	<b>65</b>	<b>55</b>	<b>88</b>	<b>19</b>	<b>266</b>	<b>3</b>	<b>267,3</b>

1-Larvas removidas da ferida após 24h. Todas as larvas estavam mortas

2-Somatório das larvas eliminadas após o tratamento com as recuperadas da ferida após 24h

Com exceção de um animal avaliado, o qual apresentou expulsão das larvas na primeira avaliação, não houve expulsão larval dos demais nas três primeiras avaliações, correspondentes aos tempos de 15, 30 e 45 minutos após o tratamento.

Houve discreta expulsão larval de outros dois cães tratados após 1 e 2h de tratamento, porém a queda só foi proeminente a partir da avaliação após 3h até o período de 12h após o tratamento, onde foi observada média de expulsão de  $26,6 \pm 63,2$ ,  $37,4 \pm 65,2$ ,  $36,1 \pm 54,5$  e  $38,5 \pm 78,9$  larvas para os tempos 3, 4, 6 e 12h, respectivamente. A expulsão foi notadamente observada no momento em que é registrada a  $C_{m\acute{a}x}$  do ativo, que ocorreu em 3h após o tratamento, o que justifica o aumento da atividade a partir desse momento.

Correia *et al.*, (2010), De Oliveira *et al.*, (2018), De Oliveira *et al.*, (2019), ao descreverem sobre a eficácia larvicida do Nitenpyram, Spinosad e Sarolaner, respectivamente, em cães naturalmente infestados por larvas de *C. hominivorax*, descreveram no trabalho o número individual de larvas expelidas nos diferentes tempos de avaliação. As tomadas de tempo avaliadas pelos autores foram semelhantes ao do trabalho com FIP, com avaliações a cada 15 min na primeira hora, aumentando o intervalo nas análises posteriores. Todos os autores realizaram o tratamento em dose

única do ativo, com exceção de Correia *et al.*, (2010), que realizaram um segundo tratamento decorridas 6h de avaliação. Com o trabalho de Correia *et al.*, (2010), foi possível observar que não houve expulsão das larvas nas três primeiras avaliações, correspondentes ao tempo de 15, 30 e 45 minutos após o tratamento, com exceção de um animal, assim como neste estudo. Com 1 e 2h após o tratamento nota-se a maior taxa de expulsão das larvas. Miranda *et al.*, (2020) publicaram um relato de caso de um animal acometido por miíase em cavidade orbital, tratado com o Nitenpyram em dose única. Diferente dos resultados obtidos por Correia *et al.*, (2010), os autores registraram queda das larvas após 30min de tratamento. Contudo, notou-se a maior taxa de expulsão larval com 2h de tratamento. Os resultados obtidos pelos dois trabalhos são justificados pela concentração sérica máxima do ativo, que ocorre entre 1 e 2h após a ingestão do comprimido, diferente da C<sub>máx</sub> do FIP sob a forma de tabletes mastigáveis, que ocorreu em 3h.

Seguindo para os resultados obtidos por De Oliveira *et al.*, (2018) com o Spinosad, dos seis animais que participaram do estudo, apenas um cão teve expulsão das larvas nos primeiros 15min após o tratamento e dois cães tiveram expulsão registradas nas avaliações de 30 min, 45 min e 1h. A expulsão larval máxima foi notadamente observada após 6h de tratamento, porém os autores finalizaram o estudo neste tempo de avaliação, então não foi possível determinar a expulsão larval e comparar com os resultados obtidos nos tempos seguintes.

Por fim, De Oliveira *et al.*, (2019), no trabalho que envolveu a eficácia do Sarolaner, os autores não registraram expulsão larval nos primeiros 30min e apenas um cão teve 3 larvas expulsas na avaliação após 45min de tratamento, sendo a maior expulsão larval observada somente após 4h.

Sendo assim, com a avaliação dos trabalhos citados e comparando com os resultados obtidos neste estudo, foi possível observar que o Nitenpyram teve a expulsão larval mais rápida, notadamente observada após 2h de tratamento, seguida do presente trabalho, que registrou expulsão notória após 3h e em seguida o Sarolaner e Spinosad, que obtiveram após 4 e 6h, respectivamente.

Diferente dos autores citados acima, do Vale *et al.*, (2023) publicaram sobre a eficácia do Lotilaner, porém os autores registraram somente a média de expulsão larval após 2 e 6h de tratamento, resultados que serão discutidos a seguir. Além disso, Cutolo *et al.*, (2021), ao publicarem sobre a eficácia do Afoxolaner, registraram as avaliações

somente antes e após 24h de tratamento e, por este motivo, não foi possível realizar a análise comparativa nas primeiras horas como nos trabalhos anteriores.

O número de larvas de *C. hominivorax* expelidas para cada tempo de avaliação foi transformado em percentual para avaliação da eficácia. Os resultados em percentual individual e acumulado estão dispostos nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

**Tabela 8.** Percentual de larvas expelidas de *Cochliomyia hominivorax* para cada tempo de avaliação experimental após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72 mg de fipronil em cães naturalmente infestados

Animal	Tempos de avaliação após o tratamento										TOTAL
	15min	30min	45min	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h	
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,5	25,4	11,9	13,6	11,9	<b>93,2</b>
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,9	14,4	11,0	50,8	<b>93,2</b>
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	26,3	45,5	19,2	9,1	<b>100,0</b>
4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	53,6	10,7	3,6	32,1	<b>100,0</b>
5	0,0	0,0	0,0	11,3	3,8	1,3	10,0	31,3	27,5	11,3	<b>96,3</b>
6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	29,3	24,4	22,0	14,6	7,3	<b>100,0</b>
7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	18,4	42,1	15,8	23,7	<b>100,0</b>
8	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	23,0	25,0	21,1	29,5	0,5	<b>99,4</b>
<b>Média</b>	<b>0,03<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>a</sup></b>	<b>1,41<sup>a</sup></b>	<b>0,77<sup>a</sup></b>	<b>10,5<sup>ac</sup></b>	<b>25,01<sup>b</sup></b>	<b>24,86<sup>bc</sup></b>	<b>16,85<sup>bc</sup></b>	<b>18,34<sup>bc</sup></b>	<b>97,76</b>
<b>DP</b>	<b>0,1</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>4,0</b>	<b>1,5</b>	<b>14,3</b>	<b>12,8</b>	<b>13,4</b>	<b>8,5</b>	<b>16,4</b>	<b>3,1</b>

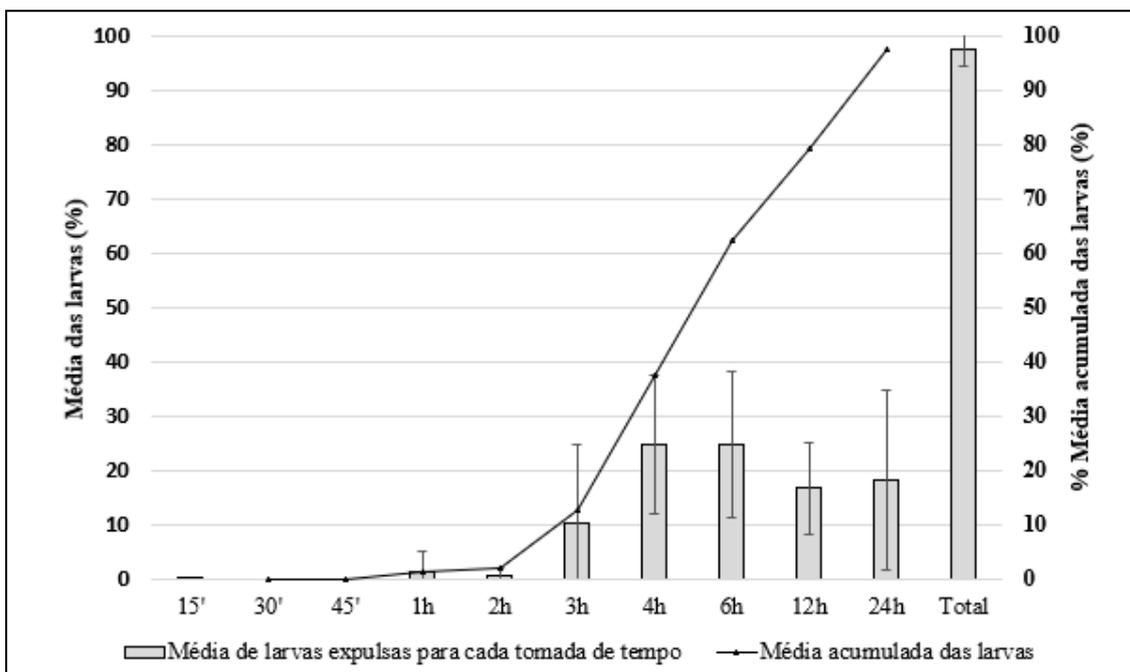
**Tabela 9.** Percentual acumulado de larvas expelidas de *Cochliomyia hominivorax* para cada tempo de avaliação experimental após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados

Animal	Tempos de avaliações após o tratamento									
	15min	30min	45min	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,5	55,9	67,8	81,4	93,2
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,9	31,4	42,4	93,2
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	26,3	71,7	90,9	100,0
4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	53,6	64,3	67,9	100,0
5	0,0	0,0	0,0	11,3	15,0	16,3	26,3	57,5	85,0	96,3
6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	31,7	56,1	78,0	92,7	100,0
7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	18,4	60,5	76,3	100,0
8	0,3	0,0	0,0	0,3	0,3	23,3	48,3	69,4	98,9	99,4
<b>Média</b>	<b>0,03<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>a</sup></b>	<b>1,4<sup>a</sup></b>	<b>2,2<sup>a</sup></b>	<b>12,7<sup>b</sup></b>	<b>37,7<sup>b</sup></b>	<b>62,6<sup>b</sup></b>	<b>79,4<sup>b</sup></b>	<b>97,8<sup>b</sup></b>
<b>DP</b>	<b>0,1</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>4,0</b>	<b>5,2</b>	<b>14,4</b>	<b>17,3</b>	<b>14,2</b>	<b>17,9</b>	<b>3,1</b>

1. Valor obtido através do Teste T para duas amostras dependentes, comparando os valores médios de eliminação média acumulada de larvas de um determinado tempo com o anterior.

Não houve expulsão larval nos primeiros 45 minutos de avaliação após o tratamento. Na avaliação de 1h foi observada expulsão de 1,4 ( $\pm 4$ )%. A expulsão foi notadamente observada a partir dos tempos de 3, 4, 6, 12 e 24h, com 10,5 ( $\pm 14,3$ ), 25 ( $\pm 12,8$ ), 24,9( $\pm 13,4$ ), 16,8( $\pm 8,5$ ) e 18,3( $\pm 16,4$ ) % do número total de larvas, respectivamente. Ao analisar a tabela de percentual acumulado, nota-se que nestes tempos de avaliação, houve expulsão de 12,7 ( $\pm 14,4$ ), 37,7 ( $\pm 17,3$ ), 62,6 ( $\pm 14,2$ ), 79,4 ( $\pm 17,9$ ) e 97,8 ( $\pm 3,1$ )% , respectivamente, promovendo expulsão significativa após 24h de tratamento.

Na Figura 13 está expresso o comparativo entre o percentual de expulsão larval para cada tempo de avaliação e o percentual acumulado dos cães que receberam o tratamento.



**Figura 13.** Comparativo do percentual de larvas (vivas e mortas) de *Cochliomyia hominivorax* eliminadas para cada tempo de avaliação com o percentual acumulativo após tratamento por via oral em dose única de tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães.

Tendo em vista que em todos os trabalhos avaliados não houve expulsão considerável das larvas até o período de 2h após o tratamento, os resultados seguintes serão discutidos a partir dessa tomada de tempo.

Comparando os resultados obtidos com os outros autores, tem-se que Correia *et al.*, (2010), no estudo com o Nitenpyram, após 2, 3, 4 e 6h de tratamento, registraram 19,1, 8,2 e 17,1% de percentual não acumulado de expulsão larval, além de 61,9, 69,7 e 86% em percentual acumulado, nestes mesmos tempos de avaliação, cujo resultado foi superior ao encontrado neste estudo.

De Oliveira *et al.*, (2018), no estudo com o Spinosad, ao comparar os mesmos tempos de avaliação, nota-se que após 2, 3, 4, 5 e 6h de tratamento, o percentual não acumulado foi de 4,65, 13,62, 20,35, 1,44 e 19,07% e percentual acumulado de 17,47, 31,09, 51,44, 52,88 e 71,96%, respectivamente.

Com o exposto acima, ao levar em consideração o percentual acumulado após 6h de tratamento dos dois trabalhos e comparando com os resultados obtidos neste estudo, tem-se o percentual de 85% de larvas expulsas nos animais tratados com o Nitenpyram, seguido de 71,96% para os animais tratados com o Spinosad e 62,6% obtidos com o tratamento com o FIP.

Ao analisar os trabalhos envolvendo as isoxazolininas, tem-se que De Oliveira *et al.* (2019), no estudo com o Sarolaner, relata a taxa média de expulsão das larvas, que foi de 50,8% após 24h de estudo. Em contrapartida, Cutolo *et al.*, (2021), no estudo com o Afoxolaner, relatou 100% de expulsão decorridas 24h de tratamento. Do Vale *et al.*, (2023), no estudo com o Lotilaner, registraram maior expulsão média das larvas em 2h após o tratamento, com taxa de expulsão larval de 80,5 e 93% após 2 e 24h após o tratamento. Nesse caso, em 24h de avaliação o FIP apresentou 97,8% de percentual acumulado de larvas expelidas, sendo superior ao encontrado no estudo com o Sarolaner e Lotilaner, ficando abaixo somente ao Afoxolaner, descrito por Cutolo *et al.*, (2021), que registraram 100% de expulsão na mesma tomada de tempo.

Em seguida, na Tabela 10, são apresentados os dados estatísticos de comparação entre o percentual de expulsão de larvas vivas e mortas em cada tempo de avaliação. Para esta análise, empregou-se o Teste T para duas amostras independentes.

**Tabela 10.** Comparação entre o percentual de larvas vivas e mortas de *Cochliomyia hominivorax* expelidas em cada tempo de avaliação experimental após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados

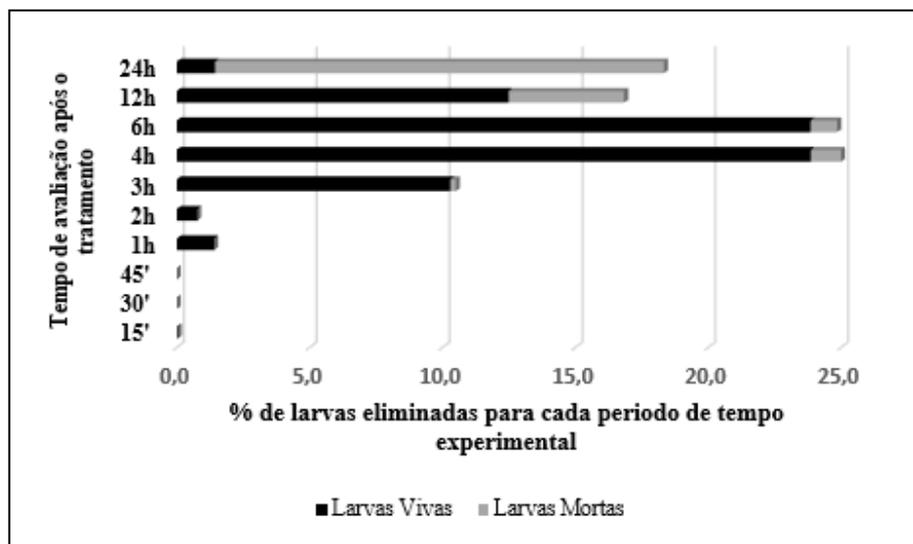
Larvas Eliminadas	Tomadas de medidas centrais	Tempos de avaliações após o tratamento									
		15'	30'	45'	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
Larvas Vivas	Média	0,03	0,0	0,0	1,4	0,8	10,3	23,9	23,8	12,5	1,4
	Desvio	0,7	0,0	0,0	3,2	1,1	63,2	65,4	54,4	80,4	1,4
Larvas Mortas	Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	1,1	1,0	4,4	16,9
	Desvio	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	2,5	2,9	5,6	16,5
Valor de p <sup>1</sup>	---	0,351	--- <sup>2</sup>	--- <sup>2</sup>	0,351	0,173	0,05	<0,001	<0,001	0,011	0,05

1-Valor de p obtido após transformação angular dos percentuais de larvas vivas e mortas e emprego do Teste T para amostras independentes

2- Valor de p não foi possível de ser obtido, pois não é possível de ser calculado intervalo de confiança para as duas amostras

Como resultado, tem-se que não há diferença estatística entre larvas vivas e mortas até o tempo de 2h. Contudo, a partir do período de avaliação seguinte, em 3h, há diferença significativa, a qual é observada nas tomadas de tempos seguintes, até a última avaliação.

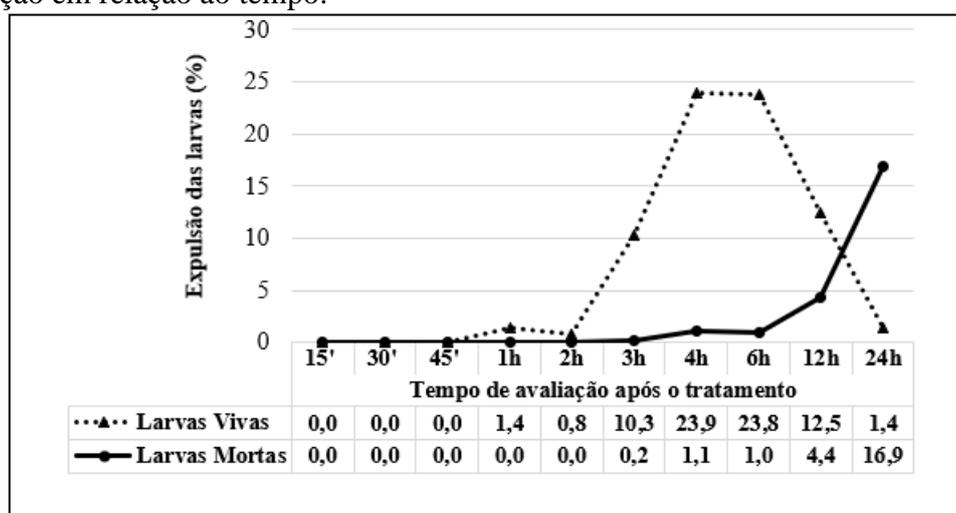
A comparação entre o percentual de larvas vivas e mortas de *C. hominivorax*, expelidas em cada tempo de avaliação experimental após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil estão expressos na Figura 14.



**Figura 14.** Comparação entre o percentual de larvas eliminadas vivas e mortas de *Cochliomyia hominivorax* expelidas em cada tempo de avaliação experimental após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados.

Nota-se que o percentual de larvas expelidas é baixo até o tempo de avaliação de 2h, e a partir das 3h há queda considerável de larvas vivas, indicadas na cor azul. A maior porcentagem de larvas vivas em comparação com a expulsão de larvas mortas é mantida até o período de avaliação das 12h e na última verificação, correspondente à 24h após o tratamento, o percentual é invertido e observa-se queda maior de larvas mortas em comparação com as vivas, indicadas na cor laranja. Além disso, a figura nos permite visualizar que a maior queda das larvas ocorre entre 4 e 6h após o tratamento.

Além disso, a Figura 15 permite uma melhor visualização do percentual de eliminação em relação ao tempo:



**Figura 15.** Comparação entre o percentual de larvas eliminadas vivas e mortas de *Cochliomyia hominivorax* expelidas em cada tempo de avaliação experimental após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados.

Assim como descrito anteriormente, nas primeiras avaliações não houve um percentual significativo de expulsão larval, porém a partir das 2h nota-se uma ascensão do percentual de larvas vivas, mantendo-se até as 4h após o tratamento. Entre 4 e 6h, nota-se que o percentual se mantém com valores semelhantes de larvas vivas expulsas, seguidas de declínio nas horas seguintes, com valor médio de 12,5 e 1,4% de larvas vivas expulsas para os tempos 12 e 24h, respectivamente. Em contrapartida, nota-se que, durante os tempos de avaliação, o percentual de larvas mortas expelidas é baixo até o período de 6h após o tratamento. Nas análises de 12 e 24h, observa-se um aumento do percentual, o qual atinge 4,4 e 16,9% de expulsão, comportamento inversamente proporcional às larvas vivas nestes mesmos tempos de avaliação.

Ao considerar somente o número de larvas vivas presentes antes e após o tratamento, têm-se os resultados descritos na Tabela 11.

**Tabela 11.** Número total e médio de larvas vivas de *Cochliomyia hominivorax* presentes nos cães antes e após 24h do tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil

Tomada de medidas centrais	Larvas presentes na ferida antes tratamento ***	Larvas vivas na ferida 24h após tratamento	Valor de P
<b>Total</b>	1254 28-791*	0 0	<b>&lt;0,001</b>
<b>Media</b>	160 267,3**	0 0	

\* Mínimo-máximo; \*\* DP; \*\*\* O total de larvas presentes na ferida antes do tratamento é o somatório das larvas expelidas e recuperadas ao longo de 24h com o total de larvas encontradas na ferida após 24h do tratamento

O número de larvas variou de 28 a 791 larvas antes do tratamento, com o número total de 1254 espécimes e média de 160 larvas por animal. A amplitude do número de larvas ocorreu devido à casuística encontrada no estudo, onde houve pequenas e grandes infestações.

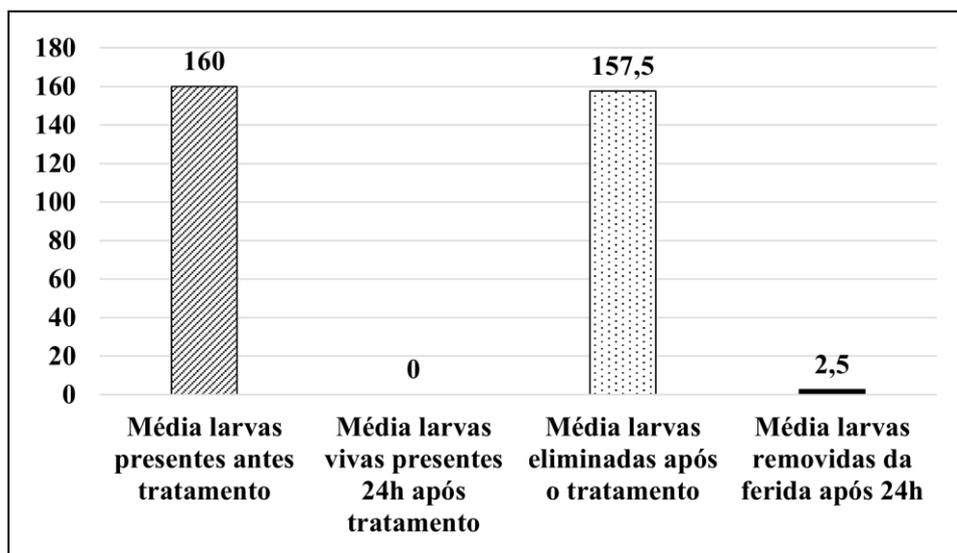
A soma dos sete animais envolvidos no estudo de Correia *et al.*, (2010) foi de 792 larvas, com uma média de 113.1 espécimes, semelhante ao exposto por De Oliveira *et al.*, (2018), que contabilizaram o número total de 624 larvas, com média de  $104 \pm 64,9$  nos seis animais que participaram do estudo.

Com relação aos trabalhos publicados para a comprovação de eficácia das isoxazolinias, foi registrado o número total de 1228 larvas nos oito cães que participaram

do estudo descrito por De Oliveira *et al.*, (2019), com média de  $153,1 \pm 159,4$  larvas por cão.

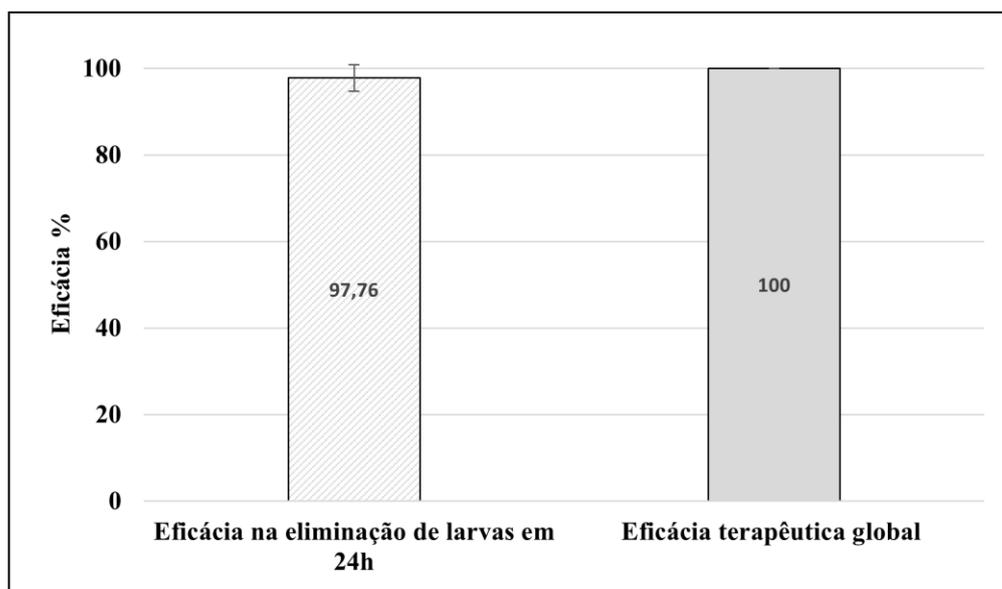
Cutolo *et al.*, (2021) contabilizaram a soma de 886 larvas nos quatorze animais incluídos e apenas do Vale *et al.*, (2023) realizaram o estudo com onze cães, mas com uma média de 35 espécimes por lesão. Diferente deste último trabalho, todos os outros relataram a eficácia dos ativos em infestações brandas e graves, sendo que o número de larvas e a amplitude presentes no estudo com o FIP foi superior à todos os trabalhos citados.

Levando em consideração a média de 160 larvas presentes na ferida antes do tratamento, tem-se que, ao final das 24h, houve média de 157,5 larvas expelidas, contra apenas 2,5 larvas que precisaram ser removidas manualmente (Figura 16).



**Figura 16.** Número médio de larvas de *Cochliomyia hominivorax* presentes antes e após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados.

Após as 24h de tratamento, nota-se que não havia larvas vivas presentes nas feridas. Foi obtida eficácia de 97,76% na eliminação das larvas após 24 horas de tratamento, e ao levar em consideração o dado de não haver larvas vivas na lesão ao término das avaliações, chegou-se à eficácia global de 100% (Figura 17).



**Figura 17.** Eficácia na eliminação das larvas *de Cochliomyia hominivorax* e eficácia terapêutica global após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados

Correia *et al.*, (2010) finalizaram as avaliações de eficácia na eliminação após 18h de tratamento com o Nitempiram, momento em que foi registrada 95,3% de eficácia na eliminação das larvas. Segundo os autores, uma vez que as larvas restantes foram encontradas mortas, foi considerada eficácia terapêutica global de 100%. Já o trabalho envolvendo o Spinosad, publicado por De Oliveira *et al.*, (2018), teve uma eficácia de 71,96% das larvas após 6h de tratamento, com eficácia global de 79,7%. Além disso, todas as isoxazolininas apresentaram 100% de eficácia global após 24h de tratamento (De Oliveira *et al.*, 2018, Cutolo *et al.*, 2021 e Do Vale *et al.*, 2023).

Quanto à identificação dos instares larvais, os dados se encontram na Tabela 12. Foram contabilizadas 21, 330 e 902 espécimes de L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>, respectivamente. Em percentual, houve apenas 1,68% de larvas de primeiro instar, contra 41,25% de média de larvas de segundo instar e 71,99% de larvas L<sub>3</sub>.

**Tabela 12.** Identificação de instares larvais de *Cochliomyia hominivorax* expelidos de cães após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil em cães naturalmente infestados

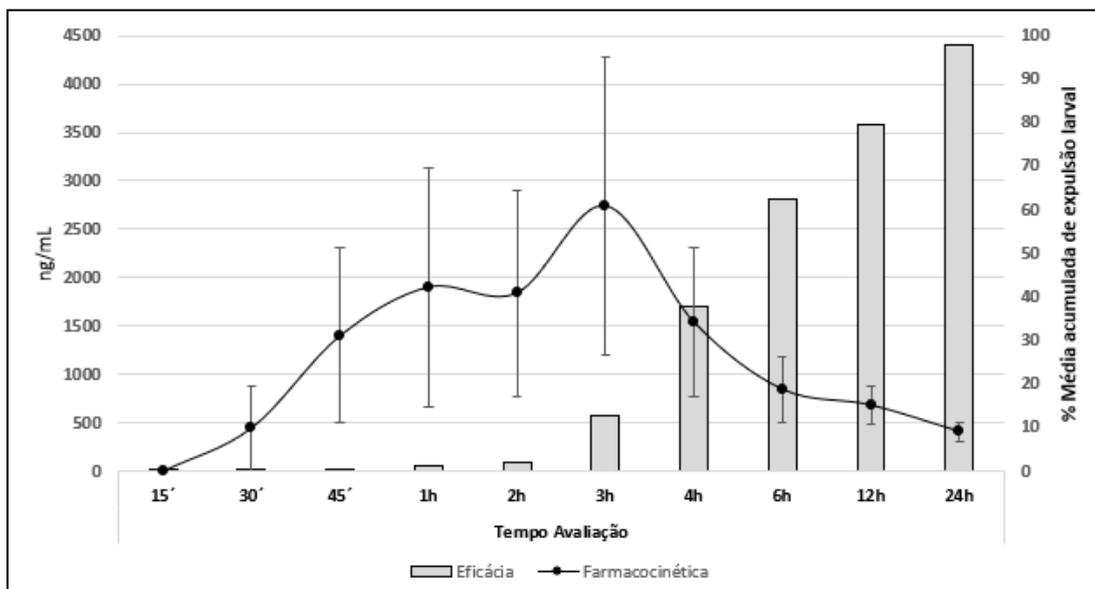
Medidas de tomada central	Instares		
	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>
<b>Total</b> <sup>1</sup>	21	330	902
<b>N</b> <sup>2</sup>	5	8	8
<b>min-max</b> <sup>3</sup>	0-10	2-198	22-590
<b>Média</b> <sup>4</sup>	2625 ± 3,42	41,25 ± 67,37	112,75 ± 193,52
<b>Percentual</b> <sup>5</sup>	1,68 <sup>a</sup> ± 0,27	26,34 <sup>ab</sup> ± 5,38	71,99 <sup>b</sup> ± 15,44

1: Somatório de larvas de cada instar; 2: Número de animais que apresentaram cada instar; 3: Valores mínimos e máximo de instares; 4: Média de instares; 5: Percentual de instares em relação ao N total; Letras iguais: valor de  $p > 0,05$ ; Letras diferentes valor de  $p \leq 0,05$

Entre os trabalhos sobre a eficácia *in vivo* de outros ativos que foram citados neste trabalho, apenas Cutolo *et al.*, (2021) registraram a quantidade de larvas mortas por instares pós-tratamento. Os demais autores afirmam que foi realizada a caracterização morfológica das larvas para identificação de *C. hominivorax*, mas não publicaram os resultados. Além disso, no trabalho de Cutolo *et al.*, (2021) foi realizada a identificação somente das larvas de L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>, diferente da metodologia descrita neste trabalho, que envolveu também a caracterização e contagem das larvas de primeiro instar.

Os autores apresentaram a soma de 84 larvas L<sub>2</sub> e 802 larvas L<sub>3</sub> presentes nos quatorze animais tratados, número inferior ao número de larvas encontradas neste estudo para ambos os estágios, o que ocorreu devido ao fato de que muitos dos animais tratados com o ativo apresentavam infestações leves (menos de 10 larvas) e moderadas (de 10 a 20 larvas), enquanto o estudo com o FIP foi conduzido com uma quantidade superior de larvas em todos os cães tratados.

Por fim, foi realizada a representação comparativa entre o percentual médio acumulativo de expulsão das larvas (vivas e mortas) e a concentração plasmática média de fipronil de acordo com os tempos de avaliação (Figura 18).



**Figura 18.** Representação comparativa entre o percentual médio acumulado de expulsão das larvas (vivas e mortas) após tratamento por via oral em dose única com tabletes mastigáveis contendo 72mg de fipronil e a concentração plasmática média de fipronil

A curva da distribuição plasmática do ativo indica que a concentração plasmática de FIP atingiu sua  $C_{max}$  em aproximadamente 2,2 horas ( $T_{max}$ ), momento em que começa a ter diferença significativa no percentual de expulsão larval. A hipótese para a relação entre a curva de concentração plasmática a eficácia frente às infestações é a de que as larvas de *C. hominivorax* necessitam ingerir o fármaco por via hematogena para entrar em contato com o ativo. Por esse motivo, a partir do momento em que o FIP atinge a  $C_{máx}$ , é quando iniciam as maiores taxas de expulsão e, conseqüentemente, de mortalidade. Ao passo que, mesmo quando há queda da concentração plasmática de FIP, as larvas ainda presentes na ferida se alimentaram do tecido do hospedeiro desde os períodos iniciais de avaliação e, por isso, o percentual de expulsão de larvas mortas foi notadamente maior nas últimas tomadas de tempo e ao final do tratamento não havia larvas vivas presentes na ferida.

## 5. CONCLUSÃO

Foi desenvolvida uma nova forma farmacêutica de fipronil sob a forma de tabletes mastigáveis com adequadas características de físico-químicas de variação de peso, teor e uniformidade de doses unitárias, garantindo sua qualidade e segurança para administração pela via oral em cães.

O fipronil administrado pela via oral em dose única em cães da raça beagle sob a forma de tabletes mastigáveis atinge a circulação sistêmica com perfil de rápida absorção atingindo  $C_{m\acute{a}x}$  de  $3126,53 \pm 1269,47$  ng/ml, em  $2,22 \pm 0,94$  (Tmax) após tratamento na dose de 6mg/kg.

A formulação de tabletes mastigáveis de fipronil 72 mg proporcionou eficácia frente a larvas de *C. hominivorax*, obtendo eficácia de 97,76% na eliminação das larvas após 24h de tratamento e eficácia global de 100% em cães infestados naturalmente.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRENS, E. H.; GLADNEY, W. J.; MCWHORTER, G. M.; DEER, J. A. Prevention of screwworm infestation in cattle by controlling Gulf Coast ticks with slow release insecticide devices. **Journal of economic entomology**, v. 70, n. 5, p. 581-585, 1977.
- ALEXANDER, James L. Screwworms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 3, p. 357-367, 2006.
- ANZIANI, O. S., LOREFICCE, C. Prevention of cutaneous myiasis caused by screw worm larvae (*Cochliomyia hominivorax*) using ivermectin. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 40, n. 1-10, p. 287-290, 1993.
- ANZIANI, O. S.; FLORES, S. G.; MOLTEDO, H.; DEROZIER, C.; GUGLIELMONE, A. A.; ZIMMERMANN, G. A.; WANKER, O. Persistent activity of doramectin and ivermectin in the prevention of cutaneous myiasis in cattle experimentally infested with *Cochliomyia hominivorax*. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 2-3, p. 243-247, 2000.
- BADAWY, M. E. I.; KENAWY, A.; EL-ASWAD, A. F. Toxicity assessment of buprofezin, lufenuron, and triflumuron to the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. **International Journal of Zoology**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- BAI, D.; LUMMIS, S. C.; LEICHT, W.; BREER, H.; SATTELLE, D. B. Actions of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor neurone. **Pesticide science**, v. 33, n. 2, p. 197-204, 1991.
- BARDIN, P. G.; VAN EEDEN, S. F.; MOOLMAN, J. A.; FODEN, A. P.; JOUBERT, J. R. Organophosphate and carbamate poisoning. **Archives of internal medicine**, v. 154, n. 13, p. 1433-1441, 1994.
- BARROS-CORDEIRO, K. B.; PUJOL-LUZ, J. R.; NAIR BÁO, S. Intra-puparial development of the *Cochliomyia macellaria* and *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, p. 334-340, 2016.
- BOWMAN, D. *Parasitologia veterinária de Georgis*. Elsevier Health Sciences, 2010.
- BRIANTI, E.; PENNISI, M. G.; BRUCATO, G.; RISITANO, A. L.; GAGLIO, G.; LOMBARDO, G.; MALARA, D.; FOGLIAZZA, A.; GIANNETTO, S. Efficacy of the fipronil 10%+(S)-methoprene 9% combination against *Rhipicephalus sanguineus* in naturally infested dogs: speed of kill, persistent efficacy on immature and adult stages and effect of water. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 96-103, 2010.
- BEUGNET, F.; DOYLE, V.; MURRAY, M.; CHALVET-MONFRAY, K. Comparative efficacy on dogs of a single topical treatment with the pioneer fipronil/(S)-methoprene and an oral treatment with spinosad against *Ctenocephalides felis*. **Parasite**, v. 18, n. 4, p. 325, 2011.
- BEUGNET, F.; BOUHSIRA, E.; HALOS, L.; FRANC, M. Preventive efficacy of a topical combination of fipronil–(S)-methoprene–epinomectin–praziquantel against ear

mite (*Otodectes cynotis*) infestation of cats through a natural infestation model. **Parasite**, v. 21, n.40, 2014.

BEUGNET, F.; HALOS, L.; LEBON, W.; LIEBENBERG, J. Assessment of the efficacy of a topical combination of fipronil-permethrin (Frontline Tri-Act®/Frontect®) against egg laying and adult emergence of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) in dogs. **Parasite**, v. 23, p.57, 2016.

BHATT, P.; RENE, E. R.; KUMAR, A. J.; GANGOLA, S.; KUMAR, G.; SHARMA, A.; ZHANG, W. CHEN, S. Fipronil degradation kinetics and resource recovery potential of *Bacillus* sp. strain FA4 isolated from a contaminated agricultural field in Uttarakhand, India. **Chemosphere**, v. 276, p. 130156, 2021.

BIRCKEL, P.; COCHET, P.; BENARD, P.; WEIL, A. Cutaneous distribution of <sup>14</sup>C-fipronil in the dog and in the cat following a spot-on administration. 1998.

BYRD, J. H.; BUTLER, J. F. Effects of temperature on *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) development. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 901-905., 1996.

BONNEAU, S.; GUPTA, S.; CADIERGUES, M. Comparative efficacy of two fipronil spot-on formulations against experimental tick infestations (*Ixodes ricinus*) in dogs. **Parasitology research**, v. 107, p. 735-739, 2010.

BORDEAU, W.; HUBERT, B. Treatment of 36 cases of canine *Sarcoptes* using a 0.25% fipronil solution. **Veterinary Dermatology**, v. 11, n. Suppl 1, p. 27, 2000.

BOSCO, A.; RINALDI, L.; LEONE, F.; PENNACCHIO, S.; CIUCA, L.; CRINGOLI, G.; GENCHI, M. The efficacy of fluralaner spot-on against natural infestations by fleas and otodectic mange mites in cats. **Summa, Animali da Compagnia**, v. 36, n. 7, p. 45-47, 2019.

BUDD, R.; ENSMINGER, M.; WANG, D.; GOH, K. S. Monitoring fipronil and degradates in California surface waters, 2008–2013. **Journal of environmental quality**, v. 44, n. 4, p. 1233-1240, 2015.

CASIDA, John E. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. **Environmental health perspectives**, v. 34, p. 189-202, 1980.

CHANG, Y. N.; TSAI, T. H. Preclinical transplacental transfer and pharmacokinetics of fipronil in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 48, n. 10, p. 886-893, 2020.

CID, Y. P.; FERREIRA, T. P.; MAGALHÃES, V. S.; CORREIA, T. R.; SCOTT, F. B. Injectable fipronil for cattle: Plasma disposition and efficacy against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary parasitology**, v. 220, p. 4-8, 2016.

COCHRAN, R. C., YU, L.; KRIEGER, R. I.; ROSS, J. H. Post application Fipronil exposure following use on pets. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 78, n. 19, p. 1217–1226, 2015.

CORREIA, T. R.; SCOTT, F. B.; VEROCAI, G. G.; SOUZA, C. P.; FERNANDES, J. I.; MELO, R. M.; VIEIRA, V. P.C.; RIBEIRO, F. A. Larvicidal efficacy of nitenpyram on the treatment of myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in dogs. **Veterinary parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 169-172, 2010.

CORRIER, D. E.; VIZCAINO, O.; TERRY, M.; BETANCOURT, A.; KUTTLER, K. L.; CARSON, C. A.; TREVINO, G.; RISTIC, M. Mortality, weight loss and anaemia in *Bos taurus* calves exposed to *Boophilus microplus* ticks in the tropics of Colombia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 11, n. 4, p. 215-221, 1979.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; CHAVES, D. P.; BRITO, D. R. B.; SANTOS, V. A. F. D.; COSTA-JÚNIOR, H. N.; BARROS, A. T. M. A review on the occurrence of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 548-562, 2019.

CRAMER-RIBEIRO, B. C.; SANAVRIA, A.; MONTEIRO, H. H. M. S.; OLIVEIRA, M. Q. D.; SOUZA, F. S. D. Inquiry of cases of myiasis by *Cochliomyia hominivorax* in dogs (*Canis familiaris*) of the Northern and Western zones of Rio de Janeiro city in 2000. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 13-20, 2003.

CORONADO, A.; KOWALSKI, A. Current status of the New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* in Venezuela. **Medical and veterinary entomology**, v. 23, p.106-110, 2009.

CUTOLO, A. A.; PERIER, N.; MENZ, I.; THYSSEN, P.; SILVA, F. O.; BEUGNET, F. Efficacy of afoxolaner (NexGard®) on the treatment of myiasis caused by the New World screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in naturally infested dogs. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 24, p. 100569, 2021.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-25, 2014.

DAVEY, R. B.; AHRENS, E. H.; GEORGE, J. E.; HUNTER III, J. S.; JEANNIN, P. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2-4, p. 261-276, 1998.

DAVEY, Ronald B.; GEORGE, John E.; SNYDER, Daniel E. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 41-52, 2001.

DEGRUGILLIER, M. E., & GROSZ, S. G. Effects of female accessory gland ablation on fertility of screwworms, stable flies, and face flies. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 74, n. 2, p. 217-221, 1981.

DE OLIVEIRA, P. C.; MORAES, P. A.; SCOTT, F. B.; VEROCAI, G. G.; CORREIA, T. R.; FERNANDES, J. I. Efficacy of spinosad on the treatment of myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in dogs. **Veterinary parasitology**, v. 258, p. 53-56, 2018.

DE OLIVEIRA, P. C.; DE ALMEIDA, G. P. S.; CARDOSO, J. D.; TAVARES, R. B.; FERNANDES, J. I.; CORREIA, T. R.; VEROCAI, G. G.; SCOTT, F. B. Efficacy of sarolaner on the treatment of myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in dogs. **Veterinary parasitology**, v. 276, p. 108966, 2019.

DE SOUZA, C. P.; VEROCAI, G. G.; RAMADINHA, R. H.; VEROCAI, G. G.; RAMADINHA, R. H. R. Myiasis caused by the New World screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in cats from Brazil: report of five cases. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 12, n. 2, p. 166-168, 2010.

DEUL, D. H.; DE JONG, B. J.; KORTENBACH, J. A. M. Inhibition of chitin synthesis by two 1-(2, 6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides. II. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 8, n. 1, p. 98-105, 1978.

DÍAZ, R. P.; ARTETA, L. C. V. Identificación de larvas productoras de miasis obtenidas del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca con importancia en salud pública. **Nova**, v. 15, n. 28, p. 79-91, 2017.

DO VALE, T. L.; COSTA, A. R.; MIRANDA, L. M.; SILVA, G. F.; SILVA, N. C. S.; LIMA, T. B.; LASMAR, P. V. F.; COSTA-JUNIOR, L. M. Efficacy of lotilaner against myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in naturally infested dogs. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 1-5, 2023.

DOS SANTOS, G. C. M.; ROSADO, L. H. G.; ALVES, M. C. C.; DE PAULA LIMA, I.; FERREIRA, T. P.; BORGES, D. A.; DE OLIVEIRA, P. C.; MAGALHÃES, V. S. M.; SCOTT, F. B.; CID, Y. P. Fipronil tablets: development and pharmacokinetic profile in beagle dogs. **Aaps Pharmscitech**, v. 21, p. 1-9, 2020.

DOS SANTOS, G. C. M.; SCOTT, F. B.; CAMPOS, D. R.; MAGALHÃES, V. DE S.; BORGES, D. A.; MIRANDA, F. R.; ALVES, M.C.C.; PEREIRA, G.A.; MOREIRA, L.O.; LIMA, E.A.S.; ROCHA, M.B.S.; CID, Y. P. Oral pharmacokinetic profile of fipronil and efficacy against flea and tick in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v.45, n.1, p.23-33, 2021.

ELWAER, O. R.; ELOWNI, E. E. Studies on the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* in Libya: effect of temperature on pupation and eclosion. **Parasitology research**, v. 77, p. 48-49, 1991.

ELOWNIA, E. E.; ELWAERB, O. R.; BENHAJB, K. M. Activity of some insecticides against adult New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. **Area-Wide Control of Insect Pests**, 2005.

FERREIRA, T. P.; BAUERFELDT, G. F.; CASTRO, R. N.; MAGALHÃES, V. S.; ALVES, M. C.; SCOTT, F. B.; CID, Y. P. Determination of Fipronil and Fipronil-Sulfone in Surface Waters of the Guandu River Basin by High-Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 1-9, 2022.

FIELD, A. Descobrimos a estatística usando o SPSS-5. Penso Editora, 5ª edição, 2020.

FRANC, M.; BEUGNET, F.; VERMOT, S. Efficacy of fipronil-(S)-methoprene on fleas, flea egg collection, and flea egg development following transplantation of gravid fleas onto treated cats. **Veterinary Therapeutics**, v. 8, n. 4, p. 285, 2007.

FRESIA, P.; PIMENTEL, S.; IRIARTE, V.; MARQUES, L.; DURÁN, V.; SARAVIA, A.; NOVAS, R.; BASIKA, T.; FERENCZI, A.; CASTELLS, D.; SAPORITI, T.; CUORE, U.; LOSIEWICZ, S.; FERNÁNDEZ, S.; CIAPPESONI, G.; DALLA-RIZZA, M.; MENCHACA, A. Historical perspective and new avenues to control the myiasis-causing *Cochliomyia hominivorax* fly in Uruguay. **Agrociencia Uruguay**, v. 25, n. 2, 2021.

FRESIA P.; LYRA, M.L.; CORONADO, A.; AZEREDO-ESPIN, A. M. Genetic structure and demographic history of new world screwworm across its current geographic range. **Journal of medical entomology**, v. 48, n. 2, p.280-290, 2011.

FORERO-BECERRA, E. G.; CORTÉS-VECINO, J. A.; VILLAMIL-JIMÉNEZ, L. C. Associated risk factors to myiasis by *Cochliomyia hominivorax* on cattle farms in Puerto Boyacá (Colombia). **Revista Científica**, v. 19, n. 5, p. 460-465, 2009.

GAN, J.; BONDARENKO, S.; OKI, L.; HAVER, D.; LI, J. X. Occurrence of fipronil and its biologically active derivatives in urban residential runoff. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 3, p. 1489-1495, 2012.

GASSEL, M.; WOLF, C.; NOACK, S.; WILLIAMS, H.; ILG, T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod  $\gamma$ -aminobutyric acid-and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, p. 111-124, 2014.

GEORGHIOU, G. P.; MELLON, R. B. Pesticide resistance in time and space. In: **Pest resistance to pesticides**. Boston, MA: Springer US, p. 1-46, 1983.

GABAJ, M. M.; WYATT, N. P.; PONT, A. C.; BEESLEY, W. N.; AWAN, M. A.; GUSBI, A. M.; BENHAJ, K. M. The screwworm fly in Libya: a threat to the livestock industry of the Old World. **The Veterinary Record**, v. 125, n. 13, p. 347-349, 1989.

GEALH, W. C.; FERREIRA, G. M.; FARAH, G. J.; TEODORO, U.; CAMARINI, E. T. Treatment of oral myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax*: two cases treated with ivermectin. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 1, p. 23-26, 2009.

GILL, J. H.; LACEY, E. Avermectin\milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 6, p. 863-877, 1998.

GUGLIELMONE, A. A.; VOLPOGNI, M. M.; MANGOLD, A. J.; ANZIANI, O. S.; CASTELLI, M. C. Evaluation of a commercial pour-on formulation of 1% fipronil for control of *Haematobia irritans* in naturally infested Holstein heifers. **Veterinaria Argentina**, v. 17, n. 162, p. 108-113, 2000.

GUILLOT, F. S.; COPPEDGE, J. R.; GOODENOUGH, J. L.; AHRENS, E.; ADAMS, T. S. Reproductive status of female screwworms captured from hosts or in traps. **Southwestern entomologist**. 2: 49-52, 1977.

GUIMARÃES JH, PAPAVERO N. Myiasis in man and animals in the Neotropical Region: bibliographic database. São Paulo: Plêiade; 1999.

GUPTA, R. C.; ANADÓN, A. Fipronil. In: **Veterinary toxicology**. Academic press, 2018. p. 533-538.

HALL, M., WALL, R. Myiasis of humans and domestic animals. **Advances in parasitology**, v. 35, p. 257-334, 1995.

HALOS, L.; CARITHERS, D. S.; SOLANKI, R.; STANFORD, H.; GROSS, S. J. Preference of dogs between two commercially available oral formulations of ectoparasiticide containing isoxazolines, afoxolaner or fluralaner. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 5, n.2, p. 25, 2015.

HAMMACK, L.; HOLT, G. G. Responses of gravid screwworm flies, *Cochliomyia hominivorax*, to whole wounds, wound fluid, and a standard blood attractant in olfactometer tests. **Journal of chemical ecology**, v. 9, p. 913-922, 1983.

HAN, H. S.; CHEN, C.; SCHIEVANO, C.; NOLI, C. The comparative efficacy of afoxolaner, spinosad, milbemycin, spinosad plus milbemycin, and nitenpyram for the treatment of canine cutaneous myiasis. **Veterinary dermatology**, v. 29, n. 4, p. 312-e109, 2018.

HEAD, S. W. Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins. **Pyrethrum, the Natural Insecticide**, p.25-48, 1973.

HOENER, BETTY-ANN.; BENET, L. Z. Factors influencing drug absorption and drug availability. **Modern pharmaceuticals**, v. 2, 2002.

HOPE FW. On insects and their larvae occasionally found in the human body. **Transactions of the Entomological Society of London**, v.2, p.256, 1940.

HOSNI, E. M.; KENAWY, M. A.; NASSER, M. G.; AL-ASHAAL, S. A.; RADY, M. H. A brief review of myiasis with special notes on the blow flies' producing myiasis (F.: Calliphoridae). **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, E. Medical Entomology & Parasitology**, v.11, n. 2, p. 25-32, 2019.

JENNINGS, K. A.; CANERDY, T. D.; KELLER, R. J.; ATIEH, B. H., DOSS, R. B.; GUPTA, R. C. Human exposure to fipronil from dogs treated with frontline. **Veterinary and human toxicology**, v. 44, n. 5, p. 301-303, 2002.

JUNIOR, P. B.; RODRIGUES, V. D. S.; GARCIA, M. V.; HIGA, L. D. O. S.; ZIMMERMANN, N. P.; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, R. Economic performance evaluation of Brangus and Nelore cattle breed naturally infested with *Rhipicephalus microplus* in an extensive production system in Central-West Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.78, p.565-577, 2019.

JUNQUERA, P.; HOSKING, B.; GAMEIRO, M.; MACDONALD, A. Benzoylphenyl ureas as veterinary antiparasitics. An overview and outlook with emphasis on efficacy, usage and resistance. **Parasite**, v. 26, 2019.

KAGABU, S.; MEDEJ, S. Stability comparison of imidacloprid and related compounds under simulated sunlight, hydrolysis conditions, and to oxygen. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 59(6), 980-985, 1995.

KALTUNGO, B. Y.; BABA, A. Y.; SAIDU, S. N. A.; ADEDEJI, A. J.; LAWAL, T. W. L.; HINMIKALU, O. E. Efficacy trial of three pour-on acaricides on external parasites of cattle in Zaria, Nigeria. **Nigerian Journal of Parasitology**, v. 38, n. 2, p. 245-249, 2017.

KNAUS, M.; CAPÁRI, B.; VISSER, M. Therapeutic efficacy of Broadline® against notoedric mange in cats. **Parasitology research**, v. 113, n. 11, p. 4303-4306, 2014.

KOLLMAYER, W. D.; FLATTUM, R. F.; FOSTER, J. P.; POWELL, J. E.; SCHROEDER, M. E.; SOLOWAY, S. B. Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides. In **Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor** (pp. 71-89), 1999.

KUŽNER, J.; TURK, S.; GRACE, S.; SONI-GUPTA, J.; FOURIE, J. J.; MARCHIONDO, A. A.; RUGG, D. Confirmation of the efficacy of a novel fipronil spot-on for the treatment and control of fleas, ticks and chewing lice on dogs. **Veterinary parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 245-251, 2013.

LACROIX, M. Z.; PUEL, S.; TOUTAIN, P. L.; VIGUIÉ, C. Quantification of fipronil and its metabolite fipronil sulfone in rat plasma over a wide range of concentrations by LC/UV/MS. **Journal of chromatography B**, v. 878, n. 22, p. 1934-1938, 2010.

LE BLANC, P-P.; AIACHE, J-M.; BESNER, J-G.; BURI, P.; LESNE, M. Tratado de biofarmácia e farmacocinética. **Ciência e técnica**, 1997.

LECRU, L. A.; COMBARROS, D.; CASTILLA-CASTAÑO, E.; NAVARRO, C.; CADIERGUES, M. C. Treatment of harvest mite infestation in dogs using a permethrin 54.5% and fipronil 6.1%(Effitix®) topical spot-on formulation. **Veterinary Sciences**, v. 6, n. 4, p. 100, 2019.

LEGHAIT, J.; GAYRARD, V.; PICARD-HAGEN, N.; CAMP, M.; PERDU, E.; TOUTAIN, P. L.; VIGUIÉ, C. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**, v. 255, n. 1-2, p. 38-44, 2009.

LI, X.; CHEN, J.; HE, X.; WANG, Z.; WU, D.; ZHENG, X.; ZHENG, L.; WANG, B. Simultaneous determination of neonicotinoids and fipronil and its metabolites in environmental water from coastal bay using disk-based solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 234, p. 224-231, 2019.

LIMA, W. S.; MALACCO, M. A. F.; BORDIN, E. L.; OLIVEIRA, E. L. Evaluation of the prophylactic effect and curative efficacy of fipronil 1% pour on (Topline®) on post-castration scrotal myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle. **Veterinary parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 373-377, 2004.

LINDQUIST, D. A.; ABUSOWA, M. Eradicating the new world Screwworm from the Libyan Arab Jamahiriya. **International Atomic Energy Agency Bulletin;(Austria)**, v. 34, n. 4, 1992.

LOPES, W. D. Z.; CHIUMMO, R. M.; VETTORATO, L. F.; DE CASTRO RODRIGUES, D.; SONADA, R. B. The effectiveness of a fixed-dose combination pour-on formulation of 1.25% fipronil and 2.5% fluazuron against economically important ectoparasites and associated pharmacokinetics in cattle. **Parasitology international**, v. 66, n. 5, p. 627-634, 2017.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; WOLSTENHOLME, A. J. Mode of action of the macrocyclic lactones. In: **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**. Wallingford UK: CAB International, p. 125-140, 2002.

MASTRANGELO, T; WELCH, J. B. An overview of the components of AW-IPM campaigns against the New World screwworm. **Insects**, v. 3, n. 4, p. 930-955, 2012.

MELO, R. M., VIEIRA, V. P. D. C., TAVARES, P. V., BATISTA, L. C., CARNEIRO, M. B., CORREIA, T. R., CID, Y.P., COUMENDOUROS, K., SCOTT, F. B. Efficacy of oral fipronil in the control of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 34, p.15-20, 2012.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; LABARTHE, N.; GUERRERO, J.; LANDAU-REMY, G.; RODRIGUES, D. P.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA, M. J. S. *Cochliomyia hominivorax* myiasis in a colony of stray cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in Rio de Janeiro, RJ. **Veterinary parasitology**, v. 146, n. 3-4, p. 376-378, 2007.

MERTZ, F. P.; YAO, R. C. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 34-39, 1990.

MICHEL, N.; FREESE, M.; BRINKMANN, M.; POHLMANN, J. D.; HOLLERT, H.; KAMMANN, U.; HAARICH, M.; THEOBALD, N.; GERWINSKI, W.; ROTARD, W.; HANEL, R. Fipronil and two of its transformation products in water and European eel from the river Elbe. **Science of The Total Environment**, v. 568, p. 171-179, 2016.

NARAHASHI, T.; ZHAO, X.; IKEDA, T.; SALGADO, V. L.; YEH, J. Z. Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 2, p. 149-152, 2010.

NAUEN, R.; DENHOLM, I. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. **Archives of insect biochemistry and physiology**:

**Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 58, n. 4, p. 200-215, 2005.

NOGUEIRA, S. N. L.; DA SILVA, M. F.; DE ANDRADE FURTADO, R.; JÚNIOR, D. P.; SOARES, M. C.; ANDRADE, M. M. A.; NASCIMENTO, E. G.; FERREIRA, L. L.; SOARES, V. E.; LOPES, W. D. Z.; DE MENDONÇA, R. P. In vitro test for the evaluation of the efficacy of topical products for the control of *Cochliomyia hominivorax* larvae. **Parasitology**, v. 147, n. 7, p. 816-821, 2020.

J NOLAN, T.; B LOK, J. Macrocyclic lactones in the treatment and control of parasitism in small companion animals. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 1078-1094, 2012.

OKUMURA, F.; AMARAL, R. B.; ORESTES, E.; SILVA, A. B.; MAZO, L. H. Electrochemical and quantum chemical investigations of the insecticide fipronil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 925-932, 2016.

PAARLBERG, T. E.; WISEMAN, S.; TROUT, C. M.; KEE, E. A.; SNYDER, D. E. Safety and efficacy of spinosad chewable tablets for treatment of flea infestations of cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 8, p. 1092-1098, 2013.

PETERSON, R. D.; NEWMAN JR, S. M. Chorionic structure of the egg of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of medical entomology**, v. 28, n. 1, p. 152-160, 1991.

PERRET, P.; SARDA, X.; WOLFF, M.; WU, T. T.; BUSHEY, D.; GOELDNER, M. Interaction of non-competitive blockers within the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A chloride channel using chemically reactive probes as chemical sensors for cysteine mutants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 36, p. 25350-25354, 1999.

PETRY, G.; FOURIE, J.; WOLKEN, S. Comparison of the palatability of a new Flavoured Drontal® plus tablet (Drontal® plus treat 10 kg) and Milbemax® chewable tablets when presented to privately owned dogs. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v.4, p.163-169, 2014.

PEZZI, M.; BONACCI, T.; LEIS, M.; MAMOLINI, E.; MARCHETTI, M. G.; KRČMAR, S.; CHICCA, M.; DEL ZINGARO, C.N.F.; FAUCHEUX, M.J.; SCAPOLI, C. Myiasis in domestic cats: a global review. **Parasites & vectors**, v.12, n.1, p. 1-14, 2019.

RAWLINS, S. C. Current trends in screwworm myiasis in the caribbean region. **Veterinary Parasitology**, v. 18, n. 3, p. 241-250, 1985.

RECK, J.; MARKS, F. S.; RODRIGUES, R. O.; SOUZA, U. A.; WEBSTER, A.; LEITE, R. C.; GONZALES, J. C.; KLAFKE, G. M.; MARTINS, J. R. Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by

Cochliomyia hominivorax in cattle?. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 1, p. 59-62, 2014.

MARTÍN REINA, J.; DUARTE, J. A.; CERRILLOS, L.; BAUTISTA PALOMAS, J. D.; MORENO NAVARRO, I. M. Insecticide reproductive toxicity profile: organophosphate, carbamate and pyrethroids. **Journal of Toxins**, 4 (1), 1-7., 2017.

RODRIGUES-GUIMARÃES, R.; MOYABORJA, G.E.; PILE, E.A.; GUIMARÃES, R.R.; SAMPAIO, F.R. Constance coefficient of blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brazil. **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa**, 35, 251-255, 2004.

SAFDAR N.; YOUNG DK.; ANDES D. Autochthonous furuncular myiasis in the United States: case report and literature review. **Clinical Infectious Diseases** v. 36, p. 73-80, 2003.

SALGADO, V.L. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiology correlates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.60, p. 91–102, 1998.

SCARAMPELLA, F.; POLLMEIER, M.; VISSER, M.; BOECKH, A.; JEANNIN, P. Efficacy of fipronil in the treatment of feline cheyletiellosis. **Veterinary parasitology**, v. 129, n. 3-4, p.333-339, 2005.

SHEIKH, S.; PALLAGATTI, S.; SINGLA, I.; KALUCHA, A.; AGGARWAL, A.; KAUR, H. Oral myiasis: a review. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 3, n. 5, p.465-468, 2011.

SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C., FURLAN, L.; GIBBONS, D.W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D.P.; KRUPKE, C.H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E.A.D.; MORRISSEY, C.A.; NOOME, D.A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J.D.; TAPPARO, A.; DYCK, H.V.; VAN PRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J.P.; WHITEHORN, P.R.; WIEMERS, M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p.5-34, 2015.

DE SOUZA, C. P.; VEROCAI, G. G.; RAMADINHA, R. H. Myiasis caused by the New World screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in cats from Brazil: report of five cases. **Journal of feline medicine and surgery**, v.12, n. 2, p.166-168, 2010.

SNOW, J. W.; COPPEDGE, J.R.; BAUMHOVER, A. H.; GORSIRA, R. The screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) reinfests the island of Curaçao, Netherlands Antilles. **Journal of medical entomology**. v.14, n.5, p. 592–593, 1978.

STAFFORD, E. G.; TELL, L. A.; LIN, Z.; DAVIS, J. L.; VICKROY, T. W.; RIVIERE, J. E.; BAYNES, R. E. Consequences of fipronil exposure in egg-laying hens. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 253, n. 1, p. 57-60, 2018.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. *Parasitologia Veterinária*, 4ª edição. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2000.

TEERLINK, J.; HERNANDEZ, J.; BUDD, R. Fipronil washoff to municipal wastewater from dogs treated with spot-on products. **Science of the Total Environment**, v.599, p.960-966, 2017.

TENNEKES HA. Fipronil in surface water: an environmental calamity remaining under radar in the Netherlands. **Journal of Ecology and Toxicology** v.2, n.1, p. 5–6, 2018.

THOMAS, D. B.; MANGAN, R. L. Oviposition and wound-visiting behavior of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 82, n. 4, p. 526-534, 1989.

TIKHOMIROV, M.; ŚNIEGOCKI, T.; POŻNIAK, B. Lipemia in the plasma sample affects fentanyl measurements by means of HPLC-MS2 after liquid-liquid extraction. **Molecules**, v.26, n.15, p. 4514, 2021.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Health and environmental effects of fipronil. **Briefing paper for Pesticides Action Network**, v.22, p.103-118, 2000.

USDA-APHIS. The foreign animal disease preparedness and response plan—disease response strategy: New World screwworm Myiasis. 2018.

VARGAS-TERÁN, M.; HOFMANN, H.C.; TWEDDLE, N.E. Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect technique. **Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management** (ed. by V. A. Dick, J. Hendrichs & A. S. Robinson), pp. 629–650, 2005.

VARGAS-TERÁN, M.; SPRADBERRY, J. P.; HOFMANN, H. C.; TWEDDLE, N. E. Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect technique. In **Sterile insect technique** p. 949-978, 2021.

WALDRON, C.; MATSUSHIMA, P.; ROSTECK, P. R.; BROUGHTON, M. C.; TURNER, J.; MADDURI, K.; CRAWFORD, K.P.; MERLO, D.J.; BALTZ, R. H. Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*1. **Chemistry & biology**, v.8, n.5, p. 487-499, 2001.

WALL, R; SHEARER, D. The importance and diversity of arthropod ectoparasites. **Veterinary Entomology**. Springer, Dordrecht, 1997. p. 1-42.

WALL, R.; SHEARER, D.; WALL, R.; SHEARER, D. The diagnosis and control of ectoparasite infestation. **Veterinary Entomology: Arthropod Ectoparasites of Veterinary Importance**, p. 313-401, 1997.

- WAN Y.; TRAN TM.; NGUYEN VT.; WANG A.; WANG J.; KANNAN K. Neonicotinoids, fipronil, chlorpyrifos, carbendazim, chlorotriazines, chlorophenoxy herbicides, bentazon, and selected pesticide transformation products in surface water and drinking water from northern Vietnam. **Science of the Total Environment**, v. 750, p. 141507, 2021.
- WATSON, G. B. Actions of insecticidal spinosyns on g-aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 71, n.1, p. 20–28, 2001.
- WHITE, W. H.; HUTCHENS, D. E.; JONES, C.; FIRKINS, L. D.; PAUL, A. J.; SMITH, L. L.; SNYDER, D. E. Therapeutic and persistent efficacy of spinosad applied as a pour-on or a topical spray against natural infestations of chewing and sucking lice on cattle. **Veterinary parasitology**, v.143, n.3-4, p. 329-336, 2007.
- WEBER, T.; SELZER, P. M. Isoxazolines: a novel chemotype highly effective on ectoparasites. **Ectoparasites: Drug Discovery Against Moving Targets**, p. 243-258, 2018.
- WINTER, M. Farmacocinética clínica básica, 1ª edição, Pharmabooks, 2012.
- WOLKEN, S.; FRANC, M.; BOUHSIRA, E.; WISEMAN, S.; HAYES, B.; SCHNITZLER, B.; JACOBS, D.E. Evaluation of spinosad for the oral treatment and control of flea infestations on dogs in Europe. **Veterinary Record**, v. 170, n.4, p. 99-99, 2011.
- WOLSTENHOLME, A. J.; ROGERS, A. T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. **Parasitology**, v.131 (S1), S85-S95, 2005.
- WOODWARD, K. N. Veterinary pesticides. **Mammalian toxicology of insecticides**, v. 12, p. 348, 2012.
- WYSS J. H. Screwworm eradication in the americas. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, n. 1, p. 186-193, 2000.
- YOUNG, D. R.; JEANNIN, P. C.; BOECKH, A. Efficacy of fipronil/(S)-methoprene combination spot-on for dogs against shed eggs, emerging and existing adult cat fleas (*Ctenocephalides felis*, Bouché). **Veterinary Parasitology**, v. 125, n.3-4, p.397-407, 2004.
- ZHANG, B.; ZHANG, L.; HE, L.; YANG, X.; SHI, Y.; LIAO, S.; YANG, S.; CHENG, J.; REN, T. Interactions of Fipronil within Fish and Insects: Experimental and Molecular Modeling Studies. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.66, p. 5756–5761, 2018