

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Desenvolvimento de Formulações Farmacêuticas Tópicas Contendo
Eugenol e Carvacrol para o Controle de Pulgas e Carrapatos em Animais
de Companhia**

Ingrid Lins Raquel de Jesus

2023



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

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS
TÓPICAS CONTENDO EUGENOL E CARVACROL PARA O
CONTROLE DE PULGAS E CARRAPATOS EM ANIMAIS DE
COMPANHIA**

Ingrid Lins Raquel De Jesus

*Sob a orientação da Professora
Yara Peluso Cid*

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

**Seropédica, RJ
Março de 2023**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

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

J58d

Jesus, Ingrid Lins Raquel de, 1994-
Desenvolvimento de formulações farmacêuticas tópicas
contendo eugenol e carvacrol para o controle de
pulgas e carrapatos em animais de companhia / Ingrid
Lins Raquel de Jesus. - Seropédica, 2023.
101 f.

Orientadora: Yara Peluso Cid.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em
Ciências Veterinárias, 2023.

1. Delineamento de formulações. 2.
Ectoparasiticidas. 3. Produtos naturais. 4. Animais
de companhia. I. Cid, Yara Peluso, 1982-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias III.
Título.



ATA N° 1011/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.013403/2023-46

Seropédica-RJ, 09 de março de 2023.

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

INGRID LINS RAQUEL DE JESUS

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 09/03/2023

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

(Assinado digitalmente em 09/03/2023 17:51)

ERIKA YOKO SUZUKI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)
Matrícula: ####047#5

(Assinado digitalmente em 10/03/2023 09:30)

YARA PELUSO CID
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)
Matrícula: ####004#7

(Assinado digitalmente em 10/03/2023 10:30)

PATRICIA GARCIA FERREIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.697-##

(Assinado digitalmente em 09/03/2023 17:52)

DIEFREY RIBEIRO CAMPOS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.737-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1011**, ano: **2023**, tipo: **ATA**, data de emissão: **09/03/2023** e o código de verificação: **12dce2e670**

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, meu irmão, meu esposo, a orientadora e aos amigos. Aos meus pets em terra e aos que já se foram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por não me desamparar em nenhum momento, por me dar forças até nos momentos mais difíceis enfrentados, por me fazer perseverar durante todo o caminho percorrido até aqui e não desistir.

Aos meus pais, Dagmar e Luiz Carlos, ao meu irmão William e ao meu querido esposo Vinicius Daniel por toda palavra de conforto, suporte e apoio, por me aguentarem nos meus dias mais difíceis, não desistindo de mim e não me deixando desistir de conquistar meus sonhos. Por todas as histórias, conselhos, ensinamentos, risadas que ainda virão. Ao meu anjinho que nos acompanhou por um momento nesta trajetória, nos fazendo felizes pelo tempo que esteve conosco.

A todos meus professores que participaram da minha formação de maneira direta ou indireta, alimentando o amor pela pesquisa e pelo conhecimento, que formaram a profissional que sou, muitas vezes sem o devido reconhecimento que merecem.

As professoras Dr^a. Thais Ribeiro, Dr^a. Érika Yoko, Dr^a. Débora Omena e Dr^a. Patrícia Ferreira pela troca de conhecimentos, conselhos, dicas, pelo amor ao trabalho e a pesquisa, pela ajuda em todo processo.

Agradeço também a todo o quadro de funcionários da UFRRJ que propiciaram a melhor qualidade de ensino dentro das limitações que o sistema oferece.

Agradeço a toda equipe do LQEPV/UFRRJ por toda colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pela expansão de conhecimentos, pela oportunidade da participação em diversos trabalhos interdisciplinares em especial ao Dr. Diefrey Ribeiro Campos e a Dr^a. Barbara Rauta de Avelar, bem como as suas equipes, por toda colaboração, ensinamentos, apoio e conselhos.

A equipe e amigos que compõe os setores de Delineamento e Análise Farmacêutica (DaF), de Diagnóstico de artrópodes, helmintos e vetores (DahVet), de Garantia de Qualidade e orientados da Dr^a. Yara Cid, doutoras Thais Paes e Viviane Magalhães; doutorandas Melina Alves e Paloma Nascimento, doutorando Fernando Miranda; mestrandas Taynara Monsores, Isabelle Vilela e Anna Júlia; e alunos de iniciação científica Camyla Nunes (minha primogênita científica), Alice Ortega, Giovanna Valle, Karen Kuhfuss, Matheus Eduardo e Mathias Pittizer pela amizade, companheirismo, apoio e suporte no decorrer deste trabalho, nas histórias e risadas que tornaram meus dias mais alegres, leves e esta caminhada menos difícil.

As amigas de vida Bruna Borges, Débora Azevedo, Elizama Cristina, Janaina de Fátima, Juliana Barbosa, Mayara Christine, Millena Padela e Thainá Tomé (por tornar meus dias mais doces também), pelo suporte, cuidado, companheirismo e momentos compartilhados.

Agradeço por fim e em especial, a professora, orientadora e amiga Yara Peluso Cid pela dedicação, por acreditar em mim até quando eu não acredito, pelo seu amor a pesquisa e aos seus orientados, por ter me dado a oportunidade de ingressar na pesquisa em seu laboratório, que hoje é minha segunda casa da qual eu não quero sair e não me vejo fora, por todo apoio técnico e emocional ao longo da convivência, pelos conselhos, palavras de conforto, disponibilidade independente do horário e por ser uma referência de profissional e pessoa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio dos órgãos de fomento, Fundação de Apoio À Pesquisa Científica e Tecnológica Da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que auxiliaram no financiamento desta pesquisa.

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

Sem vocês esse trabalho não seria possível.

Meu muito obrigada a todos!

*“Só quem sabe agradecer experimenta a plenitude
da alegria.”*

Papa Francisco

RESUMO

JESUS, Ingrid Lins Raquel. **Desenvolvimento De Formulações Farmacêuticas Tópicas Contendo Eugenol e Carvacrol Para o Controle de Pulgas e Carrapatos em Animais de Companhia.** 2023. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

O aumento da proximidade entre humanos e animais levou ao aumento da preocupação em torno da saúde e bem-estar desses animais, como o controle da pulga *Ctenocephalides felis felis* e do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, que são parasitos de grande importância na área veterinária. Com isso, o trabalho teve como objetivo desenvolver formulações tópicas contendo bioativos para o combate de adultos de *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus*, realizar sua caracterização físico-química, estabilidade, quantificação e avaliar sua eficácia residual e efeito *knock down* através de bioensaios *in vitro*. Para isso, desenvolveu-se as formulações sob a forma de *spray* e *spot-on* contendo bioativos, antioxidante, umectante, tensoativo, promotor de penetração, agente tamponante, quelante, acidificante e veículo, que foram submetidas aos testes de características organolépticas, pH, centrifugação, ciclo de congelamento e aquecimento, quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de ultravioleta. As microemulsões foram desenvolvidas contendo mistura de tensoativos, co-solvente e bioativo, deixados sob agitação por um período de duas horas. Para a realização dos bioensaios *in vitro*, utilizou-se o método de impregnação de papel filtro e na avaliação do efeito *knock down*, as avaliações foram realizadas nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos, duas, quatro, seis, oito e 24 horas, analisando-se os mesmos indivíduos; já para a eficácia residual, as análises foram realizadas diariamente, até não se observar mais mortalidade, substituindo-se os indivíduos após cada avaliação. As formulações apresentaram-se estáveis pelo prazo de 60 dias, com as características necessárias para aplicação tópica em cães. As formulações em *spray* apresentaram atividade acaricida por três dias, sendo que a formulação contendo eugenol e associação deste com carvacrol atingiram 100% de mortalidade após 24 horas, chegando a 10% após ao 3º dia; e a formulação contendo carvacrol, iniciou com 77% de atividade, chegando aos 10% no mesmo período. Já quanto a atividade pulicida das formulações em *spray*, estas apresentaram atividade > 90% por 22 dias para eugenol e sua associação com carvacrol e por 16 dias para o carvacrol; ainda apresentando atividade após o 84º dia. As formulações sob a forma de *spot-on*, apresentaram atividade superior a 90% nos primeiros sete dias de análise, apresentando atividade inferior a 10% no 43º dia aquelas contendo eugenol e carvacrol isolados e de 17% e 20% para as formulações em *spot-on* com os bioativos em associação incorporados por meio de uma microemulsão e na ausência de um sistema emulsionado. A avaliação do efeito *knock down* frente a pulgas mostrou que as formulações em *spray* contendo carvacrol e eugenol atingem o máximo de atividade em quatro horas, enquanto aquela que apresenta associação dos bioativos leva aproximadamente duas horas, enquanto as formulações em *spot-on* apresentaram 100% de mortalidade entre 30 e 45 minutos após o início da exposição. Todas as formulações desenvolvidas apresentaram as características físico-químicas adequadas para aplicação tópica em animais de companhia e estabilidade por 60 dias, apresentando atividade pulicida e carrapaticida com resultados promissores para prosseguimento dos ensaios *in vivo*, após avaliação da segurança e irritação dérmica das mesmas.

Palavras-chave: Ectoparasiticidas. Pulgas. Carrapatos. Controle. Produtos naturais. Delineamento de formulações.

ABSTRACT

JESUS, Ingrid Lins Raquel. **Development of Topical Pharmaceutical Formulations Containing Eugenol and Carvacrol for the Control of Fleas and Ticks in Companion Animals.** 2023. 81p. Dissertation (Master's in Veterinary Sciences, Veterinary Parasitology). Veterinary Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The increased proximity between humans and animals has led to increased concern about the health and well-being of these animals, such as the control of the flea *Ctenocephalides felis felis* and the tick *Rhipicephalus sanguineus*, which are parasites of great importance in the veterinary area. With this, the objective of this work was to develop topical formulations containing bioactives to combat *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus sanguineus* adults, perform their physicochemical characterization, stability, quantification and evaluate their residual efficacy and knock down effect through *in vitro* bioassays. For this, formulations were developed in the form of spray and spot-on containing bioactives, antioxidant, humectant, surfactant, penetration promoter, buffering agent, chelating agent, acidifier and vehicle, which were submitted to tests of organoleptic characteristics, pH, centrifugation, freezing and heating cycle, quantification by high performance liquid chromatography coupled to the ultraviolet detector. The microemulsions were developed containing a mixture of surfactants, co-solvent and bioactive, left under agitation for a period of two hours. To carry out the *in vitro* bioassays, the filter paper impregnation method was used and in the evaluation of the knock down effect, the evaluations were carried out at times of 15, 30, 45 and 60 minutes, two, four, six, eight and 24 hours, analyzing the same individuals; for the residual efficacy, the analyzes were performed daily, until no more mortality was observed, replacing the individuals after each evaluation. The formulations were stable for a period of 60 days, with the necessary characteristics for topical application in dogs. The spray formulations showed acaricidal activity for three days, and the formulation containing eugenol and its association with carvacrol reached 100% mortality after 24 hours, reaching 10% after the 3rd day; and the formulation containing carvacrol, started with 77% of activity, reaching 10% in the same period. As for the pulicidal activity of spray formulations, they showed activity > 90% for 22 days for eugenol and its association with carvacrol and for 16 days for carvacrol; still showing activity after the 84th day. Formulations in the form of spot-on showed activity greater than 90% in the first seven days of analysis, with activity lower than 10% on the 43rd day for those containing eugenol and carvacrol alone and 17% and 20% for the spot formulations -on with bioactives in association incorporated through a microemulsion and in the absence of an emulsified system. The evaluation of the knock down effect against fleas showed that the spray formulations containing carvacrol and eugenol reach their maximum activity in four hours, while the one that presents an association of bioactives takes approximately two hours, while the spot-on formulations showed 100% of mortality between 30 and 45 minutes after the beginning of exposure. All the developed formulations presented the physicochemical characteristics suitable for topical application in pets and stability for 60 days, showing pulicidal and tickicidal activity with promising results for continuation of *in vivo* tests, after evaluating their safety and dermal irritation.

Keywords: Ectoparasiticides. Fleas. Ticks. Control. Natural products. Formulation design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais doenças que acometem cães.....	3
Figura 2: Adulto de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	4
Figura 3: Ciclo biológico da pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i>	5
Figura 4: Sinais clínicos por infestação de <i>Ctenocephalides felis felis</i>	6
Figura 5: Ninfa de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	7
Figura 6: Ciclo biológico do carapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	8
Figura 7: Sinais clínicos por infestação de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	8
Figura 8: Fenômeno de translocação dérmica de uma formulação sob a forma de <i>spot-on</i> contendo fipronil associado a um corante fluorescente e seu impacto ao animal e ao tutor....	12
Figura 9: Estrutura química do eugenol	15
Figura 10: Estrutura química do carvacrol	16
Figura 11: Vias de transporte das formulações tópicas	18
Figura 12: Modo de aplicação da formulação em <i>spray</i>	19
Figura 13: Modo de aplicação da formulação em <i>spot-on</i>	19
Figura 14: Diferença de tamanho entre as emulsões	20
Figura 15: Diagrama Pseudoternário de Fases	21
Figura 16: Medicamentos mais prescritos nos anos de 2018 e 2021 para cães.....	22
Figura 17: Cromatograma da injeção dos bioativos eugenol e carvacrol em 280 nm por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta	32
Figura 18: Cromatograma da injeção dos bioativos eugenol e carvacrol em 278 nm por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta	32
Figura 19: Cromatograma da injeção dos bioativos eugenol e carvacrol em associação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta	33
Figura 20: Cromatograma de injeção da formulação placebo em <i>spray</i> (2) em comparação a injeção da formulação em <i>spray</i> contendo os bioativos eugenol e carvacrol (1) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta em 278 nm.....	34
Figura 21: Cromatograma de injeção da formulação placebo em <i>spot-on</i> (2) em comparação a injeção da formulação em <i>spot-on</i> contendo os bioativos eugenol e carvacrol (1) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta em 278 nm.....	35
Figura 22: Ilustração das formulações sob a forma de <i>spray</i> contendo carvacrol (SC), eugenol (SE) e associação de ambos (SCE).....	47
Figura 23: Diagrama pseudoternário de fases do sistema emulsionado contendo eugenol (ME)	49

Figura 24: Diagrama pseudoternário de fases do sistema emulsionado contendo carvacrol (MC)	50
Figura 25: Diagrama pseudoternário de fases do sistema emulsionado contendo associação de eugenol e carvacrol (MCE)	50
Figura 26: Ilustração das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> contendo carvacrol (PC), eugenol (PE) e associação de ambos (PCE).....	52
Figura 27: Comparativo das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> contendo carvacrol (PC), eugenol (PE) e associação de ambos (PCE) com efeito do processo oxidativo após 60 dias de armazenamento em geladeira	53
Figura 28: Ilustração das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> a partir da incorporação de microemulsão contendo carvacrol (PMC), eugenol (PME) e associação de ambos (PMCE)..	54
Figura 29: Comparativo das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> a partir da incorporação de microemulsão contendo carvacrol (PC), eugenol (PE) e associação de ambos (PCE) com efeito do processo oxidativo após 60 dias de armazenamento em geladeira.....	55
Figura 30: Microscopia óptica convencional das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> a partir da incorporação das microemulsões contendo carvacrol (PMC), eugenol (PME) e associação de ambos (PMCE)	59
Figura 31: Microscopia óptica com contraste de fases das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> a partir da incorporação das microemulsões contendo carvacrol (PMC), eugenol (PME) e associação de ambos (PMCE)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores que podem alterar o pH fisiológico cutâneo dos animais	17
Tabela 2: Demonstrativo do parâmetro de tamanho para microemulsão e nanoemulsão	21
Tabela 3: Condições cromatográficas utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta	24
Tabela 4: Excipientes utilizados no delineamento das pré-formulações sob a forma de <i>spray</i> e suas funções.....	27
Tabela 5: Excipientes utilizados no delineamento das pré-formulações sob a forma de <i>spot-on</i> e suas funções	27
Tabela 6: Combinações utilizadas para determinação da região de microemulsão	29
Tabela 7: Comparação das metodologias analíticas para quantificação de eugenol e carvacrol	31
Tabela 8: Parâmetros cromatográficos dos bioativos eugenol e carvacrol em 278 nm e 280 nm por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta	33
Tabela 9: Parâmetros cromatográficos da associação dos bioativos eugenol e carvacrol por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta em 278 e 280 nm	33
Tabela 10: Valores de <i>p</i> -valor do efeito matriz por nível de concentração calculados a partir do teste de t-Student para os bioativos eugenol e carvacrol	36
Tabela 11: Precisão e exatidão na faixa linear do método (50 a 150 µg/mL) nas três análises para o eugenol.....	38
Tabela 12: Precisão e exatidão na faixa linear do método (50 a 150 µg/mL) nas três análises para o carvacrol	39
Tabela 13: Precisão e exatidão nos níveis baixo (50 µg/mL), médio (100 µg/mL) e alto (150 µg/mL) intra dia e inter dia para o eugenol	40
Tabela 14: Precisão e exatidão nos níveis baixo (50 µg/mL), médio (100 µg/mL) e alto (150 µg/mL) intra dia e inter dia para o carvacrol	40
Tabela 15: Sinal ruído dos bioativos eugenol e carvacrol em pequenas concentrações para determinação de limite de detecção e limite de quantificação	41
Tabela 16: Erro relativo percentual referente a estabilidade das soluções mãe de eugenol e carvacrol na faixa linear do método (50 a 150 µg/mL) nos tempos D ₀ , RD ₀ e D ₁	42
Tabela 17: Estimativa da concentração dos bioativos eugenol e carvacrol nas formulações sob a forma de <i>spray</i> e <i>spot-on</i> para combate de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	43
Tabela 18: Incompatibilidades dos excipientes utilizados no delineamento das pré-formulações A, B e C sob a forma de <i>spray</i>	43
Tabela 19: Excipientes compatíveis e suas respectivas concentrações para o desenvolvimento das pré-formulações sob a forma de <i>spray</i> (formulação base)	44

Tabela 20: Composição das pré-formulações sob a forma de <i>spray</i> , contendo eugenol a 1 % e 7,5% com diferentes concentrações de vanilina.....	44
Tabela 21: Incompatibilidades dos excipientes utilizados no delineamento das pré-formulações A, B, C e D sob a forma de <i>spot-on</i>	45
Tabela 22: Composição da formulação final sob a forma de <i>spray</i> contendo eugenol (SE), carvacrol (SC) e associação de ambos (SCE).....	46
Tabela 23: Resultados obtidos após realização dos testes de caracterização físico-química, estabilidades preliminar e acelerada e quantificação dos bioativos das formulações sob a forma de <i>spray</i> contendo carvacrol (SC), eugenol (SE) e associação de ambos (SCE)	47
Tabela 24: Combinação detalhada geral dos excipientes para determinação da região de microemulsão	48
Tabela 25: Porcentagens reais de cada componente nas nove combinações testadas, para construção do diagrama pseudoternário de fases para o eugenol (ME)	48
Tabela 26: Porcentagens reais de cada componente nas nove combinações testadas, para construção do diagrama pseudoternário de fases para o carvacrol (MC).....	49
Tabela 27: Porcentagens reais de cada componente nas nove combinações testadas, para construção do diagrama pseudoternário de fases para a associação dos bioativos eugenol e carvacrol (MCE)	49
Tabela 28: Composição da formulação final sob a forma de <i>spot-on</i> contendo eugenol (PE), carvacrol (PC) e associação de ambos (PCE)	51
Tabela 29: Resultados obtidos após realização dos testes de caracterização físico-química, estabilidades preliminar e acelerada e quantificação dos bioativos das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> contendo carvacrol (PC), eugenol (PE) e associação de ambos (PCE)	52
Tabela 30: Composição da formulação final sob a forma de <i>spot-on</i> a partir da incorporação do sistema emulsionado de eugenol (PME), de carvacrol (PMC) e associação de ambos (PMCE)	53
Tabela 31: Resultados obtidos após realização dos testes de caracterização físico-química, estabilidades preliminar e acelerada e quantificação dos bioativos das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> a partir do sistema emulsionado contendo carvacrol (PMC), eugenol (PME) e associação de ambos (PMCE)	54
Tabela 32: Tamanho de gotícula e índice de polidispersão da formulação sob a forma de <i>spot-on</i> a partir da incorporação do sistema emulsionado contendo eugenol (PME) após 2 horas de agitação	55
Tabela 33: Tamanho de gotícula e índice de polidispersão da formulação sob a forma de <i>spot-on</i> a partir da incorporação do sistema emulsionado contendo carvacrol (PMC) após 2 horas de agitação	56
Tabela 34: Tamanho de gotícula e índice de polidispersão da formulação sob a forma de <i>spot-on</i> a partir da incorporação do sistema emulsionado contendo associação dos bioativos eugenol e carvacrol (PMCE) após 2 horas de agitação	56

Tabela 35: Tamanho de gotícula e índice de polidispersão das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> a partir da incorporação do sistema emulsionado contendo eugenol (PME) após 15 horas de agitação	57
Tabela 36: Condutividade elétrica das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> contendo eugenol (PME), carvacrol (PMC) e associação de ambos (PMCE) após 2 horas de agitação.....	58
Tabela 37: Índice de refração das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> contendo eugenol (PME), carvacrol (PMC) e associação de ambos (PMCE) após 2 horas de agitação	58
Tabela 38: Eficácia residual das pré-formulações sob a forma de <i>spray</i> contendo 1% de eugenol e diferentes concentrações de vanilina frente a <i>Ctenocephalides felis felis</i>	65
Tabela 39: Equação da reta das formulações desenvolvidas sob a forma de <i>spray</i> e <i>spot-on</i> contendo carvacrol, eugenol e associação de ambos na composição, frente a <i>Ctenocephalides felis felis</i>	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva analítica do eugenol em solvente (metanol) e em matriz fortificada (placebo com adição da solução mãe).....	35
Gráfico 2: Curva analítica do carvacrol em solvente (metanol) e em matriz fortificada (placebo com adição da solução mãe).....	36
Gráfico 3: Curva analítica da associação dos bioativos eugenol e carvacrol em solvente (metanol) no 1º dia de análise na faixa linear do método (50 a 150 µg/mL)	37
Gráfico 4: Curva analítica da associação dos bioativos eugenol e carvacrol em solvente (metanol) no 2º dia de análise na faixa linear do método (50 a 150 µg/mL)	37
Gráfico 5: Curva analítica da associação dos bioativos eugenol e carvacrol em solvente (metanol) na reanálise do 2º dia na faixa linear do método (50 a 150 µg/mL)	38
Gráfico 6: Efeito <i>knock down</i> das formulações sob a forma de <i>spray</i> contendo eugenol (SE), carvacrol (SC), associação de ambos (SCE) e controle positivo (C+) frente a <i>Ctenocephalides felis felis</i>	61
Gráfico 7: Efeito <i>knock down</i> das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> contendo eugenol (PE), carvacrol (PC), associação de ambos (SCE) e controle positivo (C+) frente a <i>Ctenocephalides felis felis</i>	62
Gráfico 8: Efeito <i>knock down</i> das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> a partir da incorporação da microemulsão contendo eugenol (PME), carvacrol (PMC), associação de ambos (SCE) e controle positivo (C+) frente a <i>Ctenocephalides felis felis</i>	62
Gráfico 9: Eficácia residual das formulações sob a forma de <i>spray</i> contendo 1% de eugenol (SP1) e 7,5% de eugenol (SP5) frente a <i>Ctenocephalides felis felis</i>	65
Gráfico 10: Eficácia residual das formulações sob a forma de <i>spray</i> contendo 10% de eugenol (SE), 10% de carvacrol (SC) e 10% de cada bioativo em associação (SCE) frente a <i>Ctenocephalides felis felis</i>	66
Gráfico 11: Eficácia residual das formulações sob a forma de <i>spray</i> contendo 10% de eugenol (SE), 10% de carvacrol (SC) e 10% de cada bioativo em associação (SCE) frente a <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	67
Gráfico 12: Eficácia residual das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> contendo 10% de eugenol (PE), 10% de carvacrol (PC) e 10% de cada bioativo em associação (PCE) frente a <i>Ctenocephalides felis felis</i>	68
Gráfico 13: Eficácia residual das formulações sob a forma de <i>spot-on</i> a partir da incorporação de microemulsão contendo 10% de eugenol (PME), 10% de carvacrol (PMC) e 10% de cada bioativo em associação (PMCE) frente a <i>Ctenocephalides felis felis</i>	69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Ctenocephalides felis felis</i>	4
2.1.1. Características morfológicas.....	4
2.1.2. Ciclo biológico	5
2.1.3. Sinais clínicos	5
2.1.4. Transmissão de Agentes Patogênicos	6
2.2. <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	6
2.2.1. Características morfológicas	6
2.2.2. Ciclo biológico	7
2.2.3. Sinais Clínicos	8
2.2.4. Transmissão de Agentes Patogênicos	9
2.3. Medidas de controle de pulgas e carapatos	9
2.3.1. Controle por produtos convencionais no Brasil	10
2.3.1.1. Organofosfatos	10
2.3.1.2. Carbamatos	10
2.3.1.3. Formamidina.....	11
2.3.1.4. Piretrinas e Piretróides	11
2.3.1.5. Fenilpirazóis	11
2.3.1.6. Lactonas macrocíclicas.....	12
2.3.1.7. Oxadiazinas	12
2.3.1.8. Spinosinas	12
2.3.1.9. Reguladores do Crescimento	13
2.3.1.10. Neonicotinóides.....	13
2.3.1.11. Isoxazolinas	13
2.3.2. Mecanismos de resistência ao controle convencional	13
2.3.3. Controle por produtos naturais	14
2.3.4. Eugenol	15
2.3.5. Carvacrol	15

2.4. Formulações tópicas de uso veterinário	16
2.4.1. Sistemas emulsionados	19
2.5. Mercado pet	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de eugenol e carvacrol nas formulações sob a forma de spray e spot-on	24
3.1.1. Preparo da solução mãe de eugenol e carvacrol	24
3.1.2. Preparo da curva padrão	24
3.1.3. Validação da metodologia analítica	24
3.1.3.1. Seletividade	24
3.1.3.2. Estabilidade	25
3.1.3.3. Efeito matriz	25
3.1.3.4. Linearidade	25
3.1.3.5. Precisão	26
3.1.3.6. Exatidão	26
3.1.3.7. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	26
3.1.3.8. Análise Estatística.....	26
3.2. Desenvolvimento das formulações	27
3.3. Caracterização das formulações e testes de estabilidade	28
3.3.1. Características organolépticas	28
3.3.2. pH	28
3.3.3. Centrifugação	28
3.3.4. Ciclo de congelamento e aquecimento	28
3.3.5. Quantificação do teor dos bioativos nas formulações	28
3.4. Desenvolvimento do sistema emulsionado	28
3.5. Caracterização do sistema emulsionado	29
3.5.1. Índice de Refração	29
3.5.2. Condutividade Elétrica	29
3.5.3. Tamanho de gotícula e índice de polidispersão	29
3.5.4. Microscopia óptica	29
3.6. Eficácia <i>in vitro</i>	29

3.6.1. Frente a pulgas <i>Ctenocephalides felis felis</i>	30
3.6.2. Frente ao carapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de eugenol e carvacrol nas formulações sob a forma de spray e spot-on	31
4.1.1. Seletividade	34
4.1.2. Efeito matriz	35
4.1.3. Linearidade	37
4.1.4. Precisão e Exatidão	39
4.1.5. Limite de detecção e quantificação	40
4.1.6. Estabilidade	41
4.2. Determinação da concentração das formulações.....	42
4.3. Delineamento das pré-formulações	43
4.3.1. Desenvolvimento da formulação sob a forma de spray	46
4.3.2. Desenvolvimento de um sistema emulsionado	48
4.3.3. Desenvolvimento da formulação sob a forma de spot-on	51
4.3.4. Desenvolvimento das formulações sob a forma de spot-on a partir do sistema emulsionado	53
4.3.4.1. Análise de tamanho de gotícula e índice de polidispersão	55
4.3.4.2. Condutividade elétrica	57
4.3.4.3. Índice de refração	58
4.3.4.4. Microscopia óptica	59
4.4. Eficácia <i>in vitro</i>	60
4.4.1. <i>knock down</i>	60
4.4.2. Eficácia Residual das pré-formulações	64
4.4.3. Eficácia Residual das formulações sob a forma de spray	66
4.4.4. Eficácia Residual das formulações sob a forma de spot-on	68
5. CONCLUSÃO	73
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	73
7. REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

O aumento no número de animais compondo famílias tornou-se ainda mais expressivo durante a pandemia do COVID-19, e esse estreitamento de laços entre tutores e seus animais de companhia tem se tornado cada vez mais evidente. Desta forma, aumentou-se os esforços visando o bem-estar desses animais, além da preocupação em torno da sua saúde. Um dos motivos de grande preocupação são as infestações causadas por ectoparasitos, principalmente a pulga do gato *Ctenocephalides felis felis* e o carrapato marrom *Rhipicephalus sanguineus*.

A pulga *C. felis felis* parasita o hospedeiro no estágio adulto, estando as demais formas evolutivas no ambiente, mas em casos de ambientes altamente infestados e com grande número de animais, pode-se encontrar formas imaturas parasitando o animal. Já o carrapato *R. sanguineus*, embora fique no ambiente, parasita o hospedeiro a cada estágio evolutivo.

No momento em que o animal hospedeiro encontra-se parasitado, o mesmo apresenta diversos sintomas visíveis, como prurido intenso e hiperemia cutânea, mas como estes parasitos são hematófagos, os hospedeiros podem apresentar anemia, a depender do grau de infestação. Além disso, as pulgas e carrapatos podem ser vetores de muitos agentes patológicos como *Bartonella henselae*, *Rickettsia felis*, *Dipylidium caninum*, por meio das pulgas; e *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis* e *Anaplasma platys*, por meio dos carrapatos.

Por todo o incômodo gerado ao hospedeiro e pelas doenças que podem ser transmitidas por estes ectoparasitos, o seu controle é de extrema importância. O controle ideal é realizado de maneira preventiva, para evitar que os animais estejam sujeitos ao parasitismo, mas quando este não pode ser realizado e com a infestação em curso, o controle mais eficaz é o combinado, visando o tratamento do animal parasitado, de outros animais que convivam, e do ambiente, para garantir a eliminação tanto de adultos quanto das formas imaturas, reduzindo a possibilidade de reinfestações subsequentes. Esse controle pode ser feito de maneira mecânica, por meio da penteação ou da retirada manual de cada indivíduo, mas dependendo do grau da infestação este método pode não ser tão eficaz, momento no qual muitos tutores utilizam antiparasitários a base de produtos químicos sintéticos.

O controle químico é utilizado comumente e encontra-se disponível para compra em muitos estabelecimentos, como o fipronil muito difundido até a atualidade. Contudo, como a comercialização destes produtos é feita sem a necessidade de prescrição, muitos tutores acabam adquirindo e utilizando de maneira indiscriminada e incorreta, o que pode acabar diminuindo sua eficácia, por desenvolvimento de resistência por parte dos parasitos alvo ao tratamento, por meio da pressão da seleção natural que induz a criação de indivíduos menos suscetíveis aos tratamentos já empregados, como forma de garantir a sobrevivência das espécies. Outro fator que faz com que o controle químico demande mais atenção, além da exposição do animal diretamente ao produto que pode culminar com alguns efeitos adversos, é a possibilidade destes serem tóxicos para os tutores que estão em contato direto com o animal (exposição não-ocupacional), para os médicos veterinários (exposição ocupacional) e a contaminação ambiental do solo, rios e do ar.

Uma forma de controle adicional consiste no emprego de alternativas naturais como os óleos essenciais e seus isolados que já são empregados na área agrícola, por exemplo, para realizar o controle de insetos que possam comprometer a plantação e seu armazenamento. Além disso, vivemos em uma sociedade que cada vez mais busca por alternativas naturais, e este modelo de vida acaba sendo espelhado nos animais de companhia, como na alimentação natural no lugar das convencionais rações, por exemplo, o que torna esta alternativa ainda mais promissora.

Independentemente se a forma de controle será química ou natural, os antiparasitários de eleição voltados para o combate de ectoparasitos tendem a ser comercializados como produtos tópicos, como sabonetes, xampus, talcos, sprays, spot-on, coleiras, pela maior facilidade e

comodidade de aplicação, e também as formas farmacêuticas orais, que foram desenvolvidas mais recentemente. Deve-se ressaltar, que se o princípio ativo não possuir sua segurança totalmente estudada e definida, o mesmo não deve ser veiculado em uma formulação oral.

O processo de desenvolvimento de uma formulação é complexo e longo, devendo passar por etapas de pesquisa de bioativos promissores, definição da forma farmacêutica mais adequada e sua composição, avaliação da eficácia *in vitro*, segurança e da possibilidade de a mesma causar irritação dérmica, para então serem realizados os testes de avaliação da eficácia *in vivo*.

Dentre os constituintes majoritários de óleos essenciais com atividade antiparasitária, o eugenol e o carvacrol já tiveram sua atividade comprovada por outros autores, e partindo-se dos resultados obtidos por Oliveira *et al.* (2022) e Miranda (2022), definiu-se as concentrações requeridas para combater adultos de pulgas e carrapatos, visto que os adultos tendem a ser indivíduos mais resistentes ao tratamento do que as formas imaturas, garantindo-se assim um controle que impacta diretamente no ciclo biológico, seja na redução da postura de ovos e/ou pela postura de ovos inviáveis.

Optou-se por desenvolver uma formulação com atividade carrapaticida e pulicida, por atender melhor a demanda do mercado pet, a partir do momento que sua versatilidade o faz ser capaz de combater ambos os ectoparasitos. Por não se conhecer a segurança do eugenol e do carvacrol para uso oral, a escolha pelo desenvolvimento de formulações tópicas é a mais adequada, visto que a absorção do produto é menor.

Bioativos voláteis como o eugenol e o carvacrol, são fotossensíveis e consequentemente mais suscetíveis ao processo de oxidação, o que pode comprometer a estabilidade das formulações que os contenham. A partir disso, pode-se lançar mão do desenvolvimento de sistemas emulsionados, como microemulsões e nanoemulsões, como uma alternativa de proteção dos bioativos da exposição a luz e consequente oxidação, o que pode levar a uma liberação mais gradual e controlada do bioativo, podendo prolongar sua eficácia.

Sabendo-se de todos os percalços causados pelas infestações por pulgas e carrapatos e dos riscos associados ao uso de produtos químicos sintéticos, o presente estudo buscou:

- desenvolver formulações tópicas nas formas de *spray* e *spot-on* contendo eugenol, carvacrol e associação de ambos, realizando as etapas iniciais desse longo processo de desenvolvimento de uma formulação;
- desenvolver microemulsões a serem incorporadas nas formulações tópicas;
- realizar a caracterização físico-química das formulações desenvolvidas;
- realizar ensaios de estabilidade preliminar e acelerada;
- avaliar a eficácia *in vitro* das formulações, tanto pelo seu efeito *knock down* como eficácia residual, frente a *R. sanguineus* e *C. felis felis*; e
- desenvolver e validar um método analítico cromatográfico para quantificação dos bioativos nas formulações.

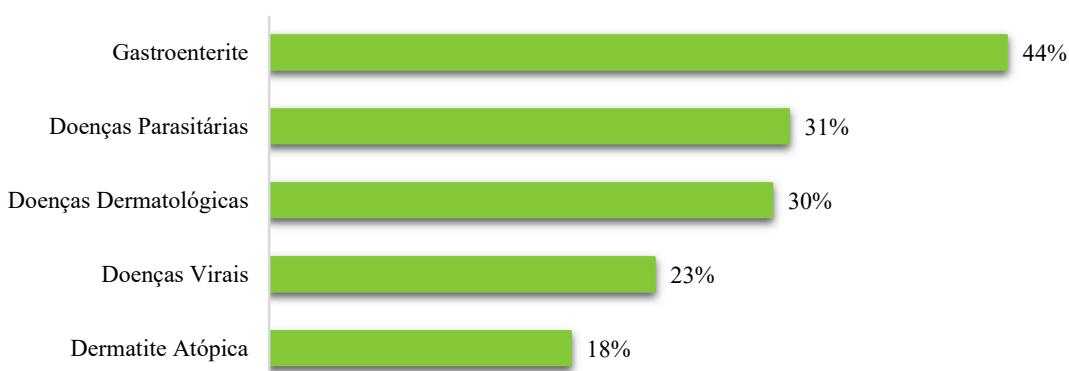
2. REVISÃO DE LITERATURA

Em um levantamento feito pela Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET) no ano de 2022 em relação a população de animais em 2021, o Brasil possui aproximadamente 149,6 milhões de animais, sendo 58,1 milhões de cachorros, um aumento de 3,9% em relação a 2020; e 27,1 milhões de gatos, correspondendo a um aumento de 5,9% (ABINPET, 2022). Segundo uma pesquisa realizada por Mura no ano de 2022, com 750 tutores, 50% destes adquiriram pelo menos um gato durante a pandemia e 31% adquiriram pelo menos um cão, destes, 23% não possuíam animais até o início da pandemia (MURA, 2022).

Com a privação de deslocamento e contato com outras pessoas, a presença de um animal no lar tornou um pouco menos doloroso esse período de isolamento social, e com isso, o vínculo entre tutor e animal de companhia foi muito fortalecido. Tanto que a maioria dos entrevistados considera o animal como um membro da família e até mesmo um amigo, um filho, diminuindo assim a visão que o animal é um mero animal de estimação, que está a nosso serviço, seja para proteção da casa ou para passar tempo (MURA, 2022).

Com esse laço cada vez mais estreito, aumenta-se as preocupações em torno da saúde e bem-estar desses animais, principalmente relacionado as patologias que podem os acometer, como mostrado (Figura 1).

Figura 1: Principais doenças que acometem cães



Fonte: Adaptado de MURA (2022).

Pode-se perceber que em cães, as doenças parasitárias ocupam o 2º lugar, seguido das doenças dermatológicas que podem ser observadas juntamente com o curso de doenças causadas por parasitos. Sendo assim, deve ter um cuidado redobrado para o controle de ectoparasitos, principalmente de pulgas e carapatos que representam maior incidência.

Existem mais de 2000 espécies e subespécies de pulgas, mas cães e gatos são hospedeiros principalmente das pulgas *C. felis felis*, *C. canis* e *Pulex* spp. Dentre estas, o gênero *Ctenocephalides* é o de maior importância médica veterinária, sendo a subespécie *C. felis felis* de maior preocupação, visto que possui uma prevalência superior a 92% em cães e 97% em gatos (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Já entre os carapatos, os mesmos são divididos em carapatos argasídeos (carapatos moles) e carapatos ixodídeos (carapatos duros). Os primeiros são considerados mais primitivos e assim, parasitam os animais com menor incidência e por um período menor, produzindo menos descendentes; enquanto os ixodídeos são mais especializados e parasitam com maior frequência, produzindo mais descendentes (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL,

2013). Por este maior grau de parasitismo e pela gama de doenças que transmite como vetor, *R. sanguineus* corresponde ao carapato de maior importância tanto veterinária quanto humana.

Pelos motivos acima listados, pode-se notar que a pulga *C. felis felis* e o carapato *R. sanguineus* são os ectoparasitos de maior importância a nível de saúde pública, requerendo maiores estudos voltados ao seu controle.

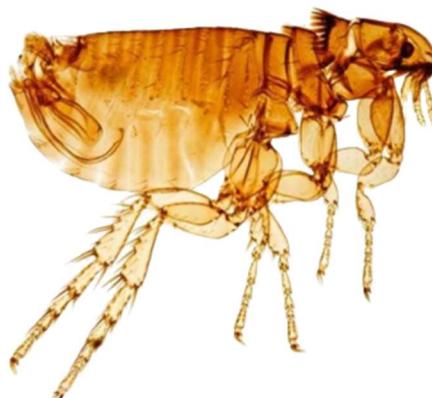
2.1. *Ctenocephalides felis felis*

2.1.1. Características morfológicas

A pulga *C. felis felis*, conhecida popularmente como pulga do gato, pertence a ordem Siphonaptera, sendo insetos muito comuns em cães e gatos, podendo parasitar também pequenos animais selvagens e até mesmo humanos (ESCCAP, 2022).

As pulgas são insetos hematófagos que parasitam hospedeiros de sangue quente, com peças bucais adaptadas para perfurar a pele do hospedeiro e assim, se alimentar. São insetos pequenos, medindo de 2-6 mm de comprimento, com coloração acastanhada e achatados lateralmente, sem asas e com patas traseiras desenvolvidas, o que garantem a elas a capacidade de realizar grandes saltos (ESCCAP, 2022). Por serem pequenas, são muitas vezes difíceis de serem localizadas no ambiente e sobre o hospedeiro, ainda mais se estes possuírem uma elevada densidade de pelos e se estes forem escuros. A pulga adulta de *C. felis felis* está representada na figura 2.

Figura 2: Adulto de *Ctenocephalides felis felis*



Fonte: PetMD Editorial (2016).

Uma pulga adulta pode viver por até 160 dias, geralmente vive no mesmo hospedeiro, e embora corresponda a apenas 5% da população total de pulgas (ovos, larvas, pupas e adultas), são o único estágio evolutivo encontrado no hospedeiro salvo em casos com alto grau de infestação. Os demais estágios são encontrados no ambiente e tendem a se abrigar em locais com baixa luminosidade (ESCCAP, 2022).

Após o primeiro repasto sanguíneo, elas não sobrevivem em jejum, necessitando de alimentação diária para sobrevivência, o que gera um grande incômodo ao animal parasitado, devido as inúmeras picadas que recebe diariamente, podendo chegar a aproximadamente 400 picadas por dia (ESCCAP, 2022).

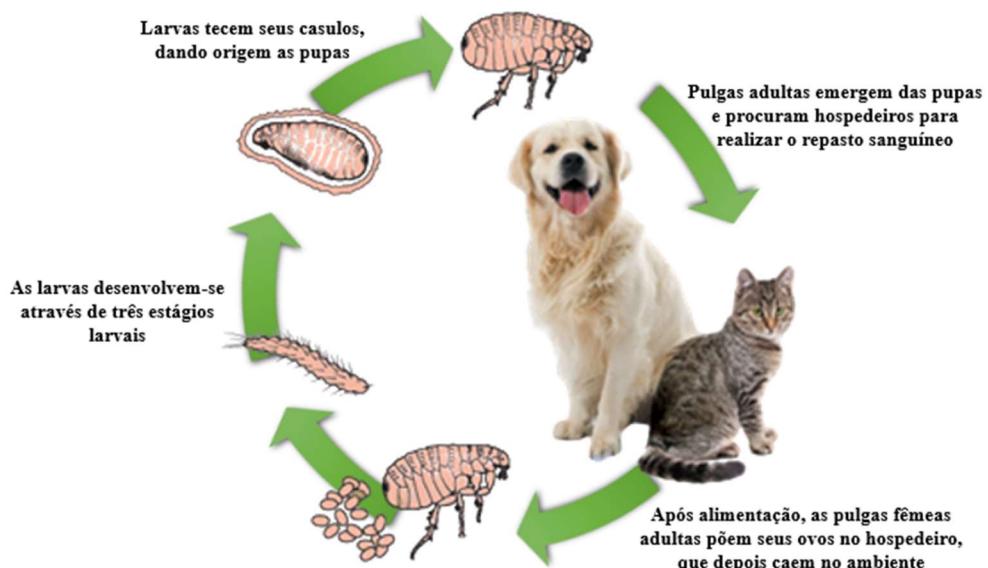
São animais adaptados tanto a ambiente internos quanto externos, podendo se reproduzir independente das estações do ano, contudo, há um aumento da reprodução nas estações mais quentes, entre a primavera e o outono (ESCCAP, 2022).

2.1.2. Ciclo biológico

O ciclo biológico da pulga do gato é composto por ovo, três estágios larvares, pupa e adultos. A sobrevivência das pulgas, assim como o tempo requerido para que os estágios imaturos cheguem até o estágio maduro, dependem diretamente das condições ambientais as quais estão expostas, seja por estímulos físicos, como vibração do solo, pegadas ou umidade e temperatura. Seu desenvolvimento completo pode durar 14 dias sob condições ideais, podendo-se prolongar por 140 dias (ESCCAP, 2022). Alguns estudos indicam que na ausência de cães e gatos, as mesmas podem realizar o repasto sanguíneo em humanos.

Seu ciclo biológico encontra-se ilustrado na figura a seguir (Figura 3).

Figura 3: Ciclo biológico da pulga *Ctenocephalides felis felis*



Fonte: Adaptado e traduzido de ESCCAP (2022).

2.1.3. Sinais clínicos

Os sinais clínicos apresentados pelos hospedeiros vão variar de acordo com o grau e duração da infestação, presença de doenças secundárias e a higiene desses animais (ESCCAP, 2022).

A frequência com que o animal fica exposto a infestações, sem passar por um tratamento adequado; a presença de infecções pré-existentes e doenças secundárias, aumentam as chances de o hospedeiro apresentar uma hipersensibilidade e assim, os sintomas manifestados (ESCCAP, 2022).

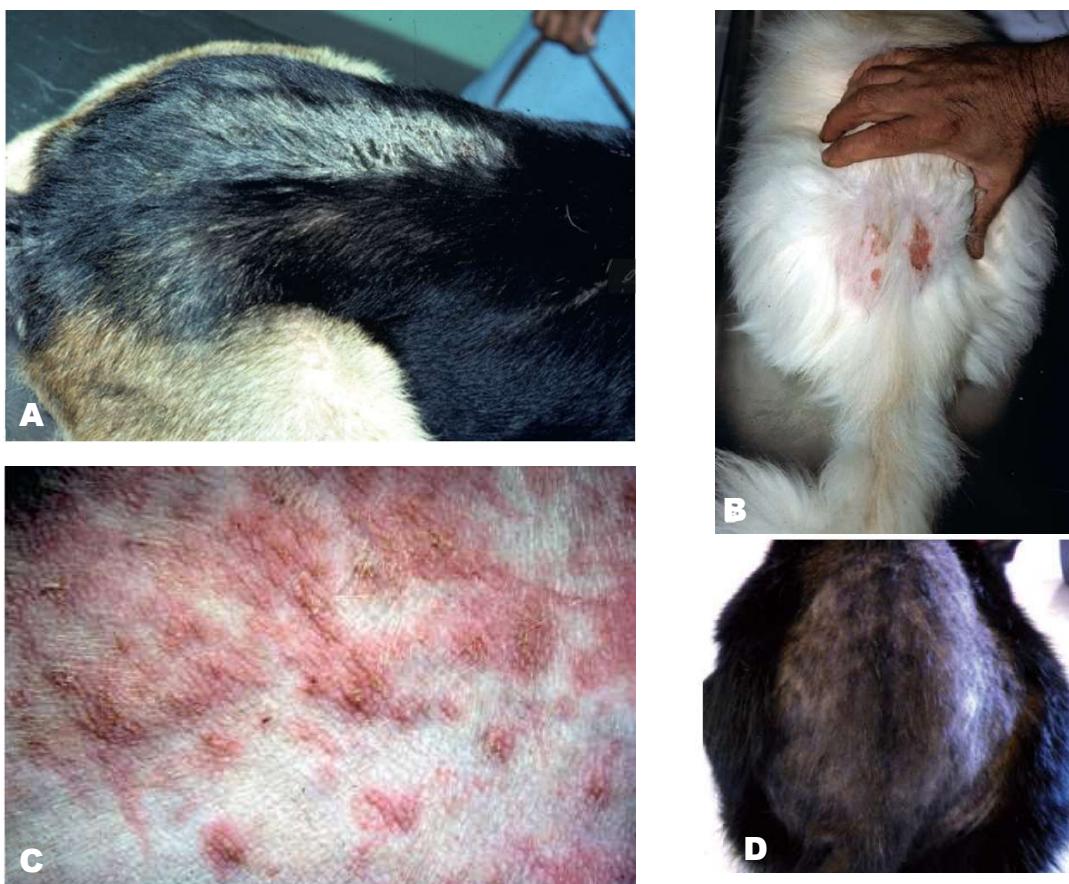
Vale lembrar que a infestação acontece de forma sintomática, mas nem sempre os sinais clínicos são perceptíveis ao tutor. Animais alérgicos, podem desenvolver uma reação imunológica à saliva das pulgas, que contêm substâncias irritantes e alergênicas, ocorrendo assim quadros de dermatite alérgica a picadas de pulgas (DAPP), prurido, irritação cutânea com regiões avermelhadas, alopecia, pápulas, máculas eritematosas com crostas, dermatite úmida, além da possibilidade de transmissão de patógenos (ESCCAP, 2022; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; FERNANDES, 2014).

Geralmente essas manifestações são observadas na região lombar dorsal e na cauda, podendo se estender até coxas e abdômen (ESCCAP, 2022), como mostrado na Figura 4.

Em casos de exposição crônica, observa-se espessamento da derme com acantose, hiperqueratose, já em casos com alta infestação, pode ocorrer anemia, precisando em alguns casos de transfusão sanguínea (ESCCAP, 2022).

A condição que mais acomete os animais de companhia é na área dermatológica, pelo desenvolvimento da dermatite alérgica, que também pode ser diagnosticada por testes intradérmicos (CARLOTTI; JACOBS, 2000).

Figura 4: Sinais clínicos por infestação de *Ctenocephalides felis felis*



A, B e D- Hipersensibilidade à picada de pulga em um cão e em um gato, na região lombo dorsal, respectivamente; C- pápulas eritematosas no abdômen de um cão com dermatite alérgica a picada de pulgas.

Fonte: MILLER, GRIFFIN, CAMPBELL (2013); ESCCAP (2022).

2.1.4. Transmissão de Agentes Patogênicos

As pulgas podem ocasionar o aparecimento de algumas doenças nos hospedeiros, especialmente em cães e gatos, como a dermatite alérgica e a deficiência de ferro, em casos mais graves (DRYDEN; RUST, 1994). Além disso, podem ser vetores competentes para vários patógenos, incluindo alguns com caráter zoonótico, como *Rickettsia typhi* (tifo murino), *R. felis*, *Bartonella henselae*, *B. vinsonii*, *Dipylidium caninum* e *Acanthocheilonema reconditum* (AVELAR; MELO; LINARDI, 2011; HALOS *et al.*, 2014; ESCCAP, 2022).

2.2. *Rhipicephalus sanguineus*

2.2.1. Características morfológicas

O carapato *R. sanguineus*, vulgarmente conhecido como carapato marrom, é um ectoparasito hematófago temporário de cães e gatos, pertencente a família Ixodidae e do gênero *Rhipicephalus*.

São carrapatos duros, que completam seu ciclo biológico no ambiente. São carrapatos resistentes ao frio, mas que são suscetíveis a forte incidência luminosa e chuvas excessivas (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Infestações por *R. sanguineus* são altamente sazonais, com aumento de casos no outono e na primavera (ESCCAP, 2022).

O carapato *R. sanguineus* pode ser encontrado por toda a extensão do animal, mas é encontrado com mais frequência em regiões não pilosas e de pele menos espessa como face, orelhas, axilas, regiões interdigitais, inguinais e perianais (ESCCAP, 2022). Por serem maiores, as fêmeas ingurgitadas são localizadas com mais facilidade do que fêmeas não ingurgitadas, machos e estágios imaturos. A ninfa de *R. sanguineus* encontra-se ilustrada na Figura 5.

Figura 5: Ninfa de *Rhipicephalus sanguineus*



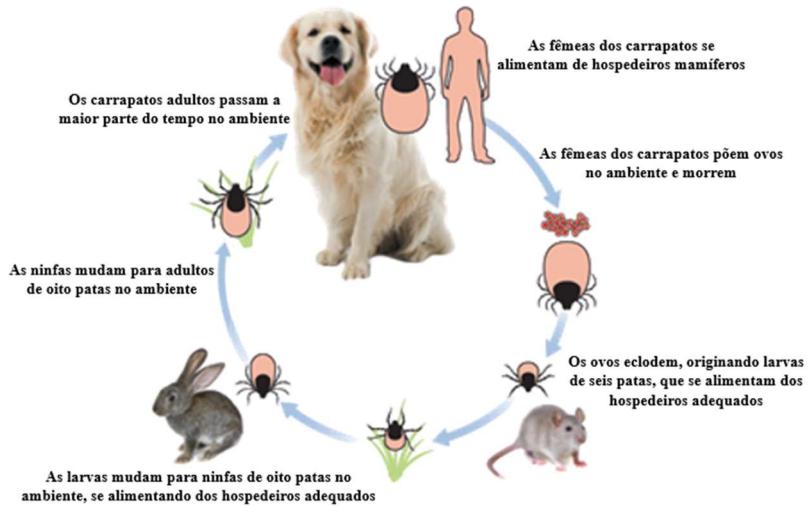
Fonte: Dantas-Torres, 2010.

2.2.2. Ciclo biológico

O ciclo biológico dos carrapatos é composto por ovo, larva, ninfa e adultos. A maioria dos carrapatos parasitam três hospedeiros durante seu desenvolvimento, de modo que cada estágio se alimenta de um novo indivíduo (ESCCAP, 2022). Contudo, *R. sanguineus* pode concluir seu desenvolvimento em apenas um hospedeiro, o parasitando em cada estágio do ciclo, ou seja, por três vezes (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Seu ciclo biológico encontra-se ilustrado na Figura 6.

Vale ressaltar que ao interromper o ciclo, o carapato pode sobreviver por longos períodos (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). O ciclo de vida pode ser concluído no período de um ano em condições essenciais, mas pode ocorrer em até três anos (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Figura 6: Ciclo biológico do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*



Fonte: Adaptado e traduzido de ESCCAP (2022)

2.2.3. Sinais Clínicos

Os sinais clínicos podem ser notados tanto no momento da infestação quanto posteriormente e sua principal importância é referente ao seu papel como vetor de doenças. Os sinais clínicos observados em animais parasitados por *R. sanguineus* estão ilustrados na Figura 7.

Figura 7: Sinais clínicos por infestação de *Rhipicephalus sanguineus*



A- dermatite em cão; B- infestação por carrapatos, causando pododermatite; C- infestação no canal auditivo de cão; D- nódulo eritematoso no local de inserção do carrapato.

Fonte: MILLER, GRIFFIN, CAMPBELL (2013); ESCCAP (2022); CEVAPET (2022)

De acordo com o grau de infestação do animal e do tempo em que o parasito está se alimentando, o hospedeiro pode apresentar um quadro grave de anemia, pela grande perda de sangue. Além disso, pode-se perceber regiões hiperêmicas, principalmente na região da face, orelhas, axilas, região interdigital, inguinal e perianal, assim como momentos de intenso prurido no hospedeiro, devido as inúmeras mordidas durante a alimentação do parasito e como tentativa de retirar o ectoparasito (ESCCAP, 2022).

No caso de carapatos, vale ressaltar que a remoção incorreta pode fazer com que suas peças bucais (gnatossoma) permaneçam no hospedeiro, o que pode gerar infecções e micro abcessos (ESCCAP, 2022).

2.2.4. Transmissão de Agentes Patogênicos

O carapato *R. sanguineus* pode ser vetor de muitas doenças e estas podem ser transmitidas por diferentes estágios, sendo sua saliva a principal via de transmissão dos patógenos (ESCCAP, 2022). Algumas doenças que possuem este carapato como vetor são:

- Babesiose por *Babesia vogeli* em cães;
- Cytauxzoonose por *Cytauxzoon manul* em felinos selvagens;
- Hepatozzonoses por *Hepatozoon canis* em cães, por meio da ingestão do carapato infectado.
- Filariose pela transmissão de *Acanthocheilonema dracunculoides*, *Acanthocheilonema reconditum* e *Cercopithifilaria* spp. em cães e gatos;
- Erliquiose por *Ehrlichia canis*;
- Anaplasmosse por *Anaplasma platys*;
- Infecções por riquétias por *Rickettsia conorii* em cães; e
- Tularemia pela transmissão de *Francisella tularensis* em gatos.

2.3. Medidas de controle de pulgas e carapatos

Grande parte do controle de ectoparasitos é direcionado ao animal infestado, visando diminuir/eliminar o parasito e assim os impactos que estes causam diretamente aos animais sintomáticos. Contudo, outros animais que compartilham o mesmo ambiente também devem ser submetidos ao tratamento, pois podem ser reservatórios assintomáticos desses ectoparasitos, podendo colaborar assim para reinfestações (ESCCAP, 2022; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Além disso, grande parte da população de pulgas e carapatos não estão no hospedeiro e sim no ambiente (HALOS *et al.*, 2014). Desta forma, tratar o ambiente também é de extrema importância, pois além de interromper o ciclo biológico no parasito, impede-se que o hospedeiro esteja exposto a uma nova reinfestação em um curto espaço de tempo, que pode ter seus sintomas agravados por não haver tempo hábil para sua completa recuperação (ESCCAP, 2022; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Além disso, vale ressaltar que em caso de viagens, é importante se informar se o local visitado é endêmico para determinados ectoparasitos, para que se possa fazer o tratamento e controle preventivos (DRYDEN, 2009).

O controle do animal infestado pode ser feito de três maneiras: por meio da remoção mecânica/física, ou utilizando produtos químicos ou de origem natural.

No controle mecânico, a remoção do parasito pode ser realizada pelo próprio animal, por meio das lambeduras ou ao se coçar, por exemplo. A remoção também pode ser realizada em banhos, na pentearação ou no caso dos carapatos, pela remoção pontual dos parasitos com

auxílio de pinças. Embora banho em gatos sejam menos frequentes, o fato deles realizarem *grooming* facilita a remoção desses ectoparasitos (ESCCAP, 2022).

Deve-se tomar cuidado para não pressionar o abdômen do parasito, pois em caso de rompimento, aumenta-se a exposição do animal parasitado a patógenos e do responsável pela remoção a infecções (ESCCAP, 2022). Após remoção, os parasitos devem ser descartados corretamente, impedindo que venham a infestar novos hospedeiros, incluindo humanos.

O controle químico de pulgas e carrapatos é realizado por meio do uso de princípios ativos acaricidas e/ou pulicidas, que podem estar veiculados em formulações orais, como os comprimidos e biscoitos medicamentosos; em formulações tópicas, como os *sprays*, *spot-on*, sabonetes e xampus e pelo uso de acessórios com o ativo “impregnado”, como no caso das coleiras (ESCCAP, 2022; HALOS *et al.*, 2014).

Os princípios ativos podem ser de origem sintética, muito difundidos a nível mundial como o fipronil, por exemplo, presente em diversos produtos; como também de origem natural, como os óleos essenciais e seus majoritários isolados, que vêm ganhando espaço pela enorme gama de propriedades e benefícios que apresentam, não só para humanos, como também para os pets.

Independentemente se sintéticos ou naturais, o sucesso do tratamento e do controle depende diretamente do tutor do animal, que deve constatar a infestação do animal, encaminhá-lo a um profissional responsável e aderir corretamente ao tratamento. Vale ressaltar que o controle ideal e eficaz dos ectoparasitos deve unir mais de uma forma de controle.

Para isso, o produto deve ser aplicado com a frequência necessária, independente da presença dos parasitos ou não; administrados corretamente (no caso de produtos tópicos ou orais) ou de tempo de ação do produto (no caso de xampus e sabonetes); respeitar a dose; não interromper o tratamento, tratando todos os animais, assim como o ambiente. Lembrando que muitas vezes, o tratamento combinado de produtos tópicos e orais pode ser o mais indicado (HALOS *et al.*, 2014).

2.3.1. Controle por produtos convencionais no Brasil

Os ativos sintéticos utilizados podem agir tanto no combate a adultos, como no combate as formas imaturas, impactando também no desenvolvimento dos indivíduos ou na regulação do seu crescimento. Além disso, eles devem possuir toxicidade seletiva, de modo a agir somente no ectoparasito e não no hospedeiro.

2.3.1.1. Organofosfatos

Os organofosfatos são inseticidas com um elevado grau de toxicidade, podendo-se observar um efeito cumulativo deste ativo e de outros semelhantes, em animais tratados frequentemente. São classificados em fosfatos (diclorvós), fosforotioatos (coumafós) e fosforoditioatos (malation e fention), apresentando atividade acaricida e inseticida (RIVIERE; PAPICH, 2018; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Pelos altos riscos que estes ativos podem causar nos animais tratados, tutores e ao meio ambiente, e pela existência de produtos mais seguros, os organofosfatos estão caindo em desuso (RIVIERE; PAPICH, 2018).

2.3.1.2. Carbamatos

São considerados mais seguros que os organofosfatos, mas ainda assim precisam de muita cautela ao serem utilizados. O representante mais comum é o carbaril, que pode estar presente em xampus e talcos, mas como necessita de aplicações frequentes, relatos de resistência são cada vez mais comuns. Já o Propoxur, outro representante dos carbamatos, além de ser mais potente do que o primeiro, pode ser veiculado em colares, sendo utilizado tanto para

combate de pulgas quanto para carrapatos (RIVIERE; PAPICH, 2018; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

2.3.1.3. Formamidina

O amitraz consiste no único exemplar das formamidinas com uso autorizado na área veterinária, sendo utilizado para o controle apenas de carrapatos em cães, estando presente em xampus, coleiras e *spot-on* ou em soluções para controle do ambiente (RIVIERE; PAPICH, 2018; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Além da sua ação frente a carrapatos, apresenta também ação repelente. Segundo Zardo e Pereira (2019), quando o amitraz está veiculado em soluções destinadas para banhos, o mesmo não apresenta eficácia residual, sendo utilizado como tratamento auxiliar (ZARDO; PEREIRA, 2019).

2.3.1.4. Piretrinas e Piretróides

As piretrinas são derivadas das plantas *Crysanthemum*, obtidas a partir da extração de seus óleos essenciais, sendo o primeiro produto natural utilizado no controle de artrópodes. Contudo, com a descoberta de novos ectoparasiticidas, está sendo cada vez mais substituída por piretróides sintéticos, que possuem uma maior resistência a degradação resultando em uma eficácia residual mais prolongada (RIVIERE; PAPICH, 2018). Segundo o descrito por Miller, Griffin e Campbell (2013), as piretrinas possuem ação contra pulgas, apresentando um efeito *knock down* rápido, com uma pequena eficácia residual, sendo rapidamente inativada pela luz ultravioleta, estando presentes em formulações sob a forma de *spray*.

Os piretróides são representados pelas permetrinas, cipermetrinas, deltametrinas, fenotrina, aletrina e fenvalerato (RIVIERE; PAPICH, 2018; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

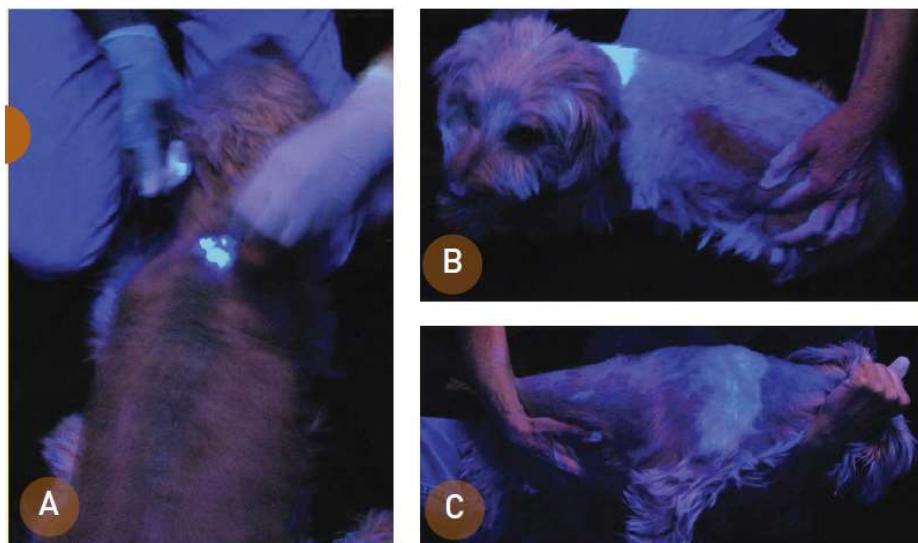
2.3.1.5. Fenilpirazóis

Tem como representante o fipronil, que possui atividade tanto acaricida quanto inseticida (RIVIERE; PAPICH, 2018). Nas pulgas, age por meio do contato direto destas com o ativo ou pela sua ingestão, agindo tanto sobre os indivíduos adultos quanto em ovos e larvas (RUST, 2010; RIVIERE; PAPICH, 2018; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Quanto aos carrapatos, possui atividade contra todos os estágios evolutivos (RIVIERE; PAPICH, 2018).

O fipronil foi um dos ativos mais comercializados em território nacional nos últimos anos, normalmente utilizado pela via tópica sendo aplicado na região dorsal dos animais, resultando na sua translocação superficial por toda extensão do animal, com uma maior deposição nas glândulas sebáceas, folículos pilosos, sebo e no pelo (Figura 8) (RUST, 2010; RIVIERE; PAPICH, 2018). Esse depósito faz com que o ativo seja secretado gradualmente, aumentando sua eficácia, visto que os parasitos precisam entrar em contato direto com o ativo para serem combatidos.

As formas farmacêuticas mais utilizadas para sua veiculação são o *spray* e *spot-on* (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; RIVIERE; PAPICH, 2018), mas em um estudo recente realizado por dos SANTOS *et al.* (2020), comprovou-se que o mesmo pode ser veiculado na forma de comprimidos, sendo uma alternativa segura para os animais e menos tóxica para seus tutores e para o meio ambiente.

Figura 8: Fenômeno de translocação dérmica de uma formulação sob a forma de *spot-on* contendo fipronil associado a um corante fluorescente e seu impacto ao animal e ao tutor



A- Aplicação da formulação *spot-on*, B e C- 5 e 24 horas após a aplicação da formulação, respectivamente.

Fonte: Rust (2010)

2.3.1.6. Lactonas macrocíclicas

As lactonas macrocíclicas são produtos da fermentação de bactérias, sendo divididas em dois grandes grupos: as avermectinas, produtos da fermentação de *Streptomyces avermitilis* e as milbemicinas (RIVIERE; PAPICH, 2018; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). As milbemicinas se dividem em milbemicina oxima, produto da fermentação de *Streptomyces hygroscopicus* e moxidectina, produto da fermentação de *Streptomyces cyaneogriseus* subespécie *noncyanogenus* (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Segundo o descrito por Riviere e Papich (2018), as milbemicinas não possuem atividade frente a pulgas e carrapatos, mas Miller, Griffin e Campbell (2013) descrevem que a moxidectina pode ser utilizada em cães visando o combate de pulgas, sob a forma de *spot-on*, quando utilizada em associação com neonicotnoides e fenilpirazóis.

2.3.1.7. Oxadiazinas

As oxadiazinas possuem o indoxacarbe como representante, possuindo atividade somente contra pulgas, sejam elas adultas, larvas ou ovos, sendo formuladas sob a forma de produtos tópicos, visto que sua eficácia depende do contato do parasito com o ativo (RIVIERE; PAPICH, 2018). Segundo Riviere e Papich (2018) o indoxacarbe não possui atividade contra carrapatos.

2.3.1.8. Spinosinas

O espinosade, consiste em um produto natural obtido pela fermentação do actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). É um ectoparasiticida de ação por contato e sistêmico, atuando nas pulgas por meio da ingestão do ativo administrado por via oral, interrompendo sua alimentação e a postura de ovos; além de ser veiculado sob a forma de *spray* e *pour-on* (RUST, 2010; RIVIERE; PAPICH, 2018).

2.3.1.9. Reguladores do Crescimento

Os reguladores do crescimento de insetos (IGR's) podem ser subdivididos em análogos ao hormônio juvenil e inibidores do desenvolvimento do inseto. Como possuem baixa atividade frente a adultos, normalmente é associado com adulticida, provendo assim um controle mais eficaz contra pulgas e carrapatos (BLAGBURN e DRYDEN, 2009; DANTAS-TORRES, 2010; RUST, 2005)

Dentre os análogos ao hormônio juvenil, destacam-se o metopreno e o piriproxifen. O metopreno quando associado ao fipronil, está presente em formulações adulticidas visando o controle de pulgas, geralmente sob a forma de *spot-on*. Já o piriproxifen é mais utilizado contra ovos e larvas da pulga, mas pode promover a morte precoce de pulgas adultas, sendo veiculado também sob a forma de *spot-on* (RIVIERE; PAPICH, 2018).

Quanto aos inibidores da síntese de quitina, temos o diflubenzuron, lufenuron e fluazuron. O lufenuron é utilizado normalmente para o controle de pulgas, enquanto o fluazuron e diflubenzuron demonstram atividade frente a carrapatos (DE OLIVEIRA, 2012; 2013; ANDREOTTI *et al.*, 2015).

2.3.1.10. Neonicotinóides

Neonicotinóides consistem em ectoparasiticidas com atividade mais pronunciada frente a pulgas (RIVIERE; PAPICH, 2018; RUST, 2010). Dentre seus representantes temos a imidacloprida, nitempiran e dinotenfurana (RIVIERE; PAPICH, 2018; RUST, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013)

2.3.1.11. Isoxazolinas

As isoxazolinas correspondem a antiparasitários com atividade acaricida e pulicida, cuja ação ocorre por meio da ingestão do ativo pelo ectoparasito, visto que são veiculadas sob a forma de comprimidos (RIVIERE; PAPICH, 2018; RUST, 2010).

2.3.2. Mecanismos de resistência ao controle convencional

De maneira geral, os ativos que atuam pela via tópica, se distribuem pela pele do animal, estocando-se em suas glândulas sebáceas, deste modo, ocorre a liberação gradual do ativo pelos folículos pilosos. Alguns estudos referentes aos ativos fipronil e a imidacloprida, sugerem que a exposição repetida dos tutores ao produto no momento da administração, ou pelo contato com o pelo dos animais tratados, representam um grave risco à saúde a longo prazo (Figura 8) (RIVIERE; PAPICH, 2018; RUST, 2010).

Além disso, o uso recorrente e muitas vezes incorreto dos ectoparasiticidas como os piretróides e organofosfatos levou ao desenvolvimento de mecanismos de resistência dos parasitos a muitos ativos, como o ocorrido em 1952, em que se relatou a primeira resistência contra DDT (dicloro-difenil-ticloroetano), mas também possui relatos de resistência contra piretrinas, organoclorados, carbamatos e fipronil (COLES; DRYDEN, 2014; RUST, 2016).

Muitos desses mecanismos agem na diminuição da penetração dos ativos, aumento na atividade da enzima responsável pela desintoxicação e diminuição da sensibilidade do receptor alvo (RIVIERE; PAPICH, 2018). Este processo pode ocorrer através da pressão da seleção natural, que induz modificações fenotípicas como forma de aumentar a capacidade de sobrevivência dos indivíduos, de modo que os descendentes possuam maior resistência, tornando o tratamento ineficaz (COLES; DRYDEN, 2014).

Além da resistência gerada, o uso generalizado destes compostos químicos também reflete na preocupação com a saúde pública, visto que podem causar problemas residuais, falta de toxicidade seletiva e poluição ambiental, pela facilidade com que podem ser carreados para o ar e para as águas (GUPTA *et al.*, 2019; KABERA *et al.*, 2011). Assim, pode ocorrer a

contaminação e envenenamento de animais e humanos por resíduos dos inseticidas inalação de aerossóis, poeira e vapor com inseticidas, exposição oral ao consumir alimentos e água contaminados, e pela exposição cutânea pelo contato direto com a pele (KABERA *et al.*, 2011).

Algumas estratégias podem ser adotadas como uma maneira de prevenir e retardar o processo de resistência, como utilizar o ectoparasiticida mais adequado e fazer rotatividade no uso dos produtos e até mesmo uso combinado destes, por exemplo (RIVIERE; PAPICH, 2018). Contudo, devido as desvantagens atreladas ao uso desses inseticidas e acaricidas sintéticos, tornou-se crescente a busca por produtos ecologicamente sustentáveis.

2.3.3. Controle por produtos naturais

Diante da redução da eficácia de alguns ativos sintéticos e pelos relatos de resistência dos parasitos ao tratamento convencional, os produtos naturais vêm ganhando destaque como medidas de controle. Embora alguns ativos sintéticos sejam baseados em compostos botânicos, alguns ativos utilizados são obtidos naturalmente, como os óleos essenciais e extratos de plantas.

O óleo de Nim por exemplo, obtido a partir da árvore *Azadirachta indica* Juss, nativa da Índia, Austrália, África e América Central e do Sul, teve suas propriedades pesticidas descobertas a aproximadamente 4 000 anos, incluindo atividade antiparasitária contra pulgas e no controle de artrópodes, com atividade ovicida, larvicida, atuando na diminuição da fecundidade, na regulação do crescimento de insetos e como repelente (HALOS *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2019; SAID-AL AHL; HIKAL; TKACHENKO, 2017).

Dentre os produtos naturais disponíveis, os óleos essenciais (OE's) são compostos bioativos com toxicidade seletiva, sendo assim tóxicos aos insetos, além de possuir rápida degradação e baixo impacto ambiental, sendo uma alternativa com atividade biológica (COSIMI; ROSSI; CANALE, 2009).

Os óleos essenciais são os metabólitos secundários produzidos pelas plantas como mecanismo de defesa contra insetos, apresentando assim atividade tanto inseticida quanto repelente (PROCHNOW, 2018). São substâncias complexas possuindo diversos constituintes em sua composição, como monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides; com elevada volatilidade, biodegradáveis com fragrância variável, que podem ser obtidos a partir das mais variadas partes da planta (CAVALCANTI *et al.*, 2015; BRITO *et al.*, 2013; ELLSE; WALL, 2014; SAID-AL AHL; HIKAL; TKACHENKO, 2017).

Os óleos essenciais já são amplamente utilizados na área agrícola como repelentes de insetos voadores, atuando na redução da perda de grãos armazenados, com atividade comprovada contra mosquitos, carapatos, piolhos e besouros (SKUHROVEC *et al.*, 2018; BALDIN *et al.*, 2014; ZANARDI *et al.*, 2015; EL-ABBASSI *et al.*, 2017; MARIANO *et al.*, 2017).

O d-limoneno e o linalol são bioativos obtidos a partir da hidrodestilação da casca de laranja por exemplo, consistindo assim em óleos voláteis que possuem propriedade pulicida. Contudo, segundo o relatado por Riviere e Papich (2018), houve relatos de intoxicação esporádica em gatos, além de relatos de reações adversas em cães e gatos (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

A bioprospecção *in vitro* realizada pelo Laboratório de Quimioterapia Experimental e Parasitologia Veterinária (LQEPM- UFRRJ) é pioneira quanto ao uso de óleos essenciais como pulicida comprovando potencial ectoparasiticida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. (BATISTA *et al.*, 2016), *Ocimum gratissimum* (FERREIRA *et al.*, 2019, dos SANTOS *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2022), *Cinnamomum* spp., *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* (CONCEIÇÃO *et al.*, 2020), *Syzygium aromaticum* (LAMBERT *et al.*, 2020, LAMBERT *et al.*, 2021), *Illicium verum* e *Pelargonium graveolens* (FREITAS *et al.*, 2021), *Pogostemon cablin* (TEMPERINI *et al.*, 2022) e *Cannabis sativa* (SOARES *et al.*, 2023).

Além disso, geralmente a atividade de um OE é associada ao seu constituinte majoritário, sendo assim alguns estudos *in vitro* foram realizados avaliando a atividade dos constituintes majoritários de óleos essenciais com atividade pulicida e carrapaticida comprovada, como os isolados eugenol (LAMBERT *et al.*, 2020, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2022) e carvacrol (MIRANDA, 2022).

2.3.4. Eugenol

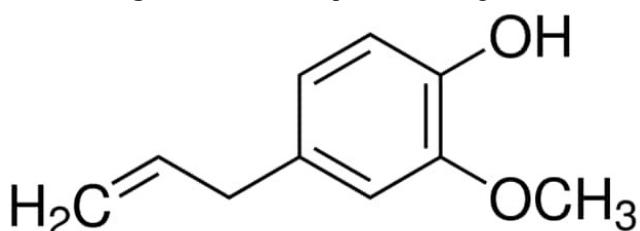
O eugenol é um composto aromático pertencente a classe dos fenilpropanóides que corresponde ao constituinte majoritário do óleo de cravo, *Syzygium aromaticum*, mas pode ser encontrado em menores concentrações nas plantas *Myristica fragrans* Houtt., *Cinnamomum verum* J. Presl, *C. loureirii* Nees, *Ocimum gratissimum* Forssk. e *O. basilicum* L. (KAUFMAN, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2022; ULANOWSKA e OLAS, 2021; NISAR, *et al.*, 2021).

Consiste em um líquido levemente amarelado e oleoso, com baixa solubilidade em água, baixa estabilidade química, sendo muito sensível a oxidação (ULANOWSKA e OLAS, 2021). É muito utilizado na indústria alimentícia, agrícola, cosmética e farmacêutica por apresentar atividade antioxidantes, analgésicas, antimutagênicas, antiplaquetários, antialérgicas e anti-inflamatórias (ULANOWSKA e OLAS, 2021; KAUFMAN, 2015; FERNANDES, *et al.*, 2020).

O eugenol também apresenta propriedades antimicrobianas contra diversos patógenos da medicina humana, incluindo um amplo grupo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vários parasitos, como a *Giardia intestinalis*, *Fasciola gigantica* e *Haemonchus contortus* (ULANOWSKA e OLAS, 2021).

Na área veterinária, o eugenol possui propriedades antiparasitárias, possuindo atividade acaricida contra *Rhipicephalus sanguineus*, *R. microplus* e *Ixodes ricinus* (FERREIRA, *et al.*, 2019; MIRANDA, 2022; ARAÚJO *et al.*, 2016) e inseticida, incluindo pulicida contra a pulga do gato *C. felis felis* (ULANOWSKA; OLAS, 2021; FERNANDES, *et al.*, 2020; LAMBERT, *et al.*, 2020; OLIVEIRA, *et al.*, 2022). Sua estrutura química encontra-se representada na Figura 9.

Figura 9: Estrutura química do eugenol



Fonte: Sigma-Aldrich (2022)

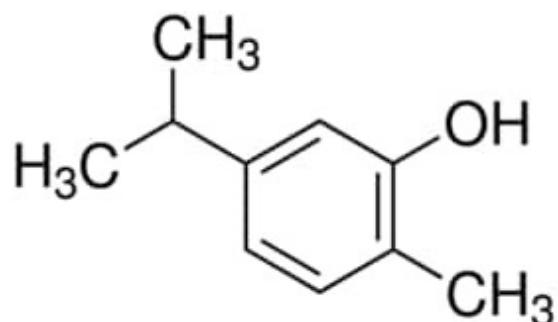
2.3.5. Carvacrol

O carvacrol é um composto aromático pertencente a classe dos monoterpenos, sendo encontrado como constituinte majoritário nos óleos de orégano, *Origanum vulgare*, mas pode ser encontrado também no tomilho (*Thymus vulgaris*), manjerona (*O. majorana*) e pimenta-do-reino (*Lepidium sp.*) (NATAL *et al.*, 2021; RATHOD *et al.*, 2021).

O carvacrol é muito utilizado na indústria farmacêutica, devido a suas propriedades antimicrobianas, antibacterianas, antioxidantes, antivirais, anti-hipertensivas, imunomodeladoras e antitumorais (KACHUR e SUNTRES, 2019; RATHOD *et al.*, 2021). Sua estrutura química encontra-se representada na Figura 10.

Na indústria alimentícia, devido a sua propriedade antibacteriana, é utilizado na proteção dos alimentos armazenados contra bactérias, fungos e insetos; inclusive no desenvolvimento de embalagens antimicrobianas (DHUMAL *et al.*, 2019; SHEMESH *et al.*, 2015; KORDALI *et al.*, 2008).

Figura 10: Estrutura química do carvacrol



Fonte: Sigma-Aldrich (2022)

Já na área veterinária, o carvacrol possui atividade carrapaticida descrita frente a *R. microplus*, *R. sanguineus* e *Amblyomma sculptum* e *A. cajennense* (NATAL *et al.*, 2021; CONCEIÇÃO *et al.*, 2020; NOVATO *et al.*, 2018; 2019; 2022; ARAÚJO *et al.*, 2016; MIRANDA, 2022; LIMA-DE SOUZA, *et al.*, 2019; 2021; SENRA *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2022; JÚNIOR *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2017; TAVARES *et al.*, 2022). Sua estrutura química encontra-se representada na Figura 10.

Tendo em vista a atividade pulicida e acaricida do eugenol e carvacrol isolados, passou-se a avaliar a atividade de ambos também em associação, verificando a possibilidade de um efeito aditivo ou sinérgico na atividade frente a *R. microplus* e *R. sanguineus* (ARAÚJO *et al.*, 2016; NOVATO *et al.*, 2016; 2019) e *A. sculptum* (VALE *et al.*, 2021).

No estudo feito por Miranda (2022), constatou-se que adultos do carapato *Rhipicephalus sanguineus* requerem concentrações maiores dos bioativos carvacrol e eugenol para alcançar a atividade máxima (100% de mortalidade) do que os estágios imaturos, e que no tocante ao eugenol, estas concentrações são mais elevadas do que as requeridas para o combate da pulga *C. felis felis* (OLIVEIRA *et al.*, 2022).

2.4. Formulações tópicas de uso veterinário

Pode-se notar, que grande parte das formulações antiparasitárias consistem em formulações tópicas, sejam elas *spray*, xampus, talcos, sabonetes, *spot-on*, sendo as formulações orais empregadas mais recentemente, na forma de comprimidos mastigáveis, biscoitos medicamentosos, entre outros. Uma vantagem das formulações tópicas é a sua fácil aplicação na pele dos animais, além de não apresentarem degradação gastrointestinal nem sofrerem o metabolismo de primeira passagem no fígado, o que acontece nas formulações orais (RIVIERE; PAPICH, 2018).

No caso das formas farmacêuticas tópicas, deve-se considerar muitos pontos para definir uma formulação como as particularidades da pele dos animais, as espécies alvo, as raças e as idades, por exemplo. Dependendo dos excipientes utilizados nessas formulações, além das propriedades tópicas, as mesmas podem ter a capacidade de penetrar na pele ou então de realizar uma translocação dérmica (RIVIERE; PAPICH, 2018).

A pele consiste no maior órgão do corpo, possuindo diversas funções essenciais, como por exemplo de proteção, consistindo em uma barreira anatômica, física e microbiológica, devido ao seu pH ácido (JÚNIOR; LIMA; MIRANDA, 2014; MAKINO; NEVES; SOUSA,

2014; BOTONI, 2022). A pele é dividida em epiderme, derme e hipoderme, e embora possua alguma semelhança com a pele humana, a pele dos animais possui algumas particularidades que devem ser consideradas no momento de se desenvolver formulações veterinárias de uso tópico, como espessura da pele, densidade dos pelos na área de aplicação, pH cutâneo (BOTONI, 2022).

Segundo Júnior *et al.* (2014) e Makino *et al.* (2014), a composição da microbiota cutânea depende de fatores como a neutralidade, comensalismo, mutualismo, antagonismo dos microrganismos presentes, e fatores abióticos físicos e químicos JÚNIOR; LIMA; MAKINO; NEVES; SOUSA, 2014).

O pH ácido da pele dos animais além de favorecer a manutenção da microbiota da pele, previne que quaisquer microrganismos infecciosos penetrem na pele. Contudo, alguns microrganismos possuem a capacidade de alterar o pH para favorecer sua entrada no organismo, influenciando na permeabilidade cutânea e na queratinização (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

O valor do pH dos animais pode variar pelo estado de saúde do mesmo, animais sadios apresentam um pH cutâneo médio é de 6,16 podendo variar entre 5,86 e 6,45 segundo Júnior *et al.* (2014) e Makino *et al.* (2014), ou entre 5,5 e 7,5 segundo Botoni (2022). No entanto, alguns fatores como uma doença em curso, por exemplo, podem alterar o pH fisiológico. Em cães com dermatite alérgica, o pH médio pode chegar a 6,65 (pH 5,17-8,74); em cães com sarna, o mesmo é de 6,45 (pH 4,95-8,30); e em cães com micose é de 6,23 (pH 4,82-7,04) (JÚNIOR; LIMA; MAKINO; NEVES; SOUSA, 2014; BOTONI, 2022). Alguns fatores que podem levar a alteração do pH fisiológico da pele dos animais encontram-se listados na tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1: Fatores que podem alterar o pH fisiológico cutâneo dos animais

Ácidos	Ácido lático, ácido urocânico, ácido graxo, aminoácidos livres, colesterol.
Básicos	Bicarbonato, lactato.
Exógenos	Produtos irritantes, tópicos e sem indicação para determinado animal.
Fisiológicos	Raça, idade, área corpórea, gênero, secreção sebácea, hidratação, dieta, exercício.
Patológicos	Dermatite atópica, dermatite irritante, bactérias, leveduras, diabetes mellitus, uremia, doença hepática.

Fonte: Adaptado de Miller, Griffin, Campbell (2013).

Sabendo-se da importância do pH da pele como uma barreira para entrada de patógenos no organismo desses animais, sua manutenção é de extrema importância, pois uma simples desordem no mesmo pode favorecer o desequilíbrio da microbiota e o funcionamento de enzimas e da hidratação, fazendo que o animal fique mais propenso a uma infecção (BOTONI, 2022).

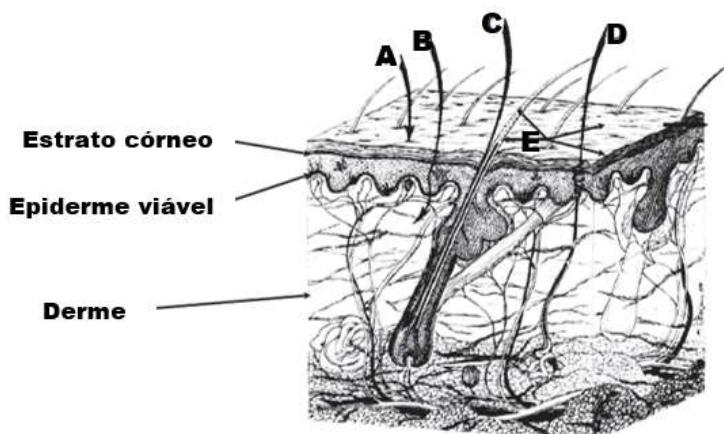
Além disso, a proporção de pele e pelos da região de aplicação do produto também deve ser considerada no momento de desenvolver uma formulação, visto que pode variar de acordo com a idade do animal, com a espécie, gênero, raça e até mesmo dentro da mesma raça (BOTONI, 2022). Inclusive, deve-se considerar também as variações em um mesmo animal, pois a espessura da pele tende a diminuir dorso-ventralmente no tronco e próximo-distalmente nos membros, tendo uma pelagem mais densa no dorso e nas laterais do corpo (BOTONI, 2022).

Para que um ativo consiga penetrar na pele, o mesmo pode se difundir por cinco vias: transcelular, intercelular, transfolicular, pelo poro de suor e por uma difusão lateral, ilustradas na figura abaixo (Figura 11).

Fármacos lipofílicos se difundem através do estrato córneo e da epiderme viável, para então alcançar os microcapilares na junção epidérmica-dérmica, mas as espessuras das peles

variam de acordo com a espécie o que resulta em diferentes distâncias que devem ser percorridas pelos bioativos para alcançarem as camadas mais internas da derme (RIVIERE; PAPICH, 2018). Os cães por exemplo possuem uma derme com aproximadamente 21 µm de espessura e os gatos com aproximadamente 13 µm (RIVIERE; PAPICH, 2018).

Figura 11: Vias de transporte das formulações tópicas



A- transcelular; B- intercelular; C- transfolicular; D- pelo poro de suor; E- difusão lateral

Fonte: Adaptado de RIVIERE e PAPICH (2018).

Cães e gatos são recobertos por pelos provenientes de folículos pilosos compostos, em que cada óstio folicular origina um pelo primário (pelo duro), de maior diâmetro, enraizado na derme e associados as glândulas sebáceas e sudoríparas; e de 5-20 pelos secundários (subpelos), de menor diâmetro, localizado próximo a superfície e possuem glândulas sebáceas (BOTONI, 2022; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; RIVIERE; PAPICH, 2018).

No entanto, a presença de uma grande quantidade de folículos pilosos aumenta a área de superfície epidérmica, aumentando consequentemente o fluxo sanguíneo e assim a absorção dos ativos (RIVIERE; PAPICH, 2018).

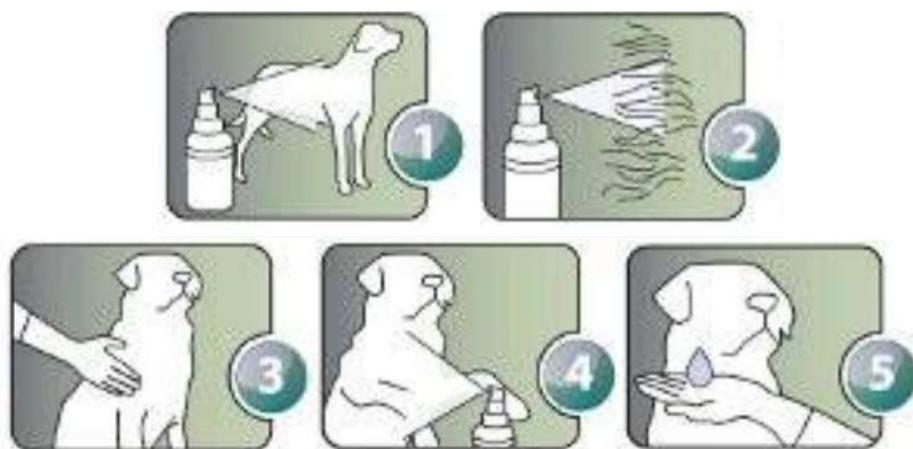
Segundo Riviere e Papich (2018):

“Os folículos pilosos são organizados e distribuídos de maneira diferente entre as espécies animais, e essas diferenças podem ditar uma administração transdérmica para produtos *pour-on*, bem como uma difusão pela superfície da pele para produtos tópicos.” (RIVIERE; PAPICH, 2018)”

Segundo a indicação de uso do produto Frontline® spray, ao administrar formulações spray, as mesmas devem ser aplicadas por todo corpo no sentido contrário ao pelo, de maneira a umedecer completamente a pele e os pelos do animal. Durante a aplicação da formulação, é indicado massagear os pelos para garantir que a formulação atinja a derme e assim realize o fenômeno de translocação dérmica. Além disso, para aplicação na região da cabeça, o produto deve ser aplicado nas luvas para posterior aplicação na face do animal, respeitando-se a área dos olhos (Boehringer Ingelheim, 2022).

Pode-se notar que em cães com maior densidade de pelos, a aplicação do produto deve ser feita com mais cautela para garantir que o produto consiga atingir a pele do animal. O modo de aplicação de produtos spray encontra-se demonstrado na Figura 12.

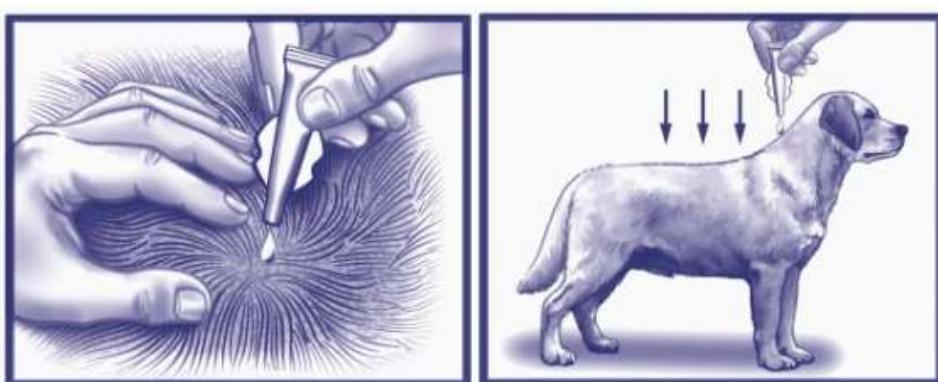
Figura 12: Modo de aplicação da formulação em *spray*



Fonte: Tiendanimal (2022)

Já para a administração de formulações *spot-on*, a densidade de pelos dos animais não tem grande influência na aplicação do produto, visto que a aplicação da formulação é feita afastando-se os pelos do animal e aplicando pontualmente entre a região da nuca e as escápulas, como demonstrado na Figura 13. Sendo assim, um produto de aplicação mais rápida e mais prática (Boehringer Ingelheim, 2022).

Figura 13: Modo de aplicação da formulação em *spot-on*

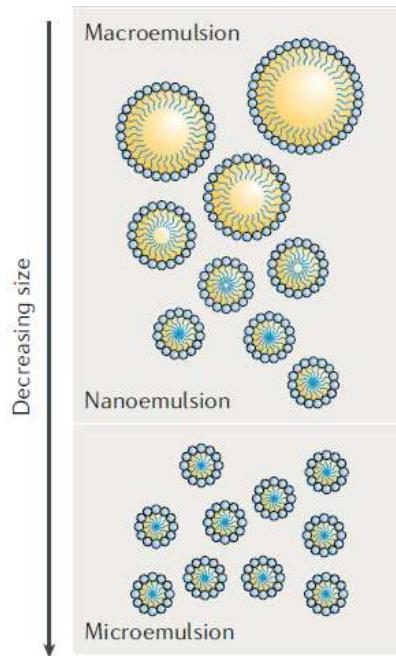


Fonte: Consulta Remédios (2022)

2.4.1. Sistemas emulsionados

As emulsões consistem na dispersão de dois líquidos imiscíveis entre si, normalmente óleo e água, que são estabilizados pela presença de um tensoativo, que fica localizado na interface do óleo com a água (PASCOA, 2012; FERREIRA, 2019). As emulsões podem ser classificadas em macroemulsões, nanoemulsões e microemulsões, como mostrado na Figura 14.

Figura 14: Diferença de tamanho entre as emulsões



Fonte: SHETH (2020)

As macroemulsões, apresentam gotículas de tamanho superior a 1 μm , geralmente polidispersas e instáveis termodinamicamente devido à alta energia livre na interface O/A (SHETH *et al.*, 2020; PASCOA, 2012). Contudo, essa instabilidade pode ser revertida cineticamente pela redução do tamanho das gotículas (OTONI *et al.*, 2016; PASCOA, 2012).

Embora o termo “micro” remeta a escala 10^{-6} e “nano” a escala 10^{-9} , as terminologias microemulsão e nanoemulsão não seguem esse padrão, visto que as gotículas de ambas terão tamanhos na ordem nanométrica.

As nanoemulsões, também são conhecidas como miniemulsões, microemulsões instáveis, submicroemulsões, são consideradas estáveis cineticamente e instáveis termodinamicamente (FERREIRA, 2011; MARIYATE; BERA, 2022; PASCOA, 2012; BEDIN, 2011; SILVA, 2013; MOURA *et al.*, 2019; SHETH *et al.*, 2020; PAVONI *et al.*, 2020).

Além disso, são formadas a partir da aplicação de uma energia externa, que pode ser fornecida por agitação mecânica de moderada a alta, garantindo assim um alto índice de cisalhamento, diminuindo a tensão superficial das gotículas, favorecendo sua formação (FERREIRA, 2011; PASCOA, 2012; MOURA *et al.*, 2019; SHETH *et al.*, 2020; MARIYATE; BERA, 2022). As gotículas formadas, apresentam formato esférico (PAVONI *et al.*, 2020; SHETH *et al.*, 2020).

Já as microemulsões são estáveis termodinamicamente, sendo formadas espontaneamente sem necessitar da aplicação de uma energia externa, consistindo em líquidos translúcidos, com gotículas monodispersas, que podem estar em formato esférico ou cilíndrico (PAVONI *et al.*, 2020; FERREIRA, 2019; MARIYATE; BERA, 2022).

Entre as micro/nano emulsões, as nanoemulsões apresentam uma vantagem frente as microemulsões, visto que são metaestáveis, ou seja, possuem uma estabilidade a longo prazo (BEDIN, 2011; SHETH *et al.*, 2020).

Em caso de nanoemulsões, deve-se atentar também ao aspecto, pois aquelas com tamanho de gotícula inferiores a 200 nm apresentam-se transparentes/translúcidas, enquanto

aqueelas com tamanho de gotícula entre 200-500 nm apresentam um aspecto leitoso e opaco (FERREIRA, 2011; BEDIN, 2011; SILVA *et al.*, 2015).

Independentemente da formação de micro ou nano emulsões, ambas apresentam baixa viscosidade e pequeno tamanho, o que melhora a permeabilidade do fármaco, facilitando sua entrada no estrato córneo (FERREIRA, 2019), além de possuírem a capacidade de proteger as moléculas do fármaco da degradação, realizando sua liberação gradual e permitir a veiculação de fármacos lipofílicos em sistemas aquosos (BEDIN, 2011; FERREIRA, 2019).

O tamanho das micro/nano emulsões ainda é bastante discutido, visto que há divergências, como mostrado a seguir, pois há autores que delimitam a faixa e outros que as sobrepõem (Tabela 2).

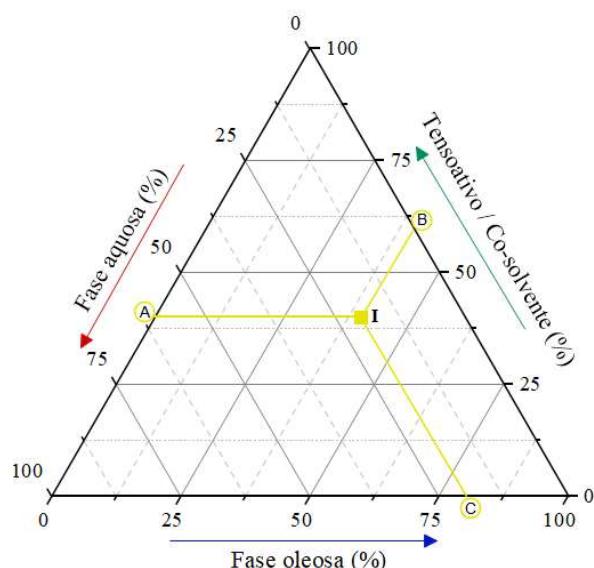
Tabela 2: Demonstrativo do parâmetro de tamanho para microemulsão e nanoemulsão

	Microemulsão	Nanoemulsão
BEDIN, 2011	< 100 nm	100 – 1000 nm
FERREIRA, 2011	< 100 nm	100 – 500 nm
PASCOA, 2012	10 – 100 nm	20 – 500 nm
SILVA, 2013	< 100 nm	200 – 500 nm
OTONI <i>et al.</i> , 2016	-	até 500 nm
MOURA <i>et al.</i> , 2019	10 – 100 nm	20 – 500 nm
SHETH <i>et al.</i> , 2020	10 nm	100 nm
HIDAJAT <i>et al.</i> , 2020	-	até 500 nm
GARAVAND <i>et al.</i> , 2021	< 100 nm	200 – 500 nm
MARIYATE; BERA, 2022	< 100 nm	100 -500 nm

Os sistemas micro/nano emulsionados podem ser classificadas como água em óleo (A/O), quando a fase interna é aquosa e encontra-se dispersa em um domínio oleoso; ou óleo em água (O/A), quando ocorre o inverso. Tal fato é determinado pelas propriedades físico-químicas dos tensoativos utilizados (FERREIRA, 2019).

Após o desenvolvimento das micro/nano emulsões e escolha da sua composição, a proporção de cada componente pode ser demonstrada a partir do diagrama pseudoternário de fases, como ilustrado a seguir (Figura 15).

Figura 15: Diagrama Pseudoternário de Fases



Fonte: Autoria própria baseado em FERREIRA (2019)

No diagrama pseudoternário de fases, cada vértice representa 100% de cada componente e o ponto I representa a proporção exata de cada componente na mistura ternária. Para determinar este ponto de interseção e as proporções corretas, utiliza-se o método de titulação com água, em que se adicionam alíquotas pré-determinadas de água a uma mistura composta por fase oleosa, tensoativos e co-solventes, até que a mistura se torne homogênea e transparente (isotrópica), o que é determinado visualmente, a partir do momento em que ocorre a turvação da mistura (FERREIRA, 2019).

A construção do diagrama de fases, indica o sistema de equilíbrio entre as emulsões, permitindo localizar regiões de transição entre as emulsões, regiões heterogêneas e homogêneas, regiões límpidas, gelificadas e determinar o tipo de sistema emulsionado (A/O ou O/A) formado (FERREIRA, 2019; SILVA, 2013).

Além disso, sua construção permite determinar as melhores combinações entre os seus componentes e suas concentrações mínimas para se obter um sistema emulsionado, respeitando-se as propriedades físico-químicas inerentes a formulação final e sua administração, como viscosidade, estabilidade e pH, visto que os sistemas emulsionados são formulações intermediárias a serem incorporadas em uma formulação final (FERREIRA, 2019).

2.5. Mercado pet

A indústria veterinária brasileira vem obtendo um crescimento consolidado e exponencial, somando lucros ano após ano. A nível mundial, o mercado pet movimentou em torno de US\$ 139,2 bilhões no ano de 2021, correspondendo a um aumento de 5,4% em relação ao ano anterior, sendo os Estados Unidos o maior produtor do setor (ABINPET, 2022).

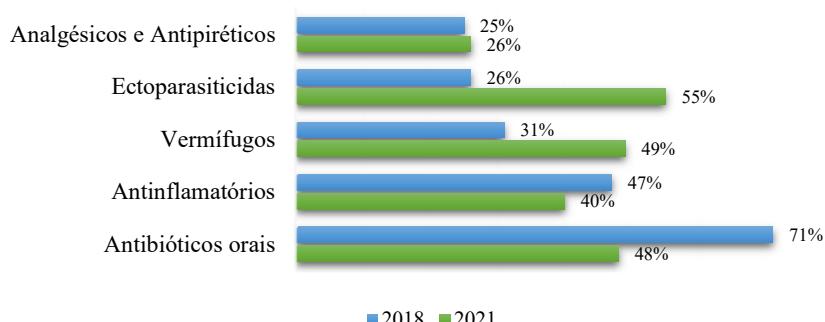
Mesmo em meio à crise econômica imposta pela COVID-19, em que muitos setores foram gravemente impactados, o mercado pet brasileiro continuou em destaque, sendo responsável pelo faturamento de 4,5% a nível mundial, ocupando hoje o sexto lugar no ranking mundial (ABINPET, 2022; MURA, 2022).

A nível nacional, o faturamento deste setor foi de aproximadamente R\$51,7 bilhões, um aumento de 27% em relação a 2020. Deste montante, cerca de 36 bilhões de reais correspondem ao setor de alimentos (pet food - 79%), cuidados com higiene e bem-estar (pet care - 7%) e serviços voltados ao atendimento e produtos veterinários (pet vet – 14%) (ABINPET, 2022; MURA, 2022).

Dentre todos os setores do ramo pet, o setor referente a medicamentos e produtos veterinários obteve um crescimento de 11%, sendo os antiparasitários responsáveis por 26% desse faturamento. Destes animais, cães e gatos representam 25% do público, ficando atrás apenas dos ruminantes (51%) (MURA, 2022).

Os medicamentos mais prescritos estão listados na figura a seguir (Figura 16).

Figura 16: Medicamentos mais prescritos nos anos de 2018 e 2021 para cães



Fonte: Adaptado de MURA (2022)

Pode-se perceber um aumento significativo dos ectoparasiticidas de 26% para 55% no período de 3 anos, passando do 4º lugar para o líder de prescrições. Além disso, pode-se perceber também uma redução considerável no número de prescrições de antibióticos orais (MURA, 2022).

O crescimento do ano de 2021 apesar de ter sido inferior aos anos anteriores, ainda relata um aumento no setor pet, sendo este importante por ter ocorrido em período de pandemia e de crise econômica mundial (MURA, 2022).

Essa ascensão se deve tanto pelo aumento do cuidado e preocupação dos tutores em relação a saúde do animal, quanto pelo aumento do número de animais que compõe famílias, muitos adquiridos durante a pandemia, como descrito anteriormente (MURA, 2022).

Esse laço cada vez mais estreito com os animais, preocupação crescente com sua saúde e bem-estar, faz com que os tutores espelhem seu estilo de vida para seus companheiros. Sendo assim, a procura por produtos que contenham componentes eficazes e menos agressivos ganhou força, favorecendo o desenvolvimento de produtos com uma abordagem *One Health*, em que a preocupação é relacionada com todas as esferas de maneira conjunta, tanta a humana, quanto a animal e a ambiental, a fim de se garantir o bem-estar de todos e esforços em saúde única.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de eugenol e carvacrol nas formulações sob a forma de *spray* e *spot-on*

A metodologia foi desenvolvida a partir da otimização dos métodos descritos por Truzzi *et al.* (2021) e Cantalapiedra *et al.* (2013), e está descrita a seguir (Tabela 3).

Tabela 3: Condições cromatográficas utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta

Sistema Cromatográfico	CLAE Dionex Ultimate 3000
Coluna	Kromasil - C18 (5µm) 150 x 4,6 mm
Fase Móvel	Metanol: água (65:35, v/v)
Comprimento de onda	278 nm
Fluxo	1 mL/min
Temperatura	40 °C
Volume de injeção	20 µL
Tempo de corrida	7 minutos

3.1.1. Preparo da solução mãe de eugenol e carvacrol

Preparou-se uma solução mãe a 1000 µg/mL para cada bioativo. Para o eugenol, pipetou-se 23 µL de eugenol SQR com teor de 99% (Sigma-Aldrich) em um balão volumétrico de 25 mL, avolumando-se o mesmo com metanol grau HPLC. Para o carvacrol, com teor de 98% (Sigma-Aldrich), pipetou-se uma alíquota de 26 µL em um balão volumétrico de 25 mL, completando o volume do mesmo com metanol grau HPLC. Os volumes pipetados correspondem a massa desejada de cada ativo (25 mg) corrigida pela densidade dos mesmos ($d= 1,067$ g/mL para o eugenol e $d=0,976$ g/mL para o carvacrol).

3.1.2. Preparo da curva padrão

Para avaliação dos parâmetros cromatográficos e otimização da metodologia descrita na literatura, preparou-se cinco diluições das soluções mães a 1000 µg/mL em metanol, obtendo-se concentrações de 50, 75, 100, 125 e 150 µg/mL para cada bioativo isoladamente.

Após o desenvolvimento do método já otimizado, preparou-se cinco diluições das soluções mãe nas concentrações mencionadas acima, mas com associação dos ativos, visto que o método deveria ser capaz de quantificar não só os bioativos separadamente, como também em associação.

3.1.3. Validação da metodologia analítica

A metodologia analítica foi avaliada de acordo com os parâmetros descritos na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166/17, que são: seletividade, estabilidade, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

3.1.3.1. Seletividade

O ensaio de seletividade deve demonstrar que o método é capaz de identificar e/ou quantificar o analito de interesse, na presença dos demais componentes presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. Sendo assim, o método deve ter a capacidade de sinalizar um resultado positivo quando o analito de interesse está presente e um resultado negativo na sua ausência.

Para isso, analisou-se os placebos das formulações e as formulações contendo os bioativos em associação desenvolvidas, por meio da CLAE-UV, sendo a leitura realizada em duplicita para cada amostra.

3.1.3.2. Estabilidade

Para avaliação da estabilidade das diluições da curva padrão, preparou-se três diluições de cada concentração e as amostras diluídas foram analisadas imediatamente após seu preparo. Cada diluição foi analisada em duplicita e os resultados são comparados, calculando-se o erro relativo (%) entre as amostras. Após isto, a solução mãe passou por novos testes de estabilidade, a fim de comparação com esta primeira análise:

- a. **Estabilidade pós processamento:** analisou-se as diluições preparadas inicialmente, após o período de 24 horas.
- b. **Estabilidade de curta duração:** preparou-se novas diluições das soluções mãe armazenadas em geladeira após 24 horas.

3.1.3.3. Efeito matriz

O efeito matriz é analisado para indicar se os constituintes da matriz interferem na curva padrão obtida. Para isso, preparou-se diluições das soluções mãe em cinco concentrações: 50, 75, 100, 125 e 150 µg/mL, em associação de bioativos e em triplicata. Preparou-se também amostras de placebos fortificadas com associação dos bioativos, nas mesmas concentrações e em triplicata.

Com isso, o efeito matriz foi determinado comparando-se os coeficientes angulares das duas curvas de calibração, aquela com os bioativos em solvente (metanol) e a da amostra fortificada com os bioativos. Caso os componentes da matriz não interfiram na análise, observa-se o paralelismo das retas obtidas por meio da regressão linear.

3.1.3.4. Linearidade

A linearidade é realizada a fim de demonstrar a capacidade do método de obter uma resposta analítica diretamente proporcional à concentração do analito de interesse. Para isso, diluiu-se as soluções mãe em associação, obtendo-se cinco concentrações: 50, 75, 100, 125 e 150 µg/mL em metanol. Essas diluições foram realizadas em triplicata independentes para cada concentração, a partir de uma mesma solução mãe.

Essas diluições foram submetidas a análise por CLAE-UV, sendo a leitura realizada em duplicita para cada amostra. As análises foram realizadas em dois dias consecutivos, com diluições independentes e em um terceiro dia, referente a reanálise das diluições processadas no dia anterior.

Para interpretação dos resultados, construiu-se um gráfico de Concentração x Área, obtendo-se uma regressão linear dos dados obtidos na curva analítica padrão, que é expressa como $y = ax + b$. Em que: o “y” corresponde a variável dependente que neste caso é a área obtida na cromatografia; o “x” corresponde a variável independente que neste caso é a concentração do analito que será calculada.

A partir da equação da reta, obteve-se o coeficiente angular (a) e linear (b) e o coeficiente de correlação linear (r), sendo possível calcular o desvio padrão relativo (DPR) e o desvio em relação a concentração real de cada bioativo para cada ponto da curva analítica, avaliando-se assim a precisão e exatidão.

3.1.3.5. Precisão

A análise de precisão é realizada a fim de demonstrar se os resultados obtidos, no caso, as concentrações calculadas, são próximos entre si. Para isso, preparou-se novamente cinco diluições em triplicatas independentes para cada concentração, analisadas em duplicita. A análise foi realizada em dias consecutivos, e a partir de uma segunda análise de uma amostra já processada no dia anterior.

Calculou-se o DPR para cada nível de concentração de um mesmo dia (intra-dia), de dias diferentes (inter-dia) e de preparamos distintos (inter-preparo) e o desvio em relação à concentração. Este cálculo foi realizado com base na fórmula a seguir:

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \cdot 100$$

Em que: DPR é o desvio padrão relativo; DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média calculada.

3.1.3.6. Exatidão

A análise de exatidão é realizada a fim de demonstrar se as concentrações reais de cada bioativo correspondem às concentrações teóricas calculadas. Para isso, preparou-se três diluições nas concentrações de 50, 100 e 150 µg/mL (correspondendo a pontos de baixo, médio e alto nível de concentração no intervalo linear).

Cada concentração foi preparada em triplicatas independentes a partir de uma mesma solução mãe, com associação dos bioativos; e cada amostra foi analisada em duplicita por CLAE-UV.

A exatidão foi calculada com base na porcentagem de recuperação dos analitos em cada nível de concentração, com a relação entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica calculada. Este cálculo foi realizado com base na fórmula a seguir:

$$Recuperação = \frac{(CM_{experimental})}{Concentração\ teórica} \cdot 100$$

Em que: CM é a concentração média

3.1.3.7. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção indica a menor concentração do analito que o método é capaz de detectar, mas não necessariamente quantificar; enquanto o limite de quantificação indica a menor concentração do analito presente em uma amostra, que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis.

Para determiná-lo por meio de métodos instrumentais, preparou-se oito diluições a partir da solução mãe, nas seguintes concentrações: 25, 10, 5, 2,5, 1,0, 0,50, 0,25L e 0,10 µg/mL analisando o sinal-ruído proveniente da análise cromatográfica. Para LD o sinal-ruído deve ser de no mínimo 2:1, enquanto para o LQ o sinal-ruído deve ser de no mínimo 10:1.

3.1.3.8. Análise Estatística

Para análise estatística, as análises por CLAE-UV foram realizadas em duplicita, obtendo-se média e desvio padrão dos resultados obtidos. A regressão linear obtida na linearidade promove um ajuste dos pontos obtidos, traçando assim uma linha reta entre eles, e esta adequação é estabelecida pelo coeficiente de correlação “r”, que pode variar entre -1 e 1.

Valores próximos a -1 e 1 referem-se a alta correlação negativa e positiva, respectivamente, enquanto valores próximos a 0 indicam falta de correlação.

Para os resultados obtidos nas etapas *in vitro*, realizou-se testes de normalidade de D'Agostinho-Pearson e testes não-paramétricos, como Kruskal-Wallis e Dun, considerando-se um nível de significância de 5% (p-valor < 0,05).

3.2. Desenvolvimento das formulações

A formulações tópicas foram desenvolvidas contendo como bioativo, eugenol a 10%, carvacrol a 10% ou uma associação de ambos a 10% cada, um agente antioxidante, umectante, tensoativo, promotor de penetração, agente tamponante, agente quelante e acidificante e veículo.

De maneira geral, a composição da formulação sob a forma de *spray* e *spot-on* estão descritas nas tabelas a seguir respectivamente (Tabela 4 e 5).

Tabela 4: Excipientes utilizados no delineamento das pré-formulações sob a forma de *spray* e suas funções

Excipiente	Função
BHT	Antioxidante
Propilenoglicol	Umectante
Tween 80	Tensoativo
DMSO	Promotor de penetração
PVA	Doador de viscosidade, tensoativo
Nipagin	
Nipasol	Conservantes
Álcool isopropílico	Veículo
BHT- hidroxitolueno butilado; Tween 80- polisorbato 80; PVA- álcool polivinílico; Nipagin- metilparabeno; Nipasol – propilparabeno; DMSO- dimetilsulfóxido.	

Tabela 5: Excipientes utilizados no delineamento das pré-formulações sob a forma de *spot-on* e suas funções

Excipiente	Função
BHT	Antioxidante
Cocoaminopropil betaina	Tensoativo
DMSO	Promotor de penetração
Álcool cetoestearílico	Emoliente e estabilizante
Álcool isopropílico	Veículo
BHT- hidroxitolueno butilado; DMSO- dimetilsulfóxido.	

As concentrações dos excipientes foram determinadas ao longo do delineamento, considerando-se a concentração mínima que estes devem apresentar para desempenhar suas funções e as características inerentes a formulação desejada, como viscosidade por exemplo.

Além disso, os excipientes acima descritos estavam sujeitos a substituição, de acordo com o comportamento apresentado na formulação final e possíveis incompatibilidades.

Os reagentes foram misturados à frio, sob agitação constante e levados ao ultrassom Ultronique, por aproximadamente 10 minutos, ou até completa solubilização.

Após preparo, as formulações foram armazenadas em frascos âmbares e transparentes, para prosseguimento dos testes de estabilidade, caracterização e de eficácia residual.

3.3. Caracterização das formulações e testes de estabilidade

3.3.1. Características organolépticas

Observou-se as formulações quanto a coloração, viscosidade, presença ou ausência de precipitado e homogeneidade.

3.3.2. pH

Mediu-se o pH das formulações durante cinco dias consecutivos e a cada mês até totalizar três meses, utilizando o pHmetro digital Del Lab. As análises foram realizadas diretamente do frasco de armazenamento, em triplicata, sendo calculado a média e o desvio padrão das medições.

3.3.3. Centrifugação

Para análise de estabilidade, colocou-se 1 mL de cada formulação em microtubos de centrífuga, levando para centrifugação por 30 minutos a 3000 rpm e por cinco horas a 3800 rpm, utilizando-se a centrífuga refrigerada Cientec.

3.3.4. Ciclo de congelamento e aquecimento

Adicionou-se 1 mL de cada formulação em vials âmbaras e transparentes, sendo estes expostos a ciclos alternados de 24 horas em resfriamento (em geladeira entre 5 e 10 °C) e em aquecimento, por meio da incubadora shaker digital Cienlab (entre 37 e 40 °C), por três dias.

3.3.5. Quantificação do teor dos bioativos nas formulações

As formulações, tanto sob a forma de *spray* quanto *spot-on*, possuíam 10% dos ativos em sua composição e para que estes fossem quantificados pelo método analítico desenvolvido, seria necessário realizar uma série de diluições. A concentração de trabalho estipulada foi a de nível médio de concentração, ou seja, 100 µg/mL.

Para isso, pipetou-se 1 mL da formulação (10 % equivalem a 100 mg/mL), para um balão volumétrico de 100 mL, avolumando-se com metanol. Desta solução resultante (1 mg/mL), pipetou-se 1 mL para um balão volumétrico de 10 mL, completado até o menisco com metanol, obtendo-se assim uma solução com a concentração desejada (0,1 mg/mL equivale a 100 µg/mL).

A cada diluição, o balão volumétrico foi vertido três vezes, garantindo uma homogeneização manual, sendo submetido posteriormente a 10 minutos no ultrassom. Só após o ultrassom, que retirava-se uma nova alíquota para prosseguir as diluições.

Após obtenção de uma amostra com a concentração de trabalho necessária para a análise, a mesma era transferida para um vial, para ser analisada pelo método analítico validado por CLAE-UV. No caso das formulações com polímeros (como o *spot-on*, por exemplo), a amostra deve ser filtrada antes de ser transferida para os vials, com filtro de seringa PVDF com tamanho de poro de 0,45µm. Vale ressaltar que os placebos utilizados para avaliação da seletividade do método analítico foram diluídos da mesma maneira.

3.4. Desenvolvimento do sistema emulsionado

A escolha dos componentes utilizados para o preparo do sistema emulsionado foi feita com base no estudo realizado por (FERREIRA, 2019), estabelecendo-se assim o propilenoglicol como co-solvente, tween 80 e span 20 como tensoativos em uma proporção 1:1, e os bioativos eugenol e carvacrol como fases oleosas.

Para isso, determinou-se uma faixa de análise em que as proporções de fase oleosa/ co-solvente e tensoativos variavam entre 90:10 e 10:90 (A - I), respectivamente, conforme tabela abaixo (Tabela 6).

Tabela 6: Combinações utilizadas para determinação da região de microemulsão

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Fase Oleosa /Co-solvente	90	80	70	60	50	40	30	20	10
Mistura de Tensoativos (1:1)	10	20	30	40	50	60	70	80	90

Após preparo, homogeneizou-se cada combinação com auxílio de um agitador magnético, adicionando-se o bioativo por último, visto que são voláteis. Feito isto, realizou-se uma titulação com alíquotas de 20 µL de água destilada, adicionadas lentamente para garantir completa homogeneização, até turvação do sistema, com agitação constante.

Com isso, escolheu-se os pontos com elevada capacidade de suporte de fase aquosa, realizando um novo preparo para prosseguir com a análise de tamanho de gotícula e índice de polidispersão, após agitação por duas horas.

Com a determinação do ponto de turvação, foi possível determinar o volume de água que o sistema comporta sem turvar, permitindo a construção de um diagrama de fases pseudoternário, indicando a região de microemulsão do ativo analisado. O procedimento foi realizado para o eugenol e carvacrol separadamente e para ambos em associação.

Após desenvolvimento do sistema emulsionado, o mesmo foi disperso em propilenoglicol, contendo outros excipientes em menor concentração, originando a formulação *spot-on*, que foi submetida aos ensaios de caracterização.

3.5. Caracterização do sistema emulsionado

3.5.1. Índice de Refração

Para determinação do índice de refração, transferiu-se gotas das formulações no compartimento do refratômetro Ionlab, calibrado previamente com água destilada, e realizou-se as leituras em triplicata.

3.5.2. Condutividade elétrica

Mediu-se a condutividade diretamente do frasco de armazenamento, em triplicata, tanto das formulações finalizadas, da água e dos bioativos puros. A leitura foi realizada no condutivímetro Ion DDS-120W.

3.5.3. Tamanho de gotícula e índice de polidispersão

Para determinar o tamanho de gotícula e o índice de polidispersão, transferiu-se 1mL de cada formulação sob a forma de *spot-on* com microemulsão incorporada para uma cubeta, realizando a leitura no equipamento Zetasizer Pro Lab Blue ZSU 3100, nos ângulos de 173º e 13º. As leituras foram realizadas em no mínimo três replicatas.

3.5.4. Microscopia óptica

Para avaliação microscópica, avaliou-se 20µL de cada formulação, realizando a observação das gotículas do sistema emulsionado em Microscópio óptico ZEISS Axio Lab.A1, com aumento ocular de 10 vezes e de 40 e 400 vezes na lente objetiva, por microscopia convencional (campo claro) e por contraste de fases. As imagens do contraste de fases foram obtidas utilizando-se a câmera Axiocam 202 mono ZEISS e a partir do software Zen Blue 3.6 ZEISS.

3.6. Eficácia *in vitro*

Para avaliação da mortalidade dos ectoparasitos expostos as formulações, utilizou-se o método da impregnação de papel filtro. Nesta etapa, foram realizadas as avaliações de eficácia residual e efeito *knock down* por meio da mortalidade dos indivíduos testados, que é avaliada

segundo o critério de motilidade, em que se considera o indivíduo vivo pela observação de qualquer movimento, por mínimo que seja.

A análise de eficácia residual assim como do efeito *knock down*, tanto para pulgas quanto carapatos, foi realizada em sextuplicata.

A mortalidade é calculada segundo a fórmula a seguir:

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{\text{mortalidade}_{\text{grupo controle}} - \text{mortalidade}_{\text{grupo tratado}}}{100 - \text{mortalidade}_{\text{grupo controle}}} * 100$$

3.6.1. Frente a pulgas *Ctenocephalides felis felis*

A avaliação da atividade inseticida frente a pulgas adultas foi realizada seguindo a metodologia descrita por dos Santos *et al.* (2020) e Conceição *et al.* (2020). Para isso, foram impregnadas fitas de papel filtro de 10 cm² (10 cm de comprimento x 1 cm de largura), com 200 µL de cada formulação.

Após secagem por aproximadamente uma hora, as fitas de papel filtro foram alocadas em tubos de ensaio contendo cinco casais de pulgas adultas não alimentadas, lacrados com TNT e elásticos, sendo acondicionados em câmaras climatizadas do tipo B.O.D. (do inglês demanda biológica de oxigênio). A avaliação da mortalidade foi realizada seguindo o critério de motilidade, descrito anteriormente.

O ensaio para determinação do efeito *knock down* tem como objetivo determinar o tempo mínimo que as pulgas necessitam ficar em contato com a formulação para se atingir a atividade máxima (100% de mortalidade). Para isso, avaliou-se todas as formulações preparadas, tanto os *spray* quanto as formulações *spot-on*, nos tempos de 15, 30, 45 minutos, e uma, duas, quatro, seis, oito e 24 horas. Neste bioensaio, as pulgas não foram substituídas a cada avaliação, avaliando-se as mesmas pulgas do início ao fim do bioensaio.

Para a avaliação da eficácia residual, a mortalidade das pulgas foi avaliada diariamente até não se observar mais mortalidade, de modo que a cada período de 24 horas, substituía-se as pulgas analisadas por novos cinco casais.

3.6.2. Frente ao carrapato *Rhipicephalus sanguineus*

Para a avaliação da mortalidade dos carrapatos, utilizou-se uma metodologia adaptada da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO).

Para isso, impregnou-se papéis filtros de 63,75 cm² (8,5 x 7,5 cm) com 670 µL de cada formulação. Após secagem por aproximadamente uma hora, os envelopes eram dobrados de maneira a formar envelopes, nos quais alocava-se cinco casais de adultos não alimentados, fechando-se o envelope com 30 bander clips, sendo acondicionado em câmaras climatizadas do tipo B.O.D. (do inglês demanda biológica de oxigênio).

Assim como no teste anterior, para avaliação da eficácia residual contabiliza-se os indivíduos vivos e mortos a cada 24 horas, substituindo os mesmos por novos cinco casais de carrapatos. Realizou-se a análise diariamente até não se observar mais mortalidade.

A avaliação do efeito *knock down* das formulações sob a forma de *spray* e *spot-on* foram realizadas igualmente ao descrito anteriormente, no item 3.6.1. Modificou-se apenas os tempos de observação, que foram de 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas.

Contudo, a formulação sob a forma de *spot-on* a partir da incorporação do sistema microemulsionado frente ao carrapato *R. sanguineus* encontra-se em andamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de eugenol e carvacrol nas formulações sob a forma de *spray* e *spot-on*

A metodologia analítica utilizada para quantificação de eugenol e carvacrol nas formulações sob a forma de *spray* e *spot-on* foi baseada na otimização do método já descrito por Cantalapiedra *et al.* (2013) e Truzzi *et al.* (2021). No primeiro, o método foi utilizado para quantificação de vanilina, eugenol, carvacrol e timol em plantas aromáticas, enquanto o segundo foi utilizado para quantificação de hesperidina e carvacrol em produtos veterinários.

As condições cromatográficas entre os métodos já definidos e a otimização aqui realizada encontram-se na tabela abaixo (Tabela 7).

Tabela 7: Comparaçao das metodologias analíticas para quantificação de eugenol e carvacrol

	CANTALAPIEDRA (2013)	TRUZZI (2021)	Método otimizado
Sistema Cromatográfico	PU-2089 Plus	Agilent 1100 system	Dionex Ultimate 3000
Coluna	C ₁₈ (5 µm) 250 x 4,6 mm	C ₁₈ (2,7 µm) 150 x 3 mm	C ₁₈ (5 µm) 150 x 4,6 mm
Fase móvel	Tampão de ácido acético-acetato de amônio 0,1 mol/L (pH 4,6) : Metanol (35:65)	0-5 min → A.CN : Água (20:80) 5-20 min → GL até ACN : Água (80:20) 20-22 min → ACN : Água (80:20)	Metanol : Água (65:35, v/v)
Temperatura do forno	40°C	25°C	40°C
Fluxo	1,0 mL/min	0,4 mL/min	1,0 mL/min
Volume de injeção	100 µL	3 µL	20 µL
Comprimento de onda	280 nm → carvacrol e eugenol	278 nm → carvacrol	278 nm → carvacrol 280 nm → eugenol
Tempo de corrida	20 minutos	32 minutos	7 minutos

GL – gradiente linear; ACN – acetonitrila

Para iniciar a desenvolvimento do método, utilizou-se como base os artigos acima citados, com pequenas alterações. Para otimizar o método, e todas as etapas prévias para sua execução, optou-se por um método com melhor custo-benefício.

Um dos métodos menciona o uso de solução tampão como fase móvel, mas estas são suscetíveis ao desenvolvimento de fungos e microrganismos, o que pode comprometer o equipamento e a coluna utilizada. Sendo assim, além de exigir um maior cuidado no momento de seu preparo e acondicionamento, pode ser necessário repará-la diariamente, além de exigir um controle diário de seu pH. O outro estudo, utiliza a ACN como fase móvel, mas dada a dificuldade na aquisição e o alto custo desta no momento, optou-se então pelo uso do metanol, solvente já utilizado na rotina do laboratório como fase móvel e de melhor custo-benefício atualmente. A temperatura do forno foi definida de acordo com o citado em Cantalapiedra *et al.* (2013) para otimizar o tempo de corrida.

Assim, a primeira etapa consistiu no preparo de duas diluições independentes para cada ativo na concentração de 100 µg/mL, partindo de soluções mãe independentes a 1000 µg/mL, todas em metanol. Feito isso, realizou-se a injeção de cada bioativo diluído individualmente, em ambos os comprimentos de onda (278 e 280 nm), para determinação do tempo de retenção, do comprimento de onda de maior absorção para cada bioativo e do tempo de corrida, obtendo-se os seguintes cromatogramas em 280 nm (Figura 17) e em 278 nm (Figura 18).

Figura 17: Cromatograma da injeção dos bioativos eugenol e carvacrol em 280 nm por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta

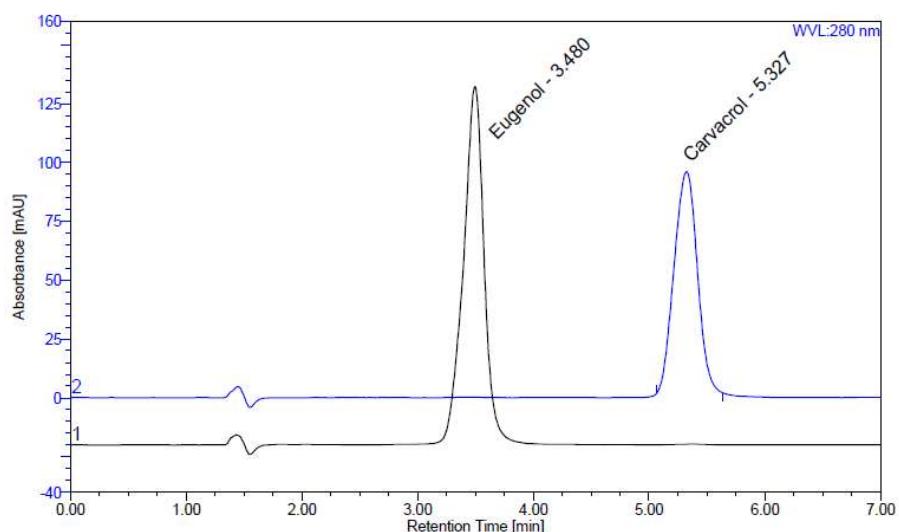
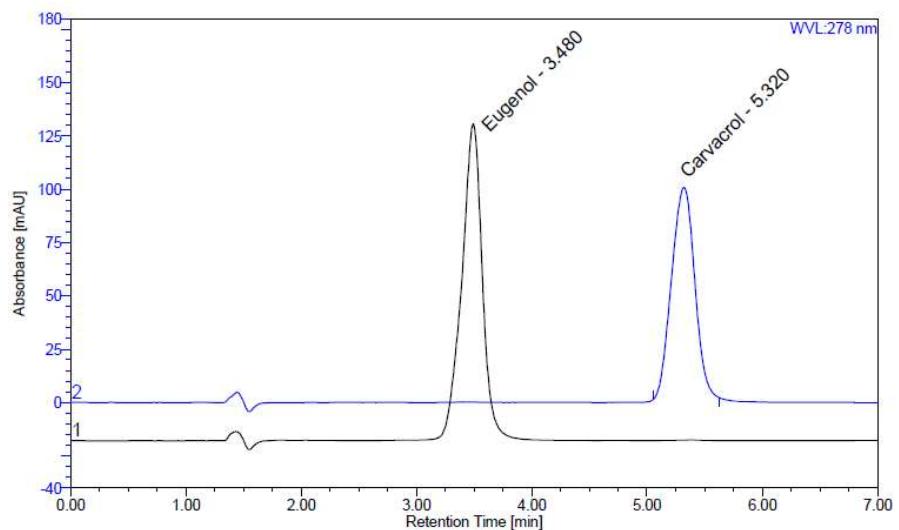


Figura 18: Cromatograma da injeção dos bioativos eugenol e carvacrol em 278 nm por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta



Pode-se perceber que os bioativos apresentam tempo de retenção distintos, podendo ser quantificados em uma corrida de sete minutos. Além disso, foi possível observar que o eugenol apresenta maior absorção em 280 nm, enquanto a maior absorção do carvacrol é em 278 nm. Os resultados obtidos nesta etapa estão listados na tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros cromatográficos dos bioativos eugenol e carvacrol em 278 nm e 280 nm por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta

Ativo	Comprimento de onda (nm)	Tempo de retenção (min)	Sinal-ruído (S/N)	Área (Mau*min)	Assimetria	Nº pratos teóricos
Eugenol	278	3,48	37,1	30,204	1,03	2158
	280	3,48	38,8	31,100	1,05	2175
Carvacrol	278	5,32	22,0	22,984	1,00	3246
	280	5,33	21,3	21,743	0,99	3272

Tendo conhecimento do comprimento de onda de maior absorção para cada bioativo e sabendo-se que as formulações podem contê-los em associação, preparou-se uma diluição contendo a associação de eugenol com carvacrol, ambos a 100 µg/mL, obtendo-se o cromatograma a seguir (Figura 19), assim como os parâmetros listados na tabela posterior (Tabela 9).

Figura 19: Cromatograma da injeção dos bioativos eugenol e carvacrol em associação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta

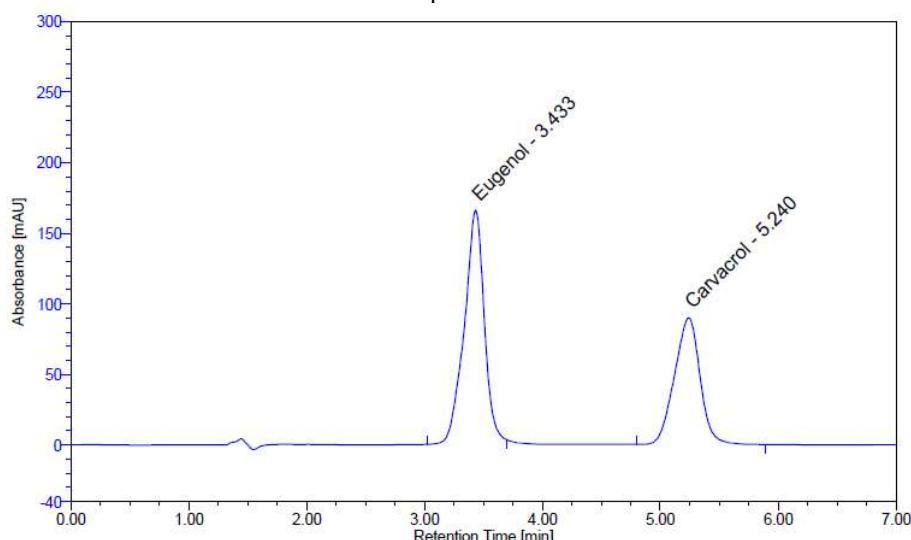


Tabela 9: Parâmetros cromatográficos da associação dos bioativos eugenol e carvacrol por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta em 278 e 280 nm

Comprimento de onda (nm)	Nº Pico	Tempo de retenção (min)	Nome	Sinal-ruído (S/N)	Área (Mau*min)	Assimetria	Resolução	Nº pratos teóricos
278	1	3,43	Eugenol	41	32,300	0,91	5,27	2126
	2	5,24	Carvacrol	526,3	23,494	0,95	-	2701
280	1	3,43	Eugenol	42,6	31,714	0,89	5,28	2162
	2	5,24	Carvacrol	68,3	22,58	0,96	-	2694

Pode-se perceber que ao analisar os ativos em associação, o eugenol passa a apresentar maior absorção no mesmo comprimento de onda que o carvacrol (278 nm) nesse momento. Como não há diferença significativa na área obtida em ambas as situações e visto que em 278 nm ambos bioativos foram atendidos, prosseguiu-se os ensaios neste comprimento de onda, podendo-se notar que os parâmetros cromatográficos avaliados cumpriram os requisitos aceitáveis de resolução ($R > 1,5$), assimetria ($0,8 < As < 1,2$), comprovando que a separação

dos analitos foi realizada de modo eficiente, visto que o número de pratos teóricos foi superior ao valor mínimo desejável, que é de 2000.

Além disso, a obtenção de um sinal-ruído superior a dois, permite supor que o eugenol e o carvacrol poderão ser detectados e quantificados com precisão e exatidão aceitáveis nas formulações, pois suas concentrações na amostra analisada correspondem a aquela a ser utilizada para quantificação nas formulações, respeitando os critérios de LQ ($LQ > 10$) e de LD ($LD > 2$) definidos na RDC nº166/17.

4.1.1. Seletividade

A seletividade é determinada pela capacidade do método analítico de detectar o analito de interesse em detrimento dos outros componentes presentes na amostra analisada, como os componentes da matriz analisada (excipientes das formulações), impurezas e produtos de degradação.

Para isso o método analítico escolhido deve ser capaz de detectar os bioativos em amostras em que estes estão presentes, e não os detectar quando estiverem ausentes, nem detectar outras substâncias no mesmo tempo de retenção que os analitos de interesse.

Para isso, injetou-se duas formulações placebo diluídas 1:1000 em metanol, referentes as formulações sob a forma de *spray* e *spot-on*, obtendo-se os seguintes cromatogramas (Figuras 20 e 21).

Figura 20: Cromatograma de injeção da formulação placebo em *spray* (2) em comparação a injeção da formulação em *spray* contendo os bioativos eugenol e carvacrol (1) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta em 278 nm

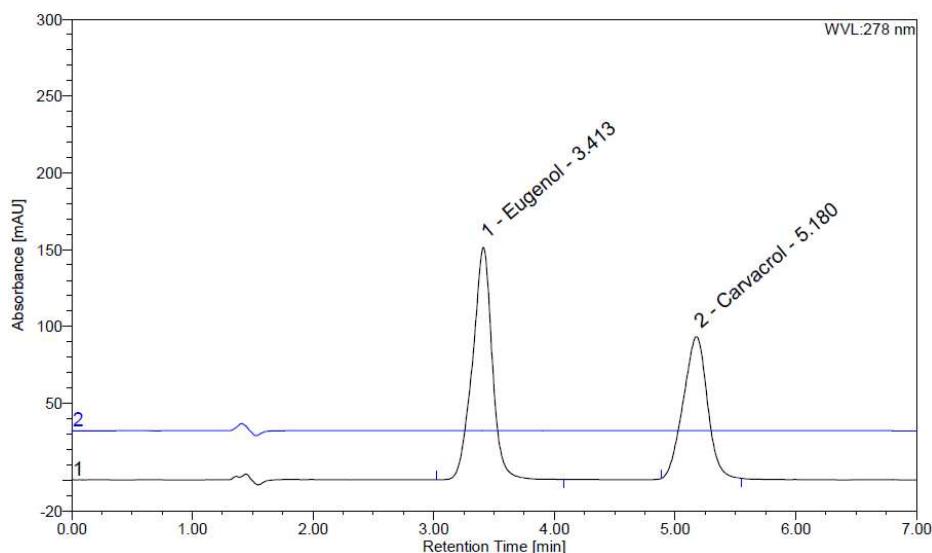
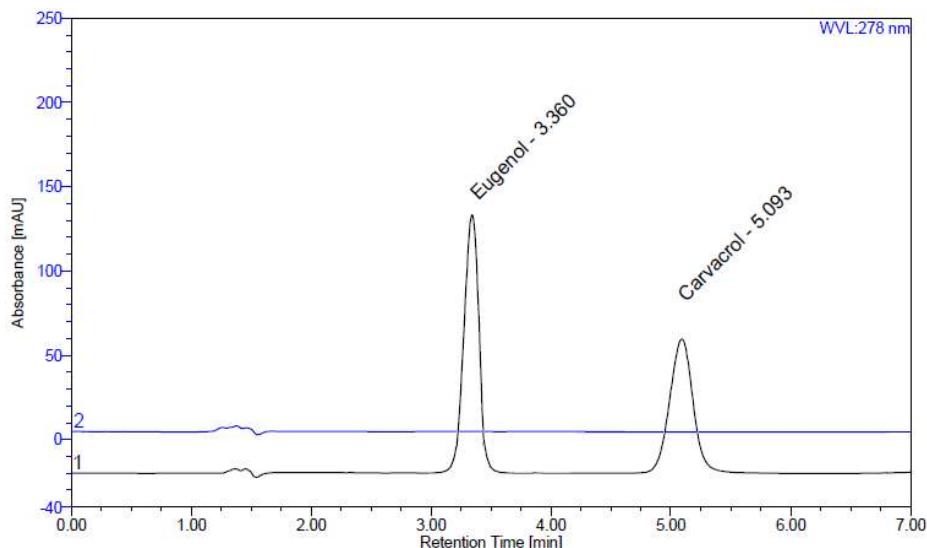


Figura 21: Cromatograma de injeção da formulação placebo em *spot-on* (2) em comparação a injeção da formulação em *spot-on* contendo os bioativos eugenol e carvacrol (1) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta em 278 nm



Ao analisar as formulações placebo de *spray* e *spot-on*, obteve-se cromatogramas com apenas um pico, referente ao metanol utilizado nas diluições. Sendo assim, as formulações não possuem interferentes detectáveis no mesmo tempo de retenção do que o eugenol e o carvacrol, atendendo aos critérios descritos na RDC nº 166/17.

4.1.2. Efeito matriz

A análise de efeito matriz foi realizada a partir da comparação da curva obtida a partir dos bioativos em metanol, com a curva obtida a partir da matriz fortificada com os bioativos, obtendo-se as seguintes curvas analíticas (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1: Curva analítica do eugenol em solvente (metanol) e em matriz fortificada (placebo com adição da solução mãe)

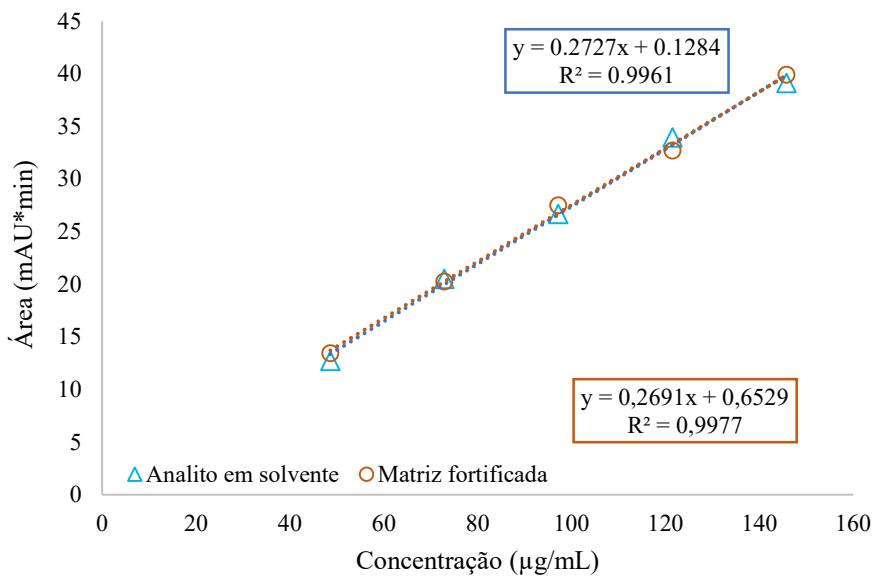
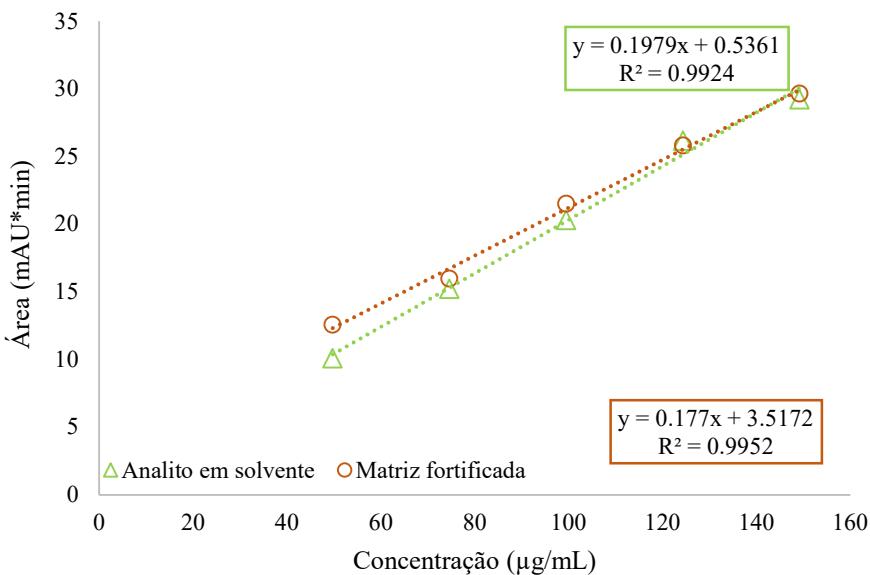


Gráfico 2: Curva analítica do carvacrol em solvente (metanol) e em matriz fortificada (placebo com adição da solução mãe)



Observando-se as inclinações da reta do analito em metanol e do analito na matriz fortificada, pode-se perceber que para o eugenol as retas apresentam paralelismo entre si, possuindo inclusive uma sobreposição com coeficientes angulares próximos. Já ao realizar esta mesma comparação em relação ao carvacrol, pode-se perceber a ausência de paralelismo nas concentrações iniciais, apresentando tal efeito nas concentrações mais elevadas, com coeficientes angulares distantes.

Contudo, ao realizar o teste de T-student (Tabela 10) e considerando um nível de significância de 5%, pode-se perceber que alguns níveis de concentração apresentaram um p-valor inferior a 0,05 indicando que há efeito matriz.

Tabela 10: Valores de *p*-valor do efeito matriz por nível de concentração calculados a partir do teste de t-Student para os bioativos eugenol e carvacrol

Concentração (µg/mL)	<i>p</i> -valor	
	Eugenol	Carvacrol
50	0,2104	0,0031
75	0,6096	0,0307
100	0,1758	0,0504
125	0,0142	0,5928
150	0,0767	0,0428

Assim, a partir do momento que se confirma o efeito matriz, é necessário preparar as soluções mãe assim como as diluições, linearidade, precisão e exatidão na matriz (formulação placebo), tornando possível a construção da curva analítica, a partir da qual é possível calcular as concentrações dos analitos com mais fidedignidade, já considerando as alterações resultantes da influência da matriz (MONTEIRO, 2018; INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2020).

4.1.3. Linearidade

A linearidade de um método analítico avalia a capacidade do método escolhido gerar uma resposta que seja diretamente proporcional à concentração do analito presente na amostra desejada, dentro de uma faixa estabelecida. Para calcular-se esta concentração com precisão precisa-se construir uma curva analítica padrão, a partir de uma solução padrão com concentração conhecida. Neste caso, utilizou-se padrões SIGMA de eugenol e carvacrol com teores de 99 e 98% respectivamente, a partir do qual preparou-se a solução mãe.

A construção da curva analítica padrão foi realizada a partir de cinco pontos, sendo o ponto central correspondente a concentração de trabalho desejada (100 µg/mL). Para isso, realizou-se cinco diluições contendo associação de bioativos, a partir das soluções mãe individuais a 1000 µg/mL, sendo estas: 50, 75, 100, 125 e 150 µg/mL.

Para análise cromatográfica, cada diluição foi realizada em triplicata independente, injetada em duplicata para análise cromatográfica ($n=6$ para cada nível de concentração), realizando as leituras em três dias, dois destes a partir de uma nova diluição da solução mãe e o terceiro a partir de uma amostra já processada ($n_{total}=18$).

A representação gráfica das linearidades encontra-se abaixo (Gráficos 3 a 5).

Gráfico 3: Curva analítica da associação dos bioativos eugenol e carvacrol em solvente (metanol) no 1º dia de análise na faixa linear do método (50 a 150 µg/mL)

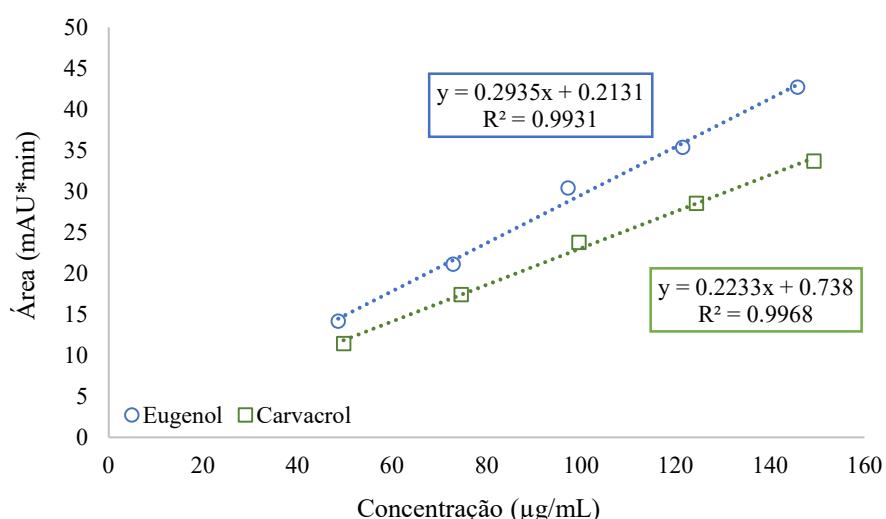


Gráfico 4: Curva analítica da associação dos bioativos eugenol e carvacrol em solvente (metanol) no 2º dia de análise na faixa linear do método (50 a 150 µg/mL)

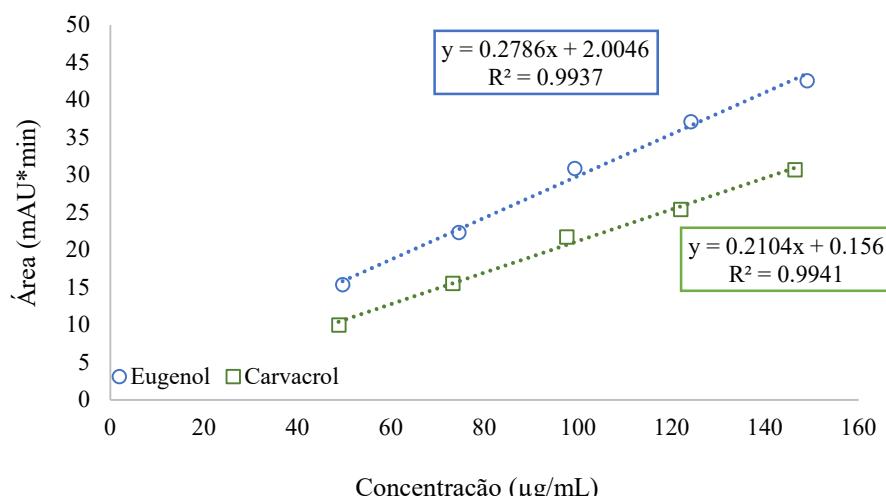
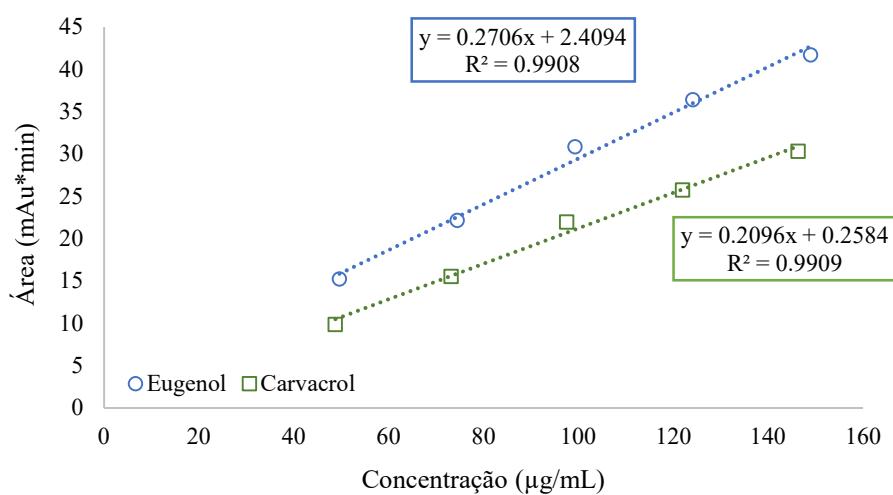


Gráfico 5: Curva analítica da associação dos bioativos eugenol e carvacrol em solvente (metanol) na reanálise do 2º dia na faixa linear do método (50 a 150 µg/mL)



Os resultados obtidos por meio do cálculo de precisão e exatidão dos níveis de concentração analisados na linearidade estão descritos nas tabelas abaixo (Tabela 11 e 12).

Tabela 11: Precisão e exatidão na faixa linear do método (50 a 150 µg/mL) nas três análises para o eugenol

Concentração (µg/mL)	Dia	Média das áreas ± DP	Precisão DPR (%)		Exatidão (% de recuperação)	
			Intra dia	Inter dia	Intra dia	Inter dia
50	1	47,51 ± 2,15	4,52		97,97	
	2	48,02 ± 0,77	1,6	2,76	96,73	96,69
	3	47,45 ± 1,68	1,42		95,58	
75	1	73,57 ± 0,54	0,73		100,93	
	2	73,05 ± 1,01	1,38	1,65	98,1	98,76
	3	72,97 ± 1,73	2,38		97,98	
100	1	102,89 ± 1,25	1,21		105,88	
	2	103,70 ± 1,82	1,76	2,24	104,44	105,4
	3	105,15 ± 3,23	3,07		105,89	
125	1	119,75 ± 0,94	0,78		98,57	
	2	126,06 ± 1,14	0,9	2,87	101,56	100,45
	3	125,64 ± 3,31	2,63		101,23	
150	1	144,68 ± 3,83	2,65		99,25	
	2	145,64 ± 1,33	0,91	1,73	97,78	98,18
	3	145,22 ± 2,13	1,46		97,5	

DP- desvio padrão; DPR- desvio padrão relativo.

Tabela 12: Precisão e exatidão na faixa linear do método (50 a 150 µg/mL) nas três análises para o carvacrol

Concentração (µg/mL)	Dia	Média das áreas ± DP	Precisão DPR (%)		Exatidão (% de recuperação)	
			Intra dia	Inter dia	Intra dia	Inter dia
50	1	49,75 ± 0,19	0,38		100,02	
	2	46,71 ± 1,63	3,5	3,6	95,76	97,42
	3	47,47 ± 0,88	1,85		97,31	
75	1	77,01 ± 1,17	1,52		103,22	
	2	73,20 ± 1,44	1,97	3,13	100,03	100,73
	3	73,01 ± 2,02	2,76		99,78	
100	1	103,10 ± 1,06	1,03		103,65	
	2	102,67 ± 1,53	1,49	1,83	105,24	105,07
	3	103,72 ± 2,81	2,71		106,31	
125	1	124,35 ± 1,07	0,86		100,01	
	2	119,97 ± 1,97	1,64	3,13	98,38	100,54
	3	127,53 ± 4,29	3,36		104,57	
150	1	147,43 ± 1,58	1,07		98,81	
	2	145,29 ± 2,28	1,57	2,21	99,28	98,71
	3	143,47 ± 4,25	2,96		98,04	

DP- desvio padrão; DPR- desvio padrão relativo.

A linearidade do método analítico pode ser comprovada visto que as análises apresentaram valores significativos de coeficiente angular e uma resposta linear com um coeficiente de determinação (r^2) maior que 0,99, sendo o valor médio de 0,993 e 0,9939 para o eugenol e carvacrol respectivamente, indicando elevada correlação positiva.

Além disso, os valores de DPR inferiores a 5% e as porcentagens de recuperação na faixa de 80 a 120 % indicam que o método é preciso e exato, segundo o descrito na RDC nº166/17.

4.1.4. Precisão e Exatidão

Segundo o disposto na RDC nº166/17, a precisão avalia a proximidade das concentrações obtidas entre si, e é determinada por meio do cálculo do desvio padrão relativo; enquanto a exatidão avalia a concordância dessas concentrações obtidas experimentalmente com uma concentração teórica tida como referência, sendo determinada por meio do cálculo da porcentagem de recuperação.

Para isso analisou-se 3 níveis de concentração, considerando-se os pontos extremos e o ponto central da curva de calibração (50, 100 e 150 µg/mL), sendo cada ponto preparado em triplicata independente a partir das soluções mãe e injetados em duplicata para análise cromatográfica, e analisados em três dias consecutivos (n=18 para cada nível de concentração).

Os resultados obtidos estão demonstrados nas tabelas abaixo (Tabela 13 e 14).

Tabela 13: Precisão e exatidão nos níveis baixo (50 µg/mL), médio (100 µg/mL) e alto (150 µg/mL) intra dia e inter dia para o eugenol

Concentração (µg/mL)	Precisão (%DPR)		Exatidão (% de recuperação)	
	Intra dia	Inter dia	Intra dia	Inter dia
50	1,46		101,17	
	3,44	3,55	95,69	96,61
	3,78		94,48	
100	2,56		105,43	
	2,48	2,57	101,5	103,78
	2,24		104,4	
150	3,23		96,04	
	3,12	2,62	93,02	94,47
	1,39		94,34	

DP- desvio padrão; DPR- desvio padrão relativo

Tabela 14: Precisão e exatidão nos níveis baixo (50 µg/mL), médio (100 µg/mL) e alto (150 µg/mL) intra dia e inter dia para o carvacrol

Concentração (µg/mL)	Precisão (%DPR)		Exatidão (% de recuperação)	
	Intra dia	Inter dia	Intra dia	Inter dia
50	1,71		98,38	
	2,89	3,23	99,04	98,36
	4,76		97,66	
100	1,58		104,91	
	2,38	2,99	102,21	103,62
	3,06		103,73	
150	2,27		97,78	
	1,41	3,99	92,55	94,35
	1,55		92,72	

DP- desvio padrão; DPR- desvio padrão relativo

Segundo o disposto no Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica para Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, para analitos com concentrações inferiores entre 100 mg/Kg e 1000 mg/Kg, o DPR máximo permitido é de 5 %, confirmando assim a precisão do método analítico.

Já quanto a exatidão, a porcentagem de recuperação dos bioativos analisados encontram-se dentro da faixa de 90 – 110 %, conforme o preconizado no Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica para Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários, confirmando que o método analítico também é exato, além de preciso.

4.1.5. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação de métodos instrumentais podem ser determinados por meio da avaliação do sinal-ruído. Para isso, injetou-se oito diluições

preparadas a partir da solução mãe, nas seguintes concentrações: 0,1 , 0,25 , 0,5 , 1,0, 2,5, 5 , 10 e 25 µg/mL, obtendo-se os resultados expressos na Tabela 15.

Segundo o disposto na RDC nº166/17, o limite de detecção consiste na menor concentração de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada; e seu sinal-ruído deve ser maior que dois, tem-se que o LD do método analítico desenvolvido é de 0,1 µg/mL.

Já o limite de quantificação pode ser definido como a menor concentração de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, devendo seu sinal-ruído ser maior do que 10.

Tabela 15: Sinal ruído dos bioativos eugenol e carvacrol em pequenas concentrações para determinação de limite de detecção e limite de quantificação

Concentração (µg/mL)	Eugenol	Carvacrol
0,10	38,8	8,2
0,25	26,2	35,2
0,50	42,05	24,95
1,00	77,1	44,85
2,50	168,35	82,7
5,00	267,1	193,85
10,0	880,35	358,5
25,0	1883	714

Com isso, o LQ do método analítico seria de 0,25 µg/mL, mas ao realizar o cálculo de concentração e teor dos pontos analisados, observou-se que abaixo da concentração de 2,5 µg/mL não é possível determinar as concentrações precisamente, sendo este o LQ do método analítico.

4.1.6. Estabilidade

A estabilidade foi avaliada em três etapas: injetou-se as cinco diluições em duplicata imediatamente após o preparo da solução mãe (D_0); estas amostras já processadas foram reanalisadas após 24 horas de preparo e armazenamento a temperatura ambiente (RD_0); e pela injeção de cinco novas diluições preparadas 24 horas após o preparo da solução mãe (D_1).

Os resultados comparativos do erro relativo percentual entre as análises D_0 , RD_0 e D_1 estão demonstrados na Tabela 16.

Observando-se os resultados obtidos, pode-se notar que os erros relativos percentuais obtidos tanto intra-dia quanto inter-dia são maiores que 2% em pelo menos um nível de concentração para ambos os bioativos, indicando que as soluções mãe utilizadas apresentam uma degradação superior ao preconizado na RDC nº 166/17, sendo consideradas assim instáveis tanto pós processamento, quanto a curto prazo.

Por se tratar de bioativos altamente voláteis e propensos a oxidação, já se esperava instabilidade das soluções mãe, sendo necessário prepará-las sempre que uma nova análise for realizada.

Tabela 16: Erro relativo percentual referente a estabilidade das soluções mãe de eugenol e carvacrol na faixa linear do método (50 a 150 µg/mL) nos tempos D₀, RD₀ e D₁

Concentração teórica (µg/mL)	Eugenol					Carvacrol				
	Concentração experimental (µg/mL)			ER (%)		Concentração experimental (µg/mL)			ER (%)	
	D ₀	RD ₀	D ₁	Intra dia	Inter dia	D ₀	RD ₀	D ₁	Intra dia	Inter dia
50	51,35	53,05	60,82	3,32	18,45	53,17	54,38	55,05	2,27	3,52
75	76,77	77,56	82,39	1,04	7,32	77,56	79,32	80,78	2,27	4,15
100	99,30	103,79	113,43	4,52	14,24	105,52	109,63	108,49	3,89	2,81
125	128,32	134,01	139,78	4,44	8,93	131,53	138,27	141,35	5,12	7,46
150	145,23	155,03	173,46	6,75	19,44	153,51	160,67	166,54	4,66	8,49

ER- erro relativo expresso em porcentagem

Entretanto, valores mais elevados de erro relativo podem ser provenientes de erros aleatórios não inerentes ao método analítico, podendo ocorrer por instabilidade da rede elétrica no momento das análises, quedas de energia, uso de balões volumétricos diferentes no preparo das diluições, por mais que estejam calibrados e até mesmo por erro do analista no momento do preparo das diluições.

Considerando-se os resultados obtidos, pode-se concluir que o método analítico proposto permite a quantificação de eugenol e carvacrol com precisão e exatidão aceitáveis, além de corresponder a um método simples, sensível, realizado em um curto espaço de tempo, com reagentes de fácil aquisição e baixo custo, atendendo a todos os requisitos exigidos segundo a RDC nº166/17.

4.2. Determinação da concentração das formulações

Em um estudo anterior realizado por Oliveira *et al.* (2022), avaliou-se a eficácia *in vitro* do eugenol frente ao carrapato *R. sanguineus* e frente a pulga *C. felis felis*, podendo-se perceber que as pulgas são mais suscetíveis a ação do eugenol, visto que os carrapatos apresentam valores de concentração letal (CL₅₀) significativamente maiores.

Já em outro estudo realizado pela mesma equipe, mas este por Miranda (2022), avaliou-se a eficácia *in vitro* do eugenol, carvacrol e da associação destes frente a larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus*, observando-se que os adultos exigiram uma concentração maior de carvacrol quando comparado aos estágios imaturos.

Observando os resultados obtidos nos dois estudos, pode-se perceber que o eugenol e o carvacrol possuem atividade pulicida e acaricida, em que os carrapatos demandam uma maior concentração dos bioativos do que as pulgas.

Comparando-se os resultados pulicidas referentes ao eugenol, formulações contendo este bioativo seriam viáveis para o combate de pulgas adultas em concentrações inferiores a 10%. Contudo, considerando que as formulações a serem desenvolvidas visam o controle dos ectoparasitos em contato direto com o hospedeiro, e que esta deve possuir ação tanto carrapaticida quanto pulicida, definiu-se que os ativos devem ser incorporados nas formulações em uma concentração correspondente a 100.000 µg/mL, visto que esta foi a concentração requerida para controle de adultos de carrapatos, sendo eficaz também frente as pulgas.

Por mais que a concentração do bioativo tenha sido definida, a forma farmacêutica utilizada para veiculá-lo definirá sua porcentagem na formulação final, logo deve-se conhecer as particularidades destas. No caso da formulação sob a forma de *spray*, deve-se considerar o

número de jatos que devem ser borrifados no animal, assim como as formulações *spot-on* devem possuir o volume de aplicação definido para se atingir a ação desejada.

Considerando o volume de aplicação de cada formulação e sabendo-se da área corporal de um animal de aproximadamente 10 Kg ($0,5 \text{ m}^2$), pode-se estimar a concentração requerida na formulação final, como demonstrado na tabela 17.

Tabela 17: Estimativa da concentração dos bioativos eugenol e carvacrol nas formulações sob a forma de *spray* e *spot-on* para combate de *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus*

Ectoparasito	Bioativo	Concentração eficaz ($\mu\text{g/mL}$)**	Estimativa da concentração na formulação (%)
Pulga	Eugenol	1.200,00	1
Carapato	*	100.000,00	10

* referente tanto ao eugenol e carvacrol isolados, quanto em associação; ** responsável por 100% de mortalidade

Considerando-se que as formulações a serem desenvolvidas devem apresentar atividade tanto pulicida quanto carrapaticida, os bioativos devem apresentar uma concentração de 10% na formulação final. Vale ressaltar que as formulações podem conter excipientes em sua composição que auxiliem no aumento da sua ação antiparasitária, e que a concentração estimada já considera possíveis perdas durante o processo de administração da formulação.

4.3. Delineamento das pré-formulações

Para o desenvolvimento da formulação sob a forma de *spray*, partiu-se de uma formulação preliminar em que os excipientes possuíam funções que colaborariam para a estabilidade da formulação, como antioxidantes, quelantes, conservantes, entre outros. Inicialmente a formulação era composta pelos excipientes demonstrados anteriormente no item 3.2 “Desenvolvimento das formulações” (Tabela 4) e conforme incompatibilidades foram sendo observadas durante o processo, realizava-se a substituição do excipiente por outro de igual função, sendo suas respectivas concentrações ajustadas durante o delineamento (Tabela 18).

Tabela 18: Incompatibilidades dos excipientes utilizados no delineamento das pré-formulações A, B e C sob a forma de *spray*

A	B	C
BHT	BHT	BHT
Propilenoglicol	Propilenoglicol	Propilenoglicol
Tween 80	Tween 80	Tween 80
DMSO	DMSO	DMSO
PVA	Metabisulfito	EDTA
Nipagin	EDTA	Solução tampão pH 7,0
Nipasol	Álcool isopropílico	Álcool isopropílico
Álcool isopropílico		

BHT- hidroxitolueno butilado; Tween 80- polisorbato 80; PVA- álcool polivinílico; Nipagin-metilparabeno; Nipasol – propilparabeno; DMSO- dimetilsulfóxido; EDTA- ácido etilenodiamino tetra acético.

A- Incompatibilidade dos conservantes com o tensoativo, sendo feita a retirada dos conservantes visto que a formulação não teria água em sua composição, que pode ser uma fonte de microrganismos. Além disso, o PVA era insolúvel nos demais excipientes.

B- Metabissulfito e EDTA não solubilizaram nos demais excipientes. Então reduziu-se a concentração de ambos, adicionando solução tampão pH 7,0 para auxiliar no processo. Embora tenham solubilizado com o tampão, percebeu-se que o metabissulfito conferia um odor forte desagradável na formulação, sendo retirado.

Com isso, chegou-se a uma formulação base (Tabela 19), em que os excipientes são compatíveis, obtendo-se formulações límpidas, homogêneas e sem separação de fases quando deixadas em repouso e quando submetidas ao teste de centrifugação, sendo uma formulação promissora para a continuação do estudo.

Tabela 19: Excipientes compatíveis e suas respectivas concentrações para o desenvolvimento das pré-formulações sob a forma de *spray* (formulação base)

BHT	0,5 %
Tween 80	5 %
DMSO	2 %
EDTA dissódico	0,1 %
Tampão pH 7,0	10 %
Propilenoglicol	10 %
Álcool isopropílico	q.s.p.
BHT-hidroxitolueno butilado; Tween 80-polisorbato 80; EDTA- ácido etilenodiamino tetra acético; DMSO- dimetilsulfóxido; q.s.p.: quantidade suficiente para.	

Contudo, observou-se alguns pontos importantes como: solubilização inicial do BHT com o DMSO e do agente acidificante com a solução tampão, para posterior incorporação dos demais excipientes.

Segundo SONGKRO *et al.* (2012), a vanilina pode ser utilizada como um agente fixador em alguns produtos como perfumes, por exemplo, visto que age prolongando a atividade de uma formulação pela diminuição da volatilidade de seus componentes.

Com isso, preparou-se quatro formulações *spray* contendo 1% de eugenol, um componente altamente volátil, e diferentes concentrações de vanilina: 0 % (SP1), 2,5 % (SP2), 5 % (SP3) e 10 % (SP4), para observação tanto da compatibilidade do bioativo com os excipientes, quanto da ação fixadora da vanilina; e uma formulação contendo 7,5% de eugenol (SP5) sem vanilina em sua composição, conforme tabela 20.

Tabela 20: Composição das pré-formulações sob a forma de *spray*, contendo eugenol a 1 % e 7,5% com diferentes concentrações de vanilina

	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5
Eugenol	1%	1%	1%	1%	7,5%
BHT	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %
Tween 80	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %
DMSO	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %
EDTA dissódico	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
Tampão pH 7,0	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
Propilenoglicol	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
Vanilina	-	2,5%	5%	10%	-
Álcool isopropílico	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.

BHT-hidroxitolueno butilado; Tween 80- polisorbato 80; EDTA- ácido etilenodiamino tetra acético; DMSO- dimetilsulfóxido; q.s.p.: quantidade suficiente para 100%.

Após testes preliminares de estabilidade, observou-se que presença do bioativo e da vanilina não modificaram as características físico-químicas da formulação, visto que estas mantiveram-se homogêneas, límpidas, líquidas e sem precipitados, de modo que a única alteração observada foi na coloração, que pela presença do ativo passou a amarelada.

Quando submetida ao teste de centrifugação, não houve a formação de precipitados, nem de separação de fases, obtendo-se uma formulação com pH médio de $8,22 \pm 0,20$. Como trata-se de um estudo preliminar, não foi necessário ajustar o pH. A formulação apresentou escurecimento de sua coloração pela oxidação do bioativo quando exposto ao ciclo de aquecimento.

Contudo, ao realizar os testes de eficácia residual, notou-se que a vanilina não contribuiu para o aumento da eficácia residual *in vitro*, o que era esperado visto que a mesma é utilizada em muitas formulações devido a sua ação fixadora. Logo, optou-se por não prosseguir os testes com a vanilina na composição.

Com a obtenção de resultados promissores do *spray* SP1, decidiu-se prosseguir os testes averiguando a capacidade da formulação comportar uma concentração maior de ativo, pois é conhecido que por mais que os excipientes de uma formulação sejam compatíveis entre si e com o bioativo, a proporção e a concentração destes deve ser avaliada para evitar que o sistema sature e para garantir a completa incorporação do ativo. Esse aumento da concentração de ativo se deve ao fato da formulação contendo 1% de eugenol (SP1) possuir atividade pulicida, mas esta não perdura por muitos dias (não apresentando eficácia residual), além de não apresentar atividade frente a carapatos *R. sanguineus*.

Para isso, preparou-se uma nova formulação *spray* contendo 7,5 % de eugenol (SP5), que consistia em uma formulação límpida, líquida de coloração amarelada, sem presença de precipitados ou separação de fases, com pH médio de $7,16 \pm 0,19$. A mesma não apresentou alterações quando submetida a centrifugação, tendo somente uma alteração de coloração quando exposta a altas temperaturas (40°C).

Assim como na SP1, após alguns dias do preparo, houve formação de precipitado pela incompatibilidade do quelante utilizado (EDTA dissódico) com o pH obtido pela formulação. O precipitado formado foi observado 15 dias após o preparo das formulações, sendo resultado da presença do EDTA dissódico em uma formulação com pH alcalino, visto que o mesmo é compatível com formulações ácidas, cujo pH encontra-se abaixo de 7,0.

Embora a formulação SP5 tenha apresentado instabilidade, a mesma apresentou atividade pulicida como esperado e uma eficácia residual por aproximadamente 48 dias, permanecendo sem atividade carapaticida.

Devido a esta incompatibilidade, o EDTA dissódico foi substituído por ácido cítrico, que além de quelante é um acidificante, colaborando então para a redução do pH da formulação.

Quanto a formulação *spot-on*, seguiu-se o mesmo raciocínio utilizado para a formulação *spray*, observando-se algumas incompatibilidades como relatado na tabela 21, a seguir.

Tabela 21: Incompatibilidades dos excipientes utilizados no delineamento das pré-formulações A, B, C e D sob a forma de *spot-on*

A	B	C	D
BHT	BHT	BHT	BHT
Cocoaminopropil betaína	Cocoaminopropil betaína	Cocoaminopropil betaína	Triton
DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
Álcool cetoestearílico	Álcool cetoestearílico	Álcool cetoestearílico	Álcool cetoestearílico
Álcool isopropílico	Óleo mineral	Propilenoglicol	Óleo de semente de uva
BHT- hidroxitolueno butilado; DMSO- dimetilsulfóxido.			

- A- formulação fluida, não apresentando viscosidade suficiente para ser classificada como *spot-on*.
- B- Formulação altamente viscosa e com sensorial gorduroso pela presença do óleo mineral.
- C- Observou-se separação de fases pela incompatibilidade da cocoaminopropil betáína com o álcool cetoestearílico. Optou-se pela retirada da cocoaminopropil betáína.
- D- Formação de gotículas pela presença do triton e separação de fases pela presença do óleo de semente de uva.

Pelo grande número de incompatibilidades, optou-se por prosseguir com a formulação *spot-on* tendo como base a formulação *spray*, partindo-se da formulação preliminar proposta na tabela 5, descrita anteriormente no item 3.2, visto que já se tinha garantia da compatibilidade de seus excipientes.

Finalizada esta etapa, conseguiu-se determinar os excipientes a serem utilizados para o desenvolvimento das formulações sob a forma de *spray* e *spot-on* para posteriores análises físico-químicas e de eficácia residual *in vitro*.

4.3.1. Desenvolvimento da formulação sob a forma de *spray*

Conhecendo a concentração necessária de cada bioativo para se obter uma formulação com a atividade pulicida e acaricida desejada, como mostrado no item 4.2, preparou-se as formulações *spray* contendo eugenol (SE), carvacrol (SC) e uma associação de ambos (SCE), todas contendo 10 % dos respectivos bioativos, conforme demonstrado na tabela abaixo (Tabela 22).

Tabela 22: Composição da formulação final sob a forma de *spray* contendo eugenol (SE), carvacrol (SC) e associação de ambos (SCE)

	SE	SC	SCE
Eugenol	10 %	-	10 %
Carvacrol	-	10 %	10 %
BHT	0,5 %	0,5 %	0,5 %
Tween 80	5 %	5 %	5 %
DMSO	2 %	2 %	2 %
Ácido cítrico	0,3 %	0,3 %	0,3 %
Tampão pH 7,0	10 %	10 %	10 %
Propilenoglicol	10 %	10 %	10 %
Álcool isopropílico	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.

BHT- hidroxitolueno butilado; Tween 80- polisorbato 80; DMSO- dimetilsulfóxido; q.s.p.: quantidade suficiente para; - ausente na formulação.

A escolha destes componentes confere as características necessárias a formulação desejada, considerando-se inclusive a viscosidade requerida para a aplicação da formulação tópica de um *spray*, que deve ser fluida o suficiente para poder ser vaporizada (borrifada).

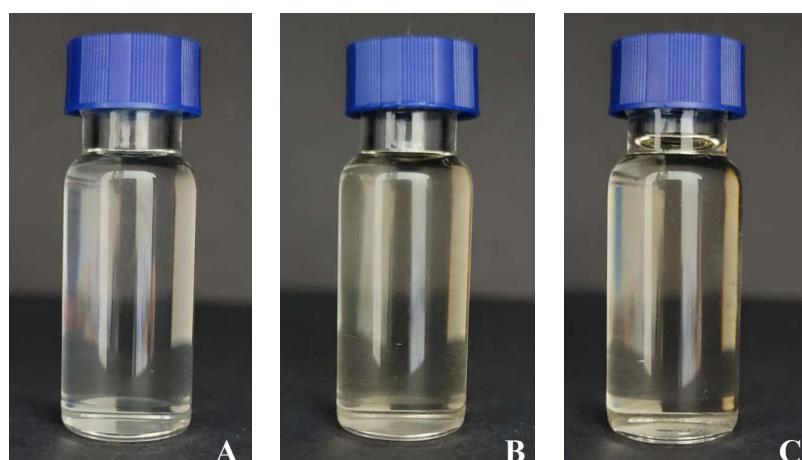
Os *sprays* desenvolvidos apresentaram as características dispostas na tabela a seguir (Tabela 23).

Tabela 23: Resultados obtidos após realização dos testes de caracterização fisico-química, estabilidades preliminar e acelerada e quantificação dos bioativos das formulações sob a forma de *spray* contendo carvacrol (SC), eugenol (SE) e associação de ambos (SCE)

	SC	SE	SCE
Aspecto	Coloração levemente amarelada	Coloração amarela	Coloração amarela mais intensa
Centrifugação	Sem precipitação ou separação de fases		
Ciclo	Leve escurecimento		
pH	6,40 ± 0,10	6,81 ± 0,06	6,61 ± 0,08
Teor	95,42 %	94,29 %	94,20 % para eugenol 95,04 % para carvacrol

Todas as formulações sob a forma de *spray* consistiram em formulações líquidas límpidas, homogêneas, sem precipitados, translúcidas, conforme ilustrado na figura 22. Todas as formulações *sprays* tiveram seu pH ajustado com trietilamina 10% para alcançar um valor de pH dentro da faixa ideal para aplicação tópica em animais, que corresponde a faixa de 5,5 a 7,0.

Figura 22: Ilustração das formulações sob a forma de *spray* contendo carvacrol (SC), eugenol (SE) e associação de ambos (SCE)



A- formulação *spray* contendo carvacrol (SC); B- formulação *spray* contendo eugenol (SE); C- formulação *spray* contendo associação de eugenol e carvacrol (SCE).

O escurecimento observado quando submetidas ao teste de ciclo de congelamento e aquecimento, ocorreu após exposição ao ciclo de aquecimento a 40°C, e ocorre devido a oxidação dos bioativos quando submetidos a elevadas temperaturas.

As formulações foram avaliadas nos primeiros cinco dias consecutivos pós preparo, depois a cada 15 dias até completar três meses, mantendo-se com as mesmas características de quando preparadas, sem precipitação, homogêneas, translúcidas e sem mudança de coloração. Quanto as diferentes formas de armazenamento, não foi observada diferença nas características entre as formulações armazenadas em frascos âmbar e transparentes.

As formulações sob a forma de *spray* foram analisadas por CLAE-UV, segundo o método desenvolvido e validado. A faixa de teor permitida para cada ativo em uma formulação é determinada segundo sua monografia, que está disposta na Farmacopeia Brasileira, entretanto, os bioativos utilizados não possuem monografia descrita. Logo será adotado a faixa permitida para a maioria dos ativos descritos na Farmacopeia, que compreende teores entre 90% e 110%. Assim, pode-se perceber que todas as formulações sob a forma de *spray* possuem seus

respectivos bioativos em concentrações dentro da faixa de variação permitida e de acordo com o esperado para atividade pulicida e carrapaticida.

4.3.2. Desenvolvimento de um sistema emulsionado

Após a definição dos componentes do sistema emulsionado e sabendo-se a proporção de cada um conforme descrito anteriormente, preparou-se as nove combinações para posterior titulação com água destilada e construção do diagrama pseudoternário de fases.

Todo o estudo foi realizado tanto para o eugenol (ME) e carvacrol (MC) como para a associação destes (MCE). As proporções gerais detalhadas encontram-se na Tabela 24, enquanto as porcentagens reais após a titulação estão descritas nas tabelas 25, 26 e 27.

Tabela 24: Combinação detalhada geral dos excipientes para determinação da região de microemulsão

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Ativo	72	64	56	48	40	32	24	16	8
PPG	18	16	14	12	10	8	6	4	2
Tween 80	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Span 20	5	10	15	20	25	30	35	40	45

PPG – propilenoglicol; proporções expressas em %.

As titulações foram realizadas com alíquotas de 20 µL de água destilada até o ponto de turvação, com agitação constante. Durante esse processo, percebeu-se que a última proporção analisada, 10:90, apresenta-se altamente viscosa pela alta concentração de tensoativos, o que dificultava sua completa homogeneização durante a adição das alíquotas de água. Esta observação associada ao fato das microemulsões não serem sistemas com elevada viscosidade, fizeram com que a proporção 10:90 fosse desconsiderada do estudo.

Finalizada as titulações, deve-se determinar a concentração de água que cada combinação comporta sem turvar. Para isso, desconsiderou-se o último ponto da titulação, aquele em que houve turvação, visto que no ponto anterior o sistema ainda se apresentava translúcido. Sendo assim, obteve-se os seguintes resultados (Tabela 25, 26 e 27).

Tabela 25: Porcentagens reais de cada componente nas nove combinações testadas, para construção do diagrama pseudoternário de fases para o eugenol (ME)

Proporção	Fase oleosa (%)	Co-solvente (%)	Tensoativo* (%)	Água (%)
90:10	67,42	16,85	9,36	6,37
80:20	59,48	14,87	18,58	7,06
70:30	52,63	13,16	28,20	6,02
60:40	45,11	11,28	37,60	6,02
50:50	37,74	9,43	47,16	5,66
40:60	29,74	7,43	55,76	7,06
30:70	22,39	5,60	65,30	6,72
20:80	14,71	3,68	73,52	8,09
10:90	5,83	1,46	65,60	27,11

*Mistura de tensoativos- Tween 80: Span 20 (1:1).

Tabela 26: Porcentagens reais de cada componente nas nove combinações testadas, para construção do diagrama pseudoternário de fases para o carvacrol (MC)

Proporção	Fase oleosa (%)	Co-solvente (%)	Tensoativo* (%)	Água (%)
90:10	67,67	16,92	9,40	6,02
80:20	61,30	15,33	19,16	4,21
70:30	54,05	13,51	28,96	3,47
60:40	46,51	11,63	38,76	3,10
50:50	39,22	9,80	49,02	1,96
40:60	31,37	7,84	58,82	1,96
30:70	23,53	5,88	68,62	1,96
20:80	15,15	3,79	75,76	5,30
10:90	7,49	1,87	84,26	6,37

*Mistura de tensoativos- Tween 80: Span 20 (1:1).

Tabela 27: Porcentagens reais de cada componente nas nove combinações testadas, para construção do diagrama pseudoternário de fases para a associação dos bioativos eugenol e carvacrol (MCE)

Proporção	Fase oleosa (%)	Co-solvente (%)	Tensoativo* (%)	Água (%)
90:10	67,42	16,85	9,36	6,37
80:20	60,38	15,09	18,86	5,66
70:30	53,64	13,41	28,74	4,21
60:40	46,34	11,58	38,62	3,47
50:50	38,92	9,73	48,64	2,72
40:60	31,02	7,75	58,14	3,10
30:70	22,82	5,70	66,54	4,94
20:80	15,04	3,76	75,18	6,02
10:90	7,34	1,83	82,42	8,42

Fase oleosa- eugenol:carvacrol (1:1); *mistura de tensoativos- Tween 80: Span 20 (1:1).

Após a determinação das proporções adequadas de cada componente, pode-se construir o diagrama pseudoternário de fases, que permite a caracterização da região de uma microemulsão, pela identificação das regiões límpidas e homogêneas.

Os diagramas estão representados a seguir (Figuras 23 a 25).

Figura 23: Diagrama pseudoternário de fases do sistema emulsionado contendo eugenol (ME)

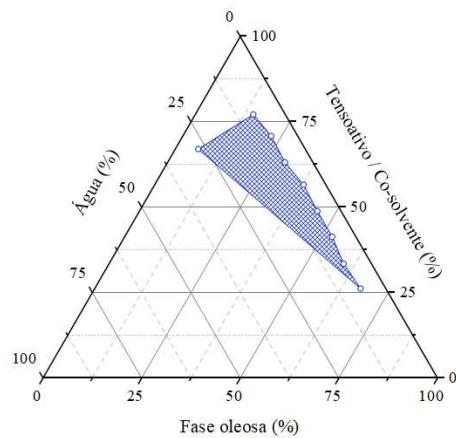


Figura 24: Diagrama pseudoternário de fases do sistema emulsionado contendo carvacrol (MC)

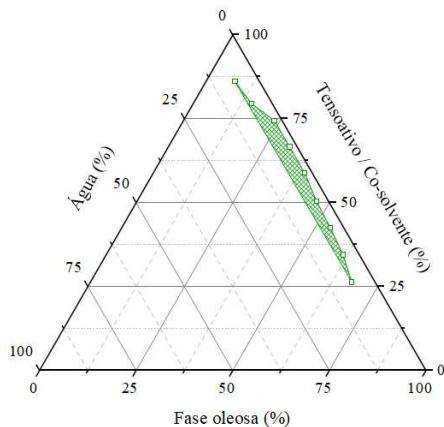
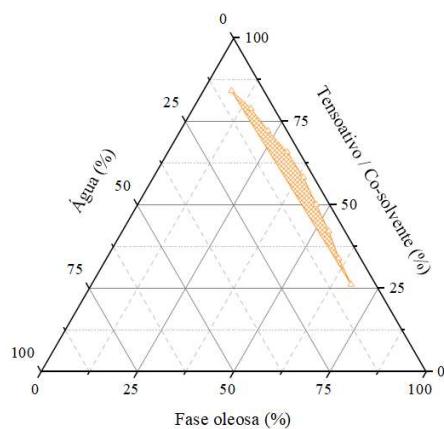


Figura 25: Diagrama pseudoternário de fases do sistema emulsionado contendo associação de eugenol e carvacrol (MCE)



Todos os componentes utilizados para o desenvolvimento do sistema emulsionado, como das formulações são seguros para aplicação tópica em animais e apresentam baixa toxicidade. No entanto, é possível perceber que quanto maior a concentração de água que o sistema comporta, menor é a concentração do ativo em sua composição, o que reduz a possibilidade de toxicidade da formulação desenvolvida.

Sabendo-se disto, para o prosseguimento dos ensaios, optou-se pelos pontos capazes de comportar um volume maior de água sem que haja turvação, buscando por pontos em comum nas análises realizadas, se possível. Além disso, os sistemas emulsionados são formulações intermediárias, sendo preparadas para compor uma formulação final, e neste caso, os sistemas emulsionados serão incorporados em formulações sob a forma de *spot-on* em que a concentração dos bioativos, seja isoladamente ou em associação, devem estar a 10 %. Sendo assim, também se considerou a concentração dos bioativos nos sistemas emulsionados para garantir que a formulação *spot-on* possuirá a concentração desejada.

Observando a concentração de água em cada sistema, optou-se por prosseguir os ensaios com as proporções 90:10 e 20:80 para MC e ME, e com as proporções 90:10 e 70:30 para MCE, visto que a proporção 20:80 apresentava uma concentração inferior a 10% de cada ativo.

Assim, preparou-se novos sistemas emulsionados, seguindo as proporções acima listadas, obtendo-se três formulações intermediárias límpidas, translúcidas, sendo a MC de coloração levemente amarelada, enquanto as microemulsões ME e MCE apresentaram coloração amarelada um pouco mais intensa que MC. Esses sistemas emulsionados foram deixados em agitação por duas horas, para posterior incorporação na formulação *spot-on* e

análise de tamanho de gotícula e índice de polidispersão. Após a incorporação do sistema emulsionado, obteve-se as formulações sob a forma de *spot-on* de carvacrol (PMC), de eugenol (PME) e associação de ambos (PMCE).

4.3.3. Desenvolvimento da formulação sob a forma de *spot-on*

Após o delineamento inicial e observação das incompatibilidades, decidiu-se partir da mesma formulação base do *spray* com algumas substituições. Pode-se perceber que houve substituição do veículo, visto que a formulação *spray* deve possuir uma consistência mais líquida para poder ser vaporizada (borrifada), enquanto o *spot-on* deve possuir uma certa viscosidade capaz de se espalhar sobre o dorso do animal sem ficar contida apenas no local de administração, permitindo a ocorrência do fenômeno de translocação dérmica para absorção dos bioativos (RIVIERE; PAPICH, 2018), sem apresentar grande fluidez de modo a escorrer livremente sob o corpo do animal.

Um dos veículos escolhidos inicialmente foi a carboximetilcelulose de média viscosidade (CMC), visto que conferiu a viscosidade desejada ao placebo do *spot-on*, além de apresentar estabilidade e as características físico-químicas requeridas. Contudo, ao incorporar os bioativos (eugenol e carvacrol), percebeu-se uma incompatibilidade destes com o veículo, pela formação de um sistema heterogêneo.

Visto que o propilenoglicol já seria utilizado na formulação como umectante e que este possui certa viscosidade, o mesmo foi eleito como veículo desta formulação.

Como dito anteriormente, a escolha dos excipientes e suas concentrações varia de acordo com as características que se deseja na formulação final. Deste modo, adicionou-se o PVP, como agente filmogênico, responsável por criar uma camada da formulação sobre a pele do animal, em que o bioativo fica fixado por mais tempo, exercendo sua atividade gradualmente e o etanol como co-solvente para auxiliar na solubilização do PVP.

Dito isto, preparou-se formulações *spot-on* contendo eugenol a 10% (PE), carvacrol a 10% (PC) e uma associação de ambos a 10% cada (PCE), conforme mostrado abaixo na tabela 28.

Tabela 28: Composição da formulação final sob a forma de *spot-on* contendo eugenol (PE), carvacrol (PC) e associação de ambos (PCE)

	PE	PC	PCE
Eugenol	10 %	-	10 %
Carvacrol	-	10 %	10 %
BHT	0,5 %	0,5 %	0,5 %
Tween 80	5 %	5 %	5 %
DMSO	2 %	2 %	2 %
Ácido cítrico	0,3 %	0,3 %	0,3 %
Etanol	10 %	10 %	10 %
PVP	5 %	5 %	5 %
Propilenoglicol	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.

BHT- hidroxitolueno butilado; Tween 80- polisorbato 80; DMSO- dimetilsulfóxido; PVP- polivinilpirrolidona; q.s.p.: quantidade suficiente para; - ausente na formulação

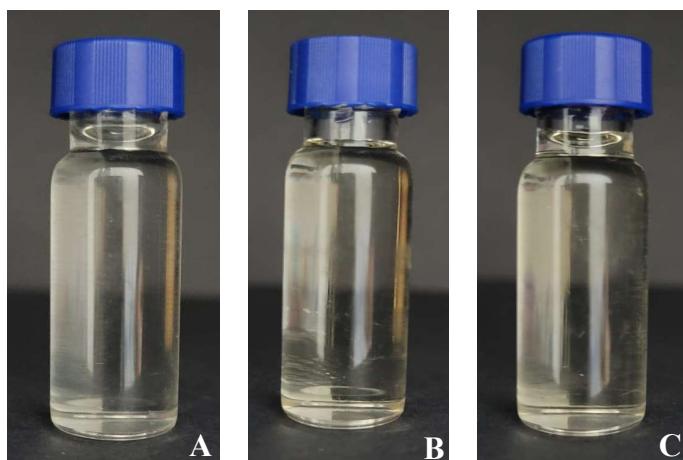
As formulações *spot-on* desenvolvidas apresentaram as características dispostas na tabela 29.

Tabela 29: Resultados obtidos após realização dos testes de caracterização fisico-química, estabilidades preliminar e acelerada e quantificação dos bioativos das formulações sob a forma de *spot-on* contendo carvacrol (PC), eugenol (PE) e associação de ambos (PCE)

	PC	PE	PCE
Aspecto	Coloração levemente amarelada	Coloração amarelada mais intensa	Coloração amarelada
Centrifugação	Sem precipitação ou separação de fases		
Ciclo	Sem alteração		
pH	6,27 ± 0,15	6,36 ± 0,10	6,00 ± 0,09
Teor	104,71 %	90,04 %	104,64 % para eugenol 104,25% para carvacrol

Todas as formulações sob a forma de *spot-on* consistiram em formulações líquidas translúcidas levemente viscosas, homogêneas, sem precipitados ou partículas em suspensão, conforme ilustrado na figura 26.

Figura 26: Ilustração das formulações sob a forma de *spot-on* contendo carvacrol (PC), eugenol (PE) e associação de ambos (PCE)



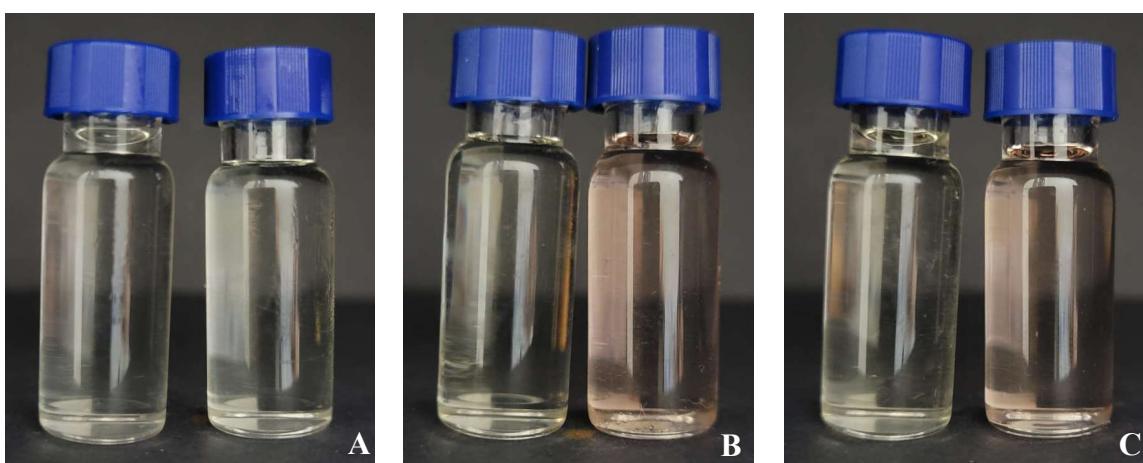
A- formulação *spot-on* contendo carvacrol (PC); B- formulação *spot-on* contendo eugenol (PE); C- formulação *spot-on* contendo associação de eugenol e carvacrol (PCE).

Assim como nas formulações sob a forma de *spray*, todas tiveram seu pH ajustado com solução de trietilamina a 10% para atingirem o pH ideal para aplicação tópica em animais, que corresponde a faixa entre 5,5 e 7,0.

Diferentemente das formulações *spray*, quando submetidas ao teste de ciclo de congelamento/aquecimento, todas as formulações permaneceram com a coloração de quando preparadas, sem escurecimento mesmo quando expostas a elevadas temperaturas.

As formulações foram avaliadas nos primeiros 5 dias consecutivos pós pregar, depois a cada 15 dias até completar três meses. Percebeu-se que as formulações contendo eugenol, PE e PCE, oxidaram após 60 dias, possuindo uma coloração levemente rosada; enquanto a formulação PC permaneceu com a coloração inicial, podendo-se perceber que o eugenol é mais suscetível a oxidação do que o carvacrol (Figura 27). O mesmo foi notado em ambas as formas de armazenamento. Além disso, passados 10 dias do pregar, notou-se a presença de gotículas nas formulações PC e PE que se incorporavam após agitação, conferindo a PE opacidade, enquanto a PC permanecia translúcida.

Figura 27: Comparativo das formulações sob a forma de *spot-on* contendo carvacrol (PC), eugenol (PE) e associação de ambos (PCE) com efeito do processo oxidativo após 60 dias de armazenamento em geladeira



A- formulação *spot-on* contendo carvacrol (PC); B- formulação *spot-on* contendo eugenol (PE); C- formulação *spot-on* contendo associação de eugenol e carvacrol (PCE).

À esquerda- formulação após preparo; À direita- formulação após armazenamento por 60 dias em geladeira.

Como já mencionado, não há uma monografia descrita na Farmacopeia com o indicativo da faixa de teor permitida para os bioativos eugenol e carvacrol, considerando-se então a faixa de 90 a 110%, de modo que todas as formulações sob a forma de *spot-on* analisadas apresentaram teores aceitáveis e dentro do preconizado, podendo prosseguir para os testes de eficácia residual *in vitro*.

4.3.4. Desenvolvimento das formulações sob a forma de *spot-on* a partir do sistema emulsionado

Diferentemente do *spot-on* anterior, em que o bioativo era adicionado diretamente na formulação, neste caso os bioativos foram incorporados a formulação por meio da adição do sistema emulsionado. Para isso, após adição dos demais excipientes na formulação, transferiu-se um volume do sistema emulsionado correspondente a concentração desejada de cada ativo (10%). Assim, preparou-se as formulações *spot-on* pela incorporação do sistema emulsionado de carvacrol (PMC), de eugenol (PME) e da associação de ambos (PMCE) como mostrado na tabela 30.

Tabela 30: Composição da formulação final sob a forma de *spot-on* a partir da incorporação do sistema emulsionado de eugenol (PME), de carvacrol (PMC) e associação de ambos (PMCE)

	PME	PMC	PMCE
ME	10 %*	-	-
MC	-	10 %*	-
MCE	-	-	10 %*
BHT	0,5 %	0,5 %	0,5 %
Tween 80	5 %	5 %	5 %
DMSO	2 %	2 %	2 %
Ácido cítrico	0,3 %	0,3 %	0,3 %
Etanol	10 %	10 %	10 %
PVP	5 %	5 %	5 %
Propilenoglicol	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.

*quantidade suficiente para 10 % de cada ativo; BHT- hidroxitolueno butilado; Tween 80- polisorbato 80; DMSO- dimetilsulfóxido; PVP- polivinilpirrolidona; q.s.p.: quantidade suficiente para 100%;

ME- sistema emulsionado de eugenol; MC- sistema emulsionado de carvacrol; MCE- sistema emulsionado com associação de eugenol e carvacrol; - ausente na formulação.

Os resultados obtidos referentes as formulações *spot-on* desenvolvidas a partir da incorporação do sistema emulsionado estão dispostos na tabela seguinte (Tabela 31).

Tabela 31: Resultados obtidos após realização dos testes de caracterização físico-química, estabilidades preliminar e acelerada e quantificação dos bioativos das formulações sob a forma de *spot-on* a partir do sistema emulsionado contendo carvacrol (PMC), eugenol (PME) e associação de ambos (PMCE)

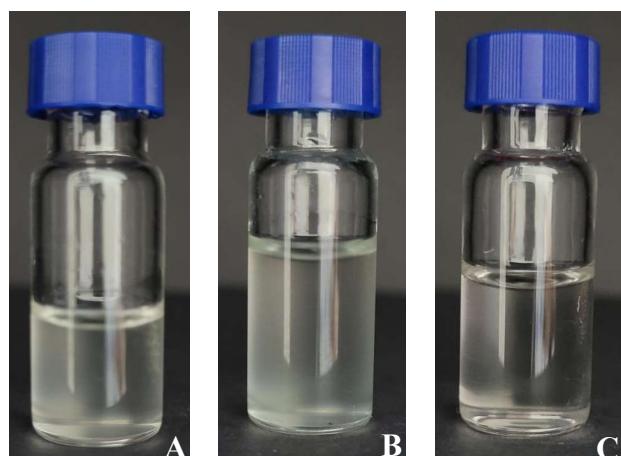
	PMC	PME	PMCE
Aspecto	Coloração levemente amarelada e opaca	Coloração amarela mais intensa e opaca	Coloração amarelada translúcida
Centrifugação	Sem precipitação ou separação de fases		
Ciclo	Sem alteração		
pH	5,80 ± 0,14	6,45 ± 0,25	6,23 ± 0,07
Teor	97,32%	107,82%	104,65% para eugenol 105,58 % para carvacrol

As formulações *spot-on* desenvolvidas consistiram em formulações líquidas, com média viscosidade, homogêneas, sem precipitados ou partículas em suspensão. As formulações PMC e PME apresentavam opacidade, enquanto a formulação PMCE encontrava-se translúcida, conforme mostrado abaixo (Figura 28).

Quando submetidas ao processo de centrifugação a 3000 rpm e 3800 rpm, por 30 minutos e cinco horas, respectivamente, as mesmas permaneceram inalteradas, sem separação de fases ou precipitação. Também não houve alteração de coloração quando submetidas ao ciclo de congelamento e aquecimento, igualmente ao observado nas formulações PC, PE e PCE.

Todas as formulações tiveram seu pH ajustado com trietilamina 10 %, e mesmo apresentando variações entre os valores de pH das formulações, todos estão dentro da faixa adequada para aplicação tópica.

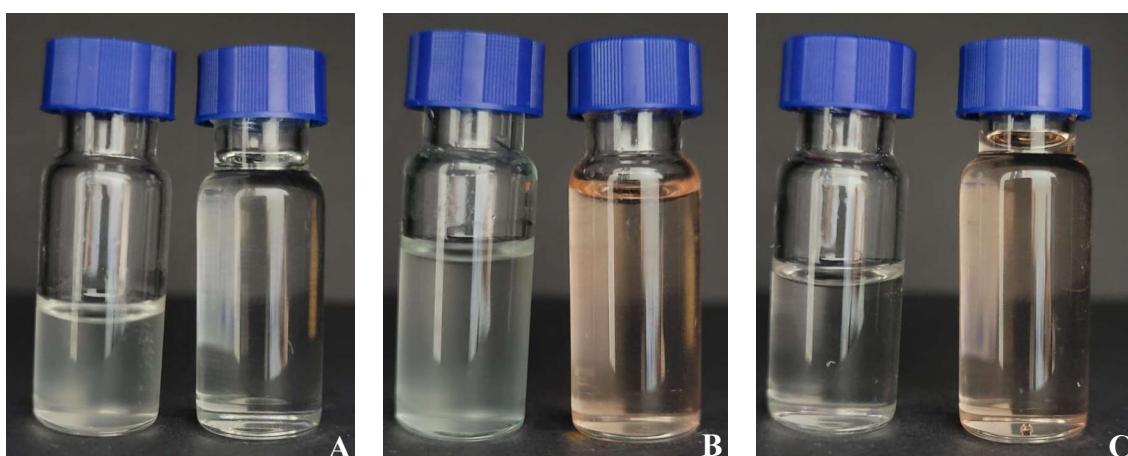
Figura 28: Ilustração das formulações sob a forma de *spot-on* a partir da incorporação de microemulsão contendo carvacrol (PMC), eugenol (PME) e associação de ambos (PMCE)



A- formulação *spot-on* contendo microemulsão de carvacrol (PMC); B- formulação *spot-on* contendo microemulsão de eugenol (PME); C- formulação *spot-on* contendo microemulsão de eugenol e carvacrol (PCE).

As formulações foram avaliadas nos primeiros cinco dias consecutivos pós preparo, depois a cada 15 dias até completar três meses. Percebeu-se que as formulações contendo eugenol, PME e PMCE, apresentaram mudança de coloração após 45 dias, adquirindo uma coloração levemente rosada, por conta da oxidação do eugenol; a formulação PMC permaneceu com a coloração inicial, mostrando novamente que o eugenol é mais suscetível a oxidação do que o carvacrol (Figura 29).

Figura 29: Comparativo das formulações sob a forma de *spot-on* a partir da incorporação de microemulsão contendo carvacrol (PC), eugenol (PE) e associação de ambos (PCE) com efeito do processo oxidativo após 60 dias de armazenamento em geladeira



A- formulação *spot-on* contendo microemulsão de carvacrol (PMC); B- formulação *spot-on* contendo microemulsão de eugenol (PME); C- formulação *spot-on* contendo microemulsão de eugenol e carvacrol (PMCE). À esquerda- formulação após preparo; À direita- formulação após armazenamento por 60 dias em geladeira.

Após a quantificação das formulações, todos teores encontravam-se dentro da faixa permitida e definida de acordo com outras monografias presentes na Farmacopeia Brasileira, prosseguindo então para os bioensaios *in vitro*.

4.3.4.1. Análise de tamanho de gotícula e índice de polidispersão

As análises de tamanho de gotícula e de índice de polidispersão foram realizadas a partir das formulações finais PMC, PME e PMCE, visto que o sistema emulsionado seria utilizado como formulação intermediária e estão demonstradas nas tabelas 32, 33 e 34.

Tabela 32: Tamanho de gotícula e índice de polidispersão da formulação sob a forma de *spot-on* a partir da incorporação do sistema emulsionado contendo eugenol (PME) após 2 horas de agitação

Proporção	Tamanho de gotícula médio (nm)	DP	DPR	Índice de polidispersão médio	DP	DPR
90:10	486,14	158,17	32,54	0,27	0,15	55,38
20:80	582,03	50,98	8,76	0,20	0,12	60,83

DP- desvio padrão, DPR- desvio padrão relativo

Tabela 33: Tamanho de gotícula e índice de polidispersão da formulação sob a forma de *spot-on* a partir da incorporação do sistema emulsionado contendo carvacrol (PMC) após 2 horas de agitação

Proporção	Tamanho de gotícula médio (nm)			Índice de polidispersão médio		
		DP	DPR		DP	DPR
90:10	355,67	164,24	46,18	0,29	0,08	28,77
20:80	478,40	168,55	35,23	0,30	0,17	57,46

DP- desvio padrão, DPR- desvio padrão relativo

Tabela 34: Tamanho de gotícula e índice de polidispersão da formulação sob a forma de *spot-on* a partir da incorporação do sistema emulsionado contendo associação dos bioativos eugenol e carvacrol (PMCE) após 2 horas de agitação

Proporção	Tamanho de gotícula médio (nm)			Índice de polidispersão médio		
		DP	DPR		DP	DPR
90:10	310,38	36,99	11,92	0,27	0,10	38,09
30:70	496,24	218,49	44,03	1,35	0,67	49,63

DP- desvio padrão, DPR- desvio padrão relativo

Pode-se perceber que todas as análises realizadas apresentaram um tamanho de gotícula menor na proporção de 90:10, sendo de 486,14 nm, 355,67 nm e 310,38 nm para PME, PMC e PMCE respectivamente. Pode-se perceber também que a formulação PME apresentou um tamanho de gotícula superior, sendo o menor valor referente a PMCE.

Como dito anteriormente, antes do processo de incorporação do sistema emulsionado, o mesmo possuía um aspecto translúcido, sem turvação, assim como a formulação *spot-on*. Contudo, percebeu-se que no momento da sua incorporação ao *spot-on*, a formulação final PME e PMC adquiriram um aspecto turvo, e isto está diretamente relacionado com o tamanho de gotícula do sistema emulsionado.

Ainda há muita discordância quanto a faixa de tamanho de gotícula que caracteriza e difere uma microemulsão de uma nanoemulsão, visto que muitos pesquisadores acabam se referindo a microemulsão de uma maneira mais abrangente, compreendendo valores na faixa de 10 – 500 nm (FERREIRA, 2019; OTONI, 2016). Contudo, alguns estudos discriminam com mais especificidade essa faixa de trabalho, referindo-se as microemulsões como aquelas que possuem um tamanho de até 100 nm (BEDIN, 2011; FERREIRA, 2011; SILVA, 2013; MOURA *et al.*, 2019; GARAVAND *et al.*, 2021; MARIYATE; BERA, 2022), e nanoemulsão quando este tamanho varia entre 100 e 500 nm (FERREIRA, 2011; MARIYATE; BERA, 2022). Há ainda quem defina que uma microemulsão deve apresentar até 10 nm (SHETH *et al.*, 2020), enquanto na nanoemulsão esta faixa pode ser entre 20 – 500 nm (MOURA *et al.*, 2019) ou de 100-1000 nm (BEDIN, 2011).

Atualmente já se sabe que a caracterização de um micro/nanoemulsão vai além do tamanho de gotícula, visto que esta faixa é sobreposta, devendo-se avaliar outros fatores. Quanto ao tamanho, embora ainda não definido com unanimidade, formulações com gotículas de até 200 nm adquirem aspecto translúcido, enquanto aquelas com gotículas maiores que 200 nm adquirem aspecto leitoso, turvo. Além disso microemulsões são estáveis termodinamicamente e uma elevada concentração de tensoativos; enquanto as nanoemulsões são estáveis cineticamente e instáveis termodinamicamente, possuindo uma menor concentração de tensoativos. Tanto as microemulsões quanto as nanoemulsões apresentam baixa viscosidade (BEDIN, 2011; FERREIRA, 2019).

Embora se tenha divergências quanto a faixa de tamanho dos sistemas emulsionados, pode-se perceber algumas similaridades entre alguns autores e, portanto, o presente trabalho irá

adotar a faixa de 10 – 500 nm para caracterizar uma microemulsão; somado as características observadas visualmente, como opacidade e translucidez e ao método de obtenção.

Quando comparamos estas informações com os resultados obtidos, podemos propor que o sistema obtido consiste em uma microemulsão com tamanho dentro da faixa adotada, aspecto turvo, e no caso da proporção 90:10, apresentam uma concentração baixa de tensoativos. Contudo as demais microemulsões estão dentro da faixa aceitável e indicativa de sistema monodispersos.

A fim comparativo, preparou-se uma nova ME na proporção de 90:10, 60:40 e 20:80, deixando a mesma em agitação por 15 horas. Esta foi incorporada a formulação *spot-on* (PME) para avaliação da influência do tempo de agitação no tamanho de gotícula, encontrando-se os seguintes resultados (Tabela 35).

Tabela 35: Tamanho de gotícula e índice de polidispersão das formulações sob a forma de *spot-on* a partir da incorporação do sistema emulsionado contendo eugenol (PME) após 15 horas de agitação

Proporção	Tamanho de gotícula (nm)	Índice de polidispersão
90:10	64,25	0,1304
60:40	464,30	3,1430
20:80	97,91	0,1684

Segundo o descrito na literatura, microemulsões são formadas espontaneamente, enquanto as nanoemulsões precisam da aplicação de uma força externa. Contudo, é possível perceber que mantendo-se a agitação por um período de 15 horas, nas proporções de 90:10 e 20:80 obteve-se microemulsões translúcidas, com tamanho de gotícula inferiores a 100 nm com índice de polidispersão inferiores a 0,3.

Já a proporção 60:40 obteve-se uma microemulsão, com tamanho entre 100 e 500 nm, mas com índice de polidispersão superior a 0,3, indicativo de um sistema polidisperso.

Pelos resultados até aqui obtidos e por questões de estabilidade e menor tempo de agitação, somente as formulações com microemulsões na proporção de 90:10 prosseguiram para os testes *in vitro*.

4.3.4.2. Condutividade elétrica

Uma das maneiras para caracterizar uma microemulsão como óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) consiste na determinação da condutividade do sistema microemulsionado. Para isso, realiza-se uma comparação da condutividade fase aquosa, neste caso a água, e da condutividade da fase oleosa, ou seja, eugenol e carvacrol, com aquela obtida pelas formulações sob a forma de *spot-on*.

Se o valor encontrado for mais próximo da condutividade da água, tem-se uma microemulsão O/A, mas se este for próximo a condutividade da fase oleosa, tem-se uma microemulsão A/O, caracterizada por uma fase externa composta por um domínio oleoso. Os valores de condutividade estão descritos na tabela 36 abaixo:

Tabela 36: Condutividade elétrica das formulações sob a forma de *spot-on* contendo eugenol (PME), carvacrol (PMC) e associação de ambos (PMCE) após 2 horas de agitação

Condutividade média ± DP	
PMC	1,565 ± 0,18
PME	1,218 ± 0,06
PMCE	1,167 ± 0,23
Água	0,374 ± 0,12
DP- desvio padrão	

Embora não tenha sido possível realizar a leitura da condutividade do eugenol e do carvacrol, visto que o condutivímetro não retornava nenhum valor, é possível notar que a condutividade das formulações é significativamente maior do que aquele apresentada pela água, aproximando-se da condutividade dos bioativos, podendo-se sugerir que se trata de um sistema A/O, em que se tem gotículas de água dispersas em óleo. Entretanto, vale ressaltar que a análise foi realizada na formulação final, em que as microemulsões estavam dispersas em propilenoglicol, que é um componente oleoso.

4.3.4.3. Índice de refração

Quanto ao índice de refração, o mesmo é realizado semelhantemente a condutividade, indicando se a microemulsão corresponde a um sistema A/O ou O/A, pela comparação dos resultados obtidos das microemulsões com a fase aquosa e a fase oleosa (bioativos), obtendo-se os resultados a seguir (Tabela 37).

Tabela 37: Índice de refração das formulações sob a forma de *spot-on* contendo eugenol (PME), carvacrol (PMC) e associação de ambos (PMCE) após 2 horas de agitação

IR ± DP	
Água	1,333 ± 0,15
Eugenol	1,494 ± 0,26
Carvacrol	1,487 ± 0,22
PMC	1,489 ± 0,03
PME	1,496 ± 0,07
PMCE	1,495 ± 0,16
DP- desvio padrão; IR- Índice de refração	

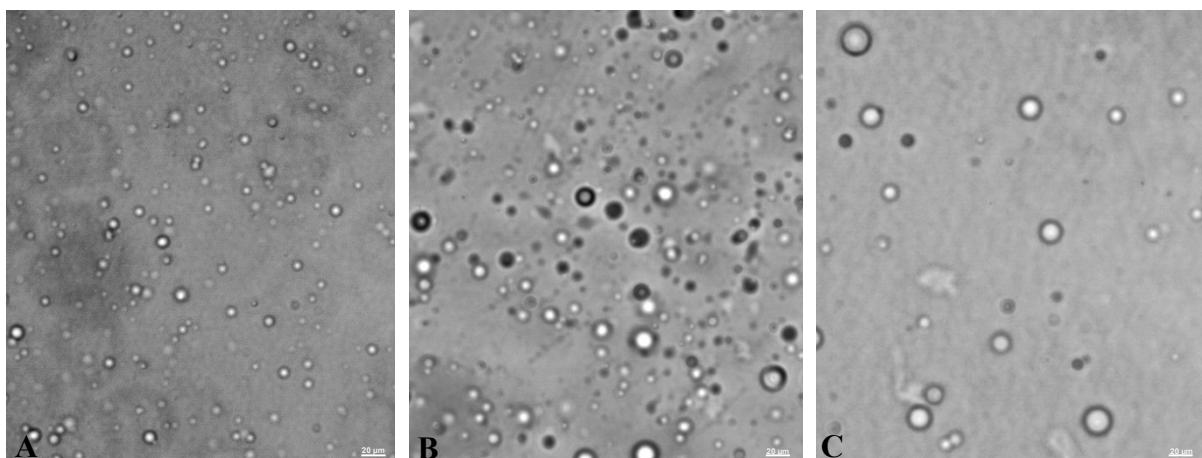
Pode-se perceber que os índices de refração das formulações encontram-se mais próximos aos índices de refração dos bioativos, sugerindo que as microemulsões apresentam um maior domínio oleoso. Assim como na condutividade elétrica, a análise foi realizada na formulação final, em que as microemulsões estão dispersas em propilenoglicol, que é um componente oleoso.

Os testes foram realizados na formulação final, com a microemulsão já incorporada, visto que corresponde a formulação que será administrada e assim, as formulações testadas correspondem a sistemas água em óleo, em que a fase externa corresponde a uma maior porção oleosa, já que o dispersante é o propilenoglicol. No entanto, estas avaliações também devem ser feitas no sistema emulsionado, para que seja feita a sua caracterização antes da influência da formulação final nestas.

4.3.4.4. Microscopia óptica

As formulações PMC, PME e PMCE foram analisadas por microscopia óptica convencional e com contraste de fases, para observação das gotículas das microemulsões na formulação final. Obteve-se as seguintes imagens para a microscopia óptica convencional de campo claro (Figura 30).

Figura 30: Microscopia óptica convencional das formulações sob a forma de *spot-on* a partir da incorporação das microemulsões contendo carvacrol (PMC), eugenol (PME) e associação de ambos (PMCE)



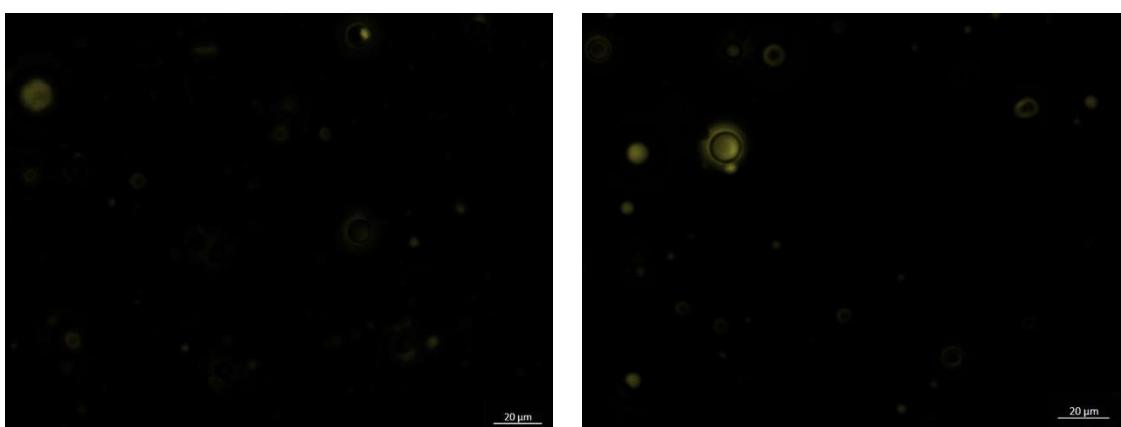
A- Formulação *spot-on* com incorporação da microemulsão de carvacrol; B- Formulação *spot-on* com incorporação da microemulsão de eugenol; C- Formulação *spot-on* com incorporação da microemulsão da associação de eugenol e carvacrol.
A escala no canto inferior direito corresponde a 20 μ m

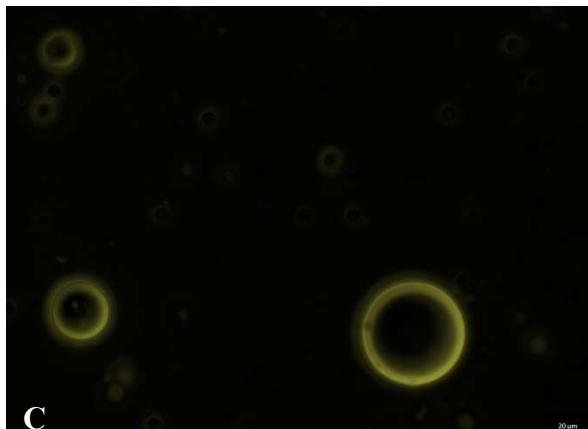
Por meio da microscopia óptica convencional, é possível observar as gotículas da microemulsão em grande quantidade nas formulações sob a forma de *spot-on*, com formato esférico característico das microemulsões de acordo com o descrito por Pavoni *et al.* (2020).

Além disso, pode-se perceber que o interior das gotículas apresenta uma coloração mais próxima a coloração do meio em que estão dispersas na formulação, que consiste no propilenoglicol.

Para melhorar a visualização e o contraste de cores entre a fase interna e externa das gotículas, realizou-se a microscopia óptica com contraste de fases (Figura 31).

Figura 31: Microscopia óptica com contraste de fases das formulações sob a forma de *spot-on* a partir da incorporação das microemulsões contendo carvacrol (PMC), eugenol (PME) e associação de ambos (PMCE)





A- Formulação *spot-on* com incorporação da microemulsão de carvacrol; B- Formulação *spot-on* com incorporação da microemulsão de eugenol; C- Formulação *spot-on* com incorporação da microemulsão da associação de eugenol e carvacrol.

A escala no canto inferior direito corresponde a 20 μ m.

Confirmando a suposição proposta na microscopia convencional, pode-se perceber mais nitidamente na Figura 31 – C, que o interior da gotícula possui a mesma característica do dispersante da microemulsão (propilenoglicol), que apresenta características oleosas; enquanto a delimitação da gotícula é observada por um halo amarelado em menor quantidade e facilmente distinguido das demais fases.

Embora os testes não tenham sido realizados nas microemulsões isoladas, sabe-se que estas foram preparadas com base em uma proporção de aproximadamente 90% de fase oleosa e uma pequena concentração de água. Partindo-se deste fato e observando que o interior da gotícula se assemelha com o dispersante oleoso, e que sua delimitação possui uma coloração diferenciada dos demais domínios e em menor quantidade, pode-se propor que a microemulsão formada é do tipo O/A. Contudo, a partir do momento que a mesma é incorporada na formulação final e passa pelos ensaios de índice de refração e condutividade elétrica, as características observadas são referentes ao dispersante, que se encontra em maior concentração na formulação e representa um domínio oleoso, indicando uma formulação A/O.

4.4. Eficácia *in vitro*

Observando-se os estudos realizados por Oliveira *et al.* (2022) e Miranda (2022), pode-se observar atividade tanto pulicida quanto acaricida dos bioativos aqui empregados, podendo-se perceber que o eugenol possui potência inseticida, enquanto o carvacrol possui potência acaricida.

4.4.1. knock down

O efeito *knock down* avalia o tempo necessário que um ativo ou bioativo requer para atingir sua eficácia máxima frente a algum parasito, que inicialmente sofre uma hiperexcitação e desorientação, podendo ser seguida de morte. Segundo o disposto pela Agência Europeia de Medicamentos e a Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (WAAVP), ela deve ser avaliada em 24 e 48 horas, respectivamente (PFISTER; ARMSTRONG, 2016). Contudo, embora muitos ativos apresentem eficácia por longos períodos, o tempo demandado para que estes combatam 100% dos indivíduos é variável, e quanto mais rápido este efeito é alcançado, mais rápido se combate os ectoparasitos, impedindo a transmissão de agentes patogênicos e controlando a infestação.

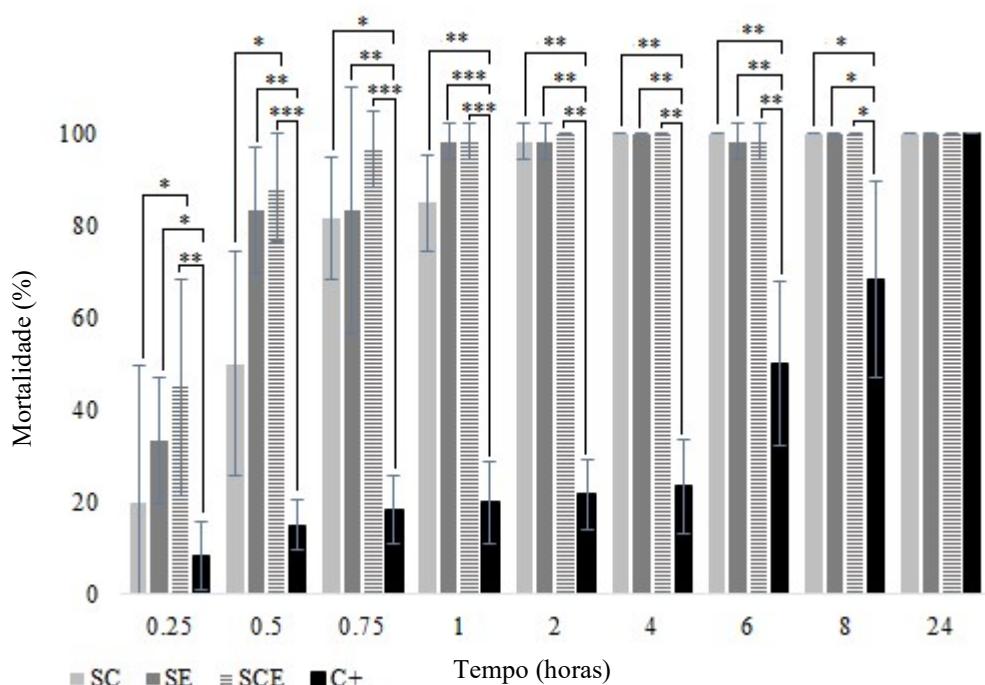
De maneira geral, pode-se perceber que a atividade da formulação aumenta com a progressão do tempo em que as pulgas ficam expostas a determinada formulação, e dependendo

da formulação em questão, a atividade máxima é alcançada em diferentes tempos, não ultrapassando o período de quatro horas.

Em relação as formulações *spray*, pode-se perceber que o SC e o SE atingem o máximo de atividade em 4 horas de exposição, enquanto a formulação contendo associação dos bioativos atinge a mesma atividade duas horas antes (após duas horas em contato).

Os resultados da avaliação do efeito *knock down* estão ilustrados nos gráficos de 6 a 8.

Gráfico 6: Efeito *knock down* das formulações sob a forma de *spray* contendo eugenol (SE), carvacrol (SC), associação de ambos (SCE) e controle positivo (C+) frente a *Ctenocephalides felis felis*

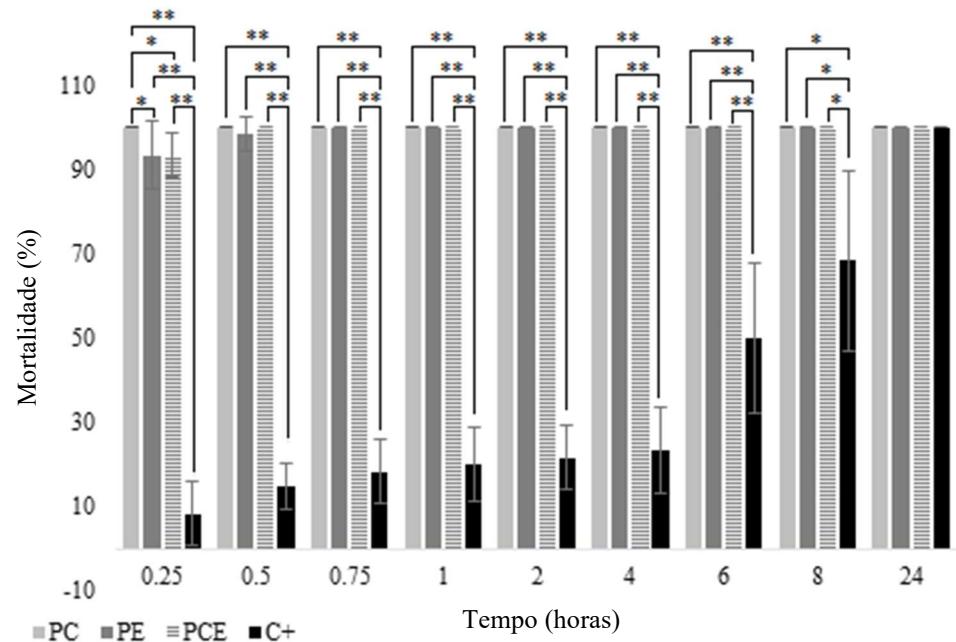


Pode-se observar mortalidade crescente de acordo com o tempo de avaliação para todas as formulações avaliadas. O efeito *knock down* pode ser observado a partir do primeiro tempo de avaliação (15 min) com valores de eficácia de 50% para a associação de eugenol e carvacrol, atingindo valores acima de 90% após 45 min de aplicação e 100% a partir de uma hora.

O controle positivo utilizado (fipronil na concentração de $8 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) não apresentou efeito *knock down in vitro* como é esperado e relatado na literatura (ZHAO *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2012; LAMBERT *et al.*, 2017; HALOS *et al.*, 2016).

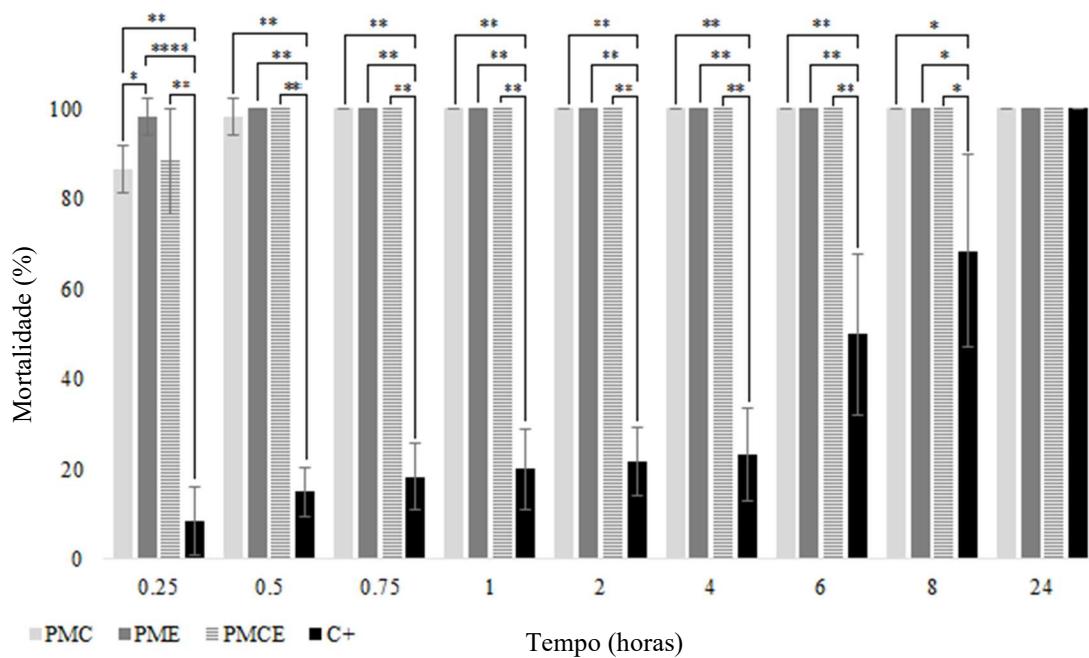
Quanto ao efeito *knock down* das formulações sob a forma de *spot-on*, a formulação PC apresentou mortalidade máxima a partir dos 15 minutos de exposição, mantendo-se desta forma até o fim dos bioensaios. Já as formulações PE e PCE apresentaram 93% de mortalidade após 15 minutos de exposição, de maneira que a formulação PCE atingiu a atividade máxima após 30 minutos, seguida da PE levando aproximadamente 45 minutos, como demonstrado no gráfico 7.

Gráfico 7: Efeito *knock down* das formulações sob a forma de *spot-on* contendo eugenol (PE), carvacrol (PC), associação de ambos (PCE) e controle positivo (C+) frente a *Ctenocephalides felis felis*



No tocante as formulações *spot-on* com microemulsões incorporadas, as formulações PMC e PMCE apresentaram um perfil inicial semelhante com 87% e 88% de mortalidade nos primeiros 15 minutos. Contudo, a formulação PMC combateu 100% das pulgas após 45 minutos do início do teste; enquanto a formulação PMCE atingiu a mesma atividade em 30 minutos. A PME embora tenha iniciado o teste com atividade superior as demais, 98%, combateu 100% de indivíduos no mesmo período que a PMCE, 30 minutos (Gráfico 8).

Gráfico 8: Efeito *knock down* das formulações sob a forma de *spot-on* a partir da incorporação da microemulsão contendo eugenol (PME), carvacrol (PMC), associação de ambos (PMCE) e controle positivo (C+) frente a *Ctenocephalides felis felis*



Pode-se observar também que o bioativo incorporado a uma microemulsão resultou em um decréscimo na atividade das formulações contendo carvacrol, visto que a PC apresentou mortalidade máxima após 15 minutos de exposição, enquanto a PMC requer um tempo superior, de 45 minutos. Já nas formulações contendo eugenol, um bioativo altamente volátil, pode-se perceber que a microemulsão fez com que a atividade máxima fosse alcançada mais previamente, reduzindo o tempo necessário de exposição de 45 minutos para 30 minutos, para PE e PME respectivamente. Contudo, obteve-se um perfil similar entre PCE e PMCE, que embora tenham apresentado mortalidade distintas em 15 minutos, atingem a mortalidade máxima em 30 minutos.

Embora as formulações *spot-on* tenham uma atividade mais rápida que o *spray*, vale ressaltar que as mesmas apresentam propilenoglicol em grandes concentrações na sua composição, que pode ocasionar obstrução dos espiráculos das pulgas, o que leva a morte por asfixia ou sufocamento (BURGESS, 2009; 2009). Sendo assim, quando olhamos para os resultados da formulação *spray*, observamos a influência unicamente dos bioativos ali presentes; enquanto na formulação *spot-on* observamos a influência tanto do bioativo quanto da formulação como um todo, incluindo a colaboração dos excipientes na eficácia da formulação final.

Como controle positivo (C+) utilizou-se o fipronil, um ativo que tem caído em desuso, mas ainda presente em alguns produtos pulicidas e acaricidas comercializados. Embora o fipronil seja um ativo com atividade comprovada, pode-se perceber que o mesmo não apresenta um efeito *knock down*, podendo-se observar um aumento gradual e linear da sua atividade, levando aproximadamente 24 horas para atingir sua atividade máxima, enquanto as formulações testadas levaram no máximo 1/6 desse tempo para apresentar o mesmo efeito. Segundo Zhao *et al.* (2003) o fipronil se liga rapidamente aos receptores alvo, mas sua interação com o receptor ativado ocorre de maneira lenta, o que pode ser percebido pela sua ação linear e gradual ao longo do tempo até atingir sua atividade máxima.

Segundo Perrins e Hendricks (2007), os piretróides apresentam ótimo efeito *knock down*, mas por apresentarem ação por pouco tempo, devem ser reaplicados com maior frequência do que outros ectoparasiticidas (PERRINS; HENDRICKS, 2007; PFISTER; ARMSTRONG, 2016). A ação rápida da permetrina, é relacionada a sua rápida penetração cuticular e elevado acúmulo no ectoparasito, contribuindo para sua elevada eficácia (PFISTER; ARMSTRONG, 2016). Além disso, possui efeito *knock down* frente ao carrapato *R. sanguineus*, por exemplo, apresentando eficácia de 70% e 40% em cães de pequeno e grande porte respectivamente, após três dias da sua aplicação, chegando a uma eficácia superior a 90% após uma semana (PFISTER; ARMSTRONG, 2016).

Em um estudo realizado por Jiang *et al.* (2012) frente a *Linepithema humile*, um inseto conhecido como formiga argentina, avaliou-se o efeito *knock down* do fipronil e da permetrina, observando-se que o enquanto a permetrina levava aproximadamente 10 minutos para combater 100% dos indivíduos, o fipronil levava em média oito horas para desempenhar a mesma atividade chegando a 66 horas no 89º dia, mostrando que o efeito *knock down* do mesmo é baixo. Este perfil foi semelhante ao obtido no presente trabalho, em que o fipronil combate 50% das pulgas em aproximadamente 6 horas.

Além do efeito *knock down* da permetrina ser rápido pela sua elevada penetração na cutícula das pulgas, a mesma ocasiona perda de motilidade quando utilizada em concentrações mais baixas, podendo agir de modo deletério em concentrações mais altas. Segundo Pfister e Armstrong (2016), a permetrina possui atividade em 99,4% das pulgas no período de 24 horas, apresentando eficácia superior a 90% após 72 horas (PFISTER; ARMSTRONG, 2016).

Como já mencionado, a permetrina possui um efeito *knock down* conhecido e segundo Halos *et al.* (2016), a mesma causa um choque súbito nas pulgas, que acabam perdendo seus movimentos e parecem mortas, mas pode ser um fenômeno reversível quando a permetrina é

utilizada em baixas concentrações (HALOS *et al.*, 2016). Em um dos seus estudos, Halos *et al.* (2016) demonstrou que o fipronil não possui efeito *knock down* (8% de mortalidade em uma hora) e que a permetrina possui um rápido efeito *knock down* mas por um curto período, variando de 24% a 86% durante um mês.

Contudo, quando a permetrina é associada ao fipronil, este efeito é potencializado, conseguindo combater 65% das pulgas em uma hora, chegando a 99% de eficácia após uma hora (HALOS *et al.*, 2016).

A associação do fipronil com a permetrina também foi estudada por Rust (2020) veiculados em uma formulação *spot-on* demonstrando uma ação mais rápida e repelente frente a carrapatos quando comparado ao afoxolaner administrado por via oral, embora ambos tenham apresentado uma eficácia superior a 90% por 14 dias (RUST, 2020).

Neste mesmo estudo, Rust descreve que o lotilaner possui eficácia de 100% após 12 horas de exposição da pulga ao ativo. Este resultado é apresentado por Cavalleri *et al.* (2015), que demonstrou que o lotilaner, uma isoxazolina mais recente que possui atividade acaricida e pulicida, é capaz de combater 100% de pulgas adultas em 12 horas, permanecendo com eficácia acima de 90% a partir de quatro horas de exposição após 35 dias do tratamento (CAVALLERI *et al.*, 2017).

Segundo Rust (2010) e Cavalleri *et al.* (2017), o espinosade, obtido a partir da fermentação de uma actinobactéria, também apresenta um rápido efeito *knock down* frente a pulga adulta (RUST, 2010; CAVALLERI *et al.*, 2017).

Seguindo a linha de produtos naturais, o d-limoneno teve seu efeito *knock down* estudado por Hink e Fee (1986), onde foi demonstrado que na concentração de 195 ng/cm², este é capaz de diminuir a motilidade de 50% das pulgas em dois minutos, de modo que após cinco minutos, 96% encontram-se mortas (HINK; FEE, 1986).

Já no estudo realizado por Júnior *et al.* (2015), avaliou-se a eficácia do d-limoneno veiculado em uma formulação *spray* frente ao inseto *Cimex lectularius*, obtendo-se 82% e 76% de mortalidade em 15 minutos e 24 horas (JÚNIOR *et al.*, 2015). Também avaliou-se o efeito *knock down* de sprays contendo permetrina e deltameetrina com sprays contendo óleos em sua composição, como: Óleo de soja + eugenol; Óleo de cedro; Óleo de alecrim + óleo de hortelã pimenta; Óleo de cravo + óleo de alecrim + óleo de hortelã pimenta + óleo de tomilho + propionato de fenetila; e Óleo de Nim (JÚNIOR *et al.*, 2015).

Os sprays contendo óleo de cedro e uma mistura de óleo de cravo, alecrim, hortelã pimenta e tomilho, foram capazes de combater 100% dos insetos em cinco minutos, seguido dos sprays contendo óleo de Nim e óleo de alecrim com hortelã pimenta, com 98% e 92% de mortalidade, de modo que somente os dois primeiros mantiveram sua eficácia por quatro horas. Os ativos permetrina e deltameetrina obtiveram 100% e 98% de mortalidade no mesmo tempo analisado (JÚNIOR *et al.*, 2015).

O spray contendo eugenol na composição apresentou 66% de mortalidade nos primeiros 5 minutos, chegando a 52% após 30 minutos. Após 24 horas, somente o spray com óleo de Nim, óleo de alecrim com hortelã pimenta, deltameetrina e permetrina mantiveram eficácia superior a 90% (JÚNIOR *et al.*, 2015).

Ao comparar os resultados obtidos pelas formulações contendo eugenol e carvacrol, pode-se observar que estas apresentam um rápido efeito *knock down*, de modo que sua atividade máxima é alcançada de maneira geral entre 15 minutos e quatro horas.

4.4.2. Eficácia Residual das pré-formulações

Como dito anteriormente, uma das primeiras formulações preparadas com bioativo, tinha como objetivo observar a compatibilidade do ativo com os excipientes determinados, além de avaliar a ação fixadora da vanilina. Para isso, realizou-se a eficácia residual das formulações SP1 a SP4, obtendo-se os resultados descritos na tabela 38.

Tabela 38: Eficácia residual das pré-formulações sob a forma de *spray* contendo 1% de eugenol e diferentes concentrações de vanilina frente a *Ctenocephalides felis felis*

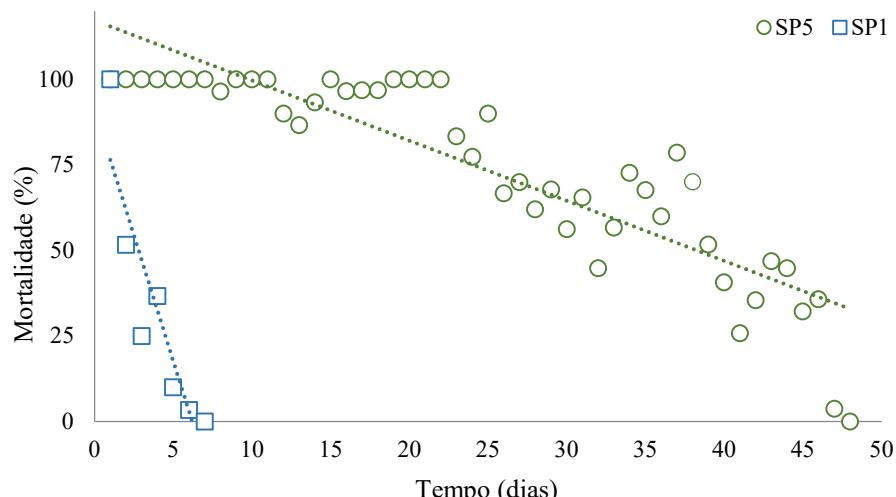
Tempo (dias)	SP1	SP2	SP3	SP4
1	100.00	67.92	61.40	46.55
2	51.67	41.38	33.33	51.06
3	25.00	4.92	22.03	18.33
4	36.67	7.21	32.32	26.89
5	10.00	1.97	8.81	7.33
6	3.33	0.66	2.94	2.44
7	0.00	0.00	0.00	0.00

Pode-se perceber que enquanto a formulação SP1 atinge a mortalidade máxima nas primeiras 24 horas, as demais formulações não alcançam 100% de mortalidade nos dias avaliados, indicando que a vanilina não exerceu sua ação fixadora na formulação testada, pois não prolongou o efeito desejado. Por mais que a atividade pulicida tenha perdurado por seis dias, percebe-se logo no primeiro dia de avaliação que o aumento da concentração de vanilina na formulação faz com que a eficácia residual decaia. Por este motivo, retirou-se a vanilina da composição das formulações, visto que sua ausência impacta positivamente na atividade esperada.

A formulação SP5 por sua vez, com 7,5% de eugenol, apresentou uma eficácia residual de 48 dias, mantendo-se com 100% de mortalidade por 22 dias consecutivos. Quando comparada com a SP1, a formulação SP5 teve atividade por 41 dias a mais, reduzindo sua atividade a metade somente no 39º dia de análise, momento em que a formulação S1 não apresentava mais atividade.

A eficácia residual de ambas as formulações frente a pulgas está demonstrada a seguir (Gráfico 9).

Gráfico 9: Eficácia residual das formulações sob a forma de *spray* contendo 1% de eugenol (SP1) e 7,5% de eugenol (SP5) frente a *Ctenocephalides felis felis*



Pode-se notar então que a formulação SP1, com 1% de eugenol em sua composição, possui atividade pulicida, mas a mesma não apresenta eficácia residual prolongada, visto que sua atividade se encerra após uma semana da impregnação. Contudo, quando a formulação é

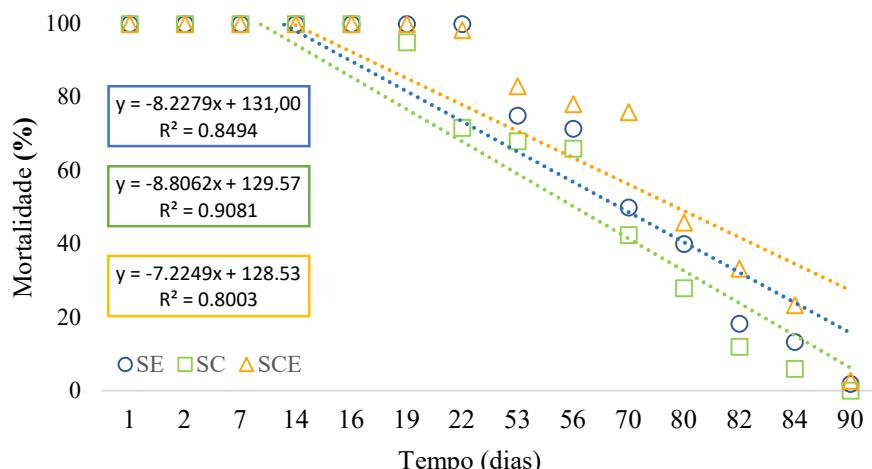
preparada novamente com uma concentração maior de bioativo, como no caso da SP5 que contém 7,5% de eugenol, além da atividade pulicida já esperada, pode-se observar um aumento significativo da eficácia residual, que agora é superior a 40 dias.

Após avaliação das incompatibilidades dos excipientes, estudos de estabilidade preliminar das pré-formulações e avaliação da incorporação do bioativo na formulação proposta, definiu-se a formulação final a ser utilizada, preparando-se então novas formulações contendo 10% dos bioativos, concentração na qual consegue-se realizar o controle tanto pulgas quanto carrapatos, ambos adultos. Partindo disto, realizou-se o estudo de eficácia residual das formulações sob a forma de *spray* e sob a forma de *spot-on*, assim como avaliação do efeito *knock down*.

4.4.3. Eficácia Residual das formulações sob a forma de *spray*

Em relação as formulações *spray*, pode-se perceber que a SE que contêm 10% de eugenol, assim como a SP5, com 7,5% de eugenol em sua composição, mantiveram sua eficácia máxima por 22 dias consecutivos, reduzindo sua atividade a metade no 70º dia de estudo, enquanto a SP5 teve o mesmo efeito já no 39º dia. Somado a isto, no 48º dia a formulação S5 não possuía mais atividade pulicida, enquanto a SE ainda era capaz de combater mais de 75% das pulgas, conforme pode-se observar no gráfico 10.

Gráfico 10: Eficácia residual das formulações sob a forma de *spray* contendo 10% de eugenol (SE), 10% de carvacrol (SC) e 10% de cada bioativo em associação (SCE) frente a *Ctenocephalides felis felis*



Referente a formulações *sprays* contendo a mesma concentração de diferentes bioativos, pode-se perceber que a manutenção da atividade máxima foi mais prolongada na SCE, seguida da SE e da SC, por 24, 22 e 16 dias respectivamente.

Segundo o disposto nas Diretrizes para o teste e avaliação da eficácia de substâncias antiparasitárias para o tratamento e prevenção de infestação de carrapatos e de pulgas em cães e gatos do Comitê de medicamentos para uso veterinário (CVMP-EMEA), para que um produto veterinário esteja apto a ser comercializado como pulicida, o mesmo deve apresentar eficácia superior a 95% pelo tempo de ação proposto. Sendo assim, a formulação contendo associação de ativos (SCE) cumpre esta exigência por 24 dias, em que sua atividade pulicida é mantida em níveis superiores a 98%, enquanto a formulação SE mantém sua atividade em 100% ao longo dos primeiros 22 dias de avaliação.

A formulação SC por sua vez, alcança o limite mínimo requerido (95%) após 19 dias (EMEA/CVMP/005/2000-Rev.2). Independente do tempo em que as formulações mantenham

a atividade pulicida em níveis acima de 95%, todas apresentam atividade em casos de reinfestação.

Pode-se perceber também que a partir do 23º dia, a formulação SCE passa a obter as maiores mortalidades quando comparada as demais formulações. Tal fato pode ser observado no tempo necessário para combater 75% das pulgas, pois enquanto o SC atinge tal feito por volta dos 21 dias, o SE leva em média 53 dias, e o SCE 70 dias. Contudo, ao mesmo tempo que o SCE leva 77 dias para reduzir sua atividade pela metade, o SE precisa de aproximadamente 70 dias.

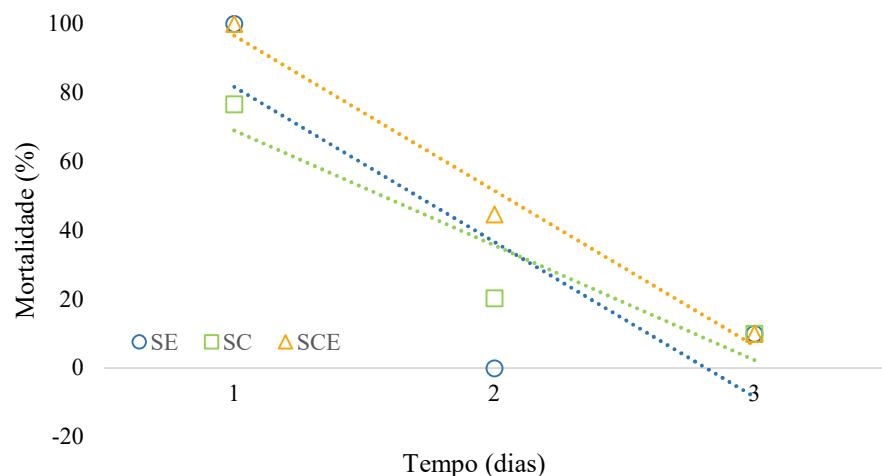
Com isso, pode-se perceber que por mais que o efeito do SCE seja mais prolongado, a partir do momento que a atividade começa a decair, ela o faz de maneira mais pronunciada. Isto pode ser observado no momento em que se analisa o decaimento da mortalidade de 75 % para 50 %, pois enquanto a SE o faz em 17 dias, a SCE precisa apenas de sete dias para apresentar a mesma redução.

Apesar das diferenças no perfil do decaimento da atividade pulicida das formulações sob a forma de *spray*, todas apresentaram atividade pulicida por aproximadamente 90 dias, em que a SC praticamente não apresentava mais mortalidade (0,09%), a SE ainda apresentava 1,95% de atividade e a SCE cerca de 2,74% de eficácia contra as pulgas.

Embora o eugenol seja elencado como o bioativo mais eficaz contra as pulgas, pode-se perceber que sua associação ao carvacrol faz com que a atividade pulicida perdure por mais dias, quando comparado ao seu efeito isolado.

Quanto ao controle de carapatos, as três formulações apresentaram atividade acaricida por três dias, momento em que a eficácia era de apenas 10 %, como demonstrado no gráfico 11.

Gráfico 11: Eficácia residual das formulações sob a forma de *spray* contendo 10% de eugenol (SE), 10% de carvacrol (SC) e 10% de cada bioativo em associação (SCE) frente a *Rhipicephalus sanguineus*



Embora o carvacrol seja o bioativo geralmente associado a sua maior atividade contra *R. sanguineus*, a formulação SC não apresentou atividade máxima, iniciando sua atividade com aproximadamente 77% de atividade. Embora as formulações SE e SCE apresentem 100% de mortalidade no primeiro dia, pode-se perceber que a associação dos ativos (SCE) proporcionou um decréscimo de atividade mais gradual do que as formulações com os ativos isolados.

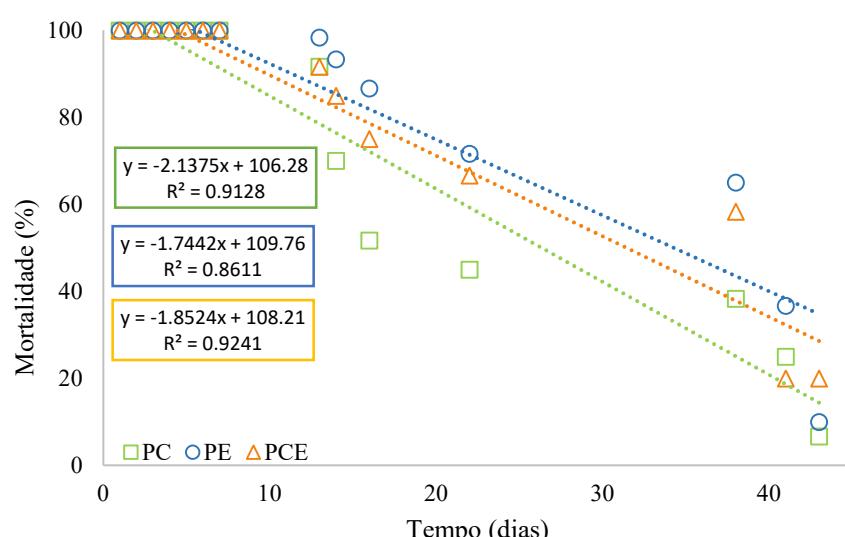
Apesar disso, percebe-se a importância do carvacrol na formulação ao observar-se o segundo dia de análise, pois o SE não apresentou mortalidade, enquanto o SC e SCE eram eficazes contra 20% e 45% dos carapatos, respectivamente.

Embora as três formulações tenham alcançado a mesma resposta no último dia de análise, pode-se notar que somente as formulações SE e SCE apresentaram eficácia acima de 90% após 24 horas, conforme o preconizado pela Agência Europeia de Medicamentos (Medicamentos e inspeções veterinárias), mas não apresentam eficácia residual considerando-se a possibilidade de reinfestações (EMEA/CVMP/005/2000-Rev.2).

4.4.4. Eficácia Residual das formulações sob a forma de *spot-on*

Assim como feito para as formulações sob a forma de *spray*, também se analisou a eficácia residual das formulações sob a forma de *spot-on*, obtendo-se os resultados contidos nos gráficos 12 e 13.

Gráfico 12: Eficácia residual das formulações sob a forma de *spot-on* contendo 10% de eugenol (PE), 10% de carvacrol (PC) e 10% de cada bioativo em associação (PCE) frente a *Ctenocephalides felis felis*

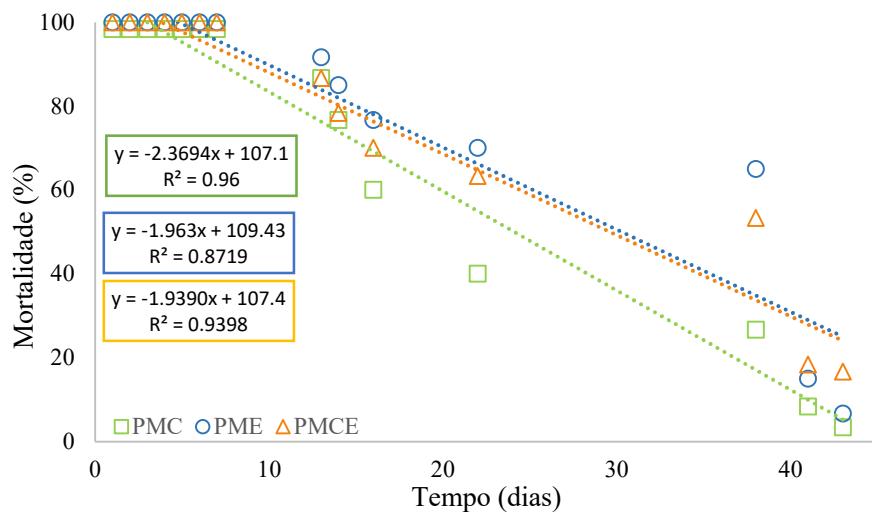


Pode-se observar que as três formulações avaliadas apresentam eficácia máxima por oito dias, sendo este o tempo máximo que a formulação PC mantém sua atividade acima de 95%. Já a formulação PE mantém sua atividade acima de 95% por um tempo superior as demais, apresentando 98% de mortalidade em torno do 13º dia de análise; enquanto a formulação PCE apresenta 96% de mortalidade por dez dias, dados importantes para registro de medicamentos veterinários seguindo as diretrizes propostas pela EMEA e determinação do tempo de eficácia de uma formulação.

As formulações PE e PCE apresentam um decaimento de 50% da mortalidade entre os dias 38 e 41, enquanto a formulação PC apresenta o mesmo decaimento já no 16º dia de análise. No 43º dia de análise, enquanto as formulações PC e PE apresentam aproximadamente 7% e 10% de atividade respectivamente, a formulação PCE apresenta em torno de 20% de atividade pulicida.

Além disso, comparando-se estes resultados com os obtidos nas formulações sob a forma de *spray*, no 44º dia, quando a formulação sob a forma de *spot-on* apresenta uma atividade de aproximadamente 1,8%, 2,7% e 18% para PC, PE e PCE respectivamente, a formulação *spray* ainda é capaz de combater 44%, 70% e 82% respectivamente para SC, SE e SCE.

Gráfico 13: Eficácia residual das formulações sob a forma de *spot-on* a partir da incorporação de microemulsão contendo 10% de eugenol (PME), 10% de carvacrol (PMC) e 10% de cada bioativo em associação (PMCE) frente a *Ctenocephalides felis felis*



De maneira geral, somente a formulação PMC não atingiu 100% de mortalidade, mas manteve sua maior atividade (98,33%) pelo mesmo período que as demais formulações mantiveram a atividade máxima, cerca de oito dias. A partir do 11º e 12º dia de análise, as formulações PME e PMCE apresentam atividade inferiores a 95%.

A partir do 13º dia de análise, pode-se perceber que salvo algumas exceções, as formulações que tiveram o bioativo incorporado em uma microemulsão (PMC, PME e PMCE) apresentaram uma atividade inferior quando comparada as formulações sem microemulsão.

Em relação as formulações com microemulsão, no 17º dia pode-se perceber que o *spot-on* PMC possuía 40% de atividade pulicida, frente a 70% e 63% do PME e PMCE respectivamente no mesmo período. Até o 40º de análise, o *spot-on* PME apresentava uma atividade mais elevada, mas a partir do 41º a maior atividade estava atrelada ao PMCE.

Com exceção das formulações PC e PMC que apresentaram redução da sua atividade a metade entre os dias 16-22, todas as demais apresentaram este perfil somente entre os dias 38 e 41. Sendo assim, independente da forma como o bioativo está incorporado na formulação final, as formulações contendo carvacrol apresentaram uma menor atividade quando comparada as demais.

No último dia de análise, 43º dia, enquanto as formulações contendo os bioativos isolados possuíam 10% de atividade em média, as formulações contendo a associação destes, PCE e PMCE apresentavam uma atividade de 20% e 17% respectivamente.

Como já notado anteriormente, pode-se perceber que o carvacrol possui uma menor eficácia frente a pulgas quando comparado ao eugenol, mas no momento em que estão associados, promovem um aumento do efeito residual.

Vale ressaltar que a formulação sob a forma de *spot-on* contém propilenoglicol em sua composição e em elevada concentração, que apresenta uma média viscosidade. Por ser um componente hidrofóbico, o propilenoglicol pode obstruir os espiráculos das pulgas, que além de dificultar sua respiração, pode levar a asfixia e sufocamento (BURGUESS, 2009). Além disso, insetos hematófagos como o piolho por exemplo, excretam água por transpiração pelos espiráculos, sendo assim, a partir do momento que o espiráculo encontra-se obstruído por substâncias hidrofóbicas, a excreção da água ingerida na hematofagia é dificultada, fazendo com que o seu intestino passe por um estresse osmótico, ocorrendo então sua ruptura e consequente morte do parasito (BURGUESS, 2009). Por ser tratar de um inseto hematófago, as pulgas podem estar sujeitas a este mesmo processo quando em contato com substâncias

hidrofóbicas em grandes concentrações, de modo que os resultados obtidos nesta etapa do estudo refletem a ação da formulação como um todo, considerando a atividade dos bioativos e a influência dos excipientes na formulação final, colaborando para a atividade frente a pulgas.

Já frente a carrapatos, a partir da ecdisse de ninfa para adultos, estes passam a apresentar uma camada cutícula composta por lipídios, ceras e proteína, de modo que a absorção de compostos lipídicos, como propilenoglicol, DMSO e os bioativos, é favorecida, podendo agir também na remoção da camada epicuticular dos carrapatos, favorecendo a absorção dos bioativos (ODHIAMBO, 1982 *apud* VASCONCELLOS *et al.*, 2018).

Quanto a atividade acaricida das formulações sob a forma de *spot-on*, os resultados obtidos demonstraram-se inconclusivos, sendo necessário repeti-los, o que será feito juntamente com a avaliação do efeito *knock down*.

Analizando-se a velocidade de decaimento da atividade pulicida das formulações desenvolvidas, tem-se os resultados descritos abaixo (Tabela 39).

Tabela 39: Equação da reta das formulações desenvolvidas sob a forma de *spray* e *spot-on* contendo carvacrol, eugenol e associação de ambos na composição, frente a *Ctenocephalides felis felis*

Formulação	a	b	r ²
SC	-8,8062	129,57	0,9081
SE	-8,2279	131,00	0,8494
SCE	-7,2249	128,53	0,8003
PC	-2,1375	106,28	0,9128
PE	-1,7442	109,76	0,8611
PCE	-1,8524	108,21	0,9241
PMC	-2,3694	107,10	0,9600
PME	-1,9630	109,43	0,8719
PMCE	-1,9390	107,40	0,9398

a- coeficiente angular; b- coeficiente linear; r²- coeficiente de determinação

Os coeficientes angulares (a) obtidos na regressão linear informam o perfil da inclinação da reta, sendo assim, quanto maior o valor ‘a’, maior é a inclinação, e consequentemente, maior é a velocidade com que a atividade pulicida é reduzida. Ao observar as formulações sob a forma de *spray* desenvolvidas, pode-se notar que a SCE possui uma menor inclinação, resultando em uma eficácia residual mais prolongada e um decaimento mais gradual da sua atividade ao longo do tempo, o que não é observado na SC, cuja inclinação é mais acentuada. Contudo, pode-se perceber que as formulações sob a forma de *spray* apresentam os maiores valores de inclinação de reta, e embora a sua atividade perdure por mais dias até começar a diminuir, a partir do momento que o decaimento ocorre, este acontece de maneira mais rápida do que as demais formulações.

As formulações sob a forma de *spot-on*, apresentam uma inclinação menor do que as formulações *spray*, mas deve-se lembrar que a formulação *spot-on* apresentou eficácia máxima por um período aproximadamente três vezes menor, quando comparado a formulação sob a forma de *spray*. Contudo, comparando-se as formulações sob a forma de *spot-on* entre si, temos que o PC novamente apresenta a maior inclinação, enquanto a formulação PE e PCE apresentam um decréscimo mais gradual das suas atividades.

Já nas formulações sob a forma de *spot-on* contendo microemulsões incorporadas, pode-se perceber o mesmo perfil das formulações anteriores que continham carvacrol em sua composição, além de ser possível observar que as formulações PME e PMCE apresentaram um perfil semelhante de decaimento, sendo este menos íngreme do que o observado na PMC.

Assim, percebe-se que o carvacrol possui o decaimento mais rápido de sua atividade, dentre os bioativos utilizados e associações, e também que as formulações sob a forma de *spot-on* contendo microemulsão em sua composição apresentaram valores de coeficiente angular mais elevados quando comparadas as formulações sob a forma de *spot-on* sem microemulsão, tendo assim uma maior velocidade de perda de atividade.

De modo geral, pode-se observar que as formulações sob a forma de *spray* requiriram mais tempo para atingir a mortalidade máxima e embora não tenham influência dos excipientes em sua atividade pulicida, pode-se observar no teste de eficácia residual, que as mesmas possuem uma atividade mais duradoura a longo prazo, visto que combatem 100% das pulgas por no mínimo 16 dias, no caso do SC, podendo chegar a 22 dias para SE e SCE. Já para as formulações sob a forma de *spot-on*, essa atividade máxima é mantida somente por sete a oito dias.

Alguns estudos já avaliaram a atividade de formulações contendo eugenol e carvacrol, tanto isolados quanto em associação com outros bioativos, geralmente frente a carapatos *R. microplus* e *R. sanguineus*, não encontrando-se estudos relativos à avaliação de formulações com estes bioativos frente a pulga *C. felis felis*.

No estudo realizado por Ferreira *et al.* (2018), avaliou-se primeiramente a atividade do eugenol frente a larvas e adultos de *R. microplus*, determinando-se que a concentração necessária deste bioativo para controle de 100% do estágio larval era de 2,5 mg/mL, chegando a 100 mg/mL para adultos, resultado este semelhante ao encontrado por Miranda (2022) frente a adultos de *R. sanguineus*, que foi utilizado como base para determinação das concentrações dos bioativos nas formulações aqui desenvolvidas (MIRANDA, 2022; FERREIRA *et al.*, 2018). Já ao avaliar a atividade do eugenol a 100mg/mL em uma formulação, obteve-se uma eficácia de 96,3%, próxima a obtida nas formulações SE e SCE, que apresentaram 100% de mortalidade após 24 horas de exposição dos carapatos à formulação (FERREIRA *et al.*, 2018).

Já Valente *et al.* (2014), observou-se que o eugenol a uma concentração de 0,3% era capaz de combater 100% das larvas de *R. microplus*, mas para que a oviposição fosse inibida em 100%, o mesmo deveria estar a uma concentração de 5% ou a 30% para que combater 100% das fêmeas ingurgitadas (VALENTE *et al.*, 2014). Prosseguindo os estudos, mas agora com a veiculação do eugenol a 5% em uma formulação *pour-on*, Valente *et al.* (2017) obteve uma eficácia média de 14% na reprodução após 20 dias de tratamento, chegando a 12 % no 37º dia, concluindo assim que para combater 100% dos adultos de *R. microplus*, o eugenol deveria estar a uma concentração de 30%, três vezes maior do que a requerida neste trabalho para combate de adultos de *R. sanguineus* nas formulações sob a forma de *spray* (VALENTE *et al.*, 2017). Embora sejam de espécies diferentes, o *R. microplus* e *R. sanguineus* são ixodídeos, que apresentaram a mesma concentração necessária para combater 100% do estágio adulto.

Em 2020, Coelho *et al.* (2020) avaliaram a eficácia de uma formulação contendo eugenol e timol em associação na forma de uma dispersão micelar frente a *R. sanguineus*, demonstrando que em concentrações acima de 0,5% (5mg/mL), a formulação era eficaz contra mais de 95% das ninfas não alimentadas, e larvas e ninfas ingurgitadas, precisando de uma concentração superior (1% equivalente a 10mg/mL) para combaterem mais de 95% das larvas não alimentadas. A partir destes resultados, Monteiro *et al.*, (2021) desenvolveram uma microemulsão contendo timol e eugenol em associação a 5 mg/mL cada, para avaliação da eficácia frente a larva de *R. sanguineus* em um experimento *in vivo*, observando-se um controle de aproximadamente 85,2% na eclosão das larvas (MONTEIRO *et al.*, 2021).

As larvas tendem a ser mais suscetíveis ao tratamento, pois a composição da sua cutícula e sua espessura mais fina facilitam a absorção dos bioativos. Nesta fase também ocorrer a respiração cuticular, que pode estar associada a uma absorção ainda maior dos bioativos (SONENSHINE; ROE, 2014 *apud* MONTEIRO *et al.*, 2021).

O carvacrol, por sua vez, teve sua atividade larvicida avaliada frente a *R. microplus*, avaliando também a influência da encapsulação neste processo em um estudo realizado por Lima *et al.*, 2017, onde foi demonstrado que o encapsulado diminuiu a concentração necessária de bioativo para combater as larvas, aproximadamente 0,71mg/mL, apresentando atividade por até 60 horas (LIMA *et al.*, 2017). Partindo-se disto, Lima *et al.* (2019) avaliou também o efeito do encapsulado do carvacrol na sua atividade repelente frente a larvas de *R. microplus*, demonstrando novamente que o encapsulado promove uma maior repelência, combatendo 50% dos indivíduos até em concentrações mais baixas, $0,05\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$, em comparação a $0,13\text{-}0,27\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ do carvacrol não encapsulado, após seis horas após do tratamento (LIMA *et al.*, 2019). Sendo assim, como o *R. sanguineus* também é um ixodídeo, pode-se esperar que as formulações a base de carvacrol aqui desenvolvidas, que estão a uma concentração mais elevada do que as avaliadas nesses estudos, também podem apresentar atividade repelente.

Em um estudo mais recente, Sousa *et al.* (2022) avaliou a eficácia de um xampu a base de carvacrol frente a larvas de *R. sanguineus* e *R. microplus*, demonstrando que a concentração de 0,15% foi eficaz contra 100% dos indivíduos testados, indicando que o carvacrol é altamente eficaz contra carrapatos (SOUSA *et al.*, 2022).

Observando-se os resultados dos trabalhos aqui discutidos, pode-se observar que o carvacrol demanda uma menor concentração para combater larvas de carrapatos quando comparado ao eugenol, sendo assim mais eficaz. Esta diferença de atividade pode ser observada em Senra *et al.* (2013), que avaliou a atividade do eugenol e carvacrol frente a larvas e ninhas de *R. sanguineus*, em que o eugenol e o carvacrol devem estar a uma concentração de $10\text{ }\mu\text{L}/\text{mL}$ e $2,5\text{ }\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente, para se obter 100% de mortalidade de ambos os estágios analisados (SENRA *et al.*, 2013).

Como já mencionado anteriormente, a partir do momento em que foi observada a atividade do eugenol e carvacrol isolados frente a carrapatos, iniciou-se estudos avaliando a atividade destes, em associação, no aumento da atividade carrapaticida. Assim, NOVATO *et al.* (2019) avaliou a ação carrapaticida de uma formulação contendo associação de eugenol e carvacrol frente a *R. microplus*, demonstrando que formulações contendo 10% dos bioativos conseguem combater 100% das larvas e aproximadamente 15% das fêmeas ingurgitadas (NOVATO *et al.*, 2019). Assim, pode-se esperar que as formulações desenvolvidas neste trabalho, que também contém 10% dos bioativos, apresentem eficácia frente a estágios imaturos, visto que o *R. sanguineus* também pertence à família Ixodidae.

Pode-se observar então que a maioria dos estudos são realizados contra os estágios imaturos dos carrapatos, principalmente larvas. Contudo, deve-se lembrar que o carrapato parasita o hospedeiro em todos seus estágios de desenvolvimento, sendo assim, o controle de adultos também é importante por promover a interrupção do ciclo desde a oviposição; devendo-se considerar também que por serem menos suscetíveis ao tratamento, os mesmos requerem concentrações mais elevadas de bioativos quando comparado aos estágios imaturos, de modo que ao combater os adultos, realiza-se o controle de todo ciclo biológico em conjunto. Por este motivo que o presente trabalho preconizou o desenvolvimento de uma formulação que apresenta ação adulticida contra *R. sanguineus*.

Quanto as pulgas, com exceção do trabalho de Oliveira *et al.* (2022), não foram achados estudos referentes ao desenvolvimento de formulações contendo eugenol e carvacrol e avaliação de sua atividade frente a ovos, larvas, pupas e adultos.

No mais, deve-se ressaltar que embora a formulação sob a forma de spray desenvolvida tenha apresentado resultados mais promissores quando comparada a formulação sob a forma de spot-on, trata-se de um bioensaio *in vitro*, podendo apresentar um comportamento distinto ao se realizar o experimento *in vivo*, que além da atividade tópica por contato direto do parasito com a formulação, também pode apresentar atividade pela ingestão dos bioativos no momento

da hematofagia. Além disso, a partir dos resultados obtidos em outros estudos, além do efeito pulicida e carrapaticida frente a adultos aqui avaliados, pode-se esperar eficácia das formulações contra estágios imaturos e atividade repelente contra larvas.

5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as formulações desenvolvidas sob a forma de *spray* e *spot-on* apresentaram as características físico-químicas necessárias para sua aplicação tópica em cães, apresentando estabilidade pelo período de 60 dias. Além disso, o método analítico desenvolvido e validado é capaz de detectar e quantificar o eugenol e o carvacrol com precisão e exatidão, de uma maneira rápida e de melhor custo-benefício. Quanto aos bioensaios *in vitro*, as formulações apresentaram atividade pulicida e carrapaticida, demonstrando um rápido efeito *knock down* contra pulgas e uma elevada eficácia residual frente a pulga *Ctenocephalides felis felis* e ao carrapato *Rhipicephalus sanguineus*.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

As formulações contendo eugenol, carvacrol e a associação de ambos bioativos demonstraram-se promissoras e com atividade pulicida e carrapaticida, sendo necessário a realização de ensaios de irritação dérmica e segurança dos bioativos eugenol e carvacrol para prosseguimento dos ensaios *in vivo*.

Quanto ao sistema emulsionado, os estudos prosseguirão avaliando a influência do tempo de agitação no tamanho da gotícula formada; e a influência do tamanho destas na atividade antiparasitária e na absorção do ativo *in vivo*.

Os bioensaios *in vitro* referentes ao efeito *knock down* e eficácia residual das formulações *spot-on* frente aos carrapatos *R. sanguineus* serão continuados para determinação do tempo letal e do tempo de ação das formulações quanto a sua atividade adulticida.

7. REFERÊNCIAS

- ABINPET, Brasil. (2022). Disponível em: https://abinpet.org.br/wp-content/uploads/2022/08/abinpet_folder_dados_mercado_2022_draft3_web.pdf. Acesso em: dezembro de 2022.
- ANDREOTTI, R. et al. Diflubenzuron Effectiveness in Cattle Tick (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) Control in Field Conditions. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 6, n. 373, p. 2, 2015.
- ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L.; ZERINGOTA, V.; MATORANO, R.; MELO, D.; DA SILVA, B. C.; DAEMON, E.; DE CARVALHO, M. G.; MONTEIRO, C. M. O. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and veterinary entomology**, v. 30, n. 4, p. 377-382, 2016.
- AVELAR, D. M.; MELO, M. N.; LINARDI, P. M. Morphology and growth characteristics of cultured *Leptomonas ctenocephali* from *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) of dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, p. 394-398, 2011.
- BALDIN, E. L. L. et al., Bioactivity of *Pelargonium graveolens* essential oil and related monoterpenoids against sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. **Journal of Pest Science**, v. 88, n. 1, p. 191–199, 2015.
- de BATISTA, L. C. S. O. et al., *In vitro* efficacy of essential oils and extracts of *Schinus molle* L. against *Ctenocephalides felis felis*. **Parasitology**, v. 143, n. 5, p. 627–638, 2016.
- BEDIN, A. C. Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol: Desenvolvimento, Caracterização e Estudo de Liberação *in vitro*. 2011. 110 folhas. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, UFSC, 2011.
- BLAGBURN, B. L.; DRYDEN, M. W. Biology, treatment, and control of flea and tick infestations. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1173-1200, 2009.
- BOTONI, L. A importância da seleção criteriosa de produtos dermocosméticos na rotina de cuidados com a pele e a pelagem de cães e gatos. **AVERT Saúde Animal**, 2022.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários (CGAL/SDA). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. - Brasília. Mapa/ACS, 72 p., 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Boas Práticas de fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de julho de 2017.
- BRITO, A. M. G. et al., Aromaterapia: Da gênese a atualidade. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 1, p. 789–793, 2013.
- BURGESS, I. F. The mode of action of dimeticone 4% lotion against head lice, *Pediculus capitis*. **BMC Pharmacology**, 9(1), 2009.
- BURGESS, I. F. Current treatments for *pediculosis capitis*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 22(2), p. 131–136, 2009.

CANTALAPIEDRA, A., GISMERA, M. J., SEVILLA, M. T., PROCPIO, J. R. Sensitive and Selective Determination of Phenolic Compounds from Aromatic Plants Using an Electrochemical Detection Coupled with HPLC Method. **Phytochemical Analysis**, v. 25, p.247 – 254, 2014.

CARLOTTI, D. N., JACOBS, D. E. Therapy, control and prevention of flea allergy dermatitis in dogs and cats. **Veterinary Dermatology**, 11(2), p. 83–98, 2000.

CAVALCANTI, A.S., et al., Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, p. 356-362, 2015.

CAVALLERI, D., et al. Assessment of the speed of flea kill of lotilaner (CredelioTM) throughout the month following oral administration to dogs. **Parasites & Vectors**, 10(1), 2017.

CID, Y. P. Curva de concentração plasmática do fipronil por via subcutânea em bovinos e eficácia contra o carapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) microplus, um importante ectoparasito na pecuária brasileira e argentina. 2012. 65 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

COELHO, L. et al., Combination of thymol and eugenol for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Evaluation of synergism on immature stages and formulation development. **Veterinary Parasitology**, 2020.

COLES, T. B.; DRYDEN, M. W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.

CONCEIÇÃO, C. L. et al., Evaluation of Insecticidal Activity of Thyme, Oregano, and Cassia Volatile Oils on Cat Flea. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 6, p. 774–779, 2020

COSIMI, S.; ROSSI, E. C.; CANALE, A. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor*(L.). **Journal of Stored Products Research**, 45, p. 125-132, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites Vectors** 3, 26, 2010.

DE OLIVEIRA, P. R. et al. Fluazuron-induced morphophysiological changes in the cuticle formation and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs. **Parasitology Research**, v. 112, n. 1, p. 45-58, 2013.

DE OLIVEIRA, P. R. et al. Potential of the insect growth regulator, fluazuron, in the control of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae): Determination of the LD95 and LD50. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 35-39, 2012.

DHUMAL, C. V., AHMED, J., BANDARA, N., & SARKAR, P. Improvement of antimicrobial activity of sago starch/guar gum bi-phasic edible films by incorporating carvacrol and citral. **Food Packaging and Shelf Life**, 21, 2019.

DRYDEN, M. W., RUST, M. K. The cat flea: biology, ecology and control. **Veterinary Parasitology**, 52(1-2), 1994.

DRYDEN, M. W. Flea and tick control in the 21st century: challenges and opportunities. **Veterinary Dermatology**, 20(5-6), p. 435–440, 2009.

- EL-ABBASSI, A. *et al.*, Potential applications of olive oil mill wastewater as biopesticide for crops protection. **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 10-21, 2017.
- ELLSE, L.; WALL, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: A review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 28, n. 3, p. 233–243, 2014.
- ESCCAP. Control of Ectoparasites in Dogs and Cats (7 ed.), 2022.
- FERNANDES, M. J. G., PEREIRA, R. B., PEREIRA, D. M., FORTES, A. G., CASTANHEIRA, E. M. S., GONÇALVES, M. S. T. New Eugenol Derivatives with Enhanced Insecticidal Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n 23, 2020.
- FERNANDES, F.B. Controle de *Ctenocephalides* spp. em cães com dermatite alérgica à picada de pulga. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 38 páginas, 2014.
- FERREIRA, M. S. Caracterização estrutural de sistemas formados por compostos siliconados: mesofases, microemulsões e nanoemulsões. 2011. 150 páginas. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em UNICAMP, Campinas, 2011.
- FERREIRA, T. P.; CID, Y. P.; ALVES, M. C. C.; SANTOS, G. C. M.; AVELAR, B. R.; FREITAS, J. P.; OŻAROWSKI, M.; CHAVES, D. S. A. *In vitro* acaricidal activity of *Ocimum gratissimum* essential oil on *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma sculptum* and *Rhipicephalus microplus* larvae. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1604-1613, 2019.
- FERREIRA, F. M., DELMONTE, C. C., NOVATO, T. L. P., MONTEIRO, C. M. O., DAEMON, E., VILELA, F. M. P., & AMARAL, M. P. H. Acaricidal activity of essential oil of *Syzygium aromaticum*, hydrolate and eugenol formulated or free on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, 32(1), p. 41–47, 2018.
- FERREIRA, P. G. Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da esporotricose. 2019. 223 folhas. Tese (Doutorado em Ciências aplicadas a Produtos para Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos de Saúde, Niterói, UFF, 2019.
- FERREIRA, P. G. *et al.*, Development of a Method for the Quantification of Clotrimazole and Itraconazole and Study of Their Stability in a New Microemulsion for the Treatment of Sporotrichosis. **Molecules**, 24(12), 2019.
- FREITAS, J. P. *et al.*, Efficacy and residual effect of *Illicium verum* (star anise) and *Pelargonium graveolens* (rose geranium) essential oil on cat fleas *Ctenocephalides felis felis*. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 30, n 4, 2021.
- FRONTLINE: spray. Responsável Técnico Simone B. Zampieri - CRMV-SP 19.996, 2022. 1 Bula de remédio (1 página). Disponível em: https://www.boehringer-ingelheim.com.br/sites/br/files/frontline_spray_01.07.2019.pdf. Acesso em: novembro de 2022.
- FRONTLINE: topspot. Responsável Técnico Simone B. Zampieri - CRMV-SP 19.996, 2022. 1 Bula de remédio (5 páginas). Disponível em: https://www.boehringer-ingelheim.com.br/sites/br/files/frontline_spray_01.07.2019.pdf. Acesso em: novembro de 2022.
- GARAVAND, F., JALAI-JIVAN, M., ASSADPOUR, E., JAFARI, S. M. Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review. **Food Chemistry**, 2021.
- GUPTA, R. C.; DOSS, R. B.; SRIVASTAVA, A.; LALL, R.; SINHA, A. Nutraceuticals for control of ticks, fleas and other ectoparasites. **Springer Nature Switzerland**, p. 625-632, 2019.

HALOS, L., et al. Flea control failure? Myths and realities. **Trends in Parasitology**, 30(5), p. 228–233 2014.

HALOS, L., FOURIE, J. J., FANKHAUSER, B., BEUGNET, F. Knock-down and speed of kill of a combination of fipronil and permethrin for the prevention of *Ctenocephalides felis* flea infestation in dogs. **Parasites & Vectors**, 2016.

HIDAJAT, M. J., JO, W., KIM, H., NOH, J. Effective Droplet Size Reduction and Excellent Stability of Limonene Nanoemulsion Formed by High-Pressure Homogenizer. **Colloids Interfaces**, 2020.

HINK, W. F., FEE, B. J. Toxicity of d-limonene, the major component of citrus peel oil, to all life stages of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **J. Med. Entomol.**, v. 23, n. 4, p. 400-404, 1986.

INGLATERRA. Agência Europeia de Medicina. Medicina veterinária e inspeções (EMEA). Diretrizes para o teste e avaliação da eficácia de substâncias antiparasitárias para o tratamento e prevenção de infestação de carrapatos e de pulgas em cães e gatos do Comitê de medicamentos para uso veterinário (CVMP-EMEA). Londres, 12 de novembro de 2007.

Instituto Nacional De Metrologia Normalização E Qualidade Industrial – INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRC-008). Rio de Janeiro. 8^a revisão. 30 p. 2020.

JIANG, W., SOEPRONO, A., RUST, M. K., GAN, J. Ant control efficacy of pyrethroids and fipronil on outdoor concrete surfaces. **Pest Manag Sci**, p. 271-177, 2014.

JUNIOR, A. M. P. et al., Efficacy of carvacrol on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* engorged female ticks (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): effects on mortality and reproduction. **Natural Product Research**, 34:23, p. 3428-3431, 2020.

JÚNIOR, R. L. S., LIMA, R. K. R., MIRANDA, T. C. A. Measuring pH of bar soaps, shampoos and conditioners for veterinary use. **MedVet Dermato – Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária**, 3 (11), p. 344-348, 2014.

JÚNIOR, W. A. D., et al. Knockdown and Lethal Effects of Eight Commercial Nonconventional and Two Pyrethroid Insecticides against Moderately Permethrin-resistant Adult Bed Bugs, *Cimex lectularius* (L.) (Hemiptera: Cimicidae). **Biopestic. Int.**, 11(2), p. 108-117, 2015.

KABERA, J. et al., Insecticidal effects of essential oils of *Pelargonium graveolens* and *Cymbopogon citratus* on *Sitophilus zeamais* (Motsch.). **African Journal of Food Sciences**, v. 5, n. 6, p. 366–375, 2011.

KACHUR, K., SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–12, 2019.

KAUFMAN, T. S. The Multiple Faces of Eugenol. A Versatile Starting Material and Building Block for Organic and Bio-Organic Synthesis and a Convenient Precursor Toward Bio-Based Fine Chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 6, p. 1055-1086, 2015.

KORDALI, S., CAKIR, A., OZER, H., CAKMAKCI, R., KESDEK, M., METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, 99(18), p. 8788–8795, 2008.

LAMBERT, M. M., CAMPOS, D. R., AVELAR, B. R., SANTOS, R. R., BORGES, D. A., ASSIS, R. C. P., SCOTT, F. B., COUMENDOUROS, K. Eficácia da associação de fipronil e

permetrina no controle de *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* em cães artificialmente infestados. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, 39(4), 246-251, 2017.

LAMBERT, M. M. et al., Activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and its main constituent eugenol in the inhibition of the development of *Ctenocephalides felis felis* and the control of adults. **Veterinary Parasitology**, v. 282, n. April, p. 109-126, 2020.

LAMBERT, M. M. et al., *In vitro* evaluation of the acaricidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) essential oil and eugenol against non-fed larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n 1, 2021.

LIMA, A. S. et al., Use of encapsulated carvacrol with yeast cell walls to control resistant strains of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Industrial Crops and Products**, Volume 108, p. 190-194, 2017.

LIMA, A.S., LANDULFO, G.A., COSTA-JÚNIOR, L.M. Repellent effects of encapsulated carvacrol on the *Rhipicephalus (boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). **J. Med. Entomol.** 56, p. 881–885, 2019.

LIMA-DE-SOUZA, J. R. et al., Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, Volume 116, p. 66-72, 2019.

LIMA-DE-SOUZA, J. R.; DE OLIVEIRA, P. R.; ANHOLETO, L. A.; SODELLI, L. F.; FERREIRA, A. R. F.; REMEDIO, R. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. The bioactive compound carvacrol as a potential acaricide: An assessment of its effects on the integument of female *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks. **Microscopy research and technique**, 2021.

MAKINO, H., NEVES, R. C. S. M., SOUSA, V. R. F. Valores de pH de xampus de uso em cães. **Centro Científico Conhecer**, v. 10, n. 19, p.1869 – 1875, 2014

MARIANO, W. S. et al., *Arapaima gigas*, exposto a um biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*: perfil Leucocitário e análise da mucosa intestinal. In: EBI 2017 – XXII ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 22., 2017, Porto Seguro. Anais Ebi 2017 – XXII Encontro Brasileiro De Ictiologia. Porto Seguro: Universidade Federal do Sul da Bahia, p. 728-732, 2017.

MARIYATE, J., BERA, A. A critical review on selection of microemulsions or nanoemulsions for enhanced oil recovery. **Journal of Molecular Liquids** 353, 2022.

MILLER, W. H., GRIFFIN, C. E., CAMPBELL, K. E. Muller & Kirk's small animal dermatology. 7 ed. Elsevier, 2013.

MIRANDA, F.R. Avaliação *in vitro* da Atividade Sinérgica Entre Fipronil, Eugenol e Carvacrol Frente Larvas, Ninfas e Adultos Não Alimentados de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille, 1806). 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, 2022.

MONTEIRO, L. Desenvolvimento de método analítico para determinação de Resíduos de agrotóxicos em casca e polpa de tomate tipo italiano. 2018. 44 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso- Engenharia Agroindustrial Indústria Alimentícia, Universidade Federal do Rio Grande, Santo Antônio de Pádua, 2018.

MONTEIRO, C. et al., Thymol and eugenol microemulsion for *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato control: Formulation development, field efficacy, and safety on dogs. **Veterinary Parasitology** 296, 2021.

MOURA, M. C. P. A. *et al.*, Microemulsions and nanoemulsions applied to iron ore flotation. **Journal of Materials Research and Technology**, 8 (3), p. 2978 – 2986, 2019.

MURA, G. Tendências do Mercado Pet: Cenário Pet VET para os próximos anos. COMAC (Comissão Animais de Companhia), 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/animais-e-estimacao/2022/34a-ro-27-07-2022/tendencias-do-mercado-pet-vet-para-os-proximos-anos.pdf>. Acesso em janeiro de 2023.

NATAL, C.M.; PEREIRA, D.M.; PEREIRA, R.B.; FERNANDES, M.J.G.; FORTES, A.G.; CASTANHEIRA, E.M.S.; GONÇALVES, M.S.T. Carvacrol Derivatives with Potential Insecticidal Activity. **Chem. Proc.** v. 3, 37, 2021.

NATAL, C. M., *et al.*, New carvacrol and thymol derivatives as potential insecticides: synthesis, biological activity, computational studies and nanoencapsulation. **Royal Society of Chemistry**, v. 11, p. 34024–34035, 2021.

NISAR, M. F., KHADIM, M., RAFIQ, M., CHEN, J., YANG, Y., WAN, C. C. Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review. **Hindaei**, v. 2021, 14 p., 2021.

NOVATO, T. L. P. *et al.*, Evaluation of synergism and development of a formulation with thymol, carvacrol and eugenol for *Rhipicephalus microplus* control. **Experimental Parasitology**, v. 207, 2019.

NOVATO, T. L. P. *et al.*, Acaricidal activity of carvacrol and thymol on acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) populations and combination with cypermethrin: Is there cross-resistance and synergism? **Veterinary Parasitology**, v. 310, 2022.

NOVATO, T. L. P. *et al.*, *In vitro* assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Volume 260, p. 1-4, 2018.

ODHIAMBO T.R. Current Themes in Tropical Science: physiology of ticks. Pergamon, Oxford. 508p, 1982.

OLIVEIRA, L. M. *et al.*, *Ocimum gratissimum* essential oil and eugenol against *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus sanguineus*: *In vitro* activity and residual efficacy of a eugenol-based spray formulation. **Veterinary Parasitology**, v. 309, 2022.

OTONI, C. G. *et al.*, Microemulsions and nanoemulsions applied to iron ore flotation. **Food Hydrocolloids** 57, p. 72 -79, 2016.

PASCOA, H. Desenvolvimento e caracterização de microemulsão à Base de óleo de sucupira (*P. emarginatus* vog. Fabaceae) e Avaliação da atividade antiinflamatória tópica). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFG, 2012.

PAVONI, L. et al., An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. Nanomaterials, 2020.

PERRINS, N., HENDRICKS, A. Recent advances in flea control. **In Practice**, v. 29, p. 202-207, 2007.

PFISTER, K., ARMSTRONG, R. Systemically and cutaneously distributed ectoparasiticides: a review of the efficacy against ticks and fleas on dogs. **Parasites & Vectors**, 9(1), 2016.

PROCHNOW, D. Caracterização morfo-anatômica e metabólica de espécies do gênero *Cymbopogon*: uma contribuição para o melhoramento das espécies. 2018. 103 folhas. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

RATHOD, N. B., Kulawik, P., Ozogul F., Regenstein, J. M., Ozogul, Y. Biological activity of plant-based carvacrol and thymol and their impact on human health and food quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 733–748, 2021.

RIVIERI, J. E., PAPICH, M. G, Veterinary Pharmacology & Therapeutics. 10 ed. Hoboken, NJ: **John Wiley & Sons Inc.**, 2018.

RUST, M. K. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. **TRENDS in Parasitology**, v. 21, n. 5, p. 232-236, 2005.

RUST, M. K. How do flea control products kill fleas? **NAVC Clinician's Brief**, 2010.

RUST, M. K.; LANCE, W.; HEMSARTH, H. Synergism of the IGRs Methoprene and Pyriproxyfen Against Larval Cat Fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of medical Entomology**, v. 53, n. 3, p. 629-633, 2016.

RUST, M. K. The Biology and Ecology of Cat Fleas and Advancements in Their Pest Management: A Review. **Insects**, v. 8, n. 4, p. 118, 2017.

RUST, M. K. Recent Advancements in the Control of Cat Fleas. **Insects**, v. 11, 2020.

SAID-AL AHL, H.; HIKAL, W.; TKACHENKO, K. G. Essential Oils with Potential as Insecticidal Agents: A Review. **International Journal of Environmental Planning and Management**, v. 3, n. 4, p. 23–33, 2017.

dos SANTOS, *et al.*, Fipronil Tablets: Development and Pharmacokinetic Profile in Beagle Dogs. **AAPS PharmSciTech**, 21, v. 9, 2020.

dos SANTOS, J. V. B. *et al.*, *In vitro* activity of essential oils against adult and immature stages of *Ctenocephalides felis felis*. **Parasitology**, v. 147, n. 3, p. 340–347, 2019.

SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R., DA SILVA MATOS, R.; MELO, D.; GOMES, G. A.; DE CARVALHO, M. G.; DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 112, n. 10, p. 3471-3476, 2013.

SHEMESH, R., *et al.*, Novel LDPE/halloysite nanotube films with sustained carvacrol release for broad-spectrum antimicrobial activity. **RSC Advances**, 5(106), p. 87108–87117, 2015.

SHETH, T., SESHA DRI, S., PRILESZKY, T. HELGESON, M. E. Multiple nanoemulsions. **Nature Reviews Materials**, 2020.

SILVA, G. B. R. F. Desenvolvimento e caracterização físico-química e biofarmacêutica de nano e microemulsões lipídicas de uso intravenoso contendo metildidrojasmonato. 2013. 167 folhas. Tese (Doutorado em Nanotecnologia Farmacêutica) – Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, UNESP, Araraquara, SP, 2013.

SILVA, J. D. F. DA, SILVA, Y. P. PIATNICKI, C. M. S., BÖCKEL, W. J., MENDONÇA, C. R. B. Microemulsions: components, characteristics, potentialities in food chemistry and other applications. **Química Nova**, 2015.

SKUHROVEC, J. *et al.*, Insecticidal activity of two formulations of essential oils against the cereal leaf beetle. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science**, v. 68,

n. 6, p. 489–495, 2018.

SOARES, Eduardo Fellipe Melo Santos et al. Insecticidal activity of essential oil of *Cannabis sativa* against the immature and adult stages of *Ctenocephalides felis felis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 32, 2023.

SONENSHINE, D.E., ROE, R.M. Biology of Ticks, 2 ed., Vol 1. Oxford University Press, Oxford. 539p, 2014.

SONGKRO, S. et al., Effects of Glucam P-20, Vanillin, and Fixolide on Mosquito Repellency of Citronella Oil Lotions. **Journal of Medical Entomology**, Volume 49, p. 672 - 677, 2012.

SOUZA, A. I. P, et al., *In vitro* assessment of the acaricidal activity of a carvacrol shampoo on tick larvae. **Experimental Parasitology**, v. 242, 2022.

TAVARES, C. P. et al., Effects of carvacrol and thymol on the antioxidant and detoxifying enzymes of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 13, 2022.

TEMPERINI, M. B. et al. Insecticidal activity *in vitro* of the essential oil of *Pogostemon cablin* against *Ctenocephalides felis felis*. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 44, 2022.

TRUZZI, E., BENVENUTI, S., BERTELLI, D. AND SCOZZOLI, M. Optimization and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Hesperidin and Carvacrol for Veterinary Use. **American Journal of Analytical Chemistry** 12, p. 459-470, 2021.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, 2021.

VALE, L. et al., Binary combinations of thymol, carvacrol and eugenol for *Amblyomma sculptum* control: Evaluation of *in vitro* synergism and effectiveness under semi-field conditions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 6, p. 101816, 2021.

VALENTE, P. P., AMORIM, J. M., CASTILHO, R. O., LEITE, R. C., & RIBEIRO, M. F. B. *In vitro* acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 113(1), p. 417–423, 2014.

VALENTE, P. P. et al., *In vivo* efficacy of a biotherapeutic and eugenol formulation against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, 116(3), 929–938, 2017.

VASCONCELLOS, J. S. P. et al., Atividade acaricida de diferentes solventes sobre fêmeas ingurgitadas e larvas de *Rhipicephalus microplus*. **Pesq. Vet. Bras.** 38(6), p. 1125-1129, 2018.

WANG, G. W. et al., *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 10–20, 2011.

ZANARDI, O. Z. et al., Bioactivity of a matrine-based biopesticide against four pest species of agricultural importance. **Crop Protection**, [S.I.], v. 67, p. 160-167, 2015.

ZARDO, I. L., P. M. L. Segurança, eficácia e praticidade dos ectoparasiticidas para pulgas e carrapatos de cães e gatos. **Investigação**, 18(4), p. 22-31, 2019.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.