

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

TESE

**Ensaio clínico de formulação em spray contendo carvacrol e eugenol contra
Rhipicephalus linnaei e *Ctenocephalides felis felis* em cães artificialmente
infestados**

Fernando Rocha Miranda

2026



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

**Ensaio clínico de formulação em spray contendo carvacrol e eugenol contra
Rhipicephalus linnaei e *Ctenocephalides felis felis* em cães artificialmente
infestados**

Fernando Rocha Miranda

Sob a orientação da Professora Dr.^a
Yara Peluso Cid

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

Seropédica, RJ

2026

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

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

M672e MIRANDA, Fernando Rocha, 1990-
Ensaio clínico de formulação em spray contendo carvacrol e eugenol contra *Rhipicephalus linnaei* e *Ctenocephalides felis felis* em cães artificialmente infestados / Fernando Rocha MIRANDA. - Seropédica, 2026.
68 f.

Orientadora: Yara Peluso CID.
Coorientador: Fabio Barbour SCOTT.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2026.

1. Biocontrole. 2. Terpenoides. 3. Fenilpropanoides. 4. Carrapatos. 5. Pulgas. I. CID, Yara Peluso, 1982-, orient. II. SCOTT, Fabio Barbour, -, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.



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



ATA N° 357/2026 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.006694/2026-69

Seropédica-RJ, 13 de fevereiro de 2026.

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

FERNANDO ROCHA MIRANDA

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

TESE APROVADA EM 09/02/2026

(Assinado digitalmente em 18/02/2026 18:26)

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

(Assinado digitalmente em 20/02/2026 14:21)

LIVIO MARTINS COSTA JUNIOR
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.563-##

(Assinado digitalmente em 04/06/2026 12:21)

ISABELLA VILHENA FREIRE MARTINS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.547-##

(Assinado digitalmente em 20/05/2026 08:46)

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

(Assinado digitalmente em 18/02/2026 17:31)

BARBARA RAUTA DE AVELAR
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.647-##

Visualize o documento original em <https://sigac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 357, ano: 2026,
tipo: ATA, data de emissão: 13/02/2026 e o código de verificação: 4acfc4e22e

*Dedico aos amores da minha vida
À minha mãe, Janete Batista Rocha
À minha avó, Gisélia Rocha
Meus alicerces, sem vocês, nada seria possível*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Janete, pela sua garra, por sempre ter acreditado no meu potencial, mesmo quando eu mesmo duvidei. Sem seu apoio, o Fernando de 2010 não teria saído de casa para cursar graduação noutro estado. O Fernando graduado, não teria viajado para mais longe ainda em busca dos seus objetivos. Hoje, distantes apenas geograficamente, eu digo com todas as palavras que, se não fosse por ti, nada disso seria possível, te amo.

Agradeço a minha avó, dona Gisélia. Desde criança sempre me mostrando o caminho da integridade e perseverança. Olha aonde já cheguei, vó, espero que continue presenciando meu trajeto por mais uns bons anos, é apenas o começo.

Obrigado ao meu parceiro, primo e amigo, Rafael. Somos tão próximos que o considero como um irmão. Desde crianças seguimos, nos formamos juntos e, com muita alegria, tenho a sorte de ter você por perto na vida profissional também. Acredite, é bem, mais fácil quando trabalhamos juntos.

Minha amiga Marcy, eu tenho uma felicidade genuína ao lembrar que você existe e é uma pessoa próxima, afinal, quem não gostaria de ser próximo a uma pessoa tão especial, me acolheu desde o início, me ajudou e ajuda em tudo. Gostaria que soubesse que, apesar de termos nos encontrado na metade do desenvolvimento do meu trabalho, sua amizade foi um ponto crucial para que eu me mantivesse firme. Contigo aprendi a olhar o mundo diferente, ser mais empático e feliz. Obrigado.

Agradeço a minha orientadora, Professora Yara. O doutorado é realmente algo difícil, o trabalho é árduo e as vezes pensamos em desistir, porém, quando temos a sorte de sermos orientados por pessoas iluminadas, tudo se torna muito mais fácil. Eu tive muita sorte, te seguirei academicamente até o fim. Obrigado por ser inspiração para nós.

Muito obrigado a toda equipe do agora “GRISIUS” que eu tive o imenso prazer de fazer parte. Cresci, vivi, aprendi e hoje afirmo, fiz boas amizades e conquistei muitas coisas neste ambiente. Obrigado Anna Júlia, Débora, Andressa, Ygor, Brena, Isabelle, Diefrey, Bárbara, Ingrid, Giovanna, Vinícius, Thainara. Meu coração está cheio de gratidão. Obrigado a todos que dedicaram seu tempo e carinho. Que cada um sinta o meu agradecimento, mesmo que eu não tenha citado todos os nomes, afinal, que equipe gigantesca, uma família!

Obrigado a minha gatinha companheira Pitaya, todas as vezes que me sentei para trabalhar e você veio dormir aos meus pés no frio da serra catarinense, foram únicos. Beatriz, muito obrigado por me ajudar nesta etapa crucial

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

BIOGRAFIA

Fernando Rocha Miranda, filho de Janete Batista Rocha e Uilson Miranda Souza, nascido no dia 21 de janeiro de 1990, na cidade de Senhor do Bonfim, no estado da Bahia, cursou o ensino fundamental no colégio Educandário Nossa Senhora do Santíssimo Sacramento e ensino médio no colégio Centro Educacional Sagrado Coração.

Ingressou no ensino superior através do ENEM no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Vale do São Francisco, no ano de 2013, o concluindo em 2018. Durante a graduação, atuou como monitor bolsista da disciplina de farmacologia veterinária e monitor voluntário da disciplina de farmacologia animal, para o curso de Zootecnia, sob orientação do professor Dr. Raimundo Campos Palheta. Em 2019 foi Médico veterinário de Apoio Técnico no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV – UFRRJ) e ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária (PPGCV) onde trabalhou por dois anos até concluir o seu mestrado.

Bolsista CNPq de Doutorado Acadêmico Industrial (DAI - CNPq), trabalhou pesquisando a atividade de biocompostos botânicos contra ectoparasitos em cães e gatos.

Iniciou sua carreira na área acadêmica sendo professor substituto de farmacologia e toxicologia veterinária na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

RESUMO

MIRANDA, Fernando Rocha. **Avaliação da eficácia clínica de uma formulação em spray contendo carvacrol e eugenol contra *Rhipicephalus linnaei* e *Ctenocephalides felis felis* em cães artificialmente infestados** 2026. 69p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

A estreita convivência entre humanos e animais de companhia aumenta a demanda por terapias seguras contra ectoparasitos de importância médico-veterinária, como *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus linnaei*. O controle convencional, baseado em moléculas sintéticas, frequentemente associa-se a efeitos tóxicos e impacto ambiental deletério, incentivando a busca por alternativas naturais. Neste contexto, o presente estudo avaliou a eficácia *in vivo* de uma formulação em spray contendo eugenol e carvacrol, biocompostos com atividade sinérgica comprovada *in vitro*, para o controle desses ectoparasitos em cães da raça Beagle. Foram utilizados 16 cães Beagle do plantel do LQEPV. Todos os animais selecionados apresentavam infestações basais homogêneas e adequadas (>25% de recuperação), sem diferenças estatísticas entre si. Após esta verificação, os cães foram ranqueados e distribuídos nos grupos tratado (GT) e controle (GC). O grupo tratado recebeu a formulação no dia 0, com a eficácia avaliada aos +2, +7 e +14 dias, enquanto o controle permaneceu sem tratamento. A carga parasitária foi avaliada pela contagem dos ectoparasitos retidos após a infestação artificial de cada animal com 25 casais de *R. linnaei* e 50 casais de *C. felis felis*. Os valores de média geométrica no grupo controle (GC) mantiveram-se estáveis ao longo do período experimental, registrando 35,8 (D+2), 33,8 (D+7) e 35,0 (D+14) para *R. linnaei*, e 52,8 (D+2), 65,8 (D+7) e 80,8 (D+14) para *C. felis felis*. Em contraste, o grupo tratado (GT) apresentou uma redução significativa, com médias de 1,39 (D+2), 15,76 (D+7) e 32,64 (D+14) para *R. linnaei*, e 0,54 (D+2), 24,97 (D+7) e 50,09 (D+14) para *C. felis felis*. Com base nesses resultados, a eficácia acaricida da formulação foi calculada em 96,11% (D+2), 53,32% (D+7) e 6,77% (D+14) para *R. linnaei*, enquanto a eficácia pulgicida atingiu 98,97% (D+2), 62,05% (D+7) e 38,02% (D+14) para *C. felis felis*. O perfil de segurança mostrou-se satisfatório, uma vez que não foram observados sinais de toxicidade ou alterações hematológicas e bioquímicas significativas. Conclui-se que a associação em estudo configura uma alternativa natural, eficaz e segura para o controle estratégico desses ectoparasitos.

Palavras-chave: Biocontrole, Terpenóides, Fenilpropanóides, Carrapatos, Pulgas

ABSTRACT

MIRANDA, Fernando Rocha. **Evaluation of the clinical efficacy of a spray formulation containing carvacrol and eugenol against *Rhipicephalus linnaei* and *Ctenocephalides felis felis* in artificially infested dogs** 2026. 69p. Thesis (Doctor in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

The close coexistence between humans and companion animals increases the demand for safe therapies against ectoparasites of medical and veterinary importance, such as *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus linnaei*. Conventional control, based on synthetic molecules, is often associated with toxic effects and deleterious environmental impact, encouraging the search for natural alternatives. In this context, the present study evaluated the in vivo efficacy of a spray formulation containing eugenol and carvacrol, biocompounds with proven synergistic activity in vitro, for the control of these ectoparasites in Beagle dogs. Sixteen Beagle dogs from the LQEPV colony were used. All selected animals presented homogeneous and adequate basal infestations (>25% recovery), with no statistical differences between them. After this verification, the dogs were ranked and distributed into treated (TG) and control (CG) groups. The treated group received the formulation on day 0, with efficacy evaluated on days +2, +7, and +14, while the control group remained untreated. Parasite load was assessed by counting retained ectoparasites after artificial infestation of each animal with 25 pairs of *R. linnaei* and 50 pairs of *C. felis felis*. Geometric mean values in the control group (CG) remained stable throughout the experimental period, recording 35.8 (D+2), 33.8 (D+7), and 35.0 (D+14) for *R. linnaei*, and 52.8 (D+2), 65.8 (D+7), and 80.8 (D+14) for *C. felis felis*. In contrast, the treated group (TG) showed a significant reduction, with means of 1.39 (D+2), 15.76 (D+7), and 32.64 (D+14) for *R. linnaei*, and 0.54 (D+2), 24.97 (D+7), and 50.09 (D+14) for *C. felis felis*. Based on these results, the acaricidal efficacy of the formulation was calculated as 96.11% (D+2), 53.32% (D+7), and 6.77% (D+14) for *R. linnaei*, while the fleacidal efficacy reached 98.97% (D+2), 62.05% (D+7), and 38.02% (D+14) for *C. felis felis*. The safety profile was satisfactory, as no signs of toxicity or significant hematological and biochemical alterations were observed. It is concluded that the studied association represents a natural, effective, and safe alternative for the strategic control of these ectoparasites.

Keywords: Biocontrol, Terpenoids, Phenylpropanoids, Ticks, Fleas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ovos de <i>Rhipicephalus linnaei</i> observados em microscópio estereoscópico (40X) (A), Massas posturais obtidas em laboratório com temperatura e umidade controladas (B). Fonte: Arquivo pessoal.....	3
Figura 2. Larva de <i>Rhipicephalus linnaei</i> apresentando como característica que a identifica taxonomicamente, seus três pares de patas. Fonte: Arquivo pessoal.....	4
Figura 3. Vista dorsal de uma ninfa de <i>Rhipicephalus linnaei</i> , onde podem ser observados seus quatro pares de patas. Fonte: Arquivo pessoal.....	4
Figura 4. <i>Rhipicephalus linnaei</i> fêmea adulto com o escudo delimitado até menos da metade do corpo (A) e um macho com seu escudo recobrindo todo o corpo (B).....	5
Figura 5. <i>Rhipicephalus linnaei</i> fêmea adulta ingurgitada, prestes a realizar sua postura. Fonte: Arquivo pessoal.....	6
Figura 6. Ovos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> observados em lupa. Fonte: Arquivo pessoal.....	7
Figura 7. Larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> em placa de petri (A), Larva L3 vista em zoom de lupa (B), Pupários (C) e Pulga adulta após emergir (D). Fonte: Arquivo pessoal.....	8
Figura 8. Sinais clínicos de doença alérgica à picada de ectoparasitos em cão infestado por pulgas <i>Ctenocephalides felis felis</i> e carrapatos <i>Rhipicephalus linnaei</i> . Fonte: Arquivo pessoal.....	9
Figura 9. Rota metabólica de produção dos fenilpropanóides, com destaque para a complexidade e os subprodutos que conferem características específicas para as plantas (Vogt, 2010)	19
Figura 10. Rota metabólica da biossíntese de terpenóides (Kumar <i>et al.</i> , 2019)	20
Figura 11. Rota metabólica a partir do GGP que origina os bioativos CAR e timol.....	21
Figura 12. Estrutura química do Eugenol.....	22
Figura 13. Fêmeas (A) e machos (B) de <i>Rhipicephalus linnaei</i> não alimentados, mortos após exposição ao eugenol, apresentando sinais de paralisia flácida e morte. Fonte: autor.	22
Figura 14. Estrutura química do Carvacrol.....	23
Figura 15. Fêmeas (A) e machos (B) de <i>Rhipicephalus linnaei</i> não alimentados, mortos após exposição ao CAR, apresentando sinais de paralisia espástica e morte por hiperexcitabilidade.....	23
Figura 16. Fêmeas (A) e machos (B) de <i>Rhipicephalus linnaei</i> não alimentados, mortos após exposição ao CAR e EUG, apresentando sinais tanto de morte por excitação, quanto por paralisia flácida.....	24
Figura 17. Formulações à base de eugenol (EUG) e carvacrol (CAR) em frascos spray, utilizadas para aplicação tópica nos animais.....	32
Figura 18. Gráfico demonstrando os valores das médias geométricas de recuperação de carrapatos <i>Rhipicephalus linnaei</i> recuperados vivos e fixados de cães artificialmente infestados, tratados com uma formulação em spray contendo EUG + CAR.....	36

Figura 19. Gráfico demonstrando os valores das médias geométricas de recuperação de pulgas, *Ctenocephalides felis felis* recuperados vivos e fixados de cães artificialmente infestados, tratados com uma formulação em spray contendo EUG + CAR.....37

Figura 20. Gráfico demonstrando os valores eficácias geométricas da formulação em spray contendo EUG + CAR, frente a *Rhipicephalus linnaei* e *Ctenocephalides felis felis* em cães da raça beagle artificialmente infestados.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos químicos utilizados para o controle de ectoparasitos, de acordo com o tempo.....	11
Tabela 2. Identificação, peso em quilogramas e gênero dos animais escolhidos para o estudo, pré-randomização contendo 10 fêmeas e 10 machos.....	33
Tabela 3. Número de ectoparasitos viáveis recuperados por animal após desafio artificial para ranqueamento.....	34
Tabela 4. Caracterização dos grupos experimentais: número de cães, sexo e idade dos animais da raça Beagle utilizados no estudo.....	34
Tabela 5. Média geométrica dos valores da recuperação pré-tratamento (dia -7) de <i>Rhipicephalus linnaei</i> e <i>Ctenocephalides felis felis</i> de cães beagle artificialmente infestados para os grupos controle (GC) e grupo tratado (GT).....	35
Tabela 6. Valores de média geométrica obtidos a partir da contagem de Pulgas (<i>Ctenocephalides felis felis</i>) e carrapatos (<i>Rhipicephalus linnaei</i>), ambos vivos e fixados cães no grupo controle e tratado, e valores de eficácia pulgicida e acaricida de uma formulação em spray administrada por via tópica em beagles artificialmente infestados.....	36
Tabela 7. Valores dos parâmetros hematológicos de cães Beagle dos grupos controle e tratado, antes e após a aplicação do produto.....	39
Tabela 8. Valores dos parâmetros bioquímicos de cães Beagle dos grupos controle e tratado, antes e após a aplicação do produto.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 O complexo <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato (s.l.): “O Carrapato Marrom dos Cães”.....	2
2.2 <i>Rhipicephalus linnaei</i> : Espécie Tropical do Complexo <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato	2
2.2.1 <i>Rhipicephalus linnaei</i> : Ciclo de vida e Morfologia.....	2
2.3 <i>Ctenocephalides felis felis</i> : “A pulga dos Gatos”	6
2.3.1 <i>Ctenocephalides felis felis</i> : Ciclo de vida e Morfologia.....	7
2.4. <i>Rhipicephalus Linnaei</i> e <i>Ctenocephalides felis felis</i> : Importância Médico Veterinária e Para a Saúde Única	8
2.5 Evolução Histórica do Controle de Pulgas e Carrapatos na Medicina Veterinária	10
2.6 Evolução Histórica Das Formas Farmacêuticas No Controle De Ectoparasitos Na Medicina Veterinária	11
2.7 O Controle Químico De Ectoparasitos Em cães: Principais Moléculas.....	13
2.7.1 Organofosforados e carbamatos	13
2.7.2 Piretróides.....	14
2.7.3 Formamidinas	14
2.7.4 Lactonas Macrocíclicas	15
2.7.5 Neonicotinóides	15
2.7.6 Fenilpirazóis	15
2.7.7 Spinosinas.....	16
2.7.8 Disruptores de crescimento de artrópodes: Análogos do hormônio juvenil e Inibidores da síntese de quitina	16
2.7.9 Isoxazolinás	17
2.8 Controle Natural de Infestações por <i>Ctenocephalides felis felis</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (s.l.).....	18
2.8.1 Metabolismo secundário de plantas: produção de bioativos repelentes	18
2.8.2 Uso do Eugenol e Carvacrol no controle de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (s.l.).....	21
2.9 Das Vias de Administração à Formulação Tópica: Uma Abordagem Estratégica No Controle de Ectoparasitos.....	25
2.9.1 Panorama das formas farmacêuticas tópicas	25
2.9.2 Formulações spot-on	26
2.9.3 Coleiras impregnadas com ectoparasiticidas.....	26
2.9.4 Formulações em aerossol e atomização (sprays).....	27
2.10 Efeitos Adversos: Perfil Toxicológicos para o Uso Seguro de Eugenol e Carvacrol.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Desenvolvimento da formulação e obtenção de doses	28
3.2 Obtenção, Seleção e Critérios de Inclusão dos Animais	28
3.3 Infestações	29
3.4 Ranqueamento e Randomização.....	29
3.5 Tratamento.....	30
3.6 Eficácia Terapêutica e Persistência Contra Reinfestação.....	30
3.7 Análise estatística	31
3.8 Avaliação da segurança terapêutica.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Formulações	31

4.2 Seleção Dos Animais.....	32
4.3 Ranqueamento e randomização	33
4.4 Eficácia	36
4.5 Segurança.....	39
5 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

A convivência entre humanos e animais de companhia, é algo estabelecido há séculos. Esta relação mutualística iniciou-se entre canídeos e homínídeos coletores-caçadores onde os animais, além de serem utilizados como proteção ativa contra investidas de animais selvagens, também ofereciam suporte em caças, afugentando e capturando presas para a alimentação de ambos. Este vínculo se intensifica muito, principalmente depois da pandemia de COVID-19 onde pets passam a ser utilizados por humanos também como atenuadores de estresse, ansiedade, e da solidão do isolamento.

Este crescente vínculo atualmente se mostra na constante preocupação dos responsáveis com o bem-estar animal, fator que impulsiona amplamente o desenvolvimento de fármacos e protocolos terapêuticos cada vez mais seguros, principalmente contra ectoparasitos, priorizando a eficácia e a segurança das moléculas.

As pulgas *Ctenocephalides felis felis* e os carrapatos que incluem o táxon *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) são os principais ectoparasitos de cães e gatos. Sua importância não se restringe ao potencial de parasitismo, causando espoliação sanguínea e reações alérgicas, mas estende-se aos danos indiretos que impõem à saúde dos hospedeiros, por atuarem como vetores de microrganismos patogênicos. Entre os agentes transmitidos por esses ectoparasitos, destacam-se, para os carrapatos, *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp. e *Mycoplasma* spp., enquanto as pulgas são reconhecidas como vetores de *Bartonella* spp. e do cestoda *Dipylidium caninum*.

Historicamente, o controle de ectoparasitos em animais de companhia baseava-se no uso de moléculas sintéticas aplicadas por imersão ou pulverização, como piretróides e formamidinas, fármacos amplamente associados a efeitos tóxicos nos animais tratados. Atualmente, embora novas classes farmacológicas e grupos químicos mais seguros estejam disponíveis, os produtos sintéticos ainda constituem a principal ferramenta de controle, tanto nos animais quanto no ambiente. A facilidade de acesso a esses produtos pela população, aliada à sua ampla utilização, mantém o risco de intoxicações acidentais e contaminação ambiental como uma preocupação constante. Esse cenário reforça a necessidade de se investigar e desenvolver alternativas eficazes e mais seguras, como as formulações à base de compostos naturais, que possam minimizar os impactos adversos associados ao controle químico convencional.

Tendo em vista tal problemática, a utilização de fitoinsumos e seus derivados para o controle de infestações por ectoparasitos em animais de companhia, tem se destacado como, além de uma alternativa sustentável, também segura para o meio ambiente e o paciente. Dentro desta área, os extratos vegetais, óleos essenciais e os biocompostos isolados botânicos, que são provenientes de plantas como o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e o orégano (*Origanum vulgare*) demonstram atividades acaricidas e pulgicidas. Nesse contexto, a formulação em spray apresenta-se como uma estratégia farmacotécnica ideal para veicular compostos naturais voláteis, como os terpenoides e fenilpropanoides. Esta forma de aplicação, por atomização direta, garante uma cobertura uniforme e imediata da superfície corporal, assegurando que todos os compostos atinjam simultaneamente o sítio de ação, potencializando associações sinérgicas e otimizando a eficácia do tratamento.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia in vivo de uma formulação spray contendo eugenol e carvacrol no controle simultâneo de infestações por *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus linnaei* em cães artificialmente infestados, visando contribuir para o desenvolvimento de alternativas mais seguras e sustentáveis aos ectoparasiticidas sintéticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O complexo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.): “O Carrapato Marrom dos Cães”

Com uma distribuição geográfica bem definida, o popularmente conhecido como “carrapato marrom dos cães” ou “carrapato vermelho dos cães” compreende um amplo complexo taxonômico de espécimes de *R. sanguineus* (s.l.). Na América Latina, a região neotropical abriga as chamadas “espécies tropicais” (do Brasil ao México), enquanto as “espécies temperadas” são endêmicas das regiões subtropicais (Argentina, Paraguai e Uruguai) (Labruna *et al.*, 2017). As infestações por esses ectoparasitos apresentam grande relevância médica, uma vez que tratam-se de espécies altamente adaptáveis, encontradas tanto em ambientes rurais quanto urbanos (Nieto-Cabrales *et al.*, 2024; Dantas-Torres, 2010).

Pertencente ao filo Arthropoda, e a família taxonômica Ixodidae, o gênero *Rhipicephalus* foi inicialmente descrito como *Ixodes sanguineus* por Latreille (1806), sendo posteriormente alterado para o atual *R. sanguineus*, que ainda é extensamente estudado, inclusive com o uso de biologia molecular, fato comprovado pela recente descoberta de um neótipo, a linhagem tropical do *R. sanguineus* (s.l.), padronizada então como *Rhipicephalus linnaei* (Šlapeta *et al.*, 2022; Dantas-Torres *et al.*, 2013^b; Dantas-Torres *et al.*, 2010).

2.2 *Rhipicephalus linnaei*: Espécie Tropical do Complexo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato

O carrapato *R. sanguineus* (s.l.) tem sido alvo de diversos estudos taxonômicos, responsáveis pelo surgimento de duas subdivisões; *R. linnaei* (s.l.) “tropical” ou “linhagem tropical” e *R. sanguineus* (s.l.) “linhagem temperada”, ambas definidas primariamente pela sua distribuição geográfica bem relatada (Šlapeta *et al.*, 2022; Dantas-Torres *et al.*, 2013^b).

Na América Latina, a linhagem tropical é bem relatada, em regiões de clima mais quente. Essa característica é particularmente marcante no Brasil, um país de dimensões continentais que, devido à sua extensão latitudinal, abriga uma variedade de climas, indo do semiárido ao subtropical (Labruna *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2016).

A distribuição geográfica é um dos fatores cruciais para a determinação da espécie pois, são morfologicamente semelhantes, se diferem fisiologicamente e geneticamente apenas. A linhagem temperada é significativamente mais tolerante ao frio, exibindo uma taxa de sobrevivência superior em condições de inverno nas regiões do cone sul da América Latina, fator que explica o motivo da linhagem tropical não conseguir estabelecer populações nestas áreas, sendo endêmica das porções mais tropicais do país (Šlapeta *et al.*, 2022; Labruna *et al.*, 2017).

2.2.1 *Rhipicephalus linnaei*: Ciclo de vida e Morfologia

Linhagem tropical do complexo *R. sanguineus* (l.s.), *R. linnaei* expressa necessariamente ciclo trioxênico, determinado por fases no ambiente necessária para a realização de postura e ecdise, e fases em hospedeiros diferentes, para alimentação necessariamente hematófaga e cópula. Outra característica importante é o seu hábito nidícola, ou seja, são carrapatos com hábitos internos ou endofílicos, possuem também geotropismo negativo, sendo comumente encontrados fora do hospedeiro, em paredes, telhados, cumeeiras e colunas de alpendres, fato que aumenta o potencial de parasitismo deste carrapato, tendo em vista que o ambiente passa também ter bastante importância na luta contra infestações. O ciclo

de vida do *R. linnaei* é bastante complexo, necessitando de três hospedeiros, além do envolvimento ambiental para evolução e postura, sendo representado por quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adultos (Bandaranayaka *et al.*, 2022; Nava *et al.*, 2018; Dantas-Torres, 2010).

Diferentemente da linhagem temperada, o *R. linnaei* não realiza a diapausa, seu desenvolvimento é contínuo, vantajoso em climas quentes, porém, incompatível com regiões mais frias, onde as formas imaturas não resistiriam (Labruna *et al.*, 2017).

Os ovos do *R. linnaei*, geralmente encontrados em massas posturais escondidas no ambiente, tem características esféricas, de tamanho pequeno, possuindo uma coloração que pode variar entre marrom claro ou tons amarelados escuros. São postos por fêmeas ingurgitadas em forma de massa postural, contendo entre 1500 e 4000 ovos, que podem eclodir num período entre 6 dias a semanas (Dantas-Torres, 2010). Ovos e posturas podem ser observados na figura 1.

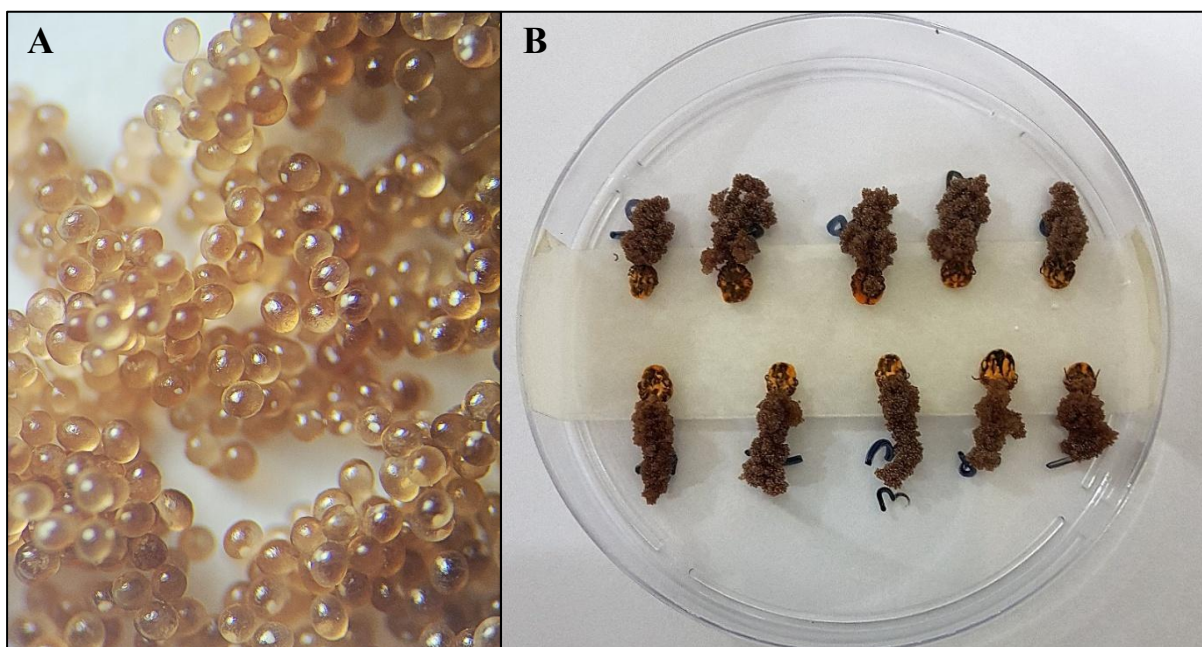


Figura 1. Ovos de *Rhipicephalus linnaei* observados em microscópio estereoscópico (40X) (A), Massas posturais obtidas em laboratório com temperatura e umidade controladas (B). Fonte: Arquivo pessoal

O período de incubação dos ovos desses carrapatos é, em média, de 23 dias, sendo influenciado por fatores como umidade e, principalmente, temperatura. A eclosão dos ovos ocorre dentro de uma amplitude térmica de 20 a 30°C, com temperaturas superiores a 27°C acelerando significativamente o processo. As larvas recém-eclodidas não possuem capacidade imediata de parasitar o hospedeiro, necessitando de um período de maturação para o completo endurecimento do exoesqueleto, o que as torna aptas à fixação e ao início do processo de alimentação (Labruna *et al.*, 2017; Dantas-Torres, 2010).

A fase larval destaca-se pela baixa especificidade parasitária, infestando diversos grupos de mamíferos, aves e répteis, incluindo humanos. Nesse estágio, os indivíduos são hexápodes (possuem três pares de patas), conforme ilustrado na Figura 2, e medem aproximadamente 0,50 mm de altura por 0,40 mm de largura. Além disso, as larvas podem permanecer viáveis no ambiente por até 60 dias à espera de um hospedeiro, em um processo de alimentação que, uma vez iniciado, dura entre 3 e 10 dias. (Dantas-Torres, 2010; Oliveira *et al.*, 2005).



Figura 2. Larva de *Rhipicephalus linnaei* apresentando como característica que a identifica taxonomicamente, seus três pares de patas. Fonte: Arquivo pessoal.

Após a alimentação, as larvas se desprendem e caem no ambiente, se abrigam e realizam a ecdise, que é o processo de evolução de fases com a troca do exoesqueleto de quitina, transformando-se em ninfas, processo que pode durar até 15 dias. Nesta fase, os quatro pares de patas são observados e são maiores que as larvas, medindo em torno de 1,20 cm de altura e 0,6 mm de largura, porém, ainda não apresentam dimorfismo sexual e necessitam mais uma vez procurar um hospedeiro novo para sua alimentação que pode perdurar por até 11 dias, dando continuidade ao ciclo (Nava *et al.*, 2018; Dantas-Torres, 2010). A figura 3 demonstra as características morfológicas da vista superior de uma ninfa de *R. linnaei*.



Figura 3. Vista dorsal de uma ninfa de *Rhipicephalus linnaei*, onde podem ser observados seus quatro pares de patas. Fonte: Arquivo pessoal.

Assim como a fase larval, as ninfas alimentadas mais uma vez se desprendem do hospedeiro e procuram um ambiente seguro para a realização da ecdise que a transformará desta vez em adultos. Os adultos, além de apresentarem dimorfismo sexual, também exibem agora seu escudo dorsal, característico dos ixodídeo (carrapatos duros). Os machos apresentam um escudo não ornamentado que se prolonga por todo idiossoma, enquanto as fêmeas têm apenas um terço do corpo preenchido pelo escudo, tendo em vista que necessitará ingurgitar completamente, para realizar a oviposição. O aparelho bucal, denominado gnatossoma, é curto e tem uma base em forma de hexágono, suas coxas, no primeiro par apresentam divisões que as tornam bífidas, na região ventral, as placas ventrais adanaais são apresentadas em pares e a estrutura respiratória, denominada peritrema, é em formato de vírgula (Nava *et al.*, 2015; Grey *et al.*, 2013; Dantas-Torres, 2010). A figura 4 apresenta dois espécimes adultos não alimentados de *R. linnaei* com enfoque no escudo dorsal que permite a caracterização sexual.



Figura 4. *Rhipicephalus linnaei* fêmea adulta com o escudo delimitado até menos da metade do corpo (A) e um macho com seu escudo recobrindo todo o corpo (B).

A fase adulta tem início após a ecdise da fase de ninfa, quando os carrapatos, já na forma adulta, sobem no hospedeiro para dar continuidade ao ciclo reprodutivo. Após a cópula, que ocorre sobre o hospedeiro, a fêmea ingurgita-se completamente com sangue, sendo então denominada teleógina ou fêmea ingurgitada (Figura 5).

Esse processo de alimentação sanguínea dura, em média, de 8 a 10 dias. Uma vez repleta, a fêmea desprende-se do hospedeiro e direciona seu metabolismo para o desenvolvimento do sistema reprodutivo e a posterior postura de ovos, que pode ocorrer em até duas semanas, sempre em locais protegidos no ambiente. Enquanto isso, o macho adulto permanece aderido ao hospedeiro por um período mais longo, podendo copular com diversas fêmeas. (Gray *et al.*, 2013; Dantas-Torres, 2013^b).



Figura 5. *Rhipicephalus linnaei* fêmea adulta ingurgitada, prestes a realizar sua postura. Fonte: Arquivo pessoal.

2.3 *Ctenocephalides felis felis*: “A pulga dos Gatos”

Os sifonápteros (Ordem Siphonaptera), são representados pelas pulgas, pequenos insetos, de coloração castanha, achatados lateralmente, desprovidos de asas e com ampla habilidade para o salto. São membros do filo Arthropoda, classe Insecta a família Pulicidae tem como um dos principais gênero: *Ctenocephalides*, sendo a subespécie *C. felis felis*, um dos mais importantes encontrada parasitando gatos e cães de maneira cosmopolita (Moore *et al.*, 2024; Rust, 2017; Hastriter e Whiting, 2009).

As pulgas *C. felis felis* são insetos pequenos, medindo em média 2 mm de comprimento, especialmente quando não alimentadas. Como todos os membros da ordem Siphonaptera (do grego siphos, 'sifão', e áptera, 'desprovido de asas'), possuem um corpo achatado lateralmente, pernas posteriores adaptadas para o salto e um ciclo de vida holometabólico, passando por metamorfose completa. A característica morfológica distintiva desta espécie é a presença de ctenídeos, uma estrutura em forma de pente, localizado na região pronotal e genal da cabeça, composto por oito a nove espinhos orientados horizontalmente. (Hastriter e Whiting, 2009).

Apenas a fase adulta é a forma parasitária, hematófaga, com aparelho bucal modificado para penetrar a epiderme do hospedeiro e promover a sucção do sangue, possibilitando assim a oogênese e espermatogênese, promovendo a oviposição, perpetuando o seu ciclo que ocorre majoritariamente no ambiente, estando apenas em torno de 5% das pulgas no hospedeiro, o restante, 95% se encontram no ambiente como formas imaturas (Franc *et al.*, 2013; Hastriter e Whiting, 2009; Dryden, 1993).

2.3.1 *Ctenocephalides felis felis*: Ciclo de vida e Morfologia

Os ovos destas pulgas são postos principalmente à noite ainda no hospedeiro, e posteriormente, após algumas horas, caem ao solo, principalmente em camas, panos e demais locais de descanso e repouso dos hospedeiros. Os ovos são bastante susceptíveis a variações de temperatura e umidade, eclodindo principalmente em valores de temperaturas entre 20 e 30 °C, com uma umidade acima de 50%. Estes valores ideais não querem dizer que os ovos não eclodirão em dias quentes ou frios, há sim nesses dias uma diminuição na taxa de eclodibilidade. Mas naturalmente, os ovos eclodem em 24h de onde emergem as larvas (Du Rand 2001; Dryden 2009; Dryden, 1993). Morfologicamente, os ovos de *C. felis felis* são esbranquiçados, lisos e alongados, características que podem ser observadas na Figura 6, a qual os exibe sob ampliação de lupa.



Figura 6. Ovos de *Ctenocephalides felis felis* observados em lupa. Fonte: Arquivo pessoal.

As larvas de *C. felis felis*, bem como as larvas de outros insetos, possuem estágios de desenvolvimento chamados de instares larvais. Estes instares são determinados pelo tempo e pelo tamanho das larvas, que nesta fase, não hematófaga, se alimentam de matéria orgânica do ambiente, fezes de pulgas adultas e, caso haja baixa demanda de nutrientes, como alternativa, praticam o canibalismo com outras larvas (Hsu *et al.*, 2002; Correia *et al.*, 2003).

Assim como os ovos, as larvas de *C. felis felis* dependem criticamente de condições específicas de temperatura e umidade para evoluírem. O desenvolvimento larval ocorre em três estágios ou instares (L1, L2 e L3), cada um com duração variável, mas que, em condições ótimas, completam-se em aproximadamente 5 a 11 dias. Morfologicamente, as larvas são vermiformes (com formato de verme), ápodas (desprovidas de patas) e possuem corpo esbranquiçado e coberto por cerdas esparsas. Sua nutrição é baseada em matéria orgânica do ambiente, com destaque para o sangue desidratado presente nas fezes das pulgas adultas. O comportamento canibal é registrado em situações de escassez alimentar, quando as larvas podem predar outras do mesmo estágio.

A fase de pupa, que pode durar de uma semana até aproximadamente cerca de seis meses em condições favoráveis, constitui o estágio de maior resistência do ciclo de vida da *C. felis felis*. Morfologicamente, a pupa se forma dentro de um casulo protetor, confeccionado pela larva com seda e partículas do ambiente, como poeira e areia, o que lhe confere camuflagem. Essa estrutura é crucial para proteger o inseto durante a metamorfose contra predadores e dessecação, sem impedir as trocas gasosas. Desenvolvem-se preferencialmente em ambientes

amenos (27–30°C e >50% de UR) e, por serem menos suscetíveis a intempéries, são encontradas em locais protegidos da luz, como sob móveis, em tapetes ou frestas. Condições adversas durante a alimentação larval podem resultar em "pupas nuas", um estágio anômalo em que o casulo não é formado adequadamente. Por fim, estímulos mecânicos como vibrações de passos ou movimentos próximos são suficientes para desencadear a eclosão do adulto já formado. (Dryden 2009, Hsu *et al.*, 2002).

Imediatamente após emergirem das pupas, as formas adultas da pulga buscam pelo seu hospedeiro para a alimentação. Ao passo que se alimentam, defecam no hospedeiro, gerando subsídio nutricional para as larvas do ambiente, fomentando o ciclo. Estes parasitos têm suma importância médico veterinária por causarem danos direto, bem como por transmitirem doenças importantes (Moore *et al.*, 2024; Dryden 2009). Podem ser observadas as fases de larva, pupa e adulto, na figura 7.



Figura 7. Larvas de *Ctenocephalides felis felis* em placa de petri (A), Larva L3 vista em zoom de lupa (B), Pupários (C) e Pulga adulta após emergir (D). Fonte: Arquivo pessoal.

2.4. *Rhipicephalus Linnaei* e *Ctenocephalides felis felis*: Importância Médico Veterinária e Para a Saúde Única

Pulgas e carrapatos tem a atenção da medicina pelo seu papel importante, tanto por problemas causados a animais, quanto para humanos, por desencadarem alterações dermatológicas, e transmitirem doenças que podem levar o paciente inclusive a óbito (Cunha *et al.*, 2009; Dantas-Torres et al. 2006^b; Brouqui e Raoult, 2006).

Ectoparasitos não assolam apenas animais, a saúde única se preocupa inclusive com infestações em humanos. Pessoas em situação de rua são muito mais expostas a infestações, inclusive por pulgas do gênero *Ctenocephalides* e carrapatos do gênero *Rhipicephalus*, fato que demonstra a importância de cada vez mais, explorarmos alternativas seguras e eficazes para o controle de infestações (Brouqui e Raoult, 2006).

O amplo potencial de adaptabilidade e parasitismo, faz com que o *R. linnaei* seja uma espécie bastante importante com relação a saúde dos animais. São artrópodes hematófagos, ou seja, em infestações massivas, além de espoliação sanguínea, suas glândulas salivares podem secretar na saliva, componentes imunossupressores que são responsáveis pela diminuição da resposta imune do hospedeiro a infestações consecutivas, causando dermatites alérgicas, prurido e desconforto (Nieto-Cabrales *et al.*, 2024; Abreu *et al.*, 2021; Mathias *et al.*, 2011). Secundariamente, as infestações em todas as fases de vida parasitária, causam danos à saúde do hospedeiro, principalmente pela transmissão de patógenos como *Anaplasma* spp., *Babesia vogeli*, *Cercopithifilaria* spp., *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, agentes que podem desencadear processos patológicos severos, podendo evoluir até a morte (Latrofa *et al.*, 2014; Dantas-Torres *et al.*, 2006^a).

As infestações por pulgas *C. felis felis* causam intensos processos inflamatórios dermatológicos com prurido e, em infestações massivas, principalmente aquelas que ocorrem concomitante com *R. linnaei*, causam grande espoliação sanguínea, fomentando quadros de anemias (Dryden e Gaafar 1991). Ainda falando de danos diretos causado pelo parasitismo primário destes ectoparasitos, a DAPE, doença alérgica à picada de ectoparasitos é uma hipersensibilidade do tipo 1, mediada por IgE, mastócitos e basófilos, com intensa atividade de histamina, ou seja, apresentando muito prurido seguido de eritema, lacerações, infecções secundárias por bactérias e até infestações secundárias por larvas de moscas biontófagas, como a *Cochliomyia hominivorax*, causando miíases primárias (Curtis, 2021; Sykes *et al.*, 2021; Choi *et al.*, 2015; Bruet *et al.*, 2012). A figura 8 mostra um cão expressando sinais clínicos de DAPE, diagnosticada juntamente com uma infestação mútua entre *C. felis felis* e *R. linnaei*.

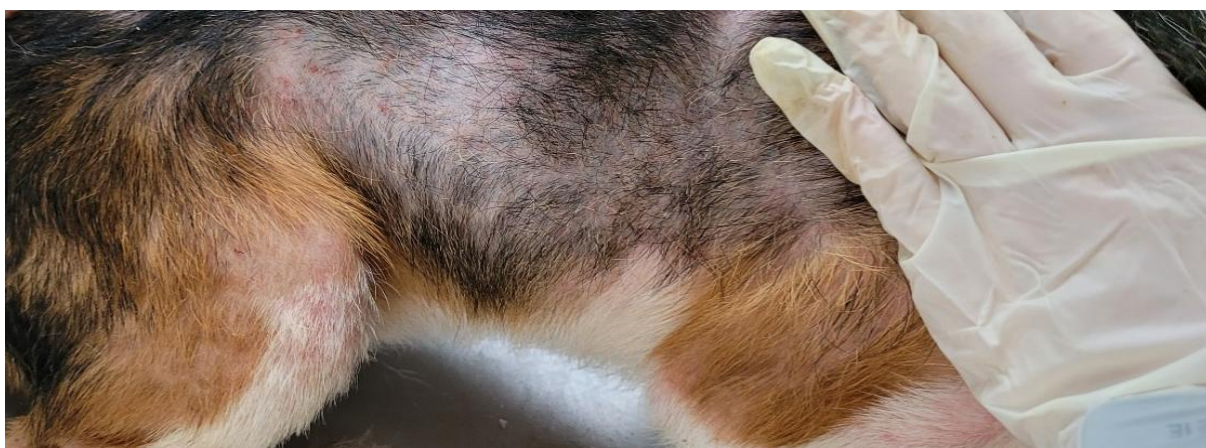


Figura 8. Sinais clínicos de doença alérgica à picada de ectoparasitos em cão infestado por pulgas *Ctenocephalides felis felis* e carrapatos *Rhipicephalus linnaei*. Fonte: Arquivo pessoal.

Assim como os carrapatos, pulgas transmitem uma gama de microrganismos patogênicos como: *Bartonella clarridgeiae*, *Bartonella henselae*, *Coxiella burnetii*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi* e até *Yersinia pestis*, a bactéria causadora da doença “peste negra” que assolou a Europa na idade média. Mas não apenas bactérias, a *C. felis felis* em gatos e participa como hospedeira intermediária do cestóide *Dipylidium caninum* e do nematoide *Acanthocheilonema reconditum*, ambos causadores de patologias que pode afetar

severamente a saúde dos animais infestados (Moore *et al.*, 2024; De Melo *et al.*, 2023; Gopinath *et al.*, 2018; Bland *et al.*, 2016; Napoli *et al.*, 2014).

2.5 Evolução Histórica do Controle de Pulgas e Carrapatos na Medicina Veterinária

Não é de hoje que a preocupação com as infestações por ectoparasitos em animais, tem ganhado o foco da terapêutica para o seu controle, registros antigos como os encontrados em textos gregos e papiros egípcios, já demonstravam como os recursos naturais desempenhavam importante papel, compondo as primeiras classes de ectoparasiticidas utilizadas para o controle de pulgas e carrapatos (Wall e Shearer, 2001).

O papiro de Ebers, um dos mais antigos tratados médicos, já descrevia no seu compêndio de moléculas, tratamentos naturais para o controle e repelência de pulgas, moscas e outros artrópodes que assolavam a sociedade egípcia, com o uso de óleos essenciais, explorando a atividade de plantas do gênero *Commiphora* (mirra), ricas em terpenóides e minerais, como o enxofre, utilizado em fumigação para a eliminação de pragas em alimentos e possivelmente, ectoparasitos em animais (Dekebo *et al.*, 2021, Panagiotakopulu *et al.*, 1995).

Até então, o controle químico de ectoparasitos era majoritariamente feito com componentes naturais, porém, no início século XX, com o descobrimento de moléculas sintéticas, como organoclorados como o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), organofosforados, e carbamatos, rapidamente houve uma rápida inserção destes componentes em formulações acaricidas e pulgicidas, dando início a uma mudança na terapêutica de animais infestados que reverbera até hoje; o advento do controle de infestações, inclusive ambientais, com ectoparasiticidas sintéticos (Coles e Dryden, 2014; Wall e Shearer, 2001).

As piretrinas representam uma classe de moléculas bioativas de origem vegetal, cuja descoberta remonta a mais de um século. Sua aplicação na medicina veterinária consolidou-se a partir da década de 1950, com o advento da síntese análoga de piretróides, o que permitiu seu uso ampliado no controle de artrópodes em animais de companhia. Extraídas predominantemente do crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), as piretrinas naturais exibem notável toxicidade seletiva, sendo aproximadamente 2000 vezes mais letais para insetos do que para vertebrados. Após cerca de 20 anos de uso, os piretróides começaram a ser suplantados por uma nova classe de compostos: as formamidinas. O amitraz emergiu como o principal representante deste grupo, sendo considerado mais seguro que seus antecessores, embora também associado a uma gama de efeitos toxicológicos (Costa, 2020; Ujihara, 2019; Anadón *et al.*, 2009).

Na década de 1980, o cenário de controle parasitário foi revolucionado com o desenvolvimento das lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas). A ivermectina, seu principal representante, destacou-se imediatamente por sua potente atividade ectoparasiticida contra uma gama de artrópodes. Um avanço notável foi seu perfil de ação endectocida, uma propriedade rara para a época, que permitia o controle simultâneo de ecto e endoparasitos com uma única molécula, elevando significativamente o padrão de eficácia na medicina veterinária.

Ainda no fim da década de 80, uma nova classe é somada para lidar contra infestações, os fenilpirazóis, com o fipronil, fármaco utilizado até os dias atuais, com uma maior margem de segurança, no quesito de toxicidade (Cid, *et al.*, 2016; Campbell, 2012).

Neste ponto, o uso de moléculas sintéticas de maneira indiscriminada, gerou um importante obstáculo para a eficácia dos protocolos terapêuticos, a resistência parasitária, identificada em todas as moléculas anteriormente utilizadas, principalmente em carrapatos (Klafke *et al.*, 2017). Frente a isto, a estratégia de controle migrou do foco exclusivo no potencial adulticida para a incorporação dos reguladores de crescimento de insetos (IGRs), como os análogos do hormônio juvenil (AHJ) e os inibidores da síntese de quitina (ISQ). Esses

compostos atuam como ectoparasiticidas disruptores, visando interromper o ciclo do parasito ao atingirem especificamente as fases imaturas. São empregados principalmente no controle de pulgas, onde sua ação sobre ovos e larvas é crucial, mas também apresentam ação sobre estágios larvais e ninfais de carrapatos. Seu uso, frequentemente concomitante com adulticidas, representa uma tentativa de reduzir a pressão de seleção que leva aos eventos de resistência. (Showler *et al.*, 2019; Pener, 2002).

Em 2014, ocorre uma revolução no controle químico de ectoparasitos, o advento das isoxazolinás, moléculas seguras e eficazes no controle de diversos ectoparasitos, desde infestações por pulgas e carrapatos, até sarnas e miíases, facilitando inclusive o manejo, tendo em vista que sua farmacocinética apresenta uma característica importante que faz com que este fármaco tenha uma boa biodisponibilidade por um período prolongado, protegendo os animais de reinfestações, inclusive. (Zhou *et al.*, 2022; Andriotti *et al.*, 2021).

O uso de fármacos sintéticos ao longo dos anos, tem sido motivo de extensa preocupação, tanto pelos seus efeitos tóxicos, quanto pelos seus resíduos ambientais, poluindo rios e solo, em resposta a isto, observam-se um retorno à exploração de moléculas naturais, assim como nos primórdios, porém, desta vez, respaldados pela ciência farmacêutica, que permite uma padronização, otimização e comprovação da eficácia, sempre buscando um equilíbrio entre terapêutica e soluções sustentáveis, buscando manter-se alinhados aos princípios de “One Health” (Ferreira *et al.*, 2022, Dryden, 2009). A Tabela 1 faz um apanhado da evolução das classes farmacológicas sintéticas, utilizadas contra ectoparasitos na medicina veterinária.

Tabela 1. Grupos químicos utilizados para o controle de ectoparasitos, de acordo com o tempo.

Grupo químico	Advento (década)	Moléculas
Organoclorados	1940	DDT e Lindano
Organofosforados	1940	Diazinone Clorpirifós.
Carbamatos	1950	Carbaril, Propoxur.
Piretróides	1950	Permetrina, Deltametrina, Cipermetrina, Flumetrina
Formamidinas	1970	Amitraz
Lactonas Macrocíclicas	1980	Ivermectina, Doramectina, Selamectina, Milbemicina oxima, Eprinomectina
Neonicotinóides	1990	Imidacloprida, dinotefuran e nitempiram
Fenilpirazóis	1990	Fipronil
Spinosinas	1990	Spinosad
AHJ	1990 - 2000	Piriproxifeno
ISQ	1990 - 2000	Lufenuron, Novaluron
Isoxazolinás	2014	Fluralaner, Afoxolaner, Lotilaner, Sarolaner

AHJ: Análogo do hormônio juvenil; ISQ: Inibidor da síntese de quitina

2.6 Evolução Histórica Das Formas Farmacêuticas No Controle De Ectoparasitos Na Medicina Veterinária

A medicina veterinária, diferentemente da humana, depara-se com uma gama de particularidades anatômicas, fisiológicas e comportamentais inerentes a cada espécie. Tais variáveis impõem a necessidade de desenvolvimento de formulações farmacêuticas específicas, adaptadas às demandas individuais de cada animal. Um exemplo importante reside no sistema digestório onde cães, felinos, suínos e equídeos são monogástricos, ao passo que os ruminantes são poligástricos. Essa distinção, por si só, representa um significativo obstáculo para o desenvolvimento e a eficácia de formulações de administração oral (Hardee; Baggo, 2021; Martinez; Hunter, 2010).

No que concerne às formulações de uso tópico, a diversidade morfológica da pele e da cobertura pilosa entre as espécies surge como outro desafio de mesma magnitude. A arquitetura folicular é altamente variável: cães e gatos, por exemplo, apresentam folículos compostos, cuja densidade e proporção de pelos primários e secundários variam inclusive entre raças. Evidências farmacocinéticas demonstram que tais disparidades morfológicas resultam em perfis de absorção e distribuição cutânea notadamente distintos para um mesmo fármaco, reforçando a impossibilidade de se estabelecer uma formulação universal (Baynes *et al.*, 2012; Toutain *et al.*, 2010).

Historicamente, as primeiras intervenções destinadas ao controle de ectoparasitos em animais de produção e companhia baseavam-se em preparações empíricas, muitas delas derivadas de práticas agrícolas ou de formulações humanas, sem padronização quanto à concentração ou segurança. Diversas substâncias de origem natural ou mineral foram testadas como ectoparasiticidas, entre as quais se incluíam óleos vegetais e animais como o de algodão e o de peixe, petróleo bruto, querosene, creosoto, extrato de tabaco, sabão e misturas de enxofre com querosene. Esses compostos, aplicados principalmente sob a forma de banhos de imersão, refletem o caráter experimental e empírico das primeiras tentativas de controle químico de ectoparasitos. (George 2000; Waltisbuhl *et al.*, 2005).

Ao longo do século XX, o avanço da farmacotécnica veterinária, aliado ao aprofundamento dos estudos em farmacocinética e farmacodinâmica comparadas, permitiu o desenvolvimento de formulações mais seguras e específicas para cada espécie animal (Dos Santos *et al.*, 2021; Toutain *et al.*, 2010).

O surgimento das formulações pour-on e spot-on, bem como das coleiras impregnadas, representou um marco na terapêutica antiparasitária tópica, garantindo maior praticidade, eficácia e adesão ao tratamento. No entanto, as formulações em spray mantêm-se como uma alternativa relevante, principalmente por oferecerem a possibilidade de aplicação direcionada e cobertura imediata de toda a superfície corporal, permitindo o contato rápido e uniforme dos princípios ativos com os ectoparasitos, além de serem particularmente úteis no tratamento de infestações localizadas ou em situações em que a absorção sistêmica deve ser evitada. Ao longo desse processo, também se observou a manutenção do uso de formulações em spray. Em diferentes épocas, essas formulações têm sido empregadas continuamente como uma alternativa prática e de ampla aplicabilidade para o controle de ectoparasitos, tanto com compostos naturais quanto sintéticos, em ensaios *in vitro* ou *in vivo*. Mais recentemente, a incorporação de tecnologias como microemulsões, nanopartículas e sistemas de liberação controlada têm proporcionado formulações capazes de otimizar a penetração cutânea e prolongar o efeito residual dos princípios ativos, reduzindo toxicidade e impactos ambientais (De Jesus *et al.*, 2025; Fantatto *et al.*, 2025; Paliy *et al.*, 2023; Lavy *et al.*, 2022; Paliy *et al.*, 2021a; Taylor, 2001).

No cenário contemporâneo, observa-se a consolidação de uma nova fronteira tecnológica com a introdução dos comprimidos obtidos por impressão tridimensional (impressão 3D). Essa inovação permite o desenvolvimento de formas farmacêuticas

personalizadas, ajustadas à espécie, ao peso e até ao perfil metabólico individual do animal, oferecendo um controle preciso sobre a dose e o perfil de liberação do fármaco. Além de ampliar as possibilidades de formulação e administração, a impressão 3D surge como uma ferramenta promissora para superar antigas limitações na terapêutica veterinária, integrando-se à tendência global de medicina personalizada e ao conceito de One Health, buscando harmonizar saúde humana, animal e ambiental (Sjöholm *et al.*, 2022; Zhu, *et al.*, 2020).

2.7 O Controle Químico De Ectoparasitos Em cães: Principais Moléculas

O controle de ectoparasitos em cães não é algo simples e fácil, se faz necessário diagnosticar corretamente o agente etiológico da infestação, para serem utilizadas estratégias terapêuticas que atrelem também o controle físico, como pentes finos, vassouras de fogo, aspiradores de pó e lavagem de panos, tendo em vista que a maioria das fases imaturas das pulgas e carrapatos se encontram no ambiente (Marchiondo *et al.*, 2013). Vivemos em uma era onde existe uma diversidade de moléculas e apresentações farmacológicas que podem ser usadas para o controle químico, devendo a escolha ser baseada de acordo em diversos critérios, cujo os principais são: segurança da molécula, susceptibilidade do animal (algumas raças como os Collies são susceptíveis a Ivermectina a intoxicação devido a uma falha na barreira hematocefálica, por exemplo), versatilidade (algumas moléculas podem atuar tanto em pulgas quanto em carrapatos) e preço (Hopper *et al.*, 2002).

2.7.1 Organofosforados e carbamatos

Embora antigos, estes grupos químicos ainda são utilizados em apresentações farmacológicas de uso externo, como coleiras de liberação contínua em sinergismo com piretróides, como é o caso do carbamato propoxur, em apresentações que contém flumetrina, conferindo atividade acaricida, pulgicida e repelente (Fourie *et al.*, 2003).

Os fármacos desta classe têm como mecanismo de ação, a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que é responsável por controlar os níveis de acetilcolina (ACh). A ACh em excesso acaba desempenhando processos tóxicos nos parasitos, os matando por paralisia flácida. Apesar de semelhantes, os organofosforados possuem maior afinidade com as enzimas AChE, que os carbamatos, que são mais facilmente dissociados do sítio de ligação enzimático, os tornando menos tóxicos que o primeiro (Klainbart *et al.*, 2022; Gupta *et al.*, 2011).

As principais aplicações dos organofosforados para o controle de infestações em cães, são em apresentações tópicas em dispositivos de liberação contínua, como coleiras contendo diazinon, porém outras moléculas como o clorpirifós, coumafós, diclorvós (DDVP), fention, triclorfon, podem ser encontradas em assimilação como no caso do fention + fluazuron (benzofeniluréia), ou em apresentações para diluição e pulverização ambiental (Klainbart *et al.*, 2022; Franc e Cadiergues, 1998; Fisher *et al.*, 1994).

Os carbamatos mais explorados para usos em cães são o propoxur e o carbaril, na apresentação farmacológica tópica de pó, coleiras ou em sabonetes para banho, geralmente em sinergismo com piretróides como a cipermetrina. Embora ainda eficazes, seu uso é desestimulado em detrimento a moléculas mais atuais que causam menos eventos tóxicos nos animais, humanos e ambientais (Klainbart *et al.*, 2022; Muhammad *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 1977).

2.7.2 Piretróides

Este grupo farmacológico foi obtido através de estudos dos princípios ativos de plantas do gênero *Chrysanthemum*, após a observação do potencial de repelência natural inerente ao crisântemo, de onde foram isolados os princípios ativos piretrina I, piretrina II, cinerinas I, cinerinas II, jasmolinas I e jasmolinas II, ambos com potencial repelente, pulgicida e acaricida (Hitmi *et al.*, 2000).

Os piretróides são potentes moléculas adulticidas e repelentes, tanto para carrapatos, quanto para pulgas e o seu mecanismo de ação principal é atuar a nível de canais iônicos para sódio, aumentando o seu tempo de abertura, causando despolarizações descoordenadas no parasitos, os fazendo se soltar do hospedeiro e os matando por paralisia espástica e hiperexcitação, mesmo mecanismo que os tornam não seguros para mamíferos, principalmente para felinos, espécie que é desaconselhado o uso de piretróides, inclusive. Quando associado com outras moléculas ectoparasitocidas, em menor dose pode sensibilizar os carrapatos, os repelindo, num efeito chamado de “hot foot” (pés quentes), onde, por hiperexcitabilidade tóxica, os carrapatos não conseguem coordenar seus movimentos, os tornando inaptos para parasitarem (Ensley, 2018; Halos *et al.*, 2012; Anadón *et al.*, 2009).

As principais moléculas utilizadas na medicina veterinária são a permetrina, cipermetrina, deltametrina, em formulações para o controle de ectoparasitos no ambiente e em apresentações tópicas como xampus e sabonetes. Também há o uso em sinergismo com outras classes farmacológicas, tendo em vista que são excelentes repelentes como por exemplo a flumetrina, em associação com neonicotinóides em coleiras para cães (Brianti *et al.*, 2014; Dantas-Torres *et al.*, 2013^b).

2.7.3 Formamidinas

As formamidinas são uma classe farmacológica de bastante importância até os dias de hoje na luta contra ectoparasitos, tendo em vista que funcionam com bastante eficiência para o controle de carrapatos e ácaros no ambiente, encontradas em diversas formulações (Paliy *et al.*, 2021^b).

O principal membro das formamidinas é o amitraz, que, apesar de não ser eficaz contra insetos, pode ser utilizado em sinergismo com outras moléculas inseticidas, para evitar este inconveniente. Ele é reconhecido por possuir mais de um mecanismo de ação ectoparasitocida. Primeiramente, ele inibe a enzima Monoamina oxidase (MAO), uma enzima que degrada neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central (SNC) dos parasitos, aumentando os níveis de Norepinefrina, epinefrina, serotonina e dopamina, causando morte por hiperexcitação. Este mecanismo pode inclusive explicar os eventos de intoxicação no SNC de animais submetidos a doses elevadas (Jonsson *et al.*, 2018; Del pino, *et al.*, 2015).

O segundo mecanismo de ação que pode explicar a alta eficácia do amitraz frente a carrapatos e ácaros é modular a atividade da octopamina/tiramina, neurotransmissores presentes nos artrópodes responsáveis pelas contrações e metabolismo muscular e pela atividade sensorial. Ao se ligar nos receptores para octopamina/tiramina, o amitraz interfere na dinâmica sensorial e de movimentação dos parasitos, causando despolarizações errôneas no SNC, causando morte por hiperexcitação (Jonsson *et al.*, 2018; Kita *et al.*, 2017).

No mercado, o amitraz é encontrado em apresentações líquidas para pulverização ambiental e para cães, é encontrado em dispositivos de liberação lenta em forma de coleiras, em sinergismo com outras moléculas, para suprir a sua não atividade em insetos, como no caso de coleiras (Baker *et al.*, 2011).

2.7.4 Lactonas Macrocíclicas

Introduzidas na medicina veterinária a partir da década de 80, as lactonas macrocíclicas revolucionaram o controle de parasitos na agropecuária, em especial no manejo sanitário de bovinos, por atuarem de forma eficaz contra endo e ectoparasitos. Essas moléculas são derivadas do metabolismo de bactérias do gênero *Streptomyces*: a espécie *Streptomyces avermitilis* deu origem às avermectinas, enquanto a *Streptomyces cyanogriseus* (ou *hygroscopicus*) deu origem às milbemicinas (Merola e Eubig, 2012; Shoop *et al.*, 1995).

As avermectinas como a ivermectina, possuem um grupamento dissacarídeo na posição C13 o que confere uma maior atividade contra artrópodes, além de endoparasitos. Já as milbemicinas como a moxidectina, não possui este grupamento, atuando com maior especificidade em endoparasitos, porém, ainda atuando contra ectoparasitos (Shoop *et al.*, 1995).

O mecanismo de ação desta classe é o primeiro a atuar com eficácia de maneira inibitória, matando o parasito por paralisia flácida. Estas moléculas atuam em receptores para GABA (ácido gama-aminobutírico) e em canais para cloro nos parasitos, aumentando o período de abertura destes canais, causando hiperpolarização neuronal, cessando todos os mecanismos energéticos que mantinham os parasitos vivos. Apesar de atuarem em sítios que também existem nos mamíferos, são bastante seguras por sua ampla especificidade, porém, não é recomendado o uso de ivermectina em cães da raça Collie (Gwaltney-Brant *et al.*, 2018; Hopper *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2002).

As principais lactonas macrocíclicas utilizadas no controle de ectoparasitos em cães são a eprinomectina, ivermectina, milbemicina oxima, moxidectina e selamectina. Sua principal aplicação nessa espécie está voltada para o tratamento das sarnas (escabiose e demodicose), de infestações por pulgas e de diversos endoparasitos, possuindo, portanto, uma ação ecto e anti-helmíntica combinada. Estas moléculas estão disponíveis em diversas apresentações farmacológicas, como comprimidos orais, soluções "pour-on" e "spot-on", e formulações injetáveis (Six *et al.*, 2000; Nolan; Lok, 2012).

2.7.5 Neonicotinóides

Os neonicotinóides são uma excelente alternativa quando tratamos de pacientes infestados por pulgas, tendo em vista que são letais para insetos, porém não atuam contra os aracnídeos, ácaros e carrapatos. O nitempiram é o mais utilizado para a eliminação rápida de infestações, devido a sua baixíssima latência, mesmo quando administrado por via oral, tendo seu início de atividade em torno de 20 minutos. Outros membros da classe são o dinotefuram, e o imidacloprida (Siak e Burrows, 2013; Vo *et al.*, 2010).

Com uma farmacocinética favorável para uso em infestações massivas, essas molécula disponíveis em apresentações como comprimidos orais e soluções pour-on, alcançam alta biodisponibilidade rapidamente. Sua rápida distribuição sanguínea garante que, ao entrarem em contato com os insetos hematófagos, atuem como agonistas nos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR). Essa ação na junção neuromuscular induz despolarizações e espasmos, resultando na morte do parasito por paralisia espástica (Thany, 2023; Vo *et al.*, 2010).

2.7.6 Fenilpirazóis

Principal representante da classe, o Fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil) fenil]-4-[(trifluorometil) sulfinil] 1Hpirazol-3-carbonitrila), descoberto na década de 80 e utilizado como inseticida na agricultura e ectoparasiticida na medicina veterinária, na década de 90, tem atividade contra uma gama de artrópodes, incluindo formigas, baratas, pulgas e carrapatos (Cid *et al.*, 2016; Romero *et al.*, 2016).

Por ser uma molécula que apresentava bastante eficácia quando comparada as classes anteriores, fora bastante explorada para o tratamento de infestações de ectoparasitos em animais de produção e de companhia em apresentações tópicas, como pour-on, spot-on e spray, fato que corroborou imensamente com a poluição ambiental de solo, rios e efluentes, se tornando agora um risco para a saúde de animais e humanos (Ferreira *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2019).

O Fipronil tem extensa atividade contra pulgas e carrapatos e seu mecanismo de ação é exemplificado pela sua atuação em receptores GABA, funcionando como antagonista. Ao se ligar nos sítios de ação, bloqueia estes receptores que estão acoplados a canais iônicos para cloro, consequentemente a modulação inibitória é interrompida, causando despolarizações errôneas, matando o ectoparasito por hiperexcitação. Apesar dos mamíferos também possuírem receptores para GABA, o fipronil é específico para artrópodes, fato que explica sua segurança para animais em doses terapêuticas (Cid *et al.*, 2016; Hovda e Hooser, 2002).

O perfil farmacocinético do fipronil mostra que, após metabolizado, seu principal metabólito ativo é o fipronil sulfona que inclusive, possui atividade artropodicida, podendo ser explorado em apresentações enterais e parenterais como comprimidos e injeções subcutâneas (Dos santos *et al.*, 2022; Cid *et al.*, 2016). Embora já sejam exploradas apresentações enterais e injetáveis a nível acadêmico, as principais apresentações encontradas no mercado são em Spray, spot-on, pour-on, em associação com piretróides, IGR's e formamidinas ou de maneira isolada (Dryden *et al.*, 2016^a; Halos *et al.*, 2016).

2.7.7 Spinosinas

As spinosinas são moléculas obtidas através do metabolismo de bactérias encontradas no solo, da espécie *Saccharopolyspora spinosa*. Foram obtidas e inicialmente utilizadas na agricultura para o controle de pragas agrícolas, possuindo um importante potencial inseticida. As principais moléculas são o spinetoram (uso agrícola) e o spinosad, utilizado na medicina veterinária para o controle principalmente de pulgas (Sparks *et al.*, 2021; Snyder *et al.*, 2015).

O mecanismo de ação desses fármacos na eliminação de ectoparasitas baseia-se em alterações neuronais e despolarizações errôneas, supostamente mediadas por sua atuação como agonistas dos receptores nicotínicos, o que culmina na morte do parasito por paralisia espástica (Orr *et al.*, 2009). A principal apresentação no mercado para animais de companhia é um comprimido contendo spinosad, indicado para o controle da pulga *C. felis felis* em cães e gatos, destacando-se por sua boa atividade residual. Embora também utilizado na agricultura, o spinetoram já é alvo de estudos para o controle de ectoparasitos em cães e gatos, sendo que as formulações iniciais demonstraram um bom período residual, com até 4 semanas de eficácia clínica contra pulgas (White *et al.*, 2017; Blagburn *et al.*, 2010).

2.7.8 Disruptores de crescimento de artrópodes: Análogos do hormônio juvenil e Inibidores da síntese de quitina

Os mecanismos de ação clássicos, principalmente adulticidas começaram a dar espaço para moléculas que interferem diretamente no ciclo do ectoparasito, impedindo eventos como ecdise, oviposição e até a eclosão, fato revolucionário que corroborou para o advento de um novo manejo químico estratégico no controle de infestações (Khoobdel, *et al.*, 2021; Marchiondo *et al.*, 2013).

Os Análogos do hormônio juvenil (AHJ), são fármacos com pouco ou nenhum potencial adulticidas. Eles têm como objetivo impedir a realização da ecdise dos ectoparasitos, interrompendo o ciclo, fazendo com que eles permaneçam nas suas fases imaturas. O principal mecanismo de ação é funcionar como um análogo afuncional do hormônio responsável pela muda, a ecdisona que além de impedir a muda, gera fases anômalas e até adultos estéreis (Parthasarathy e Palli, 2021; Singh e Kumar, 2015).

Assim como os AHJ, os Inibidores da síntese de quitina (ISQ), não são utilizados como adulticidas em infestações, eles atuam inibindo principalmente a ecdise dos parasitos pela inibição da enzima quitina-sintetase o que causa uma drástica interferência na formação de cutícula para a nova fase. A interferência na síntese de quitina faz com que o exoesqueleto dos artrópodes seja produzido com disformidades ou até mesmo, não ser produzido, os deixando vulneráveis a intempéries ambientais, desidratação, os levando a uma morte inevitável (Merzendorfer, 2013; Cohen, 2001).

Os principais AHJ são o (S)-metoprene e o piriproxifen enquanto os ISQ, com a classe das benzofenilureias são o lufenuron, fluazuron e o diflubenzuron, sendo o novaluron bem explorado em testes laboratoriais. As aplicações para estes fármacos são inúmeras, desde o controle de ectoparasitos no ambiente, até no animal, nas apresentações farmacológicas contendo outras moléculas adulticidas e repelentes como os piretróides e os fenilpropanóides, principalmente em apresentações tópicas. Esses compostos possuem boa atividade contra pulgas, o que os torna uma alternativa para o controle ambiental de infestações massivas. No entanto, sua eficácia contra carrapatos é mais restrita. Dentre eles, o fluazuron é o único com atividade comprovada, cuja principal aplicação é voltada para o controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*, ainda que também existam estudos em nível laboratorial demonstrando sua ação contra *R. sanguineus* s.l. (Junquera *et al.*, 2019; Showler *et al.*, 2019; Franc *et al.*, 2013; De Oliveira *et al.*, 2012; Young e Boeckh, 2004).

2.7.9 Isoxazolinás

O aspecto revolucionário das isoxazolinás reside não na farmacodinâmica, mas na farmacocinética. Elas solucionam um desafio recorrente no controle químico estratégico de ectoparasitos: garantir um longo período residual. Quando administradas, essas moléculas protegem os animais contra infestações por pulgas, carrapatos e outros ectoparasitos por meses. (Zhou *et al.*, 2022; Dryden *et al.*, 2015).

Pertencentes a esta classe, as moléculas fluralaner, sarolaner, lotilaner, afoxolaner e o tigelaner tem como mecanismo de ação atuarem como antagonistas de receptores GABA, impedindo a atividade do neurotransmissor de abrir canais para cloro, causando uma diminuição da atividade do sistema regulatório inibitório do ectoparasito, o matando por hiperexcitação (Gonçalves *et al.*, 2021)

No mercado, as moléculas estão disponíveis em apresentações orais e tópicas, tanto para cães quanto para gatos, porém, apesar de serem bastante seguras e eficazes, possuem um ponto negativo que é de não causarem atividade de repelência, não impedindo o primeiro contato do ectoparasito com o animal, necessitando serem administradas em associação com um repelente

tópico ou em coleiras para o tratamento eficaz de DAPE e para prevenir a transmissão de doenças além de serem muito mais caras que as alternativas do mercado porém, a maior vantagem é que o tratamento também ajuda a combater infestações ambientais, tendo em vista eu o próprio animal se torna uma “armadilha” para os ectoparasitos do ambiente (Dryden *et al.*, 2016^b).

2.8 Controle Natural de Infestações por *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.)

O uso de moléculas naturais e fitoinsumos para o controle de *C. felis felis* e *R. sanguineus* (s.l.) é promissor. Compostos bioativos de origem vegetal, como terpenóides e fenilpropanóides presentes em extratos e óleos essenciais, apresentam vantagens em relação aos fármacos sintéticos, incluindo um diferente perfil de eficácia. Os bioativos encontrados em plantas, como o eugenol (EUG), componente majoritário do *S. aromaticum* e o carvacrol (CAR), predominante em *Origanum vulgare*, atuam principalmente por mecanismos neurotóxicos e pela alteração da permeabilidade da cutícula do ectoparasito. Essas características os tornam excelentes candidatos para associações sinérgicas com outras moléculas, inclusive sintéticas. A principal vantagem dessa estratégia é a possibilidade de retardar o surgimento de resistência, que é um fenômeno inevitável a longo prazo, seja com compostos naturais ou sintéticos. Adicionalmente, o perfil ambientalmente mais favorável desses compostos naturais está atrelado à sua elevada volatilidade, que resulta em um menor acúmulo no ambiente em comparação com pesticidas sintéticos persistentes (Miranda *et al.*, 2024; Oliveira *et al.*, 2022; Conceição *et al.*; 2020; Quadros *et al.*, 2020).

Esta alternativa, atualmente explorada de maneira intensa em pesquisas científicas e clínicas, apresenta uma solução promissora na luta contra ectoparasitos e seus problemas relacionados, tendo em vista que são moléculas biodegradáveis e, em formulações bem elaboradas, podem fornecer proteção duradoura, fomentando uma abordagem sustentável e bem mais segura para animais, para o homem e para o meio ambiente (Nwanade *et al.*, 2020; Benelli *et al.*, 2016).

2.8.1 Metabolismo secundário de plantas: produção de bioativos repelentes

A via do ácido chiquímico é a principal rota metabólica dos compostos aromáticos botânicos. Terpenóides, alcalóides e fenilpropanóides, são exemplos de grupos químicos dos metabólitos secundários de plantas, produtos de um processo evolutivo focado no desenvolvimento de moléculas para a autoproteção contra o predatismo de artrópodes, animais herbívoros e até de agentes patogênicos. Estes compostos possuem bastante relevância farmacológica, nutricional e até industrial, sendo o foco de inúmeras pesquisas científicas que buscam inovação e desenvolvimento sustentável (Umalatha *et al.*, 2025, Santo-Sánchez *et al.*, 2018).

O EUG é um fenilpropanóide e um dos principais subprodutos do metabolismo secundário botânico encontrado em plantas como o *S. aromaticum*, utilizado para conferir sabores aos alimentos (Thomas *et al.*, 2024; Lao *et al.*, 2024) apresentando também propriedades antimicrobianas (Marchese *et al.*, 2017) e possuindo potencial acaricida e pulgicida (Oliveira *et al.*, 2022). Sua versatilidade é tão ampla que pode ser utilizado inclusive como anestésico em peixes (Zahran *et al.*, 2021).

Primeiramente, no interior dos plastídeos há a formação do ácido chiquímico, subsequentemente, em ácido corísmico que vai funcionar como um bioprecursor de um

importante aminoácido, a fenilalanina que por sua vez, vai sofrer a ação da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), que atuará removendo um grupo amônia do aminoácido, formando então o ácido cinâmico que, ao ser oxidado, gera o ácido p-cumárico. O ácido p-cumárico é submetido a processos de metilação até ser reduzido ao coniferil álcool, que por fim, sofrendo a ação da enzima eugenol-sintetase, será formado o EUG. A figura 9 mostra a rota metabólica para a produção dos fenilpropanóides (Atkinson, 2016; Vogt, 2010).

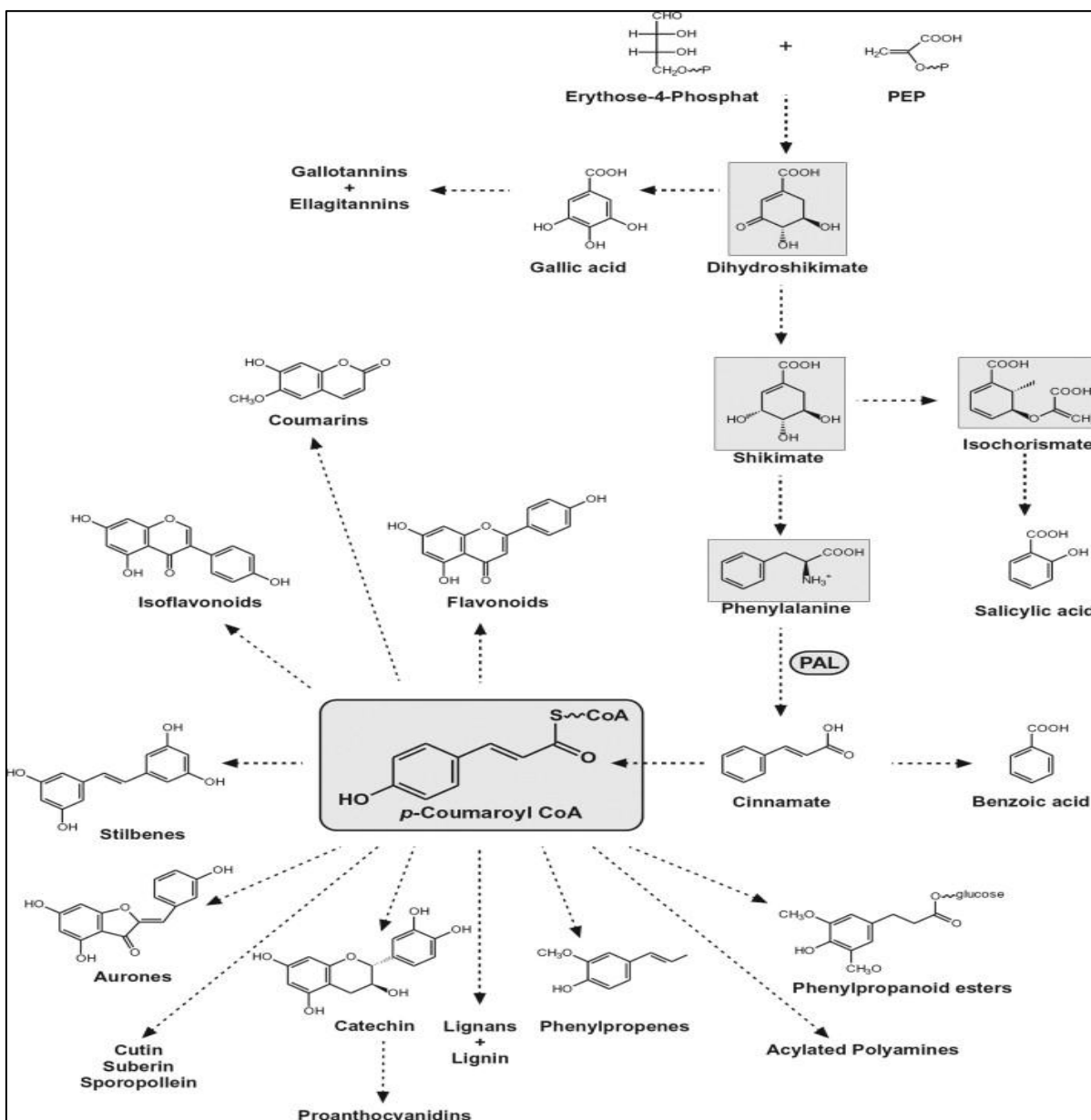


Figura 9. Rota metabólica de produção dos fenilpropanóides, com destaque para a complexidade e os subprodutos que conferem características específicas para as plantas (Vogt, 2010).

O CAR, diferentemente do EUG, é um terpenóide, um isômero do timol e um componente majoritário de diversas plantas, como por exemplo o *O. vulgare* e o *Thymus vulgare*, o tomilho. Suas propriedades nutricionais e farmacológicas o faz ser explorado pela sua atividade antimicrobiana (Lima *et al.*, 2013; Nostro e Papalia, 2012), acaricida, inseticida (De Jesus *et al.*, 2025) e como condimentos, fornecendo sabores específicos para os alimentos (Hassid *et al.*, 2025).

A biossíntese dos terpenóides ocorre dentro dos idioblastos, estruturas celulares botânicas que podem armazenar grandes quantidades compostos lipofílicos e lipídeos. A principal via de síntese destes compostos é a da não mevalonato, mediada pelos complexos enzimáticos 2-C-Metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) e deoxi-d-xilulose fosfato (DOXP) que complexam gliceraldeído-3-fosfato e um piruvato em pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) que é um precursor direto dos monoterpenos, juntamente com pirofosfato de isopentenilo (IPP) (Kumar *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). A figura 10 esquematiza a via metabólica que origina IPP e DMAPP.

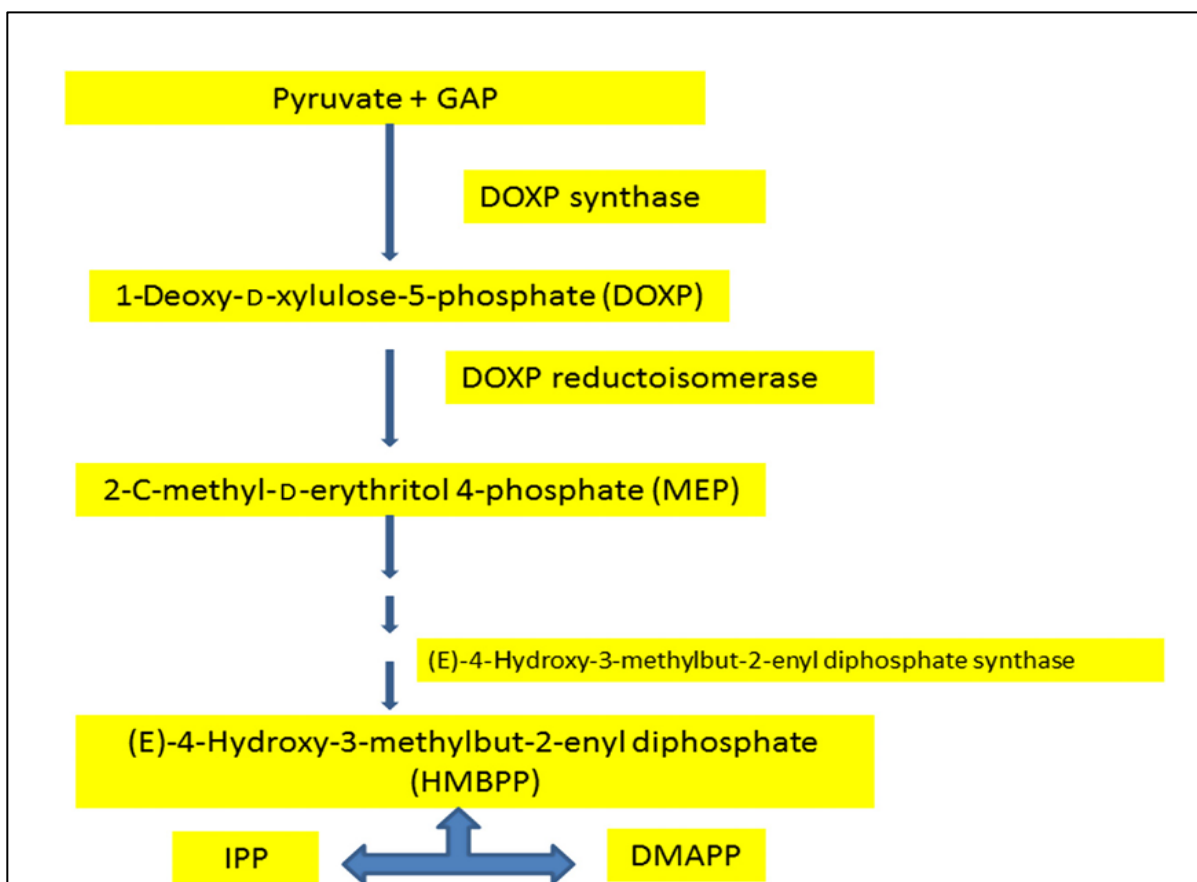


Figura 10. Rota metabólica da biossíntese de terpenóides (Kumar *et al.*, 2019).

DMAPP e IPP agora sintetizados, juntos formam o pirofosfato de geranil (GGP) que será clivado pela ação da enzima GGP-ciclase em γ -terpeno, que sofre oxidação perdendo uma dupla ligação gerando o para-cimeno. O para-cimeno agora será metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 das plantas (CYP71D) que por fim será hidroxilado em CAR ou timol (Etri e Pluhár, 2024; Akhila, 2007). A figura 11 resume a rota metabólica para a produção dos compostos CAR e timol.

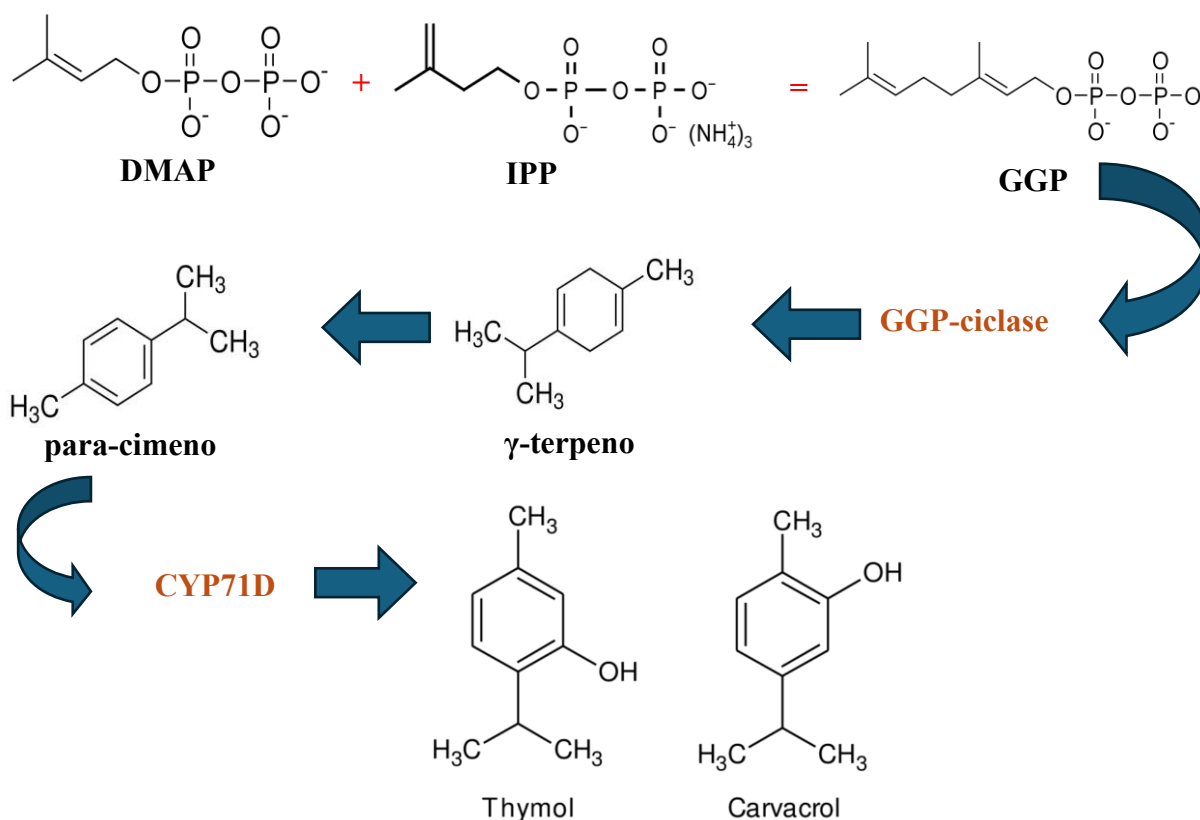


Figura 11. Rota metabólica a partir do GGP que origina os bioativos carvacrol e timol.

2.8.2 Uso do Eugenol e Carvacrol no controle de *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.)

O controle de artrópodes por meio de plantas ricas em EUG e CAR é comumente realizado em contextos experimentais mediante a utilização de extratos, óleos essenciais ou dos princípios ativos isolados. Essas substâncias demonstram eficácia em todas as fases do ciclo de vida dos artrópodes, podendo ainda ser empregadas em sinergismo, estratégia que potencializa a ação e amplia o espectro de atividade desses compostos.

Conceição *et al.* (2020), ao avaliar diferentes óleos, testou o de orégano, majoritariamente composto por CAR que exibiu potente atividade inseticida contra *C. felis felis*. Miranda *et al.* (2024), buscando estratégias para superar a resistência a acaricidas sintéticos, avaliou a combinação entre EUG e CAR alcançando notável efeito sinérgico contra todas as fases de vida (larvas, ninfas e adultos) do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.). Em estudo que avaliou especificamente a ação do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) rico em EUG e do EUG isolado, Lambert *et al.* (2020) verificaram a potente eficácia pulgicida contra *C. felis felis*. De Jesus *et al.* (2025) desenvolveram e testaram formulações do tipo spray e spot-on contra *C. felis felis* e *R. sanguineus* (s.l.) contendo EUG e CAR. Costa-Junior *et al.* (2023) verificou que o carvacrol tem uma atividade importante contra ninfas de *R. sanguineus* (s.l.). Os resultados demonstraram não apenas a eficácia dos compostos isolados, mas também o pronunciado efeito sinérgico da sua associação. Combinações binárias de CAR + EUG e timol + EUG, realizadas por Araújo *et al.* (2016) apresentam efeito sinérgico significativo contra

larvas de *R. sanguineus* s.l., com índices de combinação (CI) inferiores a 0,70, validando farmacologicamente a potencialização da atividade acaricida.

Em ensaios com fêmeas ingurgitadas, essas mesmas associações também evidenciaram sinergismo, embora a incorporação em formulações tenha apresentado um desafio, com alta eficácia larval (>90%) mas eficácia limitada contra fêmeas adultas, destacando a complexidade da transposição da eficácia in vitro para um produto estável (Vale *et al.*, 2021; Novato *et al.*, 2019). Estes resultados consolidam não só a atividade isolada dos componentes, quanto sua ação sinérgica contra pulgas e carrapatos.

O EUG (4-Allyl-2-methoxypheno) figura 12, possui mecanismos de ação contra artrópodes que não são bem elucidados, porém, Shang *et al.* (2021) avaliou a atividade acaricida do EUG contra o ácaro *Psoroptes cuniculi* e concluiu que a molécula desempenhou atividade acaricida por apresentar afinidade pela cadeia II do NADH desidrogenase mitocondrial, impedindo a respiração celular, desta maneira matando os ácaros. O segundo mecanismo de ação que pode explicar uma atividade inibitória do EUG frente aos artrópodes é o fato da atividade da molécula em receptores GABA_A dos parasitos, atividade esta que pode ser explicada pelo uso do EUG como anestésico, anticonvulsivante, ansiolítico e antimicrobiano (Li *et al.*, 2020; Siyal *et al.*, 2020; Goulet *et al.*, 2010).

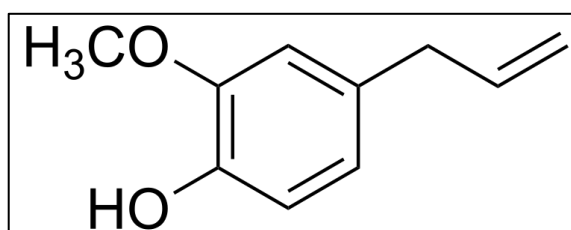


Figura 12. Estrutura química do Eugenol

A figura 13 demonstra como carrapatos expostos ao EUG apresentam sinais de morte por inibição de atividade e paralisia flácida, pelo recolhimento dos membros e diminuição gradual da movimentação.



Figura 13. Fêmeas (A) e machos (B) de *Rhipicephalus linnaei* não alimentados, mortos após exposição ao eugenol, apresentando sinais de paralisia flácida e morte. Fonte: autor

Primeiramente, o CAR tem uma atividade artropodocida que pode ser explicada por diversas ações tóxicas que a molécula causa em insetos e aracnídeos. Estudos com espectrofotometria revelam que o CAR possui uma certa atividade na inibição da AchE de parasitos que, apesar de não ser tão expressiva quanto a potência de organofosforados e carbamatos, pode estar atrelada a outros mecanismos inerentes ao bioativo (Bianchini *et al.*, 2017; Anderson; Coats, 2012).

O CAR (5-isopropil-2-metilfenol) figura 14, possui atividade excitatória. Experimentos com ratos mostraram que a molécula teve como alvo no SNC, receptores de potencial transitório (TRP) que determinam a transmissão de sinais excitatórios como dor, frio, calor e outros sinais ambientais (Luo *et al.*, 2014).

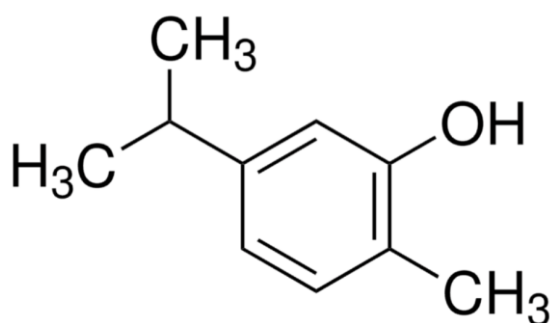


Figura 14. Estrutura química do Carvacrol

A ação modulatória excitatória pode explicar como o CAR atua matando os ectoparasitos por hiperexcitabilidade pois, quando submetidos ao bioativo, carrapatos apresentam inicialmente, hiperatividade e posterior morte por paralisia espástica, como pode ser observado na figura 15.



Figura 15. Fêmeas (A) e machos (B) de *Rhipicephalus linnaei* não alimentados, mortos após exposição ao CAR, apresentando sinais de paralisia espástica e morte por hiperexcitabilidade.

A Figura 16, obtida em ensaios *in vitro* preliminares, documenta uma manifestação morfológica distinta em carrapatos *R. linnaei* submetidos à associação CAR e EUG, caracterizada pela ocorrência dual de paralisia flácida e espástica. Essa dualidade fenotípica sugere a ocorrência de uma ação sinérgica entre os compostos, hipótese que deverá ser confirmada por meio de estudos complementares.



Figura 16. Fêmeas (A) e machos (B) de *Rhipicephalus linnaei* não alimentados, submetidos a ensaio *in vitro* com os compostos CAR e EUG.

A paralisia flácida está alinhada ao mecanismo de ação neurodepressor do eugenol. Conforme descrito para diversos bioativos, este efeito é frequentemente mediado pela modulação de canais de cloreto regulados pelo GABA, o principal neurotransmissor inibitório em artrópodes. A ativação dessa via promove um influxo de íons cloreto, resultando em hiperpolarização neuronal, bloqueio da transmissão nervosa e, clinicamente, paralisia por depressão neural (Sahin *et al.*, 2017).

Em contraste, a paralisia espástica observada corrobora o perfil neuroexcitatório do carvacrol. Evidências na literatura apontam que este monoterpene atua como um inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Cardoso *et al.*, 2020). Ao impedir a degradação da acetilcolina na fenda sináptica, ele provoca um acúmulo excessivo do neurotransmissor. A consequente estimulação prolongada e descontrolada dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) na junção neuromuscular resulta em despolarizações contínuas, espasmos musculares tetânicos e morte por exaustão que é um quadro clássico de paralisia espástica (Gamal *et al.*, 2023; Anderson e Coats, 2012).

Portanto, a manifestação morfológica registrada, sustenta a hipótese de um ataque sinérgico a dois sistemas neurotransmissores: o sistema inibitório agonista GABAérgico e o sistema colinérgico com inibição da AChE.

Além dos mecanismos de atividades supracitados, o CAR, assim como outros terpenóides também apresentam o potencial de causarem danos a cutícula de ectoparasitos, formando poros, os fragilizando e permitindo que outros compostos em sinergismo possam ter um maior potencial artropodocida, como por exemplo quando utilizado em sinergismo com o EUG, ambas as concentrações letais diminuem, pelo consequente aumento da potência da assimilação (Miranda *et al.*, 2024; Lima-de-souza *et al.*, 2022).

No mercado existem poucas formulações contendo compostos naturais para o controle de infestações por pulgas e carrapatos e todas, utilizando extratos e óleos essenciais nas apresentações de cremes e coleiras. Uma apresentação farmacológica em spray contendo EUG e CAR, além de eficaz, acaba sendo um meio sustentável para o controle de infestações.

2.9 Das Vias de Administração à Formulação Tópica: Uma Abordagem Estratégica No Controle de Ectoparasitos

O conhecimento das vias de administração é fundamental para o desenvolvimento de fármacos eficazes e seguros, uma vez que direciona a forma farmacêutica e influencia decisivamente na biodisponibilidade, no início da ação e no perfil de efeitos adversos. De modo geral, as vias podem ser classificadas em enterais e parenterais. As vias enterais ou digestivas, como a oral, embora sejam amplamente utilizadas pela praticidade, estão sujeitas ao metabolismo de primeira passagem e a variabilidades gastrointestinais que podem comprometer a chegada do princípio ativo à circulação sistêmica. Já as vias parenterais, que evitam o trato gastrointestinal, abrangem um espectro diverso, incluindo a intramuscular, subcutânea, tópica e intravenosa, caracterizadas geralmente por um início de ação mais rápido e uma biodisponibilidade mais previsível (Ramteke *et al.*, 2014; Flório *et al.*, 2017)

Dentre as vias parenterais, a via tópica consolida-se como uma alternativa notavelmente versátil e segura para o controle de ectoparasitos. Inicialmente concebida para obter efeitos localizados, sua aplicação assegura uma ação direta no tegumento e pelame, local de parasitismo primário, minimizando significativamente o risco de reações adversas sistêmicas e o estresse do animal durante o manejo (Baynes, 2018)

A eficácia de uma formulação tópica está intrinsecamente ligada à sua capacidade de distribuir-se de maneira uniforme pela superfície corporal, podendo até criar uma barreira protetora em áreas de predileção para a fixação de ectoparasitos. Estudos comparativos com diferentes princípios ativos e combinações em formulações spot-on demonstram que este perfil de distribuição é crucial para se obter uma eficácia otimizada e prolongada. O desempenho superior de certas associações sinérgicas em relação a princípios ativos isolados evidencia como a própria formulação é determinante para o sucesso do controle parasitário, permitindo uma ação mais rápida e a manutenção da eficácia durante todo o intervalo entre as aplicações. Contudo, a versatilidade farmacológica desta via vai além da ação local. Quando intencionalmente formulada para esse fim, a via tópica permite uma absorção cutânea controlada, conferindo ao tratamento um efeito sistêmico. É crucial destacar que, mesmo sendo considerada segura, o potencial de absorção percutânea através da pele íntegra exige rigor no desenvolvimento para garantir um perfil toxicológico favorável. Esta capacidade de transitar de uma ação localizada para uma distribuição corporal mais ampla amplia consideravelmente seu leque de aplicações (Pfister e Armstrong, 2016; Baynes, 2018; Fawzi *et al.*, 2021).

2.9.1 Panorama das formas farmacêuticas tópicas

Conforme destacado por Ahmed e Kasraian (2002), o desenvolvimento farmacêutico veterinário, embora compartilhe bases científicas e regulatórias com a área humana, enfrenta desafios únicos. A diversidade de espécies, portes, fisiologias e perfis de manejo exige soluções farmacotécnicas específicas, especialmente para fármacos destinados ao controle de ectoparasitos.

Diante dessas particularidades, a indústria farmacêutica disponibiliza uma gama diversificada de formas farmacêuticas tópicas. Cada uma apresenta um equilíbrio único entre

modo de aplicação, perfil de distribuição no tegumento e duração do efeito, atendendo a diferentes necessidades clínicas e perfis de manejo. As principais categorias incluem as tradicionais pipetas (*spot-on*), coleiras, sprays (aerossóis e atomizadores), xampus e pós, além de apresentações modernas como loções, géis, toalhetes impregnados e sistemas de liberação controlada (microencapsulação) (Fantatto *et al.*, 2025; Gupta *et al.*, 2019; Marchiondo *et al.*, 2013).

2.9.2 Formulações *spot-on*

As formulações *spot-on* consolidaram-se como uma das principais formas farmacêuticas tópicas na medicina de pequenos animais, representando um pilar no controle estratégico de endo e ectoparasitos. Caracterizam-se por serem soluções ou emulsões oleosas concentradas, acondicionadas em pipetas de dose única para aplicação em pontos específicos da região dorsal do animal, preferencialmente entre as escápulas ou na área correspondente a articulação atlanto-occipital (Fawzi *et al.*, 2021; Pfister e Armstrong, 2016; Beugnet e Franc, 2012).

São formulações que baseiam sua eficácia num mecanismo de distribuição robusto onde, após a deposição no tegumento, os princípios ativos lipofílicos, carregados por veículos oleosos, se difundem no filme lipídico natural dos animais, translocando-se ativamente, cobrindo toda a superfície corporal, protegendo por um período residual que pode perdurar por até semanas (De Jesus *et al.*, 2025; Mehlhorn, 2001).

As principais classes farmacológicas empregadas em formulações *spot-on* para controle de ectoparasitos são as avermectinas, milbemicinas, piretróides, fenilpirazóis (fipronil), IGR's e isoxazolinás. Tais compostos podem ser encontrados isoladamente ou em associações sinérgicas, estratégia adotada para ampliar o espectro de eficácia e superar mecanismos de resistência (Becskei *et al.*, 2017; Horak *et al.*, 2012; Bonneau *et al.*, 2010).

2.9.3 Coleiras impregnadas com ectoparasiticidas

As coleiras impregnadas consolidaram-se como dispositivos tópicos de liberação contínua, oferecendo uma abordagem profilática e de longo prazo no controle de ectoparasitos de pequenos animais. Caracterizam-se por sistemas poliméricos, geralmente à base de policloreto de vinila (PVC), silicone ou polietileno, nos quais os princípios ativos são incorporados na matriz, permitindo uma difusão passiva e homogênea através da superfície do material para o filme lipídico da pele e pelame do animal (Paliy *et al.*, 2021^a; Witchey-Lakshmanan, 1999).

Seu mecanismo de ação baseia-se na liberação controlada dos fármacos impregnados, que, uma vez em contato com o tegumento, distribuem-se de forma centrífuga a partir do ponto de contato do dispositivo, termodinamicamente. Essa distribuição é otimizada pelo movimento natural do animal e pelo contato físico da coleira com a região cervical e torácica, estabelecendo um reservatório cutâneo que confere proteção residual e repelência, por períodos que podem estender-se a vários meses (Witchey-Lakshmanan, 1999; Dantas-Torres *et al.*, 2013^a).

Diversas classes farmacológicas podem ser veiculadas nestes dispositivos, como organofosforados, carbamatos, piretróides, fenilpirazóis, neonicotinóides e reguladores de crescimento de insetos (IGRs). A versatilidade da matriz polimérica permite ainda a incorporação de sinérgicos ou a combinação estratégica de moléculas com mecanismos de ação complementares, uma abordagem fundamental para ampliar o espectro de eficácia e superar cepas resistentes (Stanneck *et al.*, 2012; Horak *et al.*, 2012).

2.9.4 Formulações em aerossol e atomização (sprays)

Os sprays representam uma das principais formas farmacêuticas tópicas na veterinária, caracterizando-se pela praticidade de aplicação, pela possibilidade de dosagem controlada e pelo uso em áreas específicas. Para além dessa conveniência operacional, sua verdadeira eficácia é determinada pela interação entre a natureza e a concentração do princípio ativo e a composição dos excipientes que compõem a formulação. Nesse contexto, as formulações em aerossol e atomização destacam-se por conferirem uma vantagem farmacotécnica decisiva que é a cobertura corporal imediata e homogênea. Este perfil as torna ferramentas de eleição tanto para o tratamento de infestações estabelecidas quanto para a proteção rápida, preenchendo uma lacuna deixada por formas que dependem de difusão passiva (De Jesus *et al.*, 2025; Paliy *et al.*, 2023).

Estas formulações caracterizam-se por serem líquidas, de natureza hidroalcoólica, oleosa ou emulsificada, acondicionadas em frascos pressurizados (aerossóis) ou com bombas dosadoras mecânicas (atomizadores). A aplicação ocorre por meio da pulverização direta e manual sobre o pelame e a pele do animal, permitindo ao operador controlar a quantidade e a área de aplicação com precisão (De Jesus *et al.*, 2025).

A versatilidade desta forma farmacêutica permite a veiculação de uma ampla gama de princípios ativos, incluindo piretróides, fenilpirazóis (fipronil), organofosforados e, notavelmente, compostos naturais voláteis como terpenoides e fenilpropanoides. A formulação em spray é particularmente adequada para moléculas que atuam por contato e para associações sinérgicas, pois garante que todos os compostos atinjam simultaneamente o mesmo sítio de ação, potencializando seu efeito combinado (De Jesus *et al.*, 2025; Dumont *et al.*, 2015).

2.10 Efeitos Adversos: Perfil Toxicológicos para o Uso Seguro de Eugenol e Carvacrol.

A avaliação de segurança de qualquer agente farmacológico, incluindo compostos naturais, fundamenta-se na definição precisa e na correta classificação dos efeitos adversos. Para farmacologia e toxicologia, estes são classicamente definidos como respostas nocivas, não intencionais e indesejáveis a uma substância, que ocorrem em doses normalmente utilizadas para profilaxia, diagnóstico ou tratamento. No entanto, a definição operacional para fins de uma avaliação toxicológica robusta vai além desta concepção. Dorato e Engelhardt (2005), classificam um efeito como adverso como um julgamento profissional. Este julgamento determina se uma alteração observada bioquímica, funcional ou morfológica, representa um risco significativo para a saúde, com potencial para comprometer o desempenho, o desenvolvimento ou a expectativa de vida do organismo.

A natureza química do EUG e do CAR é responsável tanto pela sua atividade desejada contra parasitos, quanto pelos efeitos indesejados contra o hospedeiro. Seus mecanismos de ação conferem propriedades, inclusive, como desestabilizador de membranas celulares. Como frisado anteriormente, um dos mecanismos de ação pesticida envolve a interação com a bicamada lipídica de células de invertebrados, aumentando sua permeabilidade, causando desequilíbrio iônico, perda de componentes celulares e, finalmente, morte celular. É crucial notar que este é um mecanismo de ação não seletivo; em concentrações sistêmicas suficientemente elevadas, a mesma interação pode ocorrer com membranas de células de mamíferos, constituindo a base fisiopatológica para potenciais efeitos como irritação dérmica ou ocular e citotoxicidade sistêmica (Ghorani *et al.*, 2021; Baker *et al.*, 2018).

O perfil toxicológico conjunto destes biocompostos aponta para órgãos e sistemas-alvo específicos onde a vigilância deve ser redobrada. A hepatotoxicidade é uma preocupação

primária, dado que o fígado é o principal sítio de metabolismo; a geração de metabólitos reativos pode induzir estresse oxidativo e lesão hepatocelular, refletida na elevação de enzimas séricas como ALT e AST. A aplicação tópica direta carrega o risco de causar dermatite de contato, seja de natureza irritativa ou alérgica, este último em indivíduos previamente sensibilizados. A nível sistêmico, alterações hematológicas sutis, como as observadas no estudo clínico com carvacrol, justificam a monitorização de parâmetros como hemograma completo e hematócrito em estudos *in vivo* para descartar quaisquer efeitos mielossupressores. Além disso, em doses extremamente elevadas, alguns monoterpenos e fenilpropanóides podem exercer efeitos depressores no sistema nervoso central (Ghorani *et al.*, 2021; Baker *et al.*, 2018; Nejad *et al.*, 2017; Sober *et al.*, 1950).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenvolvimento da formulação e obtenção de doses

Foram desenvolvidas formulações em spray de acordo com De Jesus *et al.* (2025), contendo a combinação de eugenol e carvacrol, cada um em concentração de 10% (p/v). A formulação também continha os seguintes excipientes: o antioxidante BHT (0,5%), o acidificante e quelante ácido cítrico (0,3% p/v), o agente de viscosidade propilenoglicol (10% v/v), o surfactante Tween 80 (5% v/v), o potencializador de penetração DMSO (2% v/v), solução tampão fosfato (pH 7,0; 10% v/v) e álcool isopropílico (q.s.p 100%).

No preparo, o BHT foi inicialmente solubilizado no DMSO, e o ácido cítrico, no tampão fosfato, separadamente. Posteriormente, todos os componentes foram incorporados e misturados à temperatura ambiente (25 °C) sob agitação constante em agitador magnético até homogeneização completa.

A determinação da dose dos bioativos foi baseada nos resultados de eficácia em bioensaios *in vitro* descritos por Miranda *et al.*, (2024). Neste estudo, a associação de EUG e CAR cada um na concentração de 1000 µg/ cm² demonstraram eficácia de 100% frente a pulgas e carrapatos. Levando em consideração a relação de peso vivo e área da superfície corporal de cães, de 0,5 m² para cada 10 kg de pesos vivo, e a relação de volume de spray administrado de 5 mL por kg de peso vivo, para um animal de 10 Kg, tem-se:

1.000 µg ----- 1 cm² (0,0001 m²) - **Concentração eficaz *in vitro***
 5.000.000 µg ----- 0,5 m² ----- 10 kg - **Concentração para um cão de 10Kg**
 5 g (ativo) ----- 10 kg (peso/vivo) → **dose eficaz *in vitro***
 1 kg ----- 5 mL - **volume de spray por kg**
 10 kg ----- **50 mL - volume de spray para um cão de 10 kg**
 5 g ----- 10 kg ----- 50 mL
 10g ----- 100 mL → 10% (p/v) → **Concentração do ativo no produto**

3.2 Obtenção, Seleção e Critérios de Inclusão dos Animais

Todos os animais utilizados no estudo foram oriundos do canil experimental de cães da raça Beagle do Centro de Pesquisa Clínica e Inovação Tecnológica em Medicina Veterinária – Laerte Grisi (GRISIUS), anexo I do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do

Rio de Janeiro, na cidade de Seropédica (22°45'31.3"S 43°40'42.3"W). O experimento foi executado, amparado pela aprovação obtida do Comitê de Ética em Utilização de Animais do Instituto de Veterinária da UFRRJ, sob número de protocolo 3950060922. Os animais foram mantidos em instalações que atendem às normas da Resolução Normativa do CONCEA nº 59/2023, tanto em estrutura quanto em manejo sanitário.

Para o estudo, foram selecionados 20 cães hígidos do plantel do GRISIUS, todos identificados com microchips subcutâneos, sem tratamento com ectoparasiticidas nos últimos 90 dias. A seleção dos animais obedeceu a rigorosos critérios de inclusão, definidos a priori para garantir a homogeneidade da amostra e a validade dos resultados:

a) Condição sanitária: Para atestar o bom estado de saúde, os animais foram submetidos a exames clínicos e físicos completos, além da coleta de amostras sanguíneas para análises hematológicas e bioquímicas. Foram incluídos apenas aqueles que não apresentaram quaisquer alterações clinicamente relevantes nesses exames.

b) Peso corporal: Os animais deveriam apresentar peso corporal entre 10 e 15 kg, visando homogeneizar o grupo experimental quanto ao tamanho e à relação dose/superfície corporal.

c) Nível de infestação parasitária pré-tratamento: Após a infestação artificial no dia -9, realizou-se uma contagem preliminar de ectoparasitos no dia -7 por meio de remoção mecânica completa. Foram incluídos apenas os cães que apresentaram uma recuperação mínima acima de 50 pulgas e 25 carrapatos nesta avaliação. Este critério assegurou que todos os animais inseridos apresentassem um nível de infestação clinicamente relevante e suficiente para avaliar a eficácia acaricida/inseticida da formulação. Cães com recuperação parasitária abaixo do limite mínimo estabelecido seriam excluídos da pesquisa antes da randomização e aplicação dos tratamentos, o que não se fez necessário, pois todos os 20 animais pré-selecionados atingiram o limiar de infestação.

Durante o experimento, todos os cães foram alimentados diariamente com ração super premium para cães adultos, em quantidades de acordo com as informações nutricionais e as indicações do fabricante, e com acesso à água fresca ad libitum.

3.3 Infestações

Os animais foram experimentalmente infestados com 100 pulgas *C. felis felis* (50 fêmeas e 50 machos) e 50 carrapatos *R. linnaei* (25 fêmeas e 25 machos) com idade de 14 dias, ambos adultos e não alimentados, provenientes da colônia de ectoparasitos do GRISIUS, amparada pelo protocolo de número 090/14 da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Os espécimes foram depositados no interior do pelame do animal, após o afastamento dos pelos por um segundo colaborador que permaneceu mantendo o cão contido em estação por 10 minutos até que houvesse a dispersão e início da fixação dos ectoparasitos, evitando assim uma remoção mecânica pelo próprio animal, o que poderia interferir nos resultados.

Ao longo do estudo, foram realizadas quatro infestações nos dias experimentais -9, -2, +5 e +12. Cada uma delas foi precedida por um protocolo de desinfestação mecânica, utilizando catação manual e pentes finos com densidade de 13 dentes por cm, instrumentos adequados para a remoção eficaz de ectoparasitos.

3.4 Ranqueamento e Randomização

Para garantir a adaptação e o bem-estar dos animais, estes passaram por um período de aclimação de cinco dias (do D-14 ao D-9) nas instalações experimentais. No nono dia pré-experimental (D -9), todos os cães foram submetidos à desinfestação mecânica de ectoparasitos, seguida de banho com xampu neutro e imediata secagem com toalhas individuais para assegurar que estivessem completamente secos antes do procedimento seguinte. Imediatamente após a secagem, procedeu-se à infestação artificial de cada animal com 25 casais de adultos não alimentados de *R. linnae* e 50 adultos não alimentados de *C. felis felis*. Após 48 horas (D -7), quantificou-se a carga parasitária, o que resultou na exclusão dos animais que apresentaram contagem inferior a 50 espécimes de pulgas e/ou inferior a 25 espécimes de carrapatos.

Dos 16 cães que permaneceram no estudo (n=16), estes foram ranqueados em ordem decrescente de carga parasitária total. A partir da contagem parasitária individual obtida no D-7, os animais foram ranqueados em ordem decrescente, utilizando prioritariamente a carga de *R. linnae* e, em casos de empate, a carga de *C. felis felis* como critério de desempate. A partir dessa lista ordenada, procedeu-se à alocação sistemática dos animais nos grupos: para cada par sequencial de cães na lista (ou seja, os dois com cargas mais similares), um foi alocado aleatoriamente no grupo tratado (GT) e o outro, no grupo controle (GC). Este método assegurou o equilíbrio entre os grupos em relação à carga parasitária inicial, conforme recomendado pelos guias da WAAVP para estudos de eficácia.

3.5 Tratamento

No dia experimental 0, os 8 cães do GT receberam por via tópica o produto contendo EUG + CAR 10% apresentação de pulverização por atomização (spray) sob todo o pelame, na dose de 500 mg/kg, de forma a cobrir toda a superfície corporal que posteriormente foi massageada para garantir que o produto também entrasse em contato com a pele dos cães. O volume de formulação administrado foi calculado de acordo com o peso dos animais seguindo a relação de 5 mL por kg de peso vivo. Os animais integrantes do GC não receberam tratamento algum.

3.6 Eficácia Terapêutica e Persistência Contra Reinfestação

A avaliação da eficácia do produto foi conduzida por meio de infestações artificiais sequenciais e contagens parasitárias em dias predeterminados. Para avaliar a eficácia terapêutica, ou seja, a capacidade do produto em eliminar uma infestação já estabelecida, realizou-se uma infestação artificial no D-2, 48 horas antes do tratamento, com a contagem da carga parasitária remanescente no D+2. Já para avaliar a eficácia preventiva (persistência do efeito contra reinfestações), infestações artificiais de desafio foram realizadas nos dias D+5 e D+12, com as respectivas contagens 48 horas depois, nos dias D+7 e D+14. Em todas as avaliações, os espécimes recuperados foram coletados mecanicamente, separados por espécie, contabilizados e classificados quanto à sua viabilidade (vivos ou mortos).

Conforme preconizado por Marchiondo *et al.* (2013), as eficácias pulgicidas (Ep) e carrapaticidas (Ec) foram calculadas mediante análise comparativa das médias de ectoparasitos viáveis recuperados dos grupos GC e GT, com base nas seguintes fórmulas padronizadas

$$EP (\%) = \frac{\text{Média de pulgas vivas GC} - \text{Média de pulgas vivas GT}}{\text{Média de pulgas vivas GC}} \times 100$$

$$EC (\%) = \frac{\text{Média de carrapatos vivos e fixados GC} - \text{Média de carrapatos vivos e fixados GT}}{\text{Média de carrapatos vivos e fixados GC}} \times 100$$

3.7 Análise estatística

Os dados referentes às contagens médias de pulgas e carrapatos adultos viáveis foram submetidos à análise estatística comparativa. Inicialmente, a aderência à distribuição normal foi confirmada para todos os conjuntos de dados por meio do teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$). Diante desse resultado, a comparação entre os grupos (controle e tratado) foi realizada utilizando o teste t de Student para amostras independentes. Um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) foi estabelecido para todas as análises, as quais foram executadas no programa Bioestat 5.3.

3.8 Avaliação da segurança terapêutica

A segurança foi avaliada mediante análise comparativa de marcadores de toxicidade (enzimas hepáticas, perfil renal) nos períodos pré e pós-tratamento, complementada por um exame clínico completo e sistematizado. Este exame incluiu a avaliação de parâmetros fisiológicos essenciais como temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória, coloração de mucosas, tempo de preenchimento capilar, estado de hidratação e escore de condição corporal, e uma inspeção minuciosa para detecção de alterações dermatológicas, como eritema, edema, prurido ou alopecia.

O monitoramento clínico foi conduzido no dia -9, para assegurar a inclusão apenas de animais hígidos, e diariamente durante todo o período experimental. O objetivo foi duplo: selecionar indivíduos clinicamente saudáveis e monitorar ativamente a ocorrência de quaisquer eventos adversos, sejam locais (no sítio de aplicação) ou sistêmicos, decorrentes da aplicação tópica ou da possível inalação da névoa do spray. Além do exame clínico, amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular antes (D-14) e depois do tratamento (D+2). Utilizaram-se tubos a vácuo com anticoagulante EDTA para os exames hematológicos e tubos sem anticoagulante para a obtenção de soro, que foi subsequentemente utilizado para a análise bioquímica.

Os parâmetros hematológicos avaliados foram: contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, hematócrito, contagem total de leucócitos e contagem de plaquetas. No perfil bioquímico sérico, foram quantificados: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamilttransferase (GGT), bilirrubina total, bilirrubina direta, ureia, creatinina, fósforo e proteínas totais.

A monitoração destes parâmetros teve como objetivo a detecção de possíveis alterações sistêmicas decorrentes da intervenção terapêutica, fundamentando-se na capacidade de prover uma avaliação integral dos principais sistemas orgânicos dos animais submetidos ao tratamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Formulações

A formulação tópica em spray contendo a associação sinérgica de eugenol (EUG) e carvacrol (CAR) foi desenvolvida com base nas concentrações efetivas previamente determinadas *in vitro* (Miranda *et al.* 2022). O veículo foi constituído por uma solução hidroalcoólica composta por propilenoglicol, álcool isopropílico, polisorbato 80, dimetilsulfóxido (DMSO) e tampão fosfato pH 7,0, otimizada para garantir a solubilidade e estabilidade dos bioativos, além de uma viscosidade adequada para a atomização, de acordo com De Jesus *et al.* (2025).

A caracterização físico-química das formulações individuais (EUG ou CAR) e da associação (EUG+CAR) confirmou sua adequação. Todas apresentaram-se como soluções límpidas, homogêneas e translúcidas, com pH ajustado entre 6,4 e 6,8 – faixa compatível com a aplicação tópica em pele de cães. Os testes de estabilidade preliminar (centrifugação) e acelerada (ciclos de temperatura) não evidenciaram separação de fases, e o leve escurecimento observado durante o estresse térmico foi atribuído à oxidação esperada dos compostos fenólicos. A análise por CLAE-UV demonstrou que os teores dos bioativos nas formulações finais mantiveram-se dentro da faixa aceitável (94-95%) durante o período avaliado de três meses, confirmando a estabilidade química do produto (De Jesus *et al.*, 2025). Para a aplicação *in vivo*, o volume da formulação a ser administrado foi calculado individualmente para cada animal, com base no seu peso corporal, assegurando uma dosagem precisa e padronizada.

Assim, os parâmetros farmacotécnicos atendidos como estabilidade físico-química, pH adequado e concentração ativa preservada, somados ao rigor da dosagem individual por peso, validam a qualidade da formulação desenvolvida e asseguram que os resultados de eficácia *in vivo* obtidos são atribuíveis à ação biológica dos compostos, e não a variáveis relacionadas à qualidade ou à integridade do produto aplicado.

A Figura 17 exibe as soluções já acondicionadas em suas embalagens finais individualizadas, prontas para a atomização no corpo dos animais.

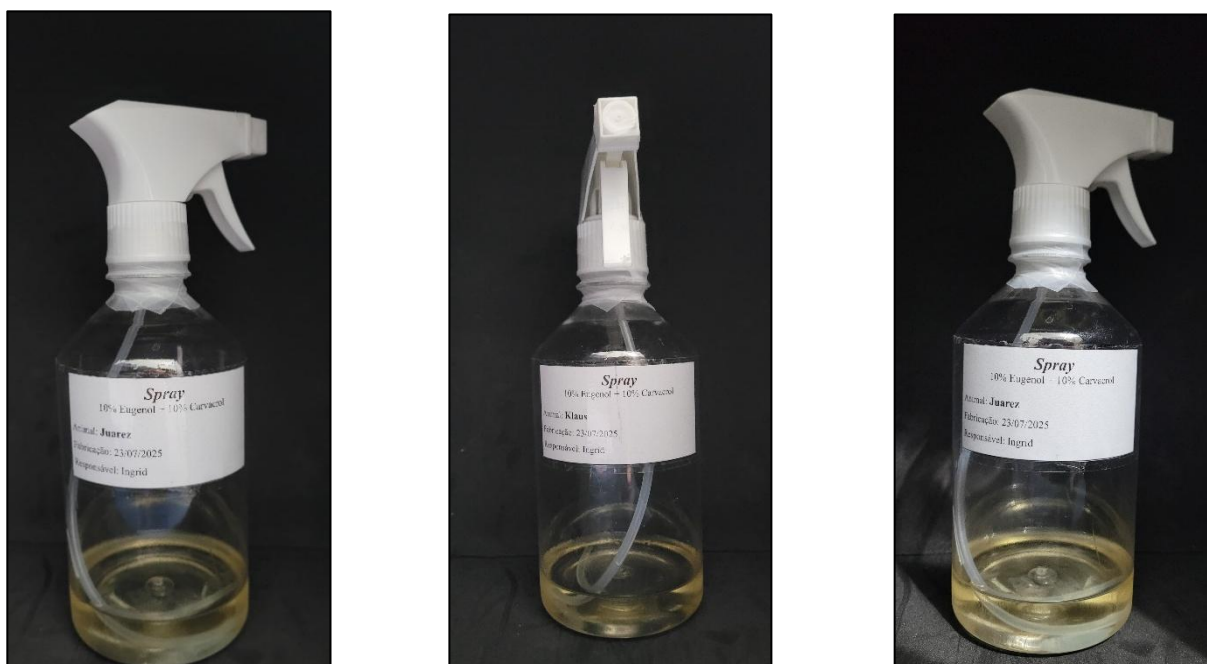


Figura 17. Formulações à base de eugenol (EUG) e carvacrol (CAR) em frascos spray, utilizadas para aplicação tópica nos animais.

4.2 Seleção Dos Animais

A padronização dos animais experimentais é um pilar metodológico essencial em ensaios de eficácia, pois minimiza variáveis de confusão que poderiam enviesar a resposta ao tratamento. A seleção preconizou a homogeneidade de peso entre os indivíduos, a fim de

assegurar a padronização da dosagem do tratamento. A Tabela 2 sumariza os dados de identificação, peso e sexo dos cães incluídos no ensaio.

Tabela 2. Identificação, peso em quilogramas e gênero dos animais escolhidos para o estudo, pré-randomização contendo 10 fêmeas e 10 machos.

Fêmeas		Machos	
Animal (Chip)	Peso (Kg)	Animal (Chip)	Peso (Kg)
556317	12,85	088937	11,00
503359	13,65	787758	13,60
811767	15,30	503411	13,60
192820	13,25	556515	15,05
787750	12,65	503622	11,65
552864	12,35	458721	15,15
787752	9,80	503624	13,80
787773	10,35	787754	12,70
556791	12,75	503418	14,95
192810	10,80	556338	11,90

O critério de homogeneidade de peso foi rigorosamente atendido, como evidenciado pelos dados na Tabela 2. Os 20 cães selecionados inicialmente (10 fêmeas e 10 machos) apresentaram pesos corporais compatíveis, com uma média de aproximadamente 12,38 kg e um desvio padrão de 1,65 kg para fêmeas e 13,34 kg com um desvio padrão de 1,49 kg para machos, indicando uma baixa dispersão em torno da média. A maior parte dos indivíduos situou-se na faixa de 9,80 a 15,30 kg.

A padronização por peso e sexo foi uma estratégia fundamental para maximizar a validade interna do estudo. Ao minimizar a variação interindividual basal através da homogeneização do peso corporal e do equilíbrio entre sexos, reduzimos ruídos de fundo que poderiam confundir a detecção do efeito do tratamento. Este rigor no controle de variáveis intrínsecas aumenta a precisão e a sensibilidade do ensaio, permitindo que diferenças observadas na carga parasitária sejam atribuídas com maior confiança à formulação testada, otimizando o desenho experimental, o que confere solidez estatística adequada, com um número ético e justificável de animais (Beynen, 1991).

4.3 Ranqueamento e randomização

Após a contagem de ectoparasitos por meio de remoção mecânica, os 20 animais foram ranqueados conforme a carga parasitária recuperada. Foram excluídos do estudo os indivíduos que apresentaram contagem insuficiente ou nula de ectoparasitos, totalizando quatro cães (três machos e uma fêmea), conforme detalhado na Tabela 3. Vale ressaltar que as cargas parasitárias superiores às iniciais, observadas em alguns animais, são atribuíveis a reinfestações a partir do ambiente, um fator intrínseco a estudos de campo dessa natureza, apesar dos banhos e da criteriosa remoção mecânica prévia realizados durante a seleção.

Tabela 3. Número de ectoparasitos viáveis recuperados por animal após desafio artificial para ranqueamento.

Animal / Microchip	Sexo	Pulgas		Carrapatos	
		Vivas	Mortas	Vivos	Mortos
556515	M	68	0	60	0
787752	F	113	0	47	0
787773	F	51	0	46	0
503359	F	73	0	45	0
503622	M	2	0	37	0
787750	F	103	0	36	0
192820	F	79	0	35	0
556791	F	98	0	35	0
458721	M	59	0	32	0
787758	M	92	0	30	0
787754	M	90	0	30	0
503418	M	59	0	29	0
556338	M	17	0	29	0
503411	F	93	0	28	0
503624	M	74	0	26	0
811767	F	0	3	25	0
192810	F	104	0	24	0
552864	F	87	0	21	0
556317	F	99	0	17	0
88937	M	0	14	2	12

Linhas destacadas correspondem aos animais excluídos no D-7 (pré-randomização) por não atenderem ao critério mínimo de infestação (<50 pulgas e/ou <25 carrapatos).

Os 16 cães selecionados foram ranqueados em ordem decrescente conforme o número de carrapatos vivos recuperados e, subsequentemente, distribuídos de forma aleatória em dois grupos: grupo tratado (GT) e grupo controle (GC), cada um composto por oito animais. O processo de randomização foi estruturado para garantir equilíbrio entre os sexos, resultando na mesma proporção de machos e fêmeas em cada grupo, conforme detalhado na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização dos grupos experimentais: número de cães, sexo e idade dos animais da raça Beagle utilizados no estudo.

Grupo	Animais	Sexo	Peso	Idade
Controle	8	F = 5 (62,5%) M = 3 (35,5%)	13,16 ^a ± 1,59	61,1 ^a ± 41,0
Tratado	8	F = 5 (62,5%) M = 3 (35,5%)	12,64 ^a ± 1,48	56,8 ^a ± 32,9

*Média aritmética dos valores de peso (Kg) com o desvio padrão (DP), média aritmética das idades em meses com o DP, F = fêmeas M = machos. Valor de p > 0,05, sem diferença estatística significativa

O processo de ranqueamento e randomização foi conduzido conforme diretrizes estabelecidas por Festing; Altman (2002) e Marchiondo *et al.* (2013) para o delineamento rigoroso de experimentos com animais, visando a formação de grupos comparáveis e a atribuição causal dos efeitos.

Os valores de carrapatos e pulgas recuperados no período que compreendeu a fase de pré-tratamento, foram superiores a 25% da infestação. O GC apresentou uma média geométrica de infestação para *R. linnaei* vivos e fixados de 36,88 e para *C. felis felis* vivas, de 83,00, mantendo-se com níveis de infestação homogêneos e estáveis durante todo o período de avaliação. O GT apresentou médias de fixação pré-tratamento de 30,75 para *R. linnaei* e 84,75 para *C. felis felis*, valores sem diferenças estatísticas ($p > 0,05$), como podem ser visualizados na tabela 5 onde lista os grupos pós-randomização.

Tabela 5. Média geométrica dos valores da recuperação pré-tratamento (dia -7) de *R. linnaei* e *C. felis felis* de cães beagle artificialmente infestados para os grupos controle (GC) e grupo tratado (GT).

	Microchip	Pulgas		Carrapatos		Peso (kg)
		Vivas	Mortas	Vivos	Mortos	
Grupo controle (GC)	556515	68	0	60	0	15,05
	787758	92	0	30	0	13,6
	503418	59	0	29	0	14,95
	787752	113	0	47	0	9,8
	503359	73	0	45	0	13,65
	192820	79	0	35	0	13,25
	503411	93	0	28	0	13,6
	552864	87	0	21	0	12,35
	Média	83,00 ^a		36,88 ^a		13,28 ^a
	DP	±16,96		±12,80		±1,66
Grupo tratado (GT)	458721	59	0	32	0	15,15
	787754	90	0	30	0	12,7
	503624	74	0	26	0	13,8
	787773	51	0	46	0	10,35
	787750	103	0	36	0	12,65
	556791	98	0	35	0	12,75
	192810	104	0	24	0	10,8
	556317	99	0	17	0	12,85
	Média	84,75 ^a		30,75 ^a		12,63 ^a
	DP	± 20,80		± 8,76		± 1,53

Letras sobescritas iguais significam que os valores não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os critérios de infestação mínima para inclusão dos animais basearam-se em parâmetros validados para modelos experimentais de ectoparasitos (Marchiondo *et al.* 2013). Ademais, a exclusão de indivíduos abaixo desse limiar, assegurando uma infestação basal mensurável, alinha-se ao princípio ético da redução, preconizado por Russell e Burch (1959) e adaptado por

Lee *et al.* (2020) para a experimentação animal, ao otimizar o poder estatístico com o menor número necessário de animais.

4.4 Eficácia

Os valores de média geométrica relacionados com a recuperação de ectoparasitos para o GC nos dias experimentais +2, +7 e +14, foram de 35,84, 33,77 e 35,01 para *R. linnaei* e 52,80, 65,79 e 80,82 para *C. felis felis*. Para o GT, os valores ficaram em 1,39, 15,76 e 32,64 para *R. linnaei* e 0,54, 24,97 e 50,09 para *C. felis felis*.

A eficácia acaricida do produto foi de 96,11%, 53,32% e 6,77% para *R. linnaei* e 98,97%, 62,05% e 38,02% para *C. felis felis* nos dias experimentais +2, +7 e +14. A tabela 6 mostra os valores de média das contagens de pulgas e carrapatos vivos, bem como a eficácia acaricida e pulgicida do composto.

Tabela 6 Valores de média geométrica obtidos a partir da contagem de Pulgas (*C. felis felis*) e carrapatos (*R. linnaei*), ambos vivos e fixados cães no grupo controle e tratado, e valores de eficácia pulgicida e acaricida de uma formulação em spray administrada por via tópica em beagles artificialmente infestados

Dia	<i>R. linnaei</i>			<i>C. felis felis</i>		
	GC Média*	GT Média*	Eficácia	GC Média*	GT Média*	Eficácia
+2	35,84 ^a ± 12,52	1,39 ^b ± 1,19	96,11 %	52,80 ^a ± 8,12	0,54 ^b ± 2,42	98,97 %
+7	33,77 ^a ± 10,52	15,76 ^b ± 9,38	35,32 %	65,79 ^a ± 19,56	24,97 ^b ± 17,72	62,05 %
+14	35,01 ^a ± 12,28	32,64 ^b ± 5,24	6,77 %	80,82 ^a ± 18,16	50,09 ^b ± 37,79	38,02%

*Médias geométricas, ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente (p>0,05); letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05).

A figura 18 apresenta os valores em um gráfico de recuperação, possibilitando uma melhor visualização da recuperação dos carrapatos, vivos e fixados do grupo controle e do grupo tratado, em cães da raça Beagle, submetidos ao tratamento com EUG + CAR numa formulação em spray.

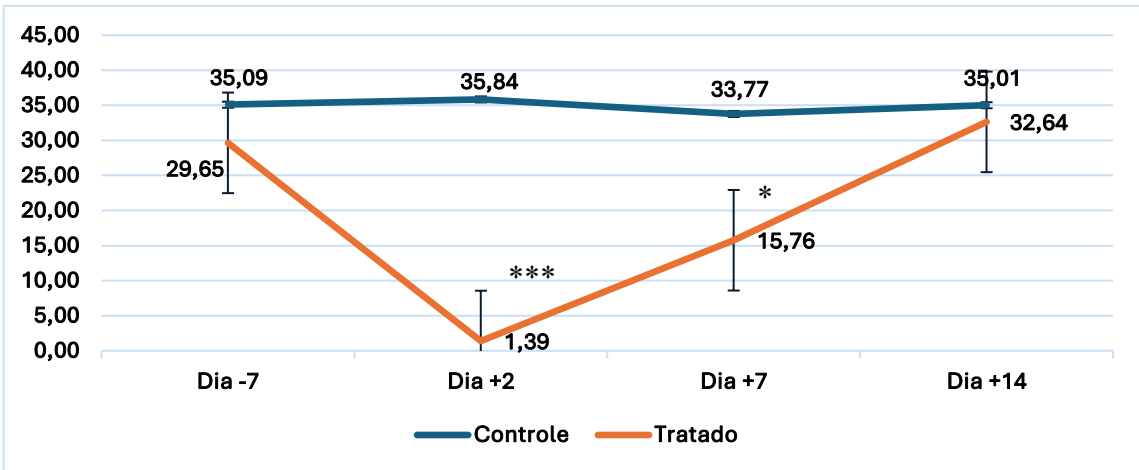


Figura18. Gráfico demonstrando os valores das médias geométricas de recuperação de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* recuperados vivos e fixados de cães artificialmente infestados, tratados com uma formulação em spray contendo EUG + CAR.

O gráfico presente na figura 19 demonstra o perfil de recuperação de espécimes de *C. felis felis* vivas em cães da Raça beagle que receberam tratamento tópico da formulação contendo EUG + CAR em spray

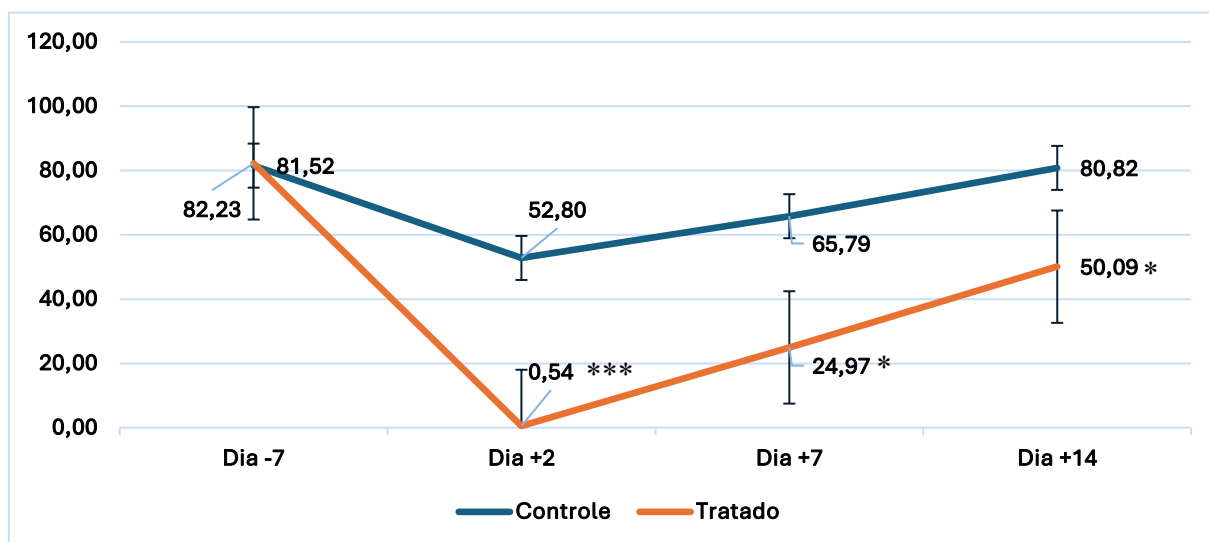


Figura 19. Gráfico demonstrando os valores das médias geométricas de recuperação de pulgas, *Ctenocephalides felis felis* recuperados vivos e fixados de cães artificialmente infestados, tratados com uma formulação em spray contendo EUG + CAR.

O gráfico da figura 20 mostra os valores da eficácia carrapaticida e pulgicida da formulação contendo EUG e CAR, comparando o GC e o GT nos dias experimentais +2, +7 e +14.

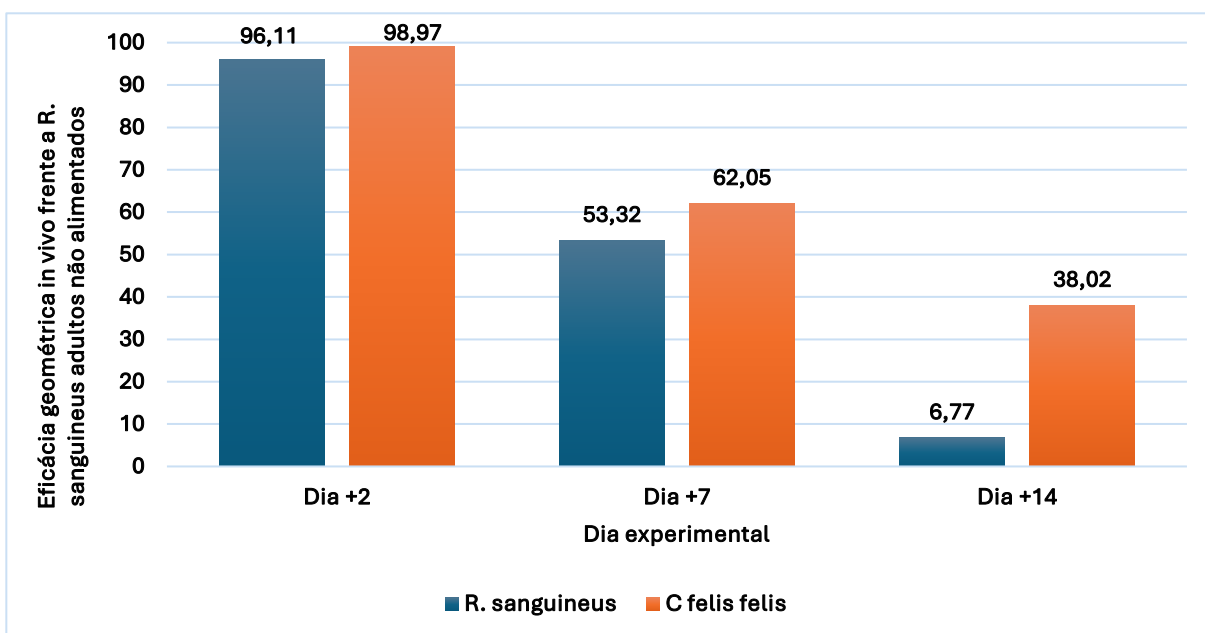


Figura 20. Gráfico demonstrando os valores eficácias geométricas da formulação em spray contendo EUG + CAR, frente a *R. linnaei* e *C. felis felis* em cães da raça beagle artificialmente infestados.

Este estudo apresenta a primeira avaliação *in vivo* da eficácia acaricida e pulgicida de uma formulação tópica em spray contendo eugenol (EUG) e carvacrol (CAR) contra *R. linnaei* e *C. felis felis* em cães artificialmente infestados. A investigação foi embasada no sólido fundamento de atividade sinérgica entre esses compostos demonstrada *in vitro* (Miranda et al., 2025). Trabalhos anteriores já haviam confirmado a eficácia isolada e combinada de EUG e CAR contra diferentes estágios e espécies de ectoparasitos, incluindo larvas e ninfas de *Amblyomma sculptum* (VALE et al., 2021), larvas de *Rhipicephalus microplus* e *R. sanguineus* (ARAÚJO et al., 2016), e, mais recentemente, em ensaios *in vitro* diretos com *C. felis felis* e *R. linnaei* (DE JESUS et al., 2025). Esses achados constituíram a premissa científica para o desenvolvimento e teste da formulação tópica em spray contendo EUG e CAR.

A elevada eficácia adulticida observada às 48 horas pós-tratamento foi de 96,11% contra *R. linnaei* e 98,97% contra *C. felis felis*. Para carrapatos, a eficácia de 98% em 48 horas foi reportada por Bonneau et al. (2015) para a combinação fipronil-permetrina em *spot-on* contra *Ixodes ricinus* é virtualmente idêntica à alcançada contra *R. linnaei* pelo spray do estudo. Da mesma forma, contra pulgas, a eficácia de 100% em 48h conferida por coleiras contendo Imidacloprida e flumetrina em gatos, espelha o resultado de 98,97% obtido com o spray em cães.

A elevada eficácia demonstrada pelo spray de EUG e CAR é clinicamente crucial, pois está alinhada ao tempo necessário para a transmissão de patógenos por ectoparasitos. Carrapatos do gênero *Rhipicephalus*, por exemplo, podem transmitir agentes como *Babesia canis vogeli* ao cão em menos de 48 horas. Da mesma forma, o ciclo reprodutivo acelerado das pulgas demanda um efeito inseticida rápido de formulações capaz de interromper a postura de ovos viáveis, que pode ocorrer num período de 24 a 36 horas após o repasto sanguíneo (Heile et al., 2007; Katavolos et al., 1998; Dryden, 1989). Este perfil de ação imediata torna a formulação desenvolvida uma alternativa estratégica tanto para o tratamento curativo de infestações estabelecidas quanto para a quebra rápida do ciclo parasitário, objetivos fundamentais no manejo integrado desses ectoparasitos.

O perfil de eficácia residual do spray CAR+EUG 10% revelou decaimento ao longo de 14 dias, com redução mais acentuada para *R. linnaei* (6,77% no D+14) em comparação a *C. felis felis* (38,02% no mesmo período). Essa diferença pode ser atribuída a características biológicas e comportamentais distintas entre as duas espécies, pertencentes a classes taxonômicas diferentes (Arachnida e Insecta).

No caso do carrapato *R. linnaei* (ixodídeo), a menor eficácia residual provavelmente está relacionada à maior resistência de seu tegumento quitinoso, que atua como barreira à penetração e retenção dos bioativos, especialmente na fase adulta. Já para a pulga *C. felis felis* (inseto), a eficácia residual relativamente maior pode ser explicada por seu comportamento de hematofagia mais frequente e pela maior exposição ao pelame tratado durante seus deslocamentos, aumentando a probabilidade de contato com os compostos residuais.

Essas diferenças, inerentes às classes Arachnida e Insecta, refletem as variações de sensibilidade e suscetibilidade a tratamentos tópicos observadas na prática de controle (Miranda et al., 2024; Coles e Dryden, 2014; Dryden e Payne, 2004).

Além dos prováveis mecanismos neurotóxicos complementares que explicam a ação rápida, a sinergia observada pode ser potencializada por um efeito físico-químico do CAR sobre a integridade do tegumento dos artrópodes. Estudos morfohistoquímicos demonstram que o carvacrol, em concentrações elevadas, induz desorganização da cutícula e das camadas epiteliais do integumento de fêmeas de *R. sanguineus*, promovendo desidratação e alterações

celulares que culminam em morte do parasito (Lima-de-Souza *et al.*, 2022; De Oliveira *et al.*, 2020)

4.5 Segurança

A formulação demonstrou um perfil de segurança adequado para a espécie canina na faixa etária estudada. Notavelmente, nenhum evento adverso local ou sistêmico foi registrado em qualquer um dos animais tratados. Durante todo o período de observação, não foram detectados quaisquer sinais de toxicidade, irritação cutânea ou das mucosas, manifestações de irritação das vias aéreas superiores, nem alterações sistêmicas ou neurológicas. As avaliações comportamentais e os exames clínicos foram realizados utilizando um formulário padronizado de monitoramento clínico, que incluiu a aferição da temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória, tempo de preenchimento capilar, além da avaliação sistemática dos sistemas nervoso, cardiovascular, linfático, respiratório, gastrointestinal, musculoesquelético, tegumentar e mucosas. Durante todo o período experimental, nenhum animal do grupo tratado apresentou anormalidades clínicas, corroborando a segurança e a excelente tolerabilidade do produto nas condições do estudo.

A análise comparativa das variações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, detalhadas nas Tabelas 7 e 8, não revelou diferenças estatisticamente significativas entre o GC e o GT. Todos os valores obtidos para os parâmetros avaliados permaneceram dentro dos intervalos de referência para a espécie canina estabelecidos pela literatura, confirmando a ausência de alterações clinicamente relevantes induzidas pelo tratamento (Kaneko *et al.*, 2008).

Tabela 7. Valores dos parâmetros hematológicos de cães Beagle dos grupos controle e tratado, antes e após a aplicação do produto.

Parâmetro	Grupos	Pré-tratamento (Média ± DP)	Pós-tratamento (Média ± DP)	Variação Δ (Média ± DP)	Valor-p
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	Controle	6.01 ± 0.76	6.19 ± 0.71	0.18 ± 0.48	0.587
	Tratado	6.29 ± 0.51	6.62 ± 0.49	0.33 ± 0.31	
Hemoglobina (g/dL)	Controle	13.7 ± 1.4	14.1 ± 1.3	0.4 ± 0.8	0.842
	Tratado	14.1 ± 1.1	14.7 ± 1.4	0.6 ± 0.7	
Hematócrito (%)	Controle	41.6 ± 4.0	43.1 ± 3.8	1.5 ± 2.5	0.721
	Tratado	42.9 ± 3.1	45.1 ± 3.6	2.2 ± 2.1	
Leucócitos (x10 ³ /μL)	Controle	11.2 ± 3.4	12.1 ± 3.6	0.9 ± 2.1	0.463
	Tratado	12.4 ± 2.9	12.3 ± 2.8	-0.1 ± 2.5	
Plaquetas (x10 ³ /μL)	Controle	289 ± 93	276 ± 104	-13 ± 58	0.325
	Tratado	327 ± 87	342 ± 143	15 ± 99	

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nas variações médias (Δ) dos parâmetros hematológicos entre os grupos Tratado e Controle (teste t para amostras independentes, p > 0,05 para todos os parâmetros).

Tabela 8. Valores dos parâmetros bioquímicos de cães Beagle dos grupos controle e tratado, antes e após a aplicação do produto

Parâmetro	Grupo	Pré-tratamento (Média ± DP)	Pós-tratamento (Média ± DP)	Δ (Média ± DP)	Valor-p
ALT (U/L)	Controle	37.6 ± 12.8	36.1 ± 9.0	-1.5 ± 12.1	0.649
	Tratado	32.8 ± 11.6	28.4 ± 9.3	-4.4 ± 12.9	
AST (U/L)	Controle	30.5 ± 6.8	26.5 ± 4.8	-4.0 ± 6.8	0.397
	Tratado	31.3 ± 4.3	31.0 ± 7.2	-0.3 ± 8.7	
FA (U/L)	Controle	40.4 ± 14.8	44.8 ± 12.9	4.4 ± 17.5	0.799
	Tratado	54.1 ± 22.4	61.1 ± 22.5	7.0 ± 22.6	
GGT (U/L)	Controle	1.8 ± 0.8	0.9 ± 0.7	-0.9 ± 1.3	0.836
	Tratado	2.1 ± 1.0	1.4 ± 0.9	-0.8 ± 1.0	
Bilirrubina Total (mg/dL)	Controle	0.18 ± 0.07	0.12 ± 0.04	-0.06 ± 0.06	0.783
	Tratado	0.17 ± 0.05	0.12 ± 0.05	-0.05 ± 0.07	
Bilirrubina Direta (mg/dL)	Controle	0.11 ± 0.03	0.06 ± 0.01	-0.05 ± 0.02	0.465
	Tratado	0.12 ± 0.02	0.06 ± 0.01	-0.06 ± 0.03	
Ureia (mg/dL)	Controle	23.8 ± 5.2	28.8 ± 5.7	5.0 ± 6.8	0.722
	Tratado	25.8 ± 6.8	29.4 ± 6.6	3.6 ± 7.7	
Creatinina (mg/dL)	Controle	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.328
	Tratado	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.1 ± 0.2	
Fósforo (mg/dL)	Controle	5.1 ± 1.1	6.4 ± 1.1	1.3 ± 1.5	0.502
	Tratado	4.8 ± 1.3	5.5 ± 1.1	0.7 ± 1.4	
PT (g/dL)	Controle	8.1 ± 1.3	7.9 ± 1.7	-0.2 ± 1.3	0.352
	Tratado	7.8 ± 0.8	7.2 ± 0.9	-0.7 ± 0.8	

Para nenhum dos parâmetros bioquímicos avaliados, a mudança média (Δ) observada no grupo Tratado foi estatisticamente diferente da mudança observada no grupo Controle (teste t para amostras independentes, todos os valores-p > 0,05).

A avaliação de segurança da formulação foi realizada por meio de monitoramento clínico e de análises laboratoriais sequenciais. Durante todo o período experimental, nenhum sinal de toxicidade aguda ou reação adversa local foi observado nos animais do grupo tratado.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos, analisados nos dias D+2, D+7 e D+14, mantiveram-se consistentemente dentro dos intervalos de referência estabelecidos para a espécie canina, não apresentando alterações clinicamente significativas quando comparados aos valores basais e ao grupo controle (Choi *et al.*, 2011; Kaneko *et al.*, 2008). A estabilidade destes marcadores essenciais, incluindo hemograma completo, enzimas hepáticas, função renal e perfil proteico, corrobora a ausência de efeitos sistêmicos adversos atribuíveis à formulação sob as condições do estudo, comprovando que a formulação é considerada segura para cães.

EUG e CAR são consideradas moléculas seguras pela FDA (Food and Drug Administration). A determinação da concentração segura e efetiva para a formulação tópica considerou o limiar entre atividade biocida e potencial irritante, bem documentado na literatura para ambos os compostos. Estudos pré-clínicos indicam que carvacrol, mesmo em concentrações elevadas, 6–12%, promove reparo tecidual em modelos de ferida, embora possa induzir edema e resposta inflamatória transitória nos primeiros dias de aplicação (Gunal *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2018).

Dados toxicológicos recentes para derivados do carvacrol fornecem parâmetros fundamentais para o cálculo de margens de segurança em modelos animais (Mendonça *et al.*, 2024). De modo análogo, o perfil de segurança do eugenol é descrito na literatura principalmente para humanos, onde ele apresenta irritação local e potencial de sensibilização dose-dependente, com concentrações acima de 5 a 10% em formulações tópicas associadas a efeitos citotóxicos e irritativos (Nejad *et al.*, 2017). Nesse contexto, um dos principais achados do presente estudo reside na geração de dados inéditos sobre a segurança tópica desses compostos em cães, uma vez que informações específicas para essa espécie eram, até então, escassas ou inexistentes na literatura.

Diante desse balanço farmacológico-toxicológico e da lacuna de dados para a espécie-alvo, a concentração de 10% para cada bioativo na presente formulação foi estabelecida como um ponto de partida estratégico. Esta concentração buscou maximizar a eficácia sinérgica *in vivo*, evidenciada pelos resultados de eficácia, enquanto se posicionava em uma faixa que, extrapolando de dados de outras espécies, poderia mitigar riscos de reações adversas locais. A ausência completa de toxicidade clínica e sistêmica observada neste bioensaio constitui, portanto, a primeira evidência robusta *in vivo* da segurança dessa concentração específica da associação CAR+EUG para a espécie canina, preenchendo uma lacuna crítica no conhecimento e validando o perfil tolerável do produto.

5 CONCLUSÃO

Este estudo pioneiro demonstrou a alta eficácia *in vivo* de uma formulação sob a forma de spray à base de carvacrol e eugenol para o controle simultâneo de *Rhipicephalus linnaei* e *Ctenocephalides felis felis* em cães. A formulação apresentou eficácia superior a 95% contra ambos os ectoparasitos em 48 horas e manteve-se ativa, com 38,02% de eficácia contra *C. felis felis* aos 14 dias pós-tratamento, um resultado que, embora decrescente, evidencia a persistência da ação do produto. A segurança da formulação foi confirmada pela ausência de reações adversas nos animais. Os resultados posicionam a formulação como uma alternativa viável e inovadora no mercado de produtos naturais, com eficácia comprovada e ação residual, corroborando o potencial da associação dos compostos para o desenvolvimento de novas estratégias de controle sustentável de ectoparasitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. R., DELALIBERA JR, I., PEREIRA, N. R. C., & CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) exposed to ozonated water: A control strategy. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 35, n. 1, p. 88-96, 2021.x
- AHMED, I.; KASRAIAN, K. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, n. 6, p. 871-882, 2002.
- AKHILA, A. Metabolic engineering of biosynthetic pathways leading to isoprenoids: Mono- and sesquiterpenes in plastids and cytosol. , v. 2, n. 4, p. 195-204, 2007.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 1, p. 7-20, 2009.
- ANDERSON, J A.; COATS, J R. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 2, p. 124-128, 2012.
- ANDRIOTTI, P. A.; SOUZA, C. P.; OLIVEIRA, P. C.; MELO, R. C.; VEROCAI, G. G.; FERNANDES, J. I. Effectiveness of sarolaner in the clinical management of furuncular myiasis in dogs naturally infested with *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Parasites & vectors**, v. 14, p. 1-4, 2021.
- ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L.; ZERINGOTA, V.; MATURANO, R.; MELO, D.; DA SILVA, B. C.; DAEMON, E.; 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.
- ATKINSON, Ross G. Phenylpropenes: occurrence, distribution, and biosynthesis in fruit. , v. 66, n. 10, p. 2259-2272, 2016.
- BAKER, B. P.; GRANT, J. A.; JENNIFER, A. Eugenol Profile Active Ingredient Eligible for Minimum Risk Pesticide Use. **New York State Integrated Pest Management Program**, 2018.
- BAKER, C. F.; HUNTER III, J. S.; MCCALL, J. W.; YOUNG, D. R.; HAIR, J. A.; EVERETT, W. R.; YOON, S. S.; IRWIN, J. P.; YOUNG, S. L.; CRAMER, L. G.; POLLMEIER, M. G.; PRULLAGE, J. B. Efficacy of a novel topical combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene for treatment and control of induced infestations with four North American tick species (*Dermacentor variabilis*, *Ixodes scapularis*, *Amblyomma americanum* and *Amblyomma maculatum*) on dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 4, p. 324-329, 2011.
- BANDARANAYAKA, K. O.; DISSANAYAKE, U. I.; RAJAKARUNA, R. S. Diversity and geographic distribution of dog tick species in Sri Lanka and the life cycle of brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* under laboratory conditions. **Acta Parasitologica**, v. 67, n. 4, p. 1708-1718, 2022.
- BAYNES, R. E.; Ectoparasitocides. In: Riviere, J. E.; PAPICH, M. G. **Veterinary Pharmacology & Therapeutics**: Ninth Edition. John Wiley & Sons, p. 1181-1184, 2018

- BAYNES, R.; RIVIERE, J.; FRANZ, T.; MONTEIRO-RIVIERE, N.; LEHMAN, P.; PEYROU, M.; TOUTAIN, P. L. Challenges obtaining a biowaiver for topical veterinary dosage forms. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 35, p. 103-114, 2012.
- BECSKEI, C.; REINEMEYER, C.; KING, V. L.; LIN, D.; MYERS, M. R.; VATTA, A. F. Efficacy of a new spot-on formulation of selamectin plus sarolaner in the treatment of *Otodectes cynotis* in cats. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. S27-S30, 2017.
- BENELLI, G.; PAVELA, R.; CANALE, A.; MEHLHORN, H. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases?. **Parasitology research**, v. 115, p. 2545-2560, 2016.
- BEUGNET, F.; FRANC, M. Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 7, p. 267-279, 2012.
- BEYNEN, Anton C. The basis for standardization of animal experimentation. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 18, n. 3, 1991.
- BIANCHINI, A. E.; GARLET, Q. I.; DA CUNHA, J. A.; BANDEIRA, G.; BRUSQUE, I. C. M.; SALBEGO, J.; SALBEGO, J.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 12, p. e6346, 2017.
- BLAND, D. M.; HINNEBUSCH, B. J. Feeding behavior modulates biofilm-mediated transmission of *Yersinia pestis* by the cat flea, *Ctenocephalides felis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004413, 2016.
- BLAGBURN, B. L.; YOUNG, D. R.; MORAN, C.; MEYER, J. A.; LEIGH-HEFFRON, A.; PAARLBERG, T.; ZIMMERMANN, A. G.; MOWREY, D.; WISEMAN, S.; SNYDER, D. E. Effects of orally administered spinosad (Comfortis®) in dogs on adult and immature stages of the cat flea (*Ctenocephalides felis*). **Veterinary parasitology**, v. 168, n. 3-4, p. 312-317, 2010.
- BONNEAU, S.; GUPTA, S.; CADIERGUES, M. Comparative efficacy of two fipronil spot-on formulations against experimental tick infestations (*Ixodes ricinus*) in dogs. **Parasitology Research**, v. 107, n. 3, p. 735-739, 2010.
- BRIANTI, E.; GAGLIO, G.; NAPOLI, E.; FALSONE, L.; PRUDENTE, C.; SOLARI BASANO, F.; LATROFA, M. S.; TARALLO, V. D.; DANTAS-TORRES, F.; CAPELLI, G.; STANNECK, D.; GIANETTO, S.; OTRANTO, D. (2014). Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniosis. **Parasites & vectors**, 7, 1-10.
- BROUQUI, P.; RAOULT, D. Arthropod-borne diseases in homeless. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 223-235, 2006.
- BRUET, V.; BOURDEAU, P. J.; ROUSSEL, A.; IMPARATO, L.; DESFONTIS, J. C. Characterization of pruritus in canine atopic dermatitis, flea bite hypersensitivity and flea infestation and its role in diagnosis. **Veterinary dermatology**, v. 23, n. 6, p. 487-e93, 2012.
- C CAMPBELL, William. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 853-865, 2012.
- CARDOSO, A.; SANTOS, E. G. G.; DA SILVA LIMA, A.; TEMEYER, K. B.; DE LEON, A. A. P.; JUNIOR, L. M. C.; DOS SANTOS SOARES, A. M. Terpenes on *Rhipicephalus*

- (*Boophilus*) microplus: Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. **Veterinary parasitology**, v. 280, p. 109090, 2020.
- CHOI, S. Y.; HWANG, J. S.; KIM, I. H.; HWANG, D. Y.; KANG, H. G. Basic data on the hematology, serum biochemistry, urology, and organ weights of beagle dogs. **Laboratory animal research**, v. 27, n. 4, p. 283-291, 2011.
- CHOI, J.; KIM, H.; NA, J.; KIM, S. H.; PARK, C. Cutaneous myiasis associated with tick infestations in a dog. **Journal of veterinary clinics**, v. 32, n. 5, p. 473-475, 2015.
- CID, Y. P.; FERREIRA, T. P.; MAGALHÃES, V. S.; CORREIA, T. R.; SCOTT, F. B. Injectable fipronil for cattle: Plasma disposition and efficacy against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary parasitology**, v. 220, p. 4-8, 2016.
- COHEN, Ephraim. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. **Pest management science**, v. 57, n. 10, p. 946-950, 2001.
- COLES, T. B.; DRYDEN, M. W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 1-10, 2014.
- CONCEICAO, C. L.; DE MORAIS, L. A.; CAMPOS, D. R.; CHAVES, J. K. D. O.; DOS SANTOS, G. C.; CID, Y. P.; DE SOUZA, M. A. A.; SCOTT, F. B.; CHAVES, D. S. A.; COUMENDOUROS, K. Evaluation of insecticidal activity of thyme, oregano, and cassia volatile oils on cat flea. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, p. 774-779, 2020.
- COSTA, M. F.; DURÇO, A. O.; RABELO, T. K.; BARRETO, R. D. S. S.; GUIMARÃES, A. G. Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: A systematic review. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 141-155, 2019.
- CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A. R.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C. L.; LEMOS, E. R. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 105-108, 2009.
- CURTIS, C. F. Ectoparasite infestation—clinical presentation. In: **BSAVA Manual of Canine and Feline Dermatology**. **BSAVA Library**, 2021. p. 55-69.
- RIBEIRO C., T.; PIMENTEL DE SOUZA, C.; ISRAEL FERNANDES, J.; VILHENA F. M.; I., DIAS SANTOS, H.; BARBOUR S., F. Ciclo biológico de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835)(Siphonaptera, Pulicidae) a partir de diferentes dietas artificiais. **R. bras. Zoo.**, 2003.
- COSTA, Lucio G. Neurotoxicity of amitraz, a formamidine pesticide. In: **Advances in Neurotoxicology**. **Academic Press**, 2020. p. 255-276.
- DANTAS-TORRES, Filipe *et al.* Efficacy of an imidacloprid/flumethrin collar against fleas, ticks and tick-borne pathogens in dogs. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 245, 2013^a.
- DANTAS-TORRES, F., LATROFA, M. S., ANNOSCIA, G., GIANNELLI, A., PARISI, A., & OTRANTO, D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 213, 2013.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & vectors**, v. 3, p. 1-11, 2010.
- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A. Canine babesiosis: a Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 197-203, 2006.^a

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 64-67, 2006.^b

DE JESUS, I.; MIRANDA, F. R.; FERREIRA, T. P.; DO NASCIMENTO, A. O.; DE LIMA, K. K. S.; DE AVELAR, B. R.; CAMPOS, D. R.; CID, Y.P Bioactive-based spray and spot-on formulations: Development, characterization and in vitro efficacy against fleas and ticks. **Experimental Parasitology**, v. 269, p. 108881, 2025.

DE MELO, T. B.; SILVA, T. R. M.; DE ALMEIDA, T. L. A. C.; TUTIJA, J. F.; DA SILVA, A. O.; DA SILVA LIRA, M.; AMORIM, D.; GIANELLI, A.; RAMOS, C. A. N.; ALVES, L. C.; DE CARVALHO, G. A.; RAMOS, R. A. N. Molecular detection of vector-borne pathogens in cats tested for FIV and FeLV. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 40, p. 100857, 2023.

DE OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; SAITO, K. C.; NUNES, E. T.; SZABÓ, M. P. J.; MATHIAS, M. I. C. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 139-147, 2005.

DE OLIVEIRA, P. R.; CALLIGARIS, I. B.; ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; PIZANO, M. A.; MATHIAS, M. I. C. 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.

DE OLIVEIRA, M. V. S.; KONIG, I. F. M.; REIS, A. C.; SILVA, L.; PECONICK, A. P.; THOMASI, S. S.; LIMA-DE-SOUZA, J. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; REMEDIO, R. N. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol affect reproduction and integument morphology in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 82, n. 2, p. 265-279, 2020.

DEKEBO, A.; JUNIEDI, S.; HU, X.; JUNG, C. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of some Commiphora species resins. In: **Gums, Resins and Latexes of Plant Origin: Chemistry, Biological Activities and uses**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 1-27.

DEL PINO, J.; MOYANO-CIRES, P. V.; ANADON, M. J.; DÍAZ, M. J.; LOBO, M.; CAPO, M. A.; FREJO, M. T. Molecular mechanisms of amitraz mammalian toxicity: a comprehensive review of existing data. **Chemical research in toxicology**, v. 28, n. 6, p. 1073-1094, 2015.

DORATO, Michael A.; ENGELHARDT, Jeffery A. The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: use, issues, and definition (s). **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 42, n. 3, p. 265-274, 2005.

DOS SANTOS, G. C. M.; SCOTT, F. B.; CAMPOS, D. R.; MAGALHAES, V. D. S.; BORGES, D. A.; MIRANDA, F. R.; ALVES, M. C. C.; PEREIRA, G. A.; MOREIRA, L. O.; LIMA, E. A. S.; ROCHA, M. B. S.; CID, Y. P. Oral pharmacokinetic profile of fipronil and efficacy against flea and tick in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 45, n. 1, p. 23-33, 2022.

DRYDEN, M. W. Biology of fleas of dogs and cats. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet**, v. 15, n. 4, p. 569-579, 1993.

DRYDEN, M. W. Host association, on-host longevity and egg production of *Ctenocephalides felis felis*. **Veterinary Parasitology**, v. 34, n. 1-2, p. 117-122, 1989.

DRYDEN, M. W. Flea and tick control in the 21st century: challenges and opportunities. **Veterinary dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 435-440, 2009.

DRYDEN, M. W.; GAAFAR, S. M. Blood consumption by the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 28, n. 3, p. 394-400, 1991.

DRYDEN, M. W.; PAYNE, P. A. Biology and control of ticks infesting dogs and cats in North America. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*, v. 5, n. 2, p. 139-154, 2004.

DRYDEN, M. W., CANFIELD, M. S., KALOSY, K., SMITH, A., CREVOISERAT, L., MCGRADY, J. C.; FOLEY, K. M.; GREEN, K.; TEBALDI, C.; SMITH, V.; BENNETT, T.; HEANEY, K.; MATH, L.; ROYAL, C.; SUN, F. Evaluation of fluralaner and afoxolaner treatments to control flea populations, reduce pruritus and minimize dermatologic lesions in naturally infested dogs in private residences in west central Florida USA. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 1-11, 2016.^a

DRYDEN, M. W.; SMITH, V.; DAVIS, W. L.; SETTJE, T.; HOSTETLER, J. Evaluation and comparison of a flumethrin-imidacloprid collar and repeated monthly treatments of fipronil/(s)-methoprene to control flea, *Ctenocephalides f. felis*, infestations on cats for eight months. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 1-6, 2016.^b

DRYDEN, M. W.; SMITH, V.; BENNETT, T.; MATH, L.; KALLMAN, J.; HEANEY, K.; SUN, F. Efficacy of fluralaner flavored chews (Bravecto®) administered to dogs against the adult cat flea, *Ctenocephalides felis felis* and egg production. **Parasites & vectors**, v. 8, p. 1-7, 2015.

DU RAND, C.; Factors influencing the life cycle of *ctenocephalides* spp. 2001.

DUMONT, P.; LIEBENBERG, J.; BEUGNET, F.; FANKHAUSER, B. Repellency and acaricidal efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against *Ixodes ricinus* and *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 531, 2015.

ENSLEY, S. M. Pyrethrins and pyrethroids. In: **Veterinary toxicology**. Academic Press, 2018. p. 515-520.

ETRI, K.; PLUHÁR, Z.; Exploring chemical variability in the essential oils of the *Thymus* Genus. **Plants**, v. 13, n. 10, p. 1375, 2024.

FANTATTO, R. R.; CONSTANTINI, J. V. C.; POLITI, F. A. S.; SORRECHIA, R.; MEDEIROS, C. C. B.; LUIZ, M. T.; BECHARA, G. H.; CHAGAS, A. C. S.; CHORILLI, M.; PIETRO, R. C. L. R. Current Tick Control Strategies and Prospects for Using Nanotechnology as an Efficient Alternative—A Review. **Veterinary Sciences**, v. 12, n. 2, p. 163, 2025.

FAWZI, E.; YOUSSEF, S.; RAS, R.; ATTIA, N.; EL-SHAZLY, Y.; EL DAMATY, H. The Anti-Ectoparasite Effects Of Different Topical Spots-On Formulation Against Ticks And Fleas In Naturally Infested Stray And Owned Dogs. **Slovenian Veterinary Research**, v. 58, n. 24-Suppl, p. 187-96, 2021.

FERREIRA, T. P.; BAUERFELDT, G. F.; CASTRO, R. N.; MAGALHÃES, V. S.; ALVES, M. C.; SCOTT, F. B.; CID, Y. P. Determination of fipronil and fipronil-sulfone in surface waters of the Guandu River Basin by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 1-9, 2022.

FESTING, M. F.W.; ALTMAN, D. G. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. **ILAR journal**, v. 43, n. 4, p. 244-258, 2002.

- FISHER, M. A.; HUTCHINSON, M. J.; JACOBS, D. E.; DICK, I. G. C. Comparative efficacy of fenthion, dichlorvos/fenitrothion and permethrin against the flea, *Ctenocephalides felis*, on the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n. 5, p. 244-246, 1994.
- FLÓRIO, J. C.; SOUSA, A. B.; GÓRNIK, S. L. Farmacocinética. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Tradução. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- FOURIE, L. J.; STANNECK, D.; HORAK, I. G. The efficacy of collars impregnated with flumethrin and propoxur against experimental infestations of adult *Rhipicephalus sanguineus* on dogs. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 74, n. 4, p. 123-126, 2003.
- FRANC, M.; BOUHSIRA, É.; BEUGNET, F. Direct transmission of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) between cats exhibiting social behaviour. **Parasite**, v. 20, p. 49, 2013.
- FRANC, M.; CADIERGUES, M-C. Comparative activity in dogs of deltamethrin-and diazinon-impregnated collars against *Ctenocephalides felis*. **American journal of veterinary research**, v. 59, n. 1, p. 59-60, 1998.
- FRANC, M.; GENCHI, C.; BOUHSIRA, E.; WARIN, S.; KALTSATOS, V.; BADUEL, L.; GENCHI, M. Efficacy of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination spot-on against *Aedes aegypti* mosquitoes on dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2-4, p. 333-337, 2012.
- GAMAL, A.; ABOELHADID, S. M.; ABO EL-ELA, F. I.; ABDEL-BAKI, A. A. S.; IBRAHIM, S. M.; EL-MALLAH, A. M.; AL-QURAISHY, S.; HASSAN, A. O.; GADELHAQ, S. M. Synthesis of carvacrol-loaded invasomes nanoparticles improved acaricide efficacy, cuticle invasion and inhibition of acetylcholinesterase against hard ticks. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 733, 2023.
- GEORGE, John E. Present and future technologies for tick control. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, n. 1, p. 583-588, 2000.
- GHORANI, V.; ALAVINEZHAD, A.; RAJABI, O.; MOHAMMADPOUR, A. H.; BOSKABADY, M. H. Safety and tolerability of carvacrol in healthy subjects: a phase I clinical study. **Drug and chemical toxicology**, v. 44, n. 2, p. 177-189, 2021.
- GONÇALVES, I. L.; DAS NEVES, G. M.; KAGAMI, L. P.; EIFLER-LIMA, V. L.; MERLO, A. A. Discovery, development, chemical diversity and design of isoxazoline-based insecticides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 30, p. 115934, 2021.
- GOPINATH, D.; MEYER, L.; SMITH, J.; ARMSTRONG, R. Topical or oral fluralaner efficacy against flea (*Ctenocephalides felis*) transmission of *Dipylidium caninum* infection to dogs. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 1-5, 2018.
- GOULET, F.; HÉLIE, P.; VACHON, P. Eugenol anesthesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) of different body weights. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 460-463, 2010.
- GRAY, J.; DANTAS-TORRES, F.; ESTRADA-PÉÑA, A.; LEVIN, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 3, p. 171-180, 2013.
- GÜNAL, M. Y.; OKÇU HEPER, A.; ZALOĞLU, N. The effects of topical carvacrol application on wound healing process in male rats. 2014.
- GUPTA, R. C.; DOSS, R. B.; SRIVASTAVA, A.; LALL, R.; SINHA, A. Nutraceuticals for control of ticks, fleas, and other ectoparasites. In: **Nutraceuticals in veterinary medicine**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 625-633.

GUPTA, R. C.; MALIK, J K.; MILATOVIC, D. Organophosphate and carbamate pesticides. In: Reproductive and developmental toxicology. **Academic Press**, 2011. p. 471-486.

GWALTNEY-BRANT, Sharon M.; DECLEMENTI, Camille; GUPTA, Ramesh C. Macrocyclic lactone endectocides. In: **Veterinary Toxicology**. Academic Press, 2018. p. 539-550.

HASTRITER, M. W.; WHITING, M. F. (2009). Siphonaptera:(fleas). In **Encyclopedia of insects** (pp. 924-928). Academic Press.

HALOS, L.; BANETH, G.; BEUGNET, F.; BOWMAN, A. S.; CHOMEL, B.; FARKAS, R.; FRANK, M.; GUILLOT, J.; INOKUMA, H.; KAUFMAN, R.; JONGEJAN, F.; JOACHIM, A.; ORTRANTO, D.; PFISTER, K.; POLLMEIER, M.; SAINZ, A.; WALL, R. Defining the concept of 'tick repellency' in veterinary medicine. **Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 419-423, 2012.

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**, v. 9, p. 1-6, 2016.

HARDEE, G. E.; BAGGO, J. Desmond. Development and formulation of veterinary dosage forms. **CRC Press**, 2021.

HASSID, A.; SALLA, M.; KRAYEM, M.; KHALED, S.; HASSAN, H. F.; EL KHATIB, S. A review on the versatile applications of plant-based essential oils in food flavoring, culinary uses and health benefits. **Discover Food**, v. 5, n. 1, p. 130, 2025.

HEILE, C.; HOFFMANN-KOEHLER, P.; WIEMANN, A.; SCHEIN, E. Transmission time of tick-borne disease agents in dogs: *Borrelia*, *Anaplasma*/*Ehrlichia* and *Babesia*. **Praktische Tierarzt-Hannover-**, v. 1, n. 8, p. 584-592,

2007HITMI, A.; COUDRET, A.; BARTHOMEUF, C. The production of pyrethrins by plant cell and tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* species. **Critical reviews in plant sciences**, v. 19, n. 1, p. 69-89, 2000.

HOPPER, K.; ALDRICH, J.; HASKINS, S. C. Ivermectin toxicity in 17 collies. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 1, p. 89-94, 2002.

HORAK, I. G.; FOURIE, J. J.; STANNECK, D. Efficacy of slow-release collar formulations of imidacloprid/flumethrin and deltamethrin and of spot-on formulations of fipronil/(s)-methoprene, dinotefuran/pyriproxyfen/permethrin and (s)-methoprene/amitraz/fipronil against *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* on dogs. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 79, 2012.

HOVDA, Lynn R.; HOOSER, Stephen B. Toxicology of newer pesticides for use in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 455-467, 2002.

HSU, M. H.; HSU, Y. C.; WU, W. J. Consumption of flea faeces and eggs by larvae of the cat flea, *Ctenocephalides felis*. **Medical and veterinary Entomology**, v. 16, n. 4, p. 445-447, 2002.

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

JONSSON, N. N.; KLAFKE, G.; CORLEY, S. W.; TIDWELL, J.; BERRY, C. M.; KOH-TAN, H. H. Molecular biology of amitraz resistance in cattle ticks of the genus *Rhipicephalus*. **Frontiers in bioscience: Landmark**, v. 23, n. 2, p. 796-810, 2018.

- JUNQUERA, P.; HOSKING, B.; GAMEIRO, M.; MACDONALD, A. Benzoylphenyl ureas as veterinary antiparasitics. An overview and outlook with emphasis on efficacy, usage and resistance. **Parasite**, v. 26, p. 26, 2019.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic press, 2008.
- KATAVOLOS, P.; ARMSTRONG, P. M.; DAWSON, J. E.; TELFORD III, S. R. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. **The journal of infectious diseases**, v. 177, n. 5, p. 1422-1425, 1998.
- KHOOBDEL, M.; RANJBAR, R.; SENDI, J. J.; SHAYEGAN, D. Effective and Safe Control of Plague-Carrying Fleas Using Insect Growth Regulators: A Review Study. **Journal of Military Medicine**, v. 23, n. 6, p. 529-540, 2021.
- KITA, T.; HAYASHI, T.; OHTANI, T.; TAKAO, H.; TAKASU, H.; LIU, G.; OHTA, H.; OZOE, F.; OZOE, Y. Amitraz and its metabolite differentially activate α - and β -adrenergic-like octopamine receptors. **Pest management science**, v. 73, n. 5, p. 984-990, 2017.
- KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; DALL AGNOL, B.; PRADEL, E.; SILVA, J.; DE LA CANAL, L. H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M. F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; ARAÚJO, S. U.; CORASSINI, V. B.; DOS SANTOS, J.; RECK, J.; MARTINS, J. R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2017.
- KLAINBART, S.; KELMER, E.; CHAI, O.; SEGEV, G.; AROCH, I. Prevalence, clinical manifestations, laboratory findings, treatment, and outcome of intermediate syndrome in anticholinesterase pesticide intoxication of dogs: A retrospective study. **The Veterinary Journal**, v. 287, p. 105883, 2022.
- KUMAR, S.; KUMAR, R.; PAL, A.; CHOPRA, D. S. Enzymes, Chapter 16. Postharvest **Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables** (Editor: Yahia, EM, Carrillo-Lopez, A.). p. 335-358, 2019.
- LABRUNA, M. B.; GERARDI, M.; KRAWCZAK, F. S.; MORAES-FILHO, J. Comparative biology of the tropical and temperate species of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) under different laboratory conditions. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 1, p. 146-156, 2017.
- LAMBERT, M. M.; CAMPOS, D. R.; BORGES, D. A.; DE AVELAR, B. R.; FERREIRA, T. P.; CID, Y. P.; BOYLAN, F.; SCOTT, F. B.; CHAVES, D. S. A.; COUMENDOUROS, K. 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, p. 109126, 2020.
- LATROFA, M. S.; DANTAS-TORRES, F.; GIANNELLI, A.; OTRANTO, D. Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 6, p. 943-946, 2014.
- LAO, Y.; GUO, J.; FANG, J.; GENG, R.; LI, M.; QIN, Y.; WU, J.; KANG, S. G.; HUANG, K.; TONG, T. Beyond flavor: the versatile roles of eugenol in health and disease. **Food & Function**, v. 15, n. 21, p. 10567-10581, 2024.
- LAVY, E.; KIRMAYER, D.; NUDELMAN, Z.; ORENSHTEIN-VILENSKY, L.; ROWAN, T. G.; SHENDEROVICH-GEFTER, J.; FRIEDMAN, M. Aspects in controlled drug delivery for topical applications in veterinary medicine. **Veterinary and Animal Science**, v. 15, p. 100235, 2022.

- LEE, K. H.; LEE, D. W.; KANG, B. C. The 'R' principles in laboratory animal experiments. **Laboratory Animal Research**, v. 36, n. 1, p. 45, 2020.
- LI, A. S.; IJIMA, A.; HUANG, J.; LI, Q. X.; CHEN, Y. Putative mode of action of the monoterpenoids linalool, methyl eugenol, estragole, and citronellal on ligand-gated ion channels. **Engineering**, v. 6, n. 5, p. 541-545, 2020.
- LI, X.; CHEN, J.; HE, X.; WANG, Z.; WU, D.; ZHENG, X.; ZHENG, L.; WANG, B. Simultaneous determination of neonicotinoids and fipronil and its metabolites in environmental water from coastal bay using disk-based solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 234, p. 224-231, 2019.
- LIMA-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**, v. 85, n. 5, p. 1784-1790, 2022.
- LIMA, I. O.; PEREIRA, F. D. O.; OLIVEIRA, W. A. D.; LIMA, E. D. O.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A.; DINIZ, M. D. F. F. M. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. **Journal of essential oil research**, v. 25, n. 2, p. 138-142, 2013.
- LUO, Q. T.; FUJITA, T.; JIANG, C. Y.; KUMAMOTO, E. Carvacrol presynaptically enhances spontaneous excitatory transmission and produces outward current in adult rat spinal substantia gelatinosa neurons. **Brain research**, v. 1592, p. 44-54, 2014.
- MARCHESE, A.; BARBIERI, R.; COPPO, E.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M. NABAVI, S. F.; IZADI, M.; ABDOLLAHI, M.; NABAVI, S.M.; AJAMI, M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical reviews in microbiology**, v. 43, n. 6, p. 668-689, 2017.
- MARCHIONDO, A. A.; HOLDSWORTH, P. A.; FOURIE, L. J.; RUGG, D.; HELLMANN, K.; SNYDER, D. E.; DRYDEN, M. W. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP): guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestations on dogs and cats. **Vet parasitol**, v. 194, n. 1, p. 84-97, 2013.
- MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; WOLSTENHOLME, A. J. Mode of action of the macrocyclic lactones. In: **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**. Wallingford UK: CAB International, 2002. p. 125-140.
- MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R.; COSTA, F. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M.; PETERKA, C. R.; PACHERO, R. C.; DIAS, R. A.; NUNES, P. H.; MARCILI, A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A. K.; HORTA, M. C.; GUILLOUX, A. G.A.; BENATTI, H. R.; RAMIREZ, D. G.; BATTESI-BARROS, D. M.; LABRUNA, M. B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 186, 2016.
- MARTINEZ, M. N.; HUNTER, R. P. Current challenges facing the determination of product bioequivalence in veterinary medicine. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 33, n. 5, p. 418-433, 2010.
- MATHIAS, M. I.C.; FURQUIM, K. C. S.; NUNES, P. H. Immunomodulatory effects of tick saliva. **Invertebrate Survival Journal**, v. 8, n. 2, p. 231-240, 2011.

MEHLHORN, H. Arthropodicidal Drugs. In: MEHLHORN, H. (Ed.). **Encyclopedic Reference of Parasitology: Biology, Structure, Function**. 2. ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2002. p.79-86.

MENDONÇA, G. H. A.; REIS, A. C.; KONIG, I. F. M.; BRITO, G. P.; RODRIGUES, J. H. S.; DE OLIVEIRA GUIMARÃES, C. S.; MATI, V. L. T.; REMEDIO, R. N. Preclinical safety assessment in rats after dermal exposure to acetylcarvacrol, a potential acaricide against the brown dog tick. **Toxicology Reports**, v. 13, p. 101834, 2024.

MEROLA, V. M.; EUBIG, P. A. Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocylic lactones) and the role of P-glycoprotein in dogs and cats. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 42, n. 2, p. 313, 2012.

MERZENDORFER, H. Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. **Insect science**, v. 20, n. 2, p. 121-138, 2013.

MILLER, J. E.; BAKER, N. F.; COLBURN, E. L. Insecticidal activity of propoxur-and carbaryl-impregnated flea collars against *Ctenocephalides felis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 7, p. 923-925, 1977.

MIRANDA, F. R.; AVELAR, B. R.; DE JESUS, I. L. R.; GUIMARÃES, B. G.; BONFIM, I. V.; ALVES, M. C. C.; FERREIRA, T. P.; AZEVEDO, T. R. C.; CID, Y. P.; SCOTT, F. B. (2024). Do combinations of fipronil, eugenol and carvacrol have synergistic effects against *Rhipicephalus sanguineus*?. **Parasitology Research**, 123(1), 48.

MOORE, C. O.; ANDRÉ, M. R.; ŠLAPETA, J.; BREITSCHWERDT, E. B. Vector biology of the cat flea *Ctenocephalides felis*. **Trends in parasitology**, 2024.

MUHAMMAD, G.; RASHID, I.; FIRYAL, S. Practical aspects of treatment of organophosphate and carbamate insecticide poisoning in animals. **Matrix Sci. Pharma**, v. 1, n. 1, p. 10-11, 2017.

NAPOLI, E.; BRIANTI, E.; FALSONE, L.; GAGLIO, G.; FOIT, S.; ABRAMO, F.; ANNOSCIA, G.; DANTAS-TORRES, F.; GIANNETTO, S.; OTRANTO, D. Development of *Acanthocheilonema reconditum* (Spirurida, Onchocercidae) in the cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera, Pulicidae). **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1718-1725, 2014.

NAVA, S.; BEATI, L.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P.; PETNEY, T.; SARACHO-BOTTERO, M. N.; TARRAGONA, E. L.; DANTAS-TORRES, F.; SILVA, M. M. S.; MANGOLD, A. J. GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 6, p. 1573-1585, 2018.

NAVA, S.; ESTRADA-PEÑA, A.; PETNEY, T.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P.; VENZAL, J. M.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 2-8, 2015.

NEJAD, S.M.; ÖZGÜNEŞ, H.; BAŞARAN, N. Pharmacological and toxicological properties of eugenol. **Turkish journal of pharmaceutical sciences**, v. 14, n. 2, p. 201, 2017.

NIETO-CABRALES, J. F.; SALCEDA-SÁNCHEZ, B.; ZAZUETA-ISLAS, H. M.; SOLÍS-CORTÉS, M.; LANDA-FLORES, M. G.; DEL MAZO-LÓPEZ, J. C.; VALTIERRA-ALZAGA, L.; SOTO-GUTIÉRREZ, H.; HUERTA-JIMENEZ, H.; BECKER, I.; ROJAS-RODRÍGUEZ, J. J.; SÁNCHEZ-MONTES, S. New records of *Rhipicephalus linnaei* infected

by *Rickettsia massiliae* from Central Mexico. **Zoonoses and Public Health**, v. 71, n. 2, p. 217-224, 2024.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T.. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 7, n. 1, p. 28-35, 2012.

NOVATO, T. L. P.; MARCHESINI, P.; MUNIZ, N.; DE AZEVEDO PRATA, M. C.; FURLONG, J.; VILELA, F. M. P.; DAEMON, E.; MATURANO, R. MONTEIRO, C.; Evaluation of synergism and development of formulation with thymol, carvacrol and eugenol for *Rhipicephalus microplus* control. **Experimental parasitology**, v. 207, p. 107774, 2019.

NWANADE, C. F.; WANG, M.; WANG, T.; YU, Z.; LIU, J.. Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 81, p. 1-35, 2020.

OLIVEIRA, L. M.; DE ALMEIDA CHAVES, D. S.; DE JESUS, I. L. R.; MIRANDA, F. R.; FERREIRA, T. P.; SILVA, C. N.; ALVES, N. S.; ALVES, M. C. C.; AVELAR, B. R.; SCOTT, F. B.; CAMPOS, D. R.; CID, Y. P. *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, p. 109771, 2022.

ORR, N.; SHAFFNER, A. J.; RICHEY, K.; CROUSE, G. D. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, n. 1, p. 1-5, 2009.

PALIY, A. P.; SUMAKOVA, N. V.; BOHACH, O. M.; BOGACH, M. V.; PAVLICHENKO, O. V.; IHNATIEVA, T. M.; DUBIN, R. A. Assessing the efficacy of antiparasitic sprays. **Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety**, v.9, n. 3, p. 6-10, 2023.

PALIY, A. P.; SUMAKOVA, N. V.; RODIONOVA, K. O.; MASHKEY, A. M.; ALEKSEEVA, N. V.; LOSIEVA, Y. A.; ZAIARKO, A. I.; KOSTYUK, V. K.; DUDUS, T. V.; MOROZOV, B. S. HORTOVYI, O. O.; PALII, A. P. Efficacy of flea and tick collars against the ectoparasites of domestic animals. **Ukrainian Journal of Ecology**, v. 11, n. 2, p. 202-208, 2021.^a

PALIY, A. P.; ZHUKOVA, I. O.; PONOMARENKO, O. V.; PAVLICHENKO, O. V.; TODOROV, N. I.; BASKO, S. O.; SYTNIK, V. A.; KOVALENKO, L. V.; RODIONOVA, K. O.; PALII, A. P. The use of preparative forms of amitraz in ectoparasitic dermatoses of animals. **Ukrainian Journal of Ecology**, v. 11, n. 6, p. 127-133, 2021.^b

PANAGIOTAKOPULU, E.; BUCKLAND, P. C.; DAY, P. M.; DOUMAS, C. Natural insecticides and insect repellents in antiquity: a review of the evidence. **Journal of Archaeological Science**, v. 22, n. 5, p. 705-710, 1995.

PARTHASARATHY, R.; PALLI, S. R. Stage-specific action of juvenile hormone analogs. **Journal of pesticide science**, v. 46, n. 1, p. 16-22, 2021.

PENER, Meir Paul. Insect growth regulators. **Encyclopedia of Pest Management**, p. 398-401, 2002.

PFISTER, K.; ARMSTRONG, R. Systemically and cutaneously distributed ectoparasiticides: a review of the efficacy against ticks and fleas on dogs. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 436, 2016.

QUADROS, D. G.; JOHNSON, T. L.; WHITNEY, T. R.; OLIVER, J. D.; OLIVA CHÁVEZ, A. S. Plant-derived natural compounds for tick pest control in livestock and wildlife: Pragmatism or Utopia?. **Insects**, v. 11, n. 8, p. 490, 2020.

RAMTEKE, K. H.; JOSHI, S. A.; DIGHE, P. A.; KHARAT, A. R. Veterinary pharmaceutical dosage forms: A technical note. **Austin Therapeutics**, v. 1, n. 1, p. 10-2014, 2014.

ROMERO, A.; RAMOS, E.; ARES, I.; CASTELLANO, V.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; ANADÓN, A.; MARTÍNEZ, M. A. Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. **Toxicology letters**, v. 252, p. 42-49, 2016.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen and Co., Ltd., 1959. xiv, 238 p.

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.

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F.; SALAS-CORONADO, R.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B.; VILLANUEVA-CAÑONGO, C. Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. In: **Plant physiological aspects of phenolic compounds**. IntechOpen, 2019.

SHANG, X. F.; DAI, L. X.; YANG, C. J.; GUO, X.; LIU, Y. Q.; MIAO, X. L.; ZHANG, J. Y. A value-added application of eugenol as acaricidal agent: the mechanism of action and the safety evaluation. **Journal of Advanced Research**, v. 34, p. 149-158, 2021.

SAHIN, S.; EULENBURG, V.; HEINLEIN, A.; VILLMANN, C.; PISCHETSRIEDER, M. Identification of eugenol as the major determinant of GABAA-receptor activation by aqueous *Syzygium aromaticum* L.(clove buds) extract. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 641-649, 2017.

SHOOP, W. L.; MROZIK, H.; FISHER, M. H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary parasitology**, v. 59, n. 2, p. 139-156, 1995.

SHOWLER, A. T.; DONAHUE, W. A.; HARLIEN, J. L.; DONAHUE, M. W.; VINSON, B. E.; THOMAS, D. B. Efficacy of novaluron+ pyriproxyfen (Tekko Pro) insect growth regulators against *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae), *Rhipicephalus* (Boophilus) *annulatus*, *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*, and *Rhipicephalus sanguineus*. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 5, p. 1338-1345, 2019.

SIKAK, M.; BURROWS, M. Flea control in cats: new concepts and the current armoury. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 1, p. 31-40, 2013.

SINGH, S.; KUMAR, K. Comparative efficacy of phenoxy derivative JHAs Pyriproxyfen and Diofenolan against polyphagous pest *Spodoptera litura* (Fabricius)(Noctuidae: Lepidoptera). **Phytoparasitica**, v. 43, p. 553-563, 2015.

SIX, R. H.; CLEMENCE, R. G.; THOMAS, C. A.; BEHAN, S.; BOY, M. G.; WATSON, P.; BENCHAOUI, H. A.; CLEMENTS, P. J. M.; ROWAN, T. G.; JERNIGAN, A. D. Efficacy and safety of selamectin against *Sarcoptes scabiei* on dogs and *Otodectes cynotis* on dogs and cats presented as veterinary patients. **Veterinary Parasitology**, v. 91, n. 3-4, p. 291-309, 2000.

SIYAL, F. J.; MEMON, Z.; SIDDIQUI, R. A.; ASLAM, Z.; NISAR, U.; IMAD, R.; SHAH, M. R. Eugenol and liposome-based nanocarriers loaded with eugenol protect against anxiolytic disorder via down regulation of neurokinin-1 receptors in mice. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 33, 2020.

SJÖHOLM, E.; MATHIYALAGAN, R.; LINDFORS, L.; WANG, X.; OJALA, S.; SANDLER, N. Semi-solid extrusion 3D printing of tailored ChewTs for veterinary use-A focus on spectrophotometric quantification of gabapentin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 174, p. 106190, 2022.

ŠLAPETA, J.; HALLIDAY, B.; CHANDRA, S.; ALANAZI, A. D.; ABDEL-SHAFY, S. *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) recognised as the “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*: Neotype designation, redescription, and establishment of morphological and molecular reference. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 13, n. 6, p. 102024, 2022.

SNYDER, D. E.; RUMSCHLAG, A. J.; YOUNG, L. M.; RYAN, W. G. Speed of flea knockdown of spinosad compared to afoxolaner, and of spinosad through 28 days post-treatment in controlled laboratory studies. *Parasites & Vectors*, v. 8, p. 1-7, 2015.

SOBER, H. A.; HOLLANDER, F.; SOBER, E. K. Toxicity of Eugenol: Determination of LD50 on Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 73, n. 1, p. 148-151, 1950.

SPARKS, T. C.; CROUSE, G. D.; BENKO, Z.; DEMETER, D.; GIAMPIETRO, N. C.; LAMBERT, W.; BROWN, A. V. The spinosyns, spinosad, spinetoram, and synthetic spinosyn mimics-discovery, exploration, and evolution of a natural product chemistry and the impact of computational tools. *Pest Management Science*, v. 77, n. 8, p. 3637-3649, 2021.

STANNECK, D.; RASS, J.; RADELOFF, I.; KRUEDEWAGEN, E.; LE SUEUR, C.; HELLMANN, K.; KRIEGER, K. Evaluation of the long-term efficacy and safety of an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar (Seresto®) in dogs and cats naturally infested with fleas and/or ticks in multicentre clinical field studies in Europe. *Parasites & vectors*, v. 5, n. 1, p. 66, 2012.

SYKES, J. E.; MERKEL, Lindsay; LITTLE, Susan E. Myiasis. In: **Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat**. WB Saunders, 2021. p. 1347-1358.

TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasiticides. *The Veterinary Journal*, v. 161, n. 3, p. 253-268, 2001.

THANY, S. H. Molecular mechanism of action of neonicotinoid insecticides. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 6, p. 5484, 2023.

THOMAS, Sona S.; BHAYANI, Hirva S.; CRASTO, Chiquito. Exploring the Molecularity of Spices: **The Gustatory Perspective**. 2024.

TOUTAIN, P.; FERRAN, A.; BOUSQUET-MÉLOU, A. Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Comparative and veterinary pharmacology*, p. 19-48, 2010.

UJIHARA, Kazuya. The history of extensive structural modifications of pyrethroids. *Journal of pesticide science*, v. 44, n. 4, p. 215-224, 2019.

UMALATHA; SUBBALAKSHMI, G.; ANURADHA, M. Introduction to Plant Secondary Metabolites. In: **In Vitro Production of Plant Secondary Metabolites: Theory and Practice**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2025. p. 1-18.

VALE, L.; DE PAULA, L. G. F.; VIEIRA, M. S.; ALVES, S. D. G. A.; DE MORAES JUNIOR, N. R.; GOMES, M. D. F.; TEIXEIRA, W. F. P.; RIZZO, P. V.; FREITAS, F. M. C.; FERREIRA, L. L.; LOPES, W. D. Z.; MONTEIRO, C. 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.

VO, D. T.; HSU, W. H.; ABU-BASHA, E. A.; MARTIN, R. J. Insect nicotinic acetylcholine receptor agonists as flea adulticides in small animals. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 33, n. 4, p. 315-322, 2010.

WALL, R.; SHEARER, D. Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and control. Blackwell Science Ltd., Osney Mead. **Oxford OX2 OEL**, v. 25, p. 23-54, 2001.

WALTISBUHL, D.; FARNSWORTH, B.; KEMP, D. Pesticides used against ectoparasites (ticks, flies, lice) of cattle in Australia. **Ectoparasiticide use in contemporary Australian livestock production, Holdsworth PA, Editor. Avcare Limited: Canberra**, p. 45-57, 2005.

WANG, Q.; QUAN, S.; XIAO, H. Towards efficient terpenoid biosynthesis: manipulating IPP and DMAPP supply. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2019.

WHITE, W. H.; RIGGS, K. L.; TOTTEN, M. L.; SNYDER, D. E.; MCCOY, C. M.; YOUNG, D. R. Initial evaluations of the effectiveness of spinetoram as a long-acting, oral systemic pulicide for controlling cat flea (*Ctenocephalides felis*) infestations on dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 233, p. 25-31, 2017.

WITCHEY-LAKSHMANAN, L. C. Long-acting control of ectoparasites: a review of collar technologies for companion animals. **Advanced drug delivery reviews**, v. 38, n. 2, p. 113-122, 1999.

YOUNG, D. R.; JEANNIN, P. C.; BOECKH, A. Efficacy of fipronil/(S)-methoprene combination spot-on for dogs against shed eggs, emerging and existing adult cat fleas (*Ctenocephalides felis*, Bouché). **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 397-407, 2004.

ZAHARAN, E.; RISHA, E.; RIZK, A. Comparison propofol and eugenol anesthetics efficacy and effects on general health in Nile Tilapia. **Aquaculture**, v. 534, p. 736251, 2021.

ZHOU, X.; HOHMAN, A. E.; HSU, W. H. Current review of isoxazoline ectoparasitocides used in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 45, n. 1, p. 1-15, 2022.

ZHU, X.; LI, H.; HUANG, L.; ZHANG, M.; FAN, W.; CUI, L. 3D printing promotes the development of drugs. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110644, 2020.