

UFRRJ

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

TESE

**Curva de Concentração Plasmático de Fipronil por
Via Subcutânea em Bovinos: Eficácia Contra o
Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*,
um Importante Ectoparasito na Pecuária
Brasileira e Argentina**

Yara Peluso Cid

2012



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**CURVA DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO FIPRONIL POR
VIA SUBCUTÂNEA EM BOVINOS E EFICÁCIA CONTRA O
CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, UM
IMPORTANTE ECTOPARASITO NA PECUÁRIA BRASILEIRA E
ARGENTINA**

YARA PELUSO CID

Sob Orientação do Professor
Fábio Barbour Scott

e Co-orientação dos Professores
Maria Bernadete Riemma Pierree

Hugo Garcia Ovando

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora**, no
Programa de Pós-graduação em
Ciência, Tecnologia e Inovação em
Agropecuária, Área de Concentração
em Patobiologia Animal

Seropédica, RJ
Maio, 2012

636.2 Cid, Yara Peluso, 1982-

C568c

T

Curva de concentração plasmática do fipronil por via subcutânea em bovinos e eficácia contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, um importante ectoparasito na pecuária brasileira e argentina / Yara Peluso Cid – 2012.

65 f. : il.

Orientador: Fábio Barbour Scott.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária.

Bibliografia: f. 57-65.

1. Bovino - Parasito - Teses. 2. Boophilus microplus - Teses. 3. Carrapato – Teses. 4. Inseticidas – Teses. I. Scott, Fábio Barbour, 1966-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
EM AGROPECUÁRIA**

YARA PELUSO CID

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, área de concentração em Patobiologia Animal.

TESE APROVADA EM 29/05/2012

Fábio Barbour Scott. Dr. UFRRJ
(Orientador)

José Carlos Gonçalves Saraiva. Dr. UFRJ

Romário Cerqueira Leite. Dr. UFMG

João Ricardo de Souza Martins. Dr.
Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamo (FEPAGRO)

Marcelo Beltrão Molento. Dr. UFPR

"A ignorância afirma ou nega veementemente,

A ciência duvida."

Voltaire

"É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia."

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e sempre à minha família que é o grande alicerce da minha vida. Minha base, meu chão, minha motivação. Muito obrigada por acreditarem em mim, torcer e nunca terem me deixado desistir e ainda incentivar a seguir em frente! Amo muito todos vocês. Meu pai Luquinha, minha mãe Márcia e meus irmãozinhos lindos Ivan e Isabella. Obrigada!

Ao meu marido Leo, grande parceiro em todos os momentos, na alegria e na tristeza. Te amo. Obrigada por tudo!

As queridas amigas farmacêuticas, Nanda, Bela, Tai, Bia e Lu, e quase farmacêutica, Tati que estão sempre ao meu lado. Amo vocês.

À amiga Viviane, companheira de laboratório. Muito obrigado por toda a força e parceria.

A equipe da Farmacomетria, Thaís, Déborah, Rodrigo e Natália, meus alunos queridos que foram cruciais para a conclusão deste trabalho e que juntamente ao amigo Fabrício proporcionaram os melhores momentos de descontração durante esse tempo. Adoro vocês.

Aos colegas de turma Carla, Marcelo e Mariana pelo apoio e amizade.

A todos os colegas do LQEPV, Ary, Alexsandro, Cássio, Vanessa, Raquel, Júlio, Lílian, Juliana Puig, Ana, Beth, Renata, Clarissa, Maria Clara, Pedro Ivan, Pedro Vianna, Francisco, Milena, Diego, Vinícius, Monique, Bruno, Aline e Luciano pelo apoio e amizade.

Aos colegas professores do DEQUIM, Otávio, Waleska, Inês, Danielle, Leila, Marco Edilson, Vítor, Arthur e Luciano pelo apoio e compreensão.

Ao professor Fábio Barbour Scott pela orientação, incentivo, apoio e oportunidades concedidas.

Aos professores Laerte Grisi, Katherina Coumendouros e Thaís Ribeiro Correia Azevedo pelo apoio e amizade.

Aos professores Maria Bernadete Riemma Pierre, Rosane de Castro Nora e José Carlos Saraiva Gonçalves pela orientação, apoio e amizade.

Ao Pesquisador André Mazzei pela orientação e apoio.

Aos professores Hugo Garcia Ovando e Fernando Manãs pela orientação e acolhimento na UNRC- Rio Cuarto- Argentina.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária. ACAPES e a FAPUR pela bolsa e apoio financeiro concedidos.

BIOGRAFIA

Yara Peluso Cid, filha de Aloysio Miana Cid e Márcia Peluso Fortes, nascida em 22 de janeiro de 1982, no município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, cursou o primário no Colégio Nossa Senhora do Carmo, o ensino fundamental e o ensino médio no Colégio dos Jesuítas, localizados no município de Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais.

No ano de 2001 ingressou no Curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), diplomando-se em janeiro de 2005. Em 2005, ingressou no curso de Habilitação em Farmácia Industrial da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), diplomando-se em dezembro de 2006.

Durante a graduação foi monitora bolsista da disciplina Química Orgânica no período de agosto de 2002 a março de 2003, sob orientação do professor Dr. Mauro Vieira de Almeida bolsista de treinamento profissional do Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA) no período de março de 2004 a fevereiro de 2005 sob orientação da professora Dr^a. Nádia Rezende Barbosa ambas na UFJF. Foi monitora bolsista da disciplina Análises Farmacêuticaseestagiária curricular no Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (LabCQ) da Faculdade de Farmácia da UFRJ no período de março de 2006 a fevereiro de 2007 sob orientação da professora Dr^a. Valéria Pereira deSousa.

Foi aprovada no processo de seleção para o Mestrado em Ciências Farmacêuticas na UFRJ, área de Tecnologia Farmacêutica, da Faculdade de Farmáciadesta instituição em 2007, sob a orientação da professora Dr^a. Maria Bernadete Riemma Pierre e co-orientação da professoraDr^a. Valéria Pereira de Sousa. Foi bolsista de Pós-graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de março de 2007 a fevereiro de 2009, obtendo o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas em março de 2009. Neste mesmo período atuou como Gerente da Garantia da Qualidade do LabCQ – UFRJ.

Em março de 2009, foi aprovada em concurso público nível professor substituto da disciplina Análises Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRJ, com exercício de março a julho de 2009.

Em abril de 2009, foi aprovada no Processo de Seleção para o PPGCTIA, nível Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), área de Patobiologia Animal subárea de Produtos Naturais e Sintéticos com Aplicação na Agropecuária,sob orientação do professor Fabio Barbour Scott. Foi bolsista de Pós-graduação da CAPES no período de abril de 2009 a agosto de 2010.

Em junho de 2010, foi aprovada em concurso público nível professor Assistente I do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICE)da UFRRJ, tendo entrado em exercício em setembro de 2010.

RESUMO

CID, Yara Peluso. 2012. **Curva de concentração plasmática do fipronil por via subcutânea em bovinos e eficácia contra carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, um importante ectoparasito na pecuária Brasileira e Argentina**. 65f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária), Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O fipronil (FIP) é um inseticida pertencente à classe dos fenilpirazóis. É amplamente utilizado como inseticida na agricultura e no controle de ectoparasitos na medicina veterinária. Seu mecanismo de ação está envolvido com o bloqueio da transmissão de sinal pela inibição do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA) presente nos insetos e ácaros. As parasitoses determinam um impacto econômico e ambiental (indireto) elevado e merecem destaque quando pensamos no controle sanitário dos rebanhos bovinos. No Brasil e na Argentina, a principal espécie de carrapato que compromete a saúde e a produtividade da pecuária bovina é *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Por isso, seu controle, além da preocupação entre os proprietários, tornou-se alvo de atenção da indústria farmacêutica veterinária assim como dos órgãos governamentais e de instituições de ensino e pesquisa. A aplicação do FIP de forma injetável (via subcutânea) se torna uma inovação visto que não está disponível no mercado nenhuma formulação contendo FIP nesta apresentação. Formulações injetáveis tendem a ser preferidas pela facilidade de aplicação e baixo risco de contaminação ambiental e do aplicador. O presente estudo teve como objetivo o emprego do FIP aplicado pela via subcutânea em bovinos no controle do *R.(B.) microplus* utilizando-se como critérios de avaliação construção da curva de concentração plasmática e estudo de eficácia. Um método analítico por CLAE-UV foi desenvolvido para determinação do FIP em amostras de plasma bovino fornecendo um processo simples e rápido com boa reprodutibilidade e baixo limite de quantificação. A validação do método analítico desenvolvido comprovou linearidade, seletividade, precisão, exatidão, sensibilidade e estabilidade demonstrando adequação do método para utilização em análise de rotina. O método se mostrou como uma importante ferramenta investigativa na análise da concentração plasmática do FIP em plasma bovino. O FIP administrado pela via SC em bovinos atingiu a circulação sistêmica ($C_{max} = 378,06 \pm 137,44$ ng/mL), sendo rapidamente absorvido ($t_{max} = 10 \pm 0,87$ horas) e sua eliminação ocorreu de forma lenta ($t_{1/2} = 12$ dias) mantendo níveis plasmáticos quantificáveis no sangue por até 21 dias após tratamento na dose de 1,0 mg/Kg. Estudos de atividade *in vitro* demonstraram que o teste de imersão de teleóginas possibilita o estabelecimento da susceptibilidade comparativa entre as três populações. A população RS demonstrou uma susceptibilidade maior em relação às outras populações testadas e foi escolhida para a realização do teste de eficácia *in vivo*. Os teste de eficácia carrapaticida *in vivo* comprovaram que o FIP aplicado pela via SC na dose de 1,0 mg/Kg em bovinos apresentou eficácia carrapaticida média de 82,41% contra *R. (B.) microplus*. A eficácia da inibição reprodutiva média foi de 35,69 %.

Palavras-chave: Fipronil. Concentração plasmática. Eficácia carrapaticida. Bovinos.

ABSTRACT

CID, Yara Peluso. **Plasma concentration curve of fipronil used subcutaneously in cattle and efficacy against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, an important cattle ectoparasite in Brazil and Argentina.** 65p. Thesis (Doctor Science em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária), Pró-reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Fipronil (FIP) is a phenylpyrazole class insecticide. It is widely used as an insecticide in agriculture and in the control of ectoparasites in veterinary medicine. Its action mechanism is involved with blocking the signal transmission by inhibiting neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA) present in insects and acari. The economic and environmental impact caused by parasites is considerably large, and should be taken into account when considering cattle's sanitary control. In Brazil and Argentina, the main tick species, that compromises the health and productivity of cattle, is the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Therefore, its control has become a focus of attention of the veterinary pharmaceutical industry as well as government agencies, and educational and research institutions. The application of FIP in an injectable form (subcutaneously) becomes an innovation, since there is no commercially available preparation containing FIP herein. Injectable formulations tend to be preferred because they are easier to apply have low risk of contamination, both to the environment and the applicator. The present study aimed at FIP usage, applied subcutaneously (SC) in cattle, to control *R. (B.) microplus*. The assessing criteria used in the research have been the construction of the plasma concentration curve and efficacy studies. A method using HPLC-UV was developed for determination of FIP in bovine plasma samples, providing a fast and simple process with good reproducibility and low limit of quantification. The validation of the analytical method showed linearity, selectivity, precision, accuracy, sensitivity and stability, thus proving it as suitable for routine analysis. This method showed to be an important investigative tool in the analysis of FIP plasma concentration in cattle. FIP administered via SC in bovine reached the systemic circulation ($C_{max} = 378.06 \pm 137.44$ ng/mL), was quickly absorbed ($t_{max} = 10 \pm 0.87$ hours), and its elimination occurred slowly ($t_{1/2} = 12$ days), while maintaining quantifiable blood plasma levels for up to 21 days after the treatment with a 1.0 mg/Kg dosage. *In vitro* activity studies showed that the immersion test of ticks allowed the establishment of comparative susceptibility of the three populations. The RS population had highest sensitivity compared to other strains tested, and it was chosen to be used in the *in vivo* acaricides efficacy test. The *in vivo* efficacy tests proved that FIP applied subcutaneously in a dose of 1.0 mg/Kg in cattle exhibited a mean efficacy of 82.41% against *R. (B.) microplus*. Mean inhibiting reproductive efficacy was of 35.69 %.

Key words: Fipronil. Plasma concentration. Tick efficacy. Cattle.

RESUMEN AMPLIADO

CID, Yara Peluso. 2012. **Curva de concentración plasmática de lo fipronil por vía subcutánea en vacunos y eficacia en el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, un importante ectoparásito para la pecuaria de Brasil y Argentina.** 65p. Tesis (Doctorado en Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária), Pró-reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

1 Introducción

Fipronil (FIP) es un insecticida perteneciente a la clase de los fenilpirazoles. Es largamente empleado como insecticida en la agricultura y control de ectoparásitos en la medicina veterinaria. Su mecanismo de acción presupone el bloqueo de la transmisión de señal por inhibición del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) presente en los insectos e ácaros. Las parasitosis determinan un elevado impacto económico y ambiental (aunque indirecto), y merecen ser destacadas cuando pensamos en el control sanitario de rebaños vacunos. En Brasil y Argentina, la principal especie de garrapata que compromete la salud y la productividad de la pecuaria vacuna es lo *Rhipicephalus(Boophilus)microplus*. Por lo tanto, su control, además de ser una preocupación entre propietarios, se ha convertido en el foco de atención en la industria farmacéutica veterinaria, bien como de organismos gubernamentales e instituciones de educación e investigación. La administración del FIP de manera inyectable (por vía subcutánea) se ha convertido en una innovación por el hecho de no haber disponible en el mercado una formulación contenedora del FIP en esta presentación. En el contexto de la importancia de la actividad pecuaria en relación con el PIB brasileño y argentino, fijándose en el hecho de que la garrapata vacuna es una de las más importantes causas de pérdida económica en esta actividad, una formulación innovadora para el combate de esas parasitas podrá aportar un largo impacto sobre las economías de esos países. La presente investigación tuvo como objetivo el empleo del FIP suministrado por vía subcutánea en vacunos para el control del *R. (B.)microplus* utilizando como criterios de evaluación la construcción de curva de concentración plasmática y estudio de eficacia.

2 Material y Métodos

Para la determinación del contenido de FIP-MP se realizó ante una SQR adquirida comercialmente (Sigma), utilizando método descrito por lo certificado de lo fabricante de la SQR por CLAE-UV.

Para el desarrollo y validación del método bioanalítico de determinación del FIP en plasma vacuno, muestras de control de calidad (Muestras CC) fueron preparadas tras la contaminación de plasma vacuno con solución contenedora de FIP para obtener las concentraciones finales de 5, 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng/mL. El ethiprole (PI) fue adicionado al plasma a la concentración final de 250 ng/mL. El plasma fue obtenido a través de la centrifugación a 3000 rpm por 10 min a 4°C de la sangre colectada de vacunos. La extracción de las Muestras CC se realizó por empleo de la técnica de EFS. Para tanto han sido utilizados cartuchos de extracción de fase polimérica HLB – Oasis. Los cartuchos fueran acondicionados con 2,0 mL de metanol e 2,0 mL de agua, adicionados de 1,0 mL de muestra (plasma), seguidos por la etapa del lavado con 1,0 mL de agua. La elución se hizo con 1,0 mL de metanol. El eluato fue evaporado a secura a 40° C y reconstituido en 100 μ L de

acetonitrila. La separación cromatográfica se realizó en columna Symmetry C18 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm) con pre-columna Kromasil C18 (5 μ m, 4.6 \times 10 mm) ambas mantenidas a 25°C. El cromatógrafo líquido con detección en ultravioleta (CL-UV) utilizado ha sido el sistema Dionex Ultimate 3000. La fase móvil consistió de acetonitrila: agua (60:40, v/v) con flujo de 1,0 mL/min. La longitud de onda fijada ha sido de 210 nm y el volumen inyección de 10 μ L. El sistema CL-UV fue controlado por el software Chromeleon 6.8. La metodología desarrollada fue validada tras la evaluación de los parámetros de selectividad, linealidad, precisión, exactitud, y límite de cuantificación basado en los criterios de aceptación descritos en el guía para validación de métodos bioanalíticos de ANVISA.

Una solución de FIP a 5% (p/v) usando glicerofórmol e propilenglicol como vehículo fue preparada para ser utilizada en los ensayos de curva de concentración plasmática e eficacia garrapaticida.

Los estudios de curva de concentración plasmática fueron conducidos utilizando 12 vacunos tratados con aplicación subcutánea por detrás de la paleta, empleada en la dosis de 1mg/Kg de peso corporal (pc), correspondiendo al volumen de 1mL/50 Kg(pc) de la solución de FIP a 5% (p/v). Las muestras de sangre heparinizadas fueron colectadas en los tiempos 0, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 24, 36 e 48 horas e 3, 7, 14, 21 e 28 días tras tratamiento, y en seguida sometidas a las etapas de extracción antes de ser analizadas por CLAE-UV através de metodología analítica desarrollada y validada. Las medidas y los cálculos necesarios para la consecución de los parámetros: pico de concentración plasmática (C_{max}), área bajo la curva (AUC), tempo correspondiente al pico plasmático (t_{max}), semivida de eliminación ($t_{1/2}$), índice constante de eliminación (Tx Const. Elim.) fueron realizadas pelo programa PK Functions for Microsoft Excel.

Para evaluación de la actividad del FIP delante de distintas poblaciones de *R.(B.)microplusha* sido desarrollado un concentrado emulsionable (CE) a base de FIP. El CE fue formulado partiendo de la solubilización del fármaco en solvente apropiado (etilglicol) y posterior incorporación de lo tensoativo (Triton X-100). Para la evaluación *in vitro* da eficacia garrapaticida del CE, teleoginas desplegadas naturalmente de *R. (B.) microplus* de vacunos naturalmente infestados fueron colectadas. En seguida se ha procedido al teste *in vitro* por inmersión de teleoginas, donde tras la inmersión de teleoginas endistintas concentraciones de caldas conteniendo FIP fueron evaluados parámetros reproductivos como, peso de las teleoginas, peso de las posturas, porcentaje de eclosión de los huevos y la eficacia da inhibición reproductiva fue calculada.

La evaluación de eficacia *in vivo* del FIP a 5% suministrado subcutáneamente, fue realizada utilizando 12 becerros, cruce de Holandés y Gyr, entre 8 meses y 1 año y dos meses, libres de productos parasiticidas por un período de 60 días, divididos en dos grupos: control y tratado. Mientras todo el período experimental, los animales permanecieran confinados individualmente, en plataformas de madera, para que las garrapatas fuesen colectadas con intervalos de 24 horas. Los animales del grupo tratado han sido tratados individualmente através de la administración subcutánea por detrás de la paleta, empleada a la dosis de 1mg/Kg (pc), correspondiendo al volumen de 1mL/50 Kg(pc) de la solución de FIP a 5% (p/v). Las hembras ingurgitadas han sido colectadas y contadas diariamente en los dos grupos experimentales hasta el día + 23 y la eficacia do FIP fue calculada. Tras a cuenta de las garrapatas, fueran apartadas dos alícuotas con 10 teleoginas cada, proveniente de cada grupo experimental, donde fueran evaluados los respectivos pesos, posturas y porcentajes de eclosión y la eficacia da la inhibición reproductiva ha sido calculada.

3 Resultados e Discusión

El contenido medio encontrado de 95,55% se ha revelado adecuado para el empleo del FIP como materia prima en el desarrollo de formulación propuesta en el trabajo.

Un método analítico por CLAE-UV fue desarrollado para determinación del FIP en muestras de plasma vacuno aportando un proceso simple y rápido con buena reproductibilidad e bajo límite de cuantificación. La validación del método analítico desarrollado comprueba la linealidad, selectividad, precisión, exactitud, sensibilidad y estabilidad demostrando adecuación del método para utilización en análisis de rutina, convirtiéndose en importante herramienta investigativa y de análisis de concentración plasmática de FIP en plasma vacuno. La selectividad del método fue comprobada partiendo de la ausencia de interferente de la matriz al mismo tiempo de retención del FIP y del PI. La solución estándar del FIP presentó estabilidad por un período de 10 días. Las muestras de plasma contaminado (Muestras CC) fueran consideradas estables una vez que presentaran DPR (%) inferiores a 20% para el LIQ e inferior a 15% para las demás concentraciones. Una respuesta lineal fue observada a la banda entre 5 y 1000 ng/mL con coeficiente de correlación lineal (r) medio de $0,9993 \pm 0,0003$ ($n=2$). Los valores medios de inclinación e intercepto de las curvas de calibración de las muestras (FIP + PI en plasma) fueran 0,331 e 0,0217 respectivamente. El método fue considerado preciso e exacto visto que las muestras de 5, 100 e 500 ng/mL presentaban valores de DPR% entre 1,6 e 12,2 % para la precisión y valores de recuperación entre 85,37% e 113,82% para la exactitud.

El FIP suministrado por vía subcutánea (SC) en vacunos atingió la circulación sistémica ($C_{max} = 378,06 \pm 137,44$ ng/mL), siendo rápidamente absorbido ($t_{max} = 10 \pm 0,87$ horas) y su eliminación ocurre de forma lenta ($t_{1/2} = 12$ días) manteniendo niveles plasmáticos cuantificables en la sangre por hasta 21 días tras tratamiento de la dosis de 1 mg/Kg.

Investigaciones de actividad *in vitro* han demostrado que la prueba de inmersión teoginas posibilita establecerse la susceptibilidad comparativa entre las tres poblaciones. La población RSha demostró una susceptibilidad mayor en relación con las otras poblaciones testadas, y ha sido elegida para la realización del teste de eficacia *in vivo*.

Las pruebas de eficacia garrapaticida *in vivo* han comprobado que el FIP aplicado por vía SC a la dosis de 1 mg/Kg en vacunos presentó eficacia garrapaticida media de 82,41% contra *R. (B.) microplus*. La eficacia de la inhibición reproductiva media ha sido 35,69 %.

4 Conclusión

El FIP aplicado por vía subcutánea en dosis de 1mg/Kg en vacunos atingió la circulación sistémica, manteniendo niveles plasmáticos cuantificables en la sangre por hasta 21 días tras tratamiento y se ha revelado eficaz en el control de la garrapata vacuna.

Palabras-clave: Fipronil. Concentración plasmática. Eficacia garrapaticida. Vacunos.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ACN – Acetonitrila
As - Assimetria
AUC – Área Sob a Curva
BOD – Câmara Climatizada com Demanda Bioquímica de Oxigênio
CE – Concentrado Emulsionável
CG – Cromatografia Gasosa
CIP – Citocromo P450
CL – Cromatografia líquida
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
 C_{max} – Pico de Concentração Plasmática
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CQ – Controle de Qualidade
CQA – Controle de Qualidade Alto
CQB – Controle de Qualidade Baixo
CQM – Controle de Qualidade Médio
DCE – Detecção por Captura de Elétrons
DMFS – Dispersão de Matriz em Fase Sólida
DNF – Detecção por Nitrogênio-Fósforo
dp – desvio padrão
DPR – Desvio Padrão Relativo
EFS – Extração em Fase Sólida
EFSC – Extração em Fluido Super-Crítico
ELL – Extração Líquido-Líquido
EIR – Eficácia da Inibição Reprodutiva
ER – Eficiência Reprodutiva
FIP – Fipronil
GABA – Ácido γ -aminobutírico
IER – Índice de Eficiência Reprodutiva
LIQ – Limite Inferior de Quantificação
LQEPV – Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária
MEFS – Micro Extração em Fase Sólida
MeOH - Metanol
MP – Matéria-Prima
MS – Espectrometria de Massa
MS/MS – Espectrometria de Massa Sequencial
N – Número de pratos teóricos
PA – Padrão Analítico
P&D – Pesquisa e Desenvolvimento
PI - Padrão Interno
PIB – Produto Interno Bruto
PS-DVB – Poli-estireno-divinilbenzeno
p/v – peso/volume
r – coeficiente de correlação linear
R –Resolução

RCA – Reguladores de Crescimento de Artrópodes
RS – Rio Grande do Sul
SC – Subcutânea
SE – Solução Estoque
Sm – Solução Mãe
Sqr – Substância Química de Referência
S/R – Relação Sinal-Ruído
 $t_{1/2}$ - Meia-vida de eliminação
TEL – Teste de Envelope de Larvas
TIA – Teste de Imersão de Adultos
TIL – Teste de Imersão de Larvas
 t_{max} – Tempo correspondente ao pico plasmático
UFRRJ– Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UR– Umidade Relativa
UV –Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor do Fipronil matéria-prima por CLAE – UV	32
Tabela 2. Estabilidade do fipronil em plasma bovino – análise inicial, pós-processamento, curta duração, ciclo de congelamento e descongelamento e longa duração.	35
Tabela 3. Resultado do teste F para a variância dos resíduos da curva de calibração do fipronil em plasma bovino por regressão linear simples	37
Tabela 4. Parâmetros da curva de calibração para os tratamentos testados de regressão linear ponderada.....	38
Tabela 5. Precisão e exatidão das amostras de controle de qualidade na faixa linear do método (5 a 1000 ng/ mL) em dois dias de testes.....	41
Tabela 6. Precisão e exatidão das amostras de controle de qualidade nos níveis baixo (5 ng/mL), médio (100 ng/mL) e alto (500 ng/mL) intra-dia e inter-dia	41
Tabela 7. Concentração plasmática do fipronil (ng/mL) de cada animal (n=12) em cada tempo (horas) testado após administração subcutânea na dose de 1mg/Kg de peso vivo	44
Tabela 8. Parâmetros farmacocinéticos para o fipronil após administração subcutânea em bovinos na dose de 1mg/Kg de peso vivo	45
Tabela 9. Eficiência reprodutiva média das populações de <i>R. (B.) microplus</i> frente ao fipronil em diferentes concentrações.	46
Tabela 10. Número de teleóginas de <i>R. (B.) microplus</i> recuperadas dos animais dos grupos controle e tratado nos períodos pré-tratamento (dias -3 a -1) e pós-tratamento (dias 1 a 23) em estudo de eficácia carrapaticida do fipronil aplicado pela via subcutânea na dose de 1 mg/kg	49
Tabela 11. Média do número de teleóginas de <i>R. (B.) microplus</i> recuperadas dos animais dos grupos controle e tratado nos períodos pré-tratamento (dias -3 a-1) e pós-tratamento (dias 1 a 3) e eficácia diária em estudo de eficácia carrapaticida do fipronil aplicado pela via subcutânea na dose de 1 mg/kg.....	50
Tabela 12. Eficácia na inibição reprodutiva diária para teleóginas de <i>R. (B.) microplus</i> coletadas após tratamento com fipronil aplicado subcutaneamente a 1mg/kg em bovinos.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo evolutivo do carrapato do boi (<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>)	6
Figura 2. (A) Sistema nervoso do artrópode, (B) Sítios de ação neurológicos de várias classes inseticidas (Adaptado de SCHARF; SUITER, 2011).....	8
Figura 3. Estrutura química do fipronil	10
Figura 4. Estrutura química do etiprole.....	20
Figura 5. Galpão onde foram mantidos os animais pertencentes ao grupo controle (animais à esquerda) e grupo tratado com FIP subcutaneamente (animais à direita) durante o estudo de eficácia carrapaticida.	29
Figura 6. Baias individuais com estrados de madeira onde foram mantidos os animais durante todo período experimental do estudo de eficácia carrapaticida.	29
Figura 7. Seletividade do método para quantificação do Fipronil matéria-prima: cromatograma de injeção (a) padrão (Fipronil Substância Química de Referência), (b) amostra (Fipronil matéria-prima) e (c) branco (acetonitrila).....	31
Figura 8. Curva de calibração do padrão (Fipronil Substância Química de Referência).....	31
Figura 9. Espectro de absorção no ultravioleta do Fipronil em acetonitrila.....	33
Figura 10. Parâmetros cromatográficos para amostras (plasma bovino contaminado com fipronil e padrão interno) na concentração do limite de quantificação.....	34
Figura 11. Cromatograma de injeção (1) plasma bovino (branco); (2) solução padrão contendo fipronil e padrão interno na ausência da matriz (padrão) e (3) plasma bovino contendo fipronil e padrão interno (amostra)	35
Figura 12. Dispersão de resíduo da curva de calibração do fipronil em plasma bovino empregando a regressão linear simples	37
Figura 13. Gráficos de resíduo das regressões ponderadas. (a) $1/x$; (b) $1/x^{0.5}$; (c) $1/x^2$; (d) $1/y$; (e) $1/y^{0.5}$; (f) $1/y^2$	39
Figura 14. Curvas analíticas do padrão analítico (fipronil e padrão interno em acetonitrila) e amostra (fipronil e padrão interno em plasma bovino) do 1º e 2º dia de testes	40
Figura 15. Estudos iniciais: curva de concentração plasmática média (n=4) em plasma bovino após administração via subcutânea de fipronil na dose de 1mg/Kg	42
Figura 16. Curva de concentração plasmática média (n=12) em plasma bovino após administração via subcutânea de FIP na dose de 1mg/Kg.....	43
Figura 17. Resultados de eficácia na inibição reprodutiva para teleóginas de <i>R. (B.) microplus</i> imersas em diferentes concentrações de fipronil, frente a três populações distintas....	46
Figura 18. Eficácia carrapaticida média do Fipronil aplicado pela via subcutânea na dose de 1mg/kg pc em bovinos sobre as formas evolutivas	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.10 Mercado de Produtos Farmacêuticos de Uso Veterinário	3
2.2 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> : O Carrapato do Boi.....	4
2.2.1 Ciclo evolutivo	5
2.2.2 Controle	6
2.3 Antiparasitários Utilizados no Controle do Carrapato do Boi.....	7
2.4 Fipronil	10
2.4.1 Farmacodinâmica, farmacocinética e toxicidade.....	11
2.4.2 Formas farmacêuticas de uso veterinário	13
2.4.3 Eficácia	14
2.5 Farmacocinética Clínica	15
2.6 Metodologia Analítica para Determinação do Fipronil.....	16
2.6.1 Métodos de extração.....	16
2.6.2 Métodos analíticos.....	19
2.7 Validação de Métodos Bioanalíticos	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Localização da Experimentação	22
3.2 Padronização do Fipronil Matéria-prima.....	22
3.2.1 Condições cromatográficas.....	22
3.2.2 Preparo da solução estoque de fipronil.....	23
3.2.3 Preparo da curva padrão	23
3.2.4 Preparo da solução amostra	23
3.3 Desenvolvimento da Metodologia Analítica para Quantificação do Fipronil em Plasma Bovino por CLAE-UV	23
3.3.1 Preparo da solução mãe de fipronil	23
3.3.2 Preparo da solução mãe de padrão interno	23
3.3.3 Preparo da curva de calibração do padrão analítico	23
3.3.4 Preparo das amostras de controle de qualidade	23
3.3.5 Extração das amostras de controle de qualidade	24
3.3.6 Condições cromatográficas.....	24
3.4 Validação da Metodologia Analítica para Quantificação do Fipronil em Plasma Bovino por CLAE-UV.....	24
3.4.1 Parâmetros cromatográficos	24
3.4.2 Seletividade	24
3.4.3 Estabilidade do padrão analítico.....	25
3.4.4 Estabilidade das amostras de controle de qualidade.....	25
3.4.5 Linearidade	25
3.4.6 Precisão.....	25
3.4.7 Exatidão	25
3.5 Preparo do Fipronil para Aplicação Injetável.....	26
3.6 Estudos da Curva de Concentração Plasmática.....	26
3.7 Atividade do Fipronil Frente a Diferentes Populações de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	27
3.7.1 Obtenção dos carrapatos.....	27

3.7.2 Preparo do concentrado emulsionável.....	27
3.7.3 Ensaio <i>in vitro</i>	28
3.8 Estudos de Eficácia Clínica.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Padronização do Fipronil Matéria-prima por CLAE – UV	31
4.2 Desenvolvimento da Metodologia Analítica para Quantificação do Fipronil em Plasma Bovino por CLAE-UV	32
4.3 Validação da Metodologia Analítica para Quantificação do Fipronil em Plasma Bovino por CLAE-UV	33
4.3.1 Parâmetros cromatográficos e limite de quantificação (LIQ)	33
4.3.2 Seletividade	34
4.3.3 Estabilidade da solução padrão.....	35
4.3.4 Estabilidade em matriz biológica (plasma)	35
4.3.5 Linearidade	36
4.3.6 Precisão e exatidão	41
4.4 Estudo da Curva de Concentração Plasmática	42
4.5 Atividade do Fipronil Frente a Diferentes Populações de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> - Teste <i>in vitro</i>	45
4.6 Estudos de Eficácia Clínica.....	48
5 CONCLUSÕES.....	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1INTRODUÇÃO

Países como o Brasil, Argentina, Uruguai e Chile constituem a base principal socioeconômica e geopolítica do MERCOSUL. Em suas economias pode-se observar uma forte inserção do agronegócio em seus produtos internos brutos (PIB).

O Brasil ocupa lugar de destaque mundial no cenário agropecuário, que tem participação significativa no PIB brasileiro, com destaque para a bovinocultura. A pecuária é a atividade que ocupa a maior área dentre todas as atividades agropecuárias desenvolvidas no Brasil: são 199 milhões hectares, o que equivale a cerca de 70% de toda a área ocupada por atividades agropecuárias no país. O Brasil abriga o segundo maior rebanho bovino no mundo. O maior rebanho é o da Índia, entretanto pela inserção do animal na religião, este não é considerado sob o aspecto de produção animal, portanto o do Brasil seria o maior com a finalidade de produção de proteína animal e seus derivados. O Brasil é também o segundo maior produtor e consumidor mundial de carnes. A carne bovina brasileira é apreciada em todo o mundo e é conhecido como “Boi Verde”, fato correlacionado com a alimentação constituída principalmente com pasto, que confere a carne um paladar diferenciado quando comparado com animais alimentados principalmente com grãos (milho, soja, sorgo e outros). Além das características organolépticas este tipo de criação possibilita um preço muito competitivo da carne bovina brasileira no mercado internacional, tendo em vista que na Europa e EUA os animais se alimentam principalmente de grãos empregados na alimentação humana. O Brasil atualmente é o maior exportador mundial de carne bovina *in natura*.

A produção leiteira brasileira também é expressiva, estimada em 27 bilhões de litros, com uma média nacional de 1.260 litros/vaca/ano, gerando um valor bruto da produção de aproximadamente de R\$ 15 bilhões. A cadeia produtiva do gado de leite é interligada com vários outros setores, sendo importante consumidora de produtos veterinários.

Embora a pecuária bovina, corte e leite, tenha um papel de destaque dentro dos agronegócios do Brasil e conseqüentemente no PIB, enfrenta desafios enormes. Não só pelo aspecto da manutenção de seu atual status como liderança mundial, mas também para atender a crescente demanda mundial por alimento.

Sabe-se que a pecuária atual está centrada no tripé: manejo, genética e saúde. Os animais devem ter potencial genético apto para a produção, entretanto condições adequadas de manejo (bem estar animal – nutrição – instalações adequadas) devem ser oferecidas para que possam expressar de forma adequada todo seu potencial fenotípico. Dentro destes três pilares da produção animal merece destaque o controle sanitário do rebanho. Sem este controle todas as medidas de manejo e a genética serão prejudicadas de forma que não se alcance o objetivo final.

No controle sanitário do rebanho bovino, as parasitoses determinam um impacto econômico e ambiental elevado. As parasitoses no Brasil ganham destaque em função da excelente condição climática conferida devido a sua posição geográfica, ou seja, por ser um país tropical, oferece todas as condições ecológicas para a instalação e manutenção de populações significativas de parasitos.

Na avaliação do mercado veterinário brasileiro, mais de 34% do montante financeiro gerido pelos produtos farmacêuticos se destina ao controle dos parasitos. Dentro deste mercado destacam-se os ectoparasiticidas, produtos empregados no controle de parasitos externos dos animais. Este cenário indica que os parasitos têm um papel preponderante dentro do contexto do manejo sanitário dos animais.

No Brasil, a principal espécie de carrapato que compromete a saúde e a produtividade da pecuária bovina, comumente chamado de carrapato do boi, denomina-se *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Atualmente, existe um desafio ainda maior que é a questão do resíduo em carne e leite e que tem se tornado um grande problema para as autoridades sanitárias. Esta questão tem sido imposta muitas vezes como barreira sanitária de outros países para a importação da carne brasileira.

Não existe uma fórmula mágica ou um método revolucionário capaz de resolver definitivamente o problema do parasitismo dos bovinos por esse carrapato, mas sabe-se que uma associação de métodos alternativos e integrados de acordo com a situação permite obter excelentes resultados e até mesmo reduzir o uso e prolongar a vida útil dos carrapaticidas.

Os produtos carrapaticidas constituem a principal opção no combate ao carrapato. A escolha e o uso correto, tanto das concentrações e da dose por animal, quanto na frequência de aplicação, assim como a mudança de produto quando necessária, são fatores preponderantes para a obtenção de resultados esperados.

Vários são os grupos químicos de carrapaticidas, hoje disponíveis, como os organofosforados, as formamidas, os piretróides e as avermectinas. Mais recentemente outros grupos foram introduzidos como os Reguladores de Crescimento de Artrópodes (RCA) e os fenilpirazóis.

A aplicação desses produtos é feita por meio de pulverização, imersão, dorsal (“pour-on”) ou injetável. No Brasil, as únicas classes com ação carrapaticida disponíveis na forma injetável são avermectinas e milbemicinas. Cada método apresenta suas vantagens e desvantagens e a escolha depende da região geográfica, tipo de criação, manejo, número de animais, entre outros fatores. Para cada produto, devem-se respeitar as recomendações do fabricante, como a concentração, a dose por animal, a carência para o abate e ordenha.

No Brasil por uma questão cultural e de manejo o proprietário prefere a forma de aplicação injetável. Embora esta forma possa apresentar desvantagem em relação ao contato imediato entre o carrapato e o acaricida, apresentada pelas formulações de uso tópico, é nítidas as vantagens relacionadas ao não desperdício de praguicidas no ambiente, menor risco de intoxicação do aplicador, facilidade de aplicação e dosificação correta.

Atualmente no Brasil existem populações resistentes de *R. (B.) microplus* aos organofosforados, amidinas, piretróides, lactonas e em menor grau aos fenilpirazóis. O uso indiscriminado de praguicidas leva ao aparecimento de resistência do carrapato as moléculas ativas. O mecanismo de resistência leva a busca por novos compostos com outros alvos terapêuticos e diferentes mecanismos de ação. No entanto, o alto custo relacionado à descoberta de novas moléculas ativas reduz o número destas introduzidas no mercado. As possibilidades de inovação estão no desenvolvimento de novas formulações que promovam o aumento do espectro de ação, facilidade de uso e segurança para o ambiente e para o aplicador. A busca por novas formulações mais seguras para o ambiente, para o aplicador e que facilitem o manejo dos animais balizam o presente trabalho.

O objetivo do presente estudo foi o emprego do fipronil (FIP) aplicado pela via subcutânea (SC) em bovinos no controle de *R. (B.) microplus* utilizando-se como critérios de avaliação a construção da curva de concentração plasmática e estudo de eficácia controlada. Dentre os objetivos específicos estão o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de FIP em plasma bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta (CLAE-UV); o estudo de eficácia carrapaticida do FIP aplicado pela via SC; e o estudo da curva de concentração plasmática do FIP aplicado pela via SC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Mercado de Produtos Farmacêuticos de Uso Veterinário

A indústria farmacêutica veterinária apresenta similaridade com a indústria farmacêutica humana desde as fases iniciais do processo de pesquisa e desenvolvimento chegando até as agências reguladoras, que, se espelham nas exigências existentes para a indústria farmacêutica humana ao elaborarem suas normas (CAPANEMA *et al.*, 2007)

Segundo o artigo 2º do Decreto 1.662/95, “Entende-se por produto veterinário toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada, cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada a alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo os aditivos, suplementos, melhoradores de produção animal, antissépticos, desinfetantes de uso ambiental ou equipamentos, pesticidas e todos os produtos que, utilizados nos animais e/ou no seu habitat, protejam, restaurem ou modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas. Compreendem-se ainda, nesta definição os produtos destinados à higiene e ao embelezamento dos animais”.

Nos últimos 30 anos, a maior necessidade de recursos para atividades de pesquisa e desenvolvimento (P&D), reforço do catálogo de produtos e ampliação geográfica das áreas de atuação levaram a um movimento de fusões e aquisições nas empresas de produtos veterinários. (CAPANEMA *et al.*, 2007). Um outro fator extremamente relevante para motivar a concentração desse setor é o aumento da preocupação com a segurança dos alimentos e, conseqüentemente, com o nível de resíduos de medicamentos em produtos de origem animal que levam a aumento significativo nos custos nessa indústria (WAAK, 2000).

O mercado brasileiro merece destaque por se encontrar entre os cinco maiores do mundo, uma vez que possui o maior mercado bovino comercial do mundo e o segundo maior mercado de animais de companhia e, também por ser o maior exportador de carne de frango. O setor vem apresentando crescimento sustentado graças, principalmente, a três fatores: aumento das exportações de produtos veterinários (centro de produção para multinacionais), aumento da fiscalização sanitária e critérios cada vez mais exigentes para comercialização interna ou externa, e maior conscientização dos criadores em manter a sanidade dos rebanhos (CAPANEMA *et al.*, 2007).

Fazendo-se uma análise do perfil da indústria farmacêutica veterinária no Brasil e no mundo observa-se que o mercado veterinário mundial faturou em 2006 aproximadamente 16 bilhões de dólares. O mercado brasileiro faturou, no mesmo ano, 1.060 bilhões de dólares. O crescimento médio do mercado veterinário mundial tem sido de aproximadamente 5% (dados até 2006). Enquanto o mercado brasileiro cresceu no mesmo período 7%. Do ano de 2004 a 2008 o mercado brasileiro cresceu 120%, com um faturamento bruto para 2008 de 1.645 bilhões de reais. O mercado brasileiro tem crescido bem acima da média do mercado mundial, mostrando-se atrativo neste segmento. É uma indústria que tem seu foco principal no mercado de produtos para animais de produção (bovinos, ovinos, caprinos, suínos, aves e equinos) correspondendo a 74% do faturamento, entretanto o mercado pet (animais de companhia) vem aumentando sua participação de forma significativa 26% do mercado. Essa é uma tendência mundial e brasileira. Quanto à distribuição das classes farmacêuticas, no mercado mundial a classe com maior faturamento é a de antiparasitários com 28,8% do mercado. No mercado brasileiro não é diferente. A classe que predomina também é a de antiparasitários que continua a ser a que desperta o maior interesse do mercado. Na América Latina, África do Sul

e Austrália dentro desta classe as empresas tem um interesse especial por produtos carrapaticidas para o controle do carrapato dos bovinos(CAPANEMA *et al.*, 2007).

A indústria nacional inova pouco. Ela copia muito. Isto significa que ela busca criar formulações semelhantes as que existem no mercado e que tem tido sucesso no comercio. Inovação tecnológica para as empresas farmacêuticas brasileiras é um conceito novo, introduzido recentemente, nos últimos cinco anos. Este atraso é até compreensível quando pensamos que o custo de desenvolvimento de um novo fármaco custa em torno de 400.000.000 dólares, inviável para a maioria das empresas nacionais. Aos poucos esta mentalidade veem mudando, através de aportes financeiros por fomentadores de pesquisa como Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq), FINEP e Fundações estaduais, através de políticas públicas de programas de estímulo a geração de inovação tecnológica e científica, buscando fixar doutores e pós-doutores na indústria e fornecendo financiamento a fundo perdido ou a baixos juros. A fixação destes doutores é de fundamental importância, pois irá gerar recursos humanos altamente qualificados. Entretanto ainda enfrentamos dificuldades, pois a maioria dos nossos doutores quer permanecer no meio acadêmico (informação verbal)¹.

Quanto à significância do custo do carrapaticida no processo da produção pecuária, pode-se dizer que este é bastante significativo. A estimativa é que o carrapato de bovinos no Brasil determine prejuízos da ordem de dois bilhões de reais ao ano. Este prejuízo estaria correlacionado a perda de pesos dos animais, baixa produtividade leiteira, mortalidade de bezerras, transmissão de doenças, desvalorização do couro e gastos com medicamentos (GOMES, 1998). O rebanho bovino brasileiro atual é superior a 200 milhões de cabeças. Estima-se que 30% deste rebanho, ou seja, 60 milhões necessitem de pelo menos de três a quatro tratamentos contra carrapato ao ano. Estes dados estimados gerariam um total de 240 milhões de doses de carrapaticidas por ano (informação verbal)¹.

Sabemos que a pecuária na Argentina tem um peso ainda maior no PIB do que no Brasil em função de uma diversificação econômica menor. O gado Argentino também sofre com o carrapato, entretanto em menor intensidade por causa das características climáticas regionais, ou seja, é um país de clima temperado onde as condições do clima são desfavoráveis ao carrapato. Entretanto é importante ressaltar que embora o Brasil represente o maior mercado veterinário na América Latina, várias empresas nacionais têm aos poucos criado seus departamentos de exportações, principalmente para países da América Latina. Para algumas destas empresas o faturamento com as exportações já chegam a 10% do faturamento total. Dentro deste contexto Argentina, Uruguai e Colômbia são os melhores mercados (informação verbal)¹.

A aplicação do FIP de forma injetável, por via subcutânea, se torna uma inovação visto que não está disponível no mercado nenhuma formulação nesta apresentação. Formulações injetáveis tendem a ser preferidas pelos proprietários pela facilidade de aplicação e baixo risco de impacto ambiental e intoxicação do aplicador.

2.2 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: O Carrapato do Boi

Os carrapatos são ectoparasitos importantes para a saúde pública e animal por transmitirem agentes infecciosos e causarem injúrias a seus hospedeiros durante a hematofagia (PEREIRA *et al.*, 2008).

¹ Informação fornecida por Fábio Barbour Scott, em Seropédica, em Fevereiro de 2012.

Os carrapatos podem causar danos diretos e indiretos. Os danos diretos podem ser evidenciados pela ingestão de sangue, inoculação de toxinas nos hospedeiros, promovendo alterações fisiológicas, como inapetência, transmissão de agentes infecciosos, principalmente *Anaplasma* e *Babesia*, responsáveis pela tristeza parasitária bovina (HOLDSWORTH *et al.*, 2006) e cicatrizes irreversíveis ocasionadas durante a alimentação. Tais danos levam a prejuízos como diminuição do ganho de peso comprometendo produção de carne e leite, mortalidade e redução da qualidade do couro do animal. Além dos prejuízos diretos, as infestações pelo carrapato bovino também causam prejuízos indiretos resultantes dos custos com mão de obra para o seu combate, assim como aquisição de equipamentos e carrapaticidas. Os prejuízos causados a pecuária brasileira superam dois bilhões de reais por ano (GOMES, 1998).

R. (B.) microplus representa a espécie de carrapato de maior interesse econômico no hemisfério sul, América Central e México. Seu controle é motivo de grandes preocupações entre os bovinocultores e tornou-se alvo de atenção da indústria farmacêutica veterinária assim como dos órgãos governamentais e de instituições de ensino e pesquisa.

2.2.1 Ciclo evolutivo

O carrapato *R. (B.) microplus* classifica-se como uma espécie de um só hospedeiro, tendo como principal hospedeiro o gado bovino. O ciclo evolutivo (Figura 1) dessa espécie consiste em duas fases: parasitária e não parasitária. A primeira ocorre no hospedeiro, começando pela fixação das larvas, passando pelos estágios de ninfa, adulto, até a fêmea ingurgitada. A segunda ocorre no ambiente quando as fêmeas ingurgitadas fazem a ovoposição gerando novas larvas. Neste tipo de ciclo apenas 5% dos carrapatos estão em parasitose, e os 95% restantes encontram-se no ambiente. Os carrapatos em parasitose encontram-se nos estágios evolutivos de larvas, ninfas e adultos e são alvo direto dos carrapaticidas. Já os carrapatos presentes nas pastagens são fêmeas ingurgitadas em fase de pré-postura e postura, ovos em incubação e larvas infestantes e são fonte de reinfestação para os animais. A duração de cada fase do ciclo evolutivo é regulada pela temperatura. A fase parasitária tem duração de 21 a 22 dias durante o ano todo, visto que a temperatura corporal do animal não sofre variações dependentes da temperatura do ambiente. No caso da fase não parasitária, nos meses mais quentes (primavera-verão) a duração é mais curta (40-50 dias) e nos meses mais frios a duração é mais longa (70-120 dias) (PEREIRA *et al.*, 2008).

A sobrevivência do carrapato na pastagem é regulada pela umidade relativa e temperatura. A intensa cobertura vegetal das pastagens garante microclima ideal com temperaturas frescas de 25-27°C e umidade relativa em torno de 80%, até mesmo nos dias ensolarados em que as temperaturas do macroclima atingem 40°C e umidade 70%. Estas condições do microclima são essenciais para as fases de postura e incubação dos ovos (fase mais vulnerável do ciclo de *R. (B.) microplus*) (PEREIRA *et al.*, 2008).

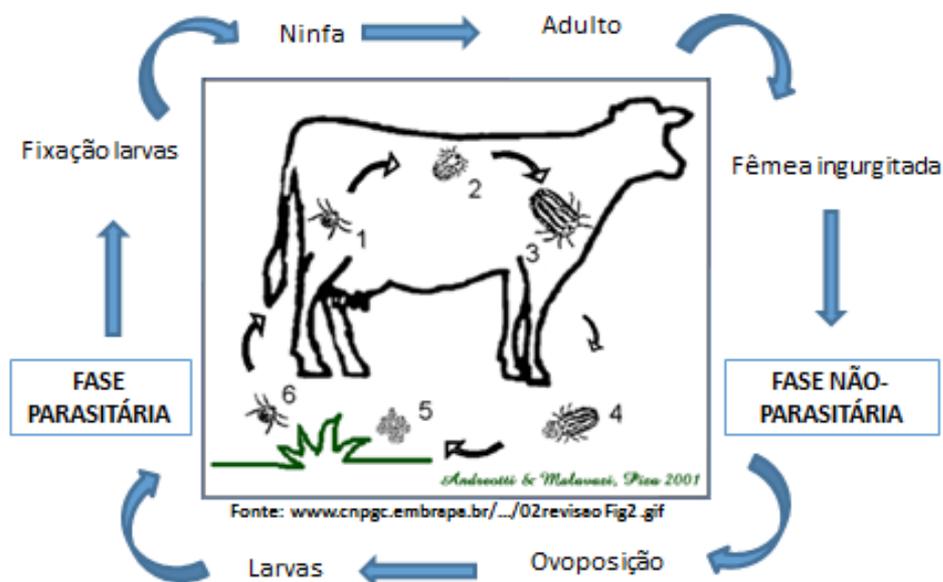


Figura 1. Ciclo evolutivo do carrapato do boi (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*)

Dependendo da região, o carrapato pode completar de três a quatro gerações por ano. O crescimento das gerações anuais é dependente das flutuações de temperatura e pluviosidade (esta última para retratar a cobertura vegetal do solo). Sendo assim, as populações tendem a crescer a partir do início da estação chuvosa e/ou aumento da temperatura e diminuir durante as estações secas e frias. Está amplamente distribuído no continente Americano atingindo desde o Norte da Argentina até o México (PEREIRA *et al.*, 2008).

2.2.2 Controle

O controle do carrapato é possível através do uso de compostos químicos e/ou vacinas, uso de pastagens que dificultam a sobrevivência das larvas do carrapato, uso de predadores naturais, tais como aves pernaltas e de rapina, formigas e algumas espécies de fungos e bactérias, e seleção de raças bovinas mais resistentes aos carrapatos (CORGOZINHO, 2008).

Segundo Labruna (2008) o combate contra *R. (B.) microplus* pode ser classificado quanto ao tipo de tratamento aplicado, podendo ser carrapaticida, tático ou uso de vacinas comerciais. O tratamento carrapaticida pode ser curativo ou racional. No primeiro caso, a aplicação de carrapaticidas é realizada sem a existência de um programa de controle, sendo baseado na visualização do carrapato ou no nível de infestação dos animais. Apesar de ser o mais utilizado no Brasil, este tipo de tratamento é cada vez menos eficiente, pois acelera o aparecimento de populações de *R. (B.) microplus* resistentes aos carrapaticidas. O tratamento racional, também chamado de controle estratégico, consiste de um programa a longo prazo, onde o tratamento carrapaticida se concentra em uma determinada época do ano, de forma que, no resto do ano, a população de carrapatos se mantenha em níveis aceitáveis, sem o uso de carrapaticidas. Independente das diferenças geográficas existentes no Brasil, alguns dos principais pontos para um controle estratégico de sucesso são: a sequência de tratamentos deve ser iniciada sempre antes da época de maior infestação por carrapatos no ano; os intervalos entre tratamentos devem ser respeitados; e a aplicação do carrapaticida deve ser

feita de forma correta, respeitando a dose terapêutica preconizada. Um programa de controle estratégico de *R. (B.) microplus* de sucesso leva a benefícios como redução do número de tratamentos por ano, diminuição da pressão de seleção para resistência dos carrapatos aos carrapaticidas, redução dos gastos com carrapaticidas e mão de obra e redução de problemas de intoxicação humana e contaminação ambiental.

Além do uso de carrapaticidas, os tratamentos táticos devem ser implementados no auxílio ao combate ao carrapato bovino. Estes tratamentos têm como objetivo diminuir a infestação por carrapatos nos pastos. Dentre os mais comuns, pode-se destacar a rotação de pastagens, queimadas e aplicação de carrapaticidas no pasto. A rotação de pastagens é viável somente quando realizada nos meses de primavera e verão, nos quais a sobrevivência das larvas é menor. Considerando o período da fase não parasitária nesses meses, o tempo mínimo de descanso da pastagem seria de 50 a 60 dias no verão. Na maioria das vezes esse longo período de descanso torna-se inviável. Uma alternativa é a rotação de pastagens com lavouras de milho, por exemplo, que além de eliminar os parasitos também beneficia a terra devido à adubação. As queimadas, apesar de ser uma prática repleta de desvantagens ainda podem ser utilizadas em casos extremos. Quanto à aplicação de carrapaticidas no pasto, já existem relatos da eficácia de produtos como piretróides e organofosforados contra outras espécies de carrapatos, porém deve ser utilizada com cuidado devido ao risco de contaminação ambiental de mananciais e coleções de água e também dos próprios animais (LABRUNA, 2008).

2.3 Antiparasitários Utilizados no Controle do Carrapato do Boi

O uso de carrapaticida é a principal ferramenta disponível no combate aos carrapatos. Os compostos utilizados no tratamento contra ectoparasitas de importância veterinária agem tanto de forma sistêmica, através de sua absorção a partir do local de aplicação ou pelo contato direto com o parasito através de uma aplicação tópica. Para que um composto atinja a circulação sanguínea e tenha ação sistêmica este pode ser administrado por via parenteral (injeção subcutânea ou intramuscular), por via tópica (aplicado sobre a pele e absorvido por via percutânea) ou por via oral. Compostos aplicados topicamente apresentam um efeito direto sobre os ectoparasitos na superfície da pele. A forma farmacêutica exerce influência direta no comportamento farmacocinético do fármaco, por essa razão, diferentes formulações de um mesmo fármaco podem se diferenciar quanto à via de aplicação, indicação, dose e posologia (TAYLOR, 2001).

De uma forma geral os ectoparasiticidas são neurotóxicos exercendo efeito sobre o sistema nervoso central do ectoparasita. O sistema nervoso do artrópode é composto por uma série de células interconectadas, chamadas neurônios, pelas quais são transmitidas cargas elétricas chamadas impulsos. Impulsos são carreados até o final de uma célula nervosa através da sinapse por intermédio de mensageiros químicos chamados neurotransmissores (SCHARF; SUITER, 2011). A Figura 2 ilustra o sistema nervoso do artrópode e os sítios de ação neurológicos de várias classes inseticidas.

Anteriormente ao uso de carrapaticidas, os primeiros tratamentos com eficácia comprovada utilizados contra o carrapato bovino relatam o uso de misturas de querosene, óleo de algodão, enxofre e petróleo aplicados duas a três vezes por semana com esponjas, seringas ou escovas (FRANCIS, 1892; MOHLER, 1906 *apud* GEORGE *et al.*, 2004).

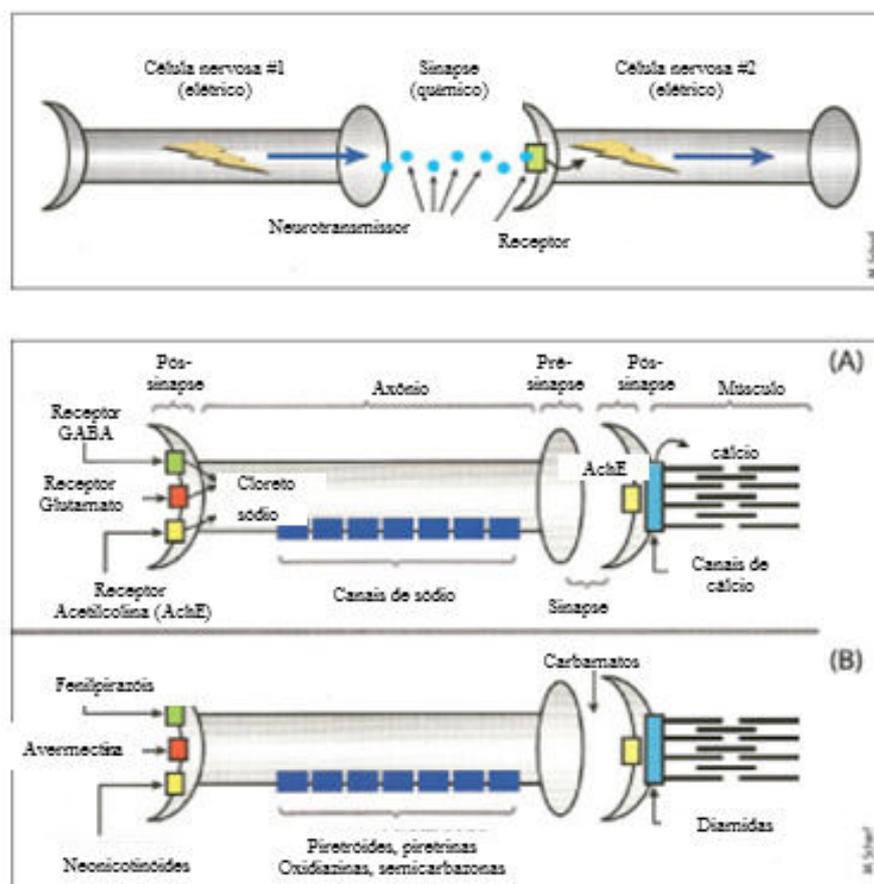


Figura 2.(A) Sistema nervoso do artrópode, (B) Sítios de ação neurológicos de várias classes inseticidas (Adaptado de SCHARF; SUITER, 2011).

Os primeiros carrapaticidas utilizados foram os derivados arsênicos aplicados na forma de banhos de imersão amplamente utilizados no controle do carrapato do boi. O aparecimento de resistência a essa classe de compostos, o estreito limite entre as concentrações eficazes e tóxicas para o gado, e preocupações em relação ao acúmulo de resíduos em animais levou à substituição dos compostos arsenicais pelos inseticidas orgânicos sintéticos na década de 1950 (GRAHAM; HOURRIGAN, 1977 *apud* GEORGE *et al.*, 2004).

A partir do desenvolvimento de resistência aos arsenicais surgiram os organoclorados que foram os primeiros inseticidas orgânicos sintéticos a serem produzidos e vários foram formulados para o controle do carrapato bovino. O Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) e hexaclorobenzeno (HCB) foram os primeiros a serem utilizados (COBBETT, 1947; MAOUNDER, 1949; WHITNALL *et al.*, 1951 *apud* GEORGE *et al.*, 2004). Dieldrin e ciclodienos também foram utilizados, porém a resistência cruzada com organoclorados abreviou a vida útil destes compostos no mercado. Hoje em dia, compostos organoclorados não estão disponíveis no mercado (GEORGE *et al.*, 2004).

Com a resistência aos organoclorados, estes foram substituídos pelos organofosfatados que são quimicamente mais instáveis e não persistentes. No controle do carrapato bovino, etion, clorpirifós, clorfenvinfós e coumafós foram os mais empregados. Os carbamatos, como o carbaril, que possuem o mesmo mecanismo de ação dos organofosfatados, também foram

utilizados. A resistência aos organofosforados e carbamatos minimizou sua utilidade (GEORGE *et al.*, 2004).

A resistência aos organofosforados levou ao desenvolvimento das formamidinas, como clorometiuron e amitraz, que demonstraram eficácia contra o carrapato bovino (GEORGE *et al.*, 1998).

A resistência as amidinas levou ao uso de piretróides. A cipermetrina, deltametrina e flumetrina são exemplos de acaricidas efetivos no controle do carrapato bovino (AGUIRE, *et al.*, 2000).

No final dos anos 90, começaram a aparecer associações de acaricidas no intuito de driblar a resistência aos compostos e atingir adequada eficácia carrapaticida. Combinações de cipermetrina e clorfenvinfós e de deltametrina e etion ainda estão disponíveis no mercado (JONSSON; MATSCHOSS, 1998). No Brasil são comercializadas associações de cipermetrina e diclorvos e de cipermetrina e clorfenvinfós (FURLONG, 1999).

Com o surgimento de resistência cruzada dos piretróides com DDT retomou-se o uso das amidinas. O reaparecimento de resistência às amidinas estimulou o desenvolvimento de novos produtos como as lactonasmacrocíclicas, os fenilpirazóis, as benzoilfenilureas e as spinosinas (CORGOZINHO, 2008).

Dentre as lactonas macrocíclicas com atividade acaricida destacam-se a ivermectina, doramectina e moxidectina administradas por via subcutânea (CAPRONI *et al.*, 1998). E também ivermectina, abamectina, eprinomectina, doramectina e moxidectina em formulações “pour-on” (DAVEY; GEORGE, 2002).

Na classe das benzoilfenilureas, o fluazuron apresenta atividade específica contra carrapatos (TAYLOR, 2001). Apresenta alta lipofilicidade, ligando-se a gordura, e sendo excretado no leite. Sendo assim, é necessário um tempo maior para o abate e consumo humano após o tratamento com fluazuron. (BULL *et al.*, 1996).

As spinosinas, representada pelo spinosad, apresentam modo de ação único que envolve rompimento da ligação da acetilcolina aos receptores nicotínicos na célula pós-sináptica (WARE, 2000). Apresenta uma maior eficácia sobre as formas de ninfa e larva em comparação com as formas adultas, e excelente proteção contra reinfestações (DAVEY; GEORGE; SYNDER, 2001).

Na classe dos fenilpirazóis, o FIP é um carrapaticida que apresenta eficácia acima de 99% aplicado na forma de “pour-on” e proteção contra reinfestação similar por oito semanas após tratamento (DAVEY *et al.*, 1998).

Pode-se verificar que a introdução de novas moléculas com ação antiparasitário controlado carrapato bovino é, na maioria das vezes, impulsionada pelo desenvolvimento de resistência do carrapato aos compostos químicos, buscando outros alvos terapêuticos e novos mecanismos de ação. É importante salientar que essas moléculas inovadoras em sua quase totalidade foram desenvolvidas para utilização como praguicidas no controle de pragas na agricultura e posteriormente introduzidas no mercado veterinário para utilização como carrapaticidano controle do carrapato bovino. Além do mecanismo de resistência outros fatores secundários incentivam a busca de inovações como o aumento da eficácia, a redução da toxicidade, redução do efeito residual no ambiente, maior segurança, maior estabilidade, períodos mais curtos de metabolização e biodegradação reduzindo os períodos de carência para abate (CORGOZINHO, 2008).

A venda e o uso de ectoparasiticidas para o controle de parasitas artrópodes de animais domésticos constituem o maior setor do mercado global de saúde animal. O controle da infestação de ectoparasitas de importância veterinária ainda se baseia intensamente no uso de substâncias que tem como alvo o sistema nervoso dos artrópodes. Essas substâncias sofrem

alguns inconvenientes como o desenvolvimento de resistência e preocupações em relação à segurança humana e ambiental. A busca por tecnologias mais seguras é dificultada pelo número limitado de sítios ativos dos artrópodes e pelo alto custo das pesquisas que envolvem o desenvolvimento de compostos com novos mecanismos de ação. O tamanho limitado do mercado de saúde animal juntamente a problemas relacionados à resistência e efeitos adversos de compostos acaricidas levou à introdução de poucos produtos com novos mecanismos de ação nos últimos anos. Entretanto, tem-se notado avanços no desenvolvimento de novos métodos de aplicação que além de possibilitarem facilidade de uso, promovam um tempo de ação prolongado ou um aumento do espectro de ação (TAYLOR, 2001).

Métodos tradicionais no tratamento contra carrapato bovino envolvem sistemas de liberação de acaricidas na forma de concentrados emulsionáveis, pós molháveis ou produtos fluidos que podem ser diluídos em água e aplicados sobre o animal sob a forma de pulverização manual ou banhos em banheiros de imersão. Formas farmacêuticas como “pour-on”, bolus intraruminal, brincos e formulações injetáveis constituem novas possibilidades de tratamento com acaricidas. Esta última forma é uma das preferidas pelos proprietários pela facilidade de aplicação e baixo risco de contaminação ambiental e intoxicação do aplicador. A eficácia de um acaricida aplicado sobre o bovino para controle do carrapato depende não somente do grau de toxicidade do composto, mas também da qualidade, quantidade e grau de dispersão do princípio ativo depositado sobre o animal ou liberado internamente. Seja qual for o método de tratamento empregado, a adesão ao procedimento pelo produtor é essencial para maximizar o grau de controle do carrapato (GEORGE *et al.*, 2004).

2.4 Fipronil

Ofipronil, (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil) fenil]-4-[(trifluorometil) sulfinil]-1Hpirazol-3-carbonitrila) é um inseticida pertencente à classe dos fenilpirazóis (TINGLE *et al.*, 2003). Sua estrutura química está representada na Figura 3. Foi descoberto pela Rhône-Poulenc Ag Company em 1987, apresentado em 1993 (THE PESTICIDE MANUAL, 2000) e registrado nos Estados Unidos em 1996 (WARE, 2000). Apresenta alta efetividade contra gafanhotos, mosquitos, pulgas e carrapatos tanto nos estágios larvais quanto no estágio adulto (CHANTON *et al.*, 2001; AAJOURD *et al.*, 2003). Devido ao seu amplo espectro de ação possui recomendações de uso agrícola, saneante, veterinário (controle de pulgas e carrapatos em animais) e domissanitário (controle de baratas e formigas) (PESTICIDE ACTION NETWORK, 2006).

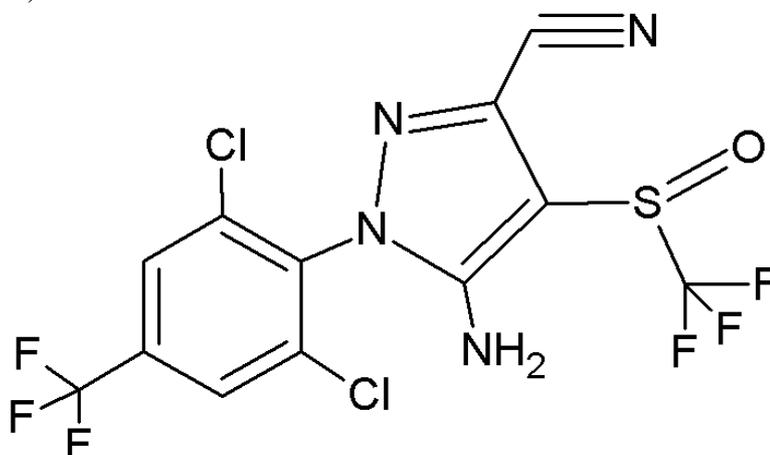


Figura 3. Estrutura química do fipronil

O FIP é amplamente utilizado no controle de vários insetos domésticos e pragas agrícolas e formulado como isca, spray e granulado. No ambiente, sua dissipação exibe baixa a moderada persistência e pode ser explicada pela combinação de processos de fotólise, hidrólise, sorção e volatilização. São cinco os produtos de degradação dependendo do modo de dissipação; fipronil-sulfona, fipronil-sulfide, fipronil-desulfinil, fipronil-amida e fipronil-detrifluorometilsulfinil (GUNASEKARA *et al.*, 2007). Vários estudos demonstram o comportamento de distribuição do FIP no solo (BOBE *et al.*, 1997; BOBE *et al.*, 1998; TINGLE *et al.*, 2003), na água (DEMCKE; SKROBIALOWSKI, 2003; AAJOUND *et al.*, 2003; RHÔNE-POULENC AG COMPANY, 1998) e no ar (NGIM; CROSBY, 2001).

No diz respeito as suas propriedades físico-químicas, sua solubilidade em água é baixa a moderada, preferindo matrizes lipofílicas (orgânicas) como lipídeos, óleos, proteínas e solventes orgânicos. É estável em temperatura ambiente, mas não é estável na presença de íons metálicos e é degradado pela luz solar produzindo uma variedade de metabólitos um dos quais o fipronil-desulfinil que é extremamente estável e mais tóxico que o composto de origem (AAJOUND *et al.*, 2003).

2.4.1 Farmacodinâmica, farmacocinética e toxicidade

Por ser um inseticida de “nova geração”, o FIP não segue as vias bioquímicas comuns aos piretróides (bloqueadores de canais de sódio), organofosfatos e carbamatos (inibidores da colinesterase) que são inseticidas clássicos aos quais alguns insetos já desenvolveram resistência (AAJOUND *et al.*, 2003). Seu mecanismo de ação está envolvido com o bloqueio da transmissão de sinal pela inibição do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA) presente no inseto (RAUGH, *et al.*, 1990). Ligam-se aos canais de cloreto inibindo o fluxo dos íons Cl^- para o interior da célula nervosa resultando na excitação excessiva do sistema nervoso, paralisia severa e morte do inseto (AAJOUND *et al.*, 2003; BOBE *et al.*, 1998; GANT *et al.*, 1998; POSTAL, *et al.*, 1995).

Os metabólitos sulfeto, sulfona e desulfinil também atuam no receptor GABA e são biologicamente ativos, enquanto que fipronil amida não tem nenhuma ação no sítio receptor GABA e não é considerado um metabólito ativo (FENET *et al.*, 2001). Os produtos de degradação do FIP são altamente tóxicos para invertebrados. Fipronil-sulfona, metabólito biológico primário do FIP, apresenta atividade até vinte vezes maior sobre os canais de cloreto de mamíferos quando comparado com dos insetos. É considerado seis vezes mais potente que o FIP no bloqueio dos canais de cloreto dos vertebrados, porém demonstra toxicidade similar ao composto de origem em mamíferos. O fipronil-desulfinil é extremamente estável e mais tóxico que FIP. Estudos metabólicos mostram que há um potencial de bioacumulação do desulfinil em tecidos gordurosos (PESTICIDE ACTION NETWORK, 2006).

O FIP quando administrado por via oral em mamíferos é absorvido pelo trato gastrointestinal e rapidamente metabolizado. É amplamente distribuído, possui uma meia vida mais longa, um percentual elevado do produto fica armazenado nos tecidos dos animais, principalmente em tecidos gordurosos, sendo liberado mais lentamente. A concentração máxima no sangue ocorre de 4 a 6 horas após sua ingestão e começa declinar lentamente (processo de eliminação lento). A excreção do FIP e de seus metabólitos após administração oral ocorre principalmente pelas fezes (45-75%) e em menor quantidade pela urina (5 a 25%) (COUTINHO *et al.*, 2005; DEFRA, 1999; U.S. EPA, 1996).

Em ratos, o FIP é rapidamente metabolizado e seus resíduos são distribuídos para os tecidos, principalmente gordura, onde ficam retidas quantidades significativas uma semana após administração oral (TINGLE *et al.*, 2003). Estudos demonstraram altas concentrações de FIP no estômago, trato gastrointestinal, gordura e adrenais após dose única oral. Níveis

moderados foram encontrados no pâncreas, fígado, tireóide e ovários. E baixos níveis presentes no músculo, cérebro e coração (U.S. EPA, 1996).

Em estudos em ratos, apresentou tempo de meia-vida em sangue total após administração oral na dose de 4 mg/Kg de 6,2 a 8,3 dias. O aumento da dose para 150 mg/Kg levou a uma diminuição significativa do tempo de meia-vida para 2,1 a 2,3 dias (U.S. EPA, 1996). Tempos de meia vida de 150 a 245 horas já encontrados no sangue refletem a liberação lenta de resíduos da gordura e podem sugerir um potencial de bioacumulação de produtos de metabolização do FIP. Estudos de resíduo em carne bovina demonstraram $t_{1/2}$ de 18 dias. Baseados nesses estudos o tempo requerido para liberação para abate após tratamento com FIP é de 21 dias. (TINGLE *et al.*, 2003).

São poucos estudos sobre a capacidade do FIP ser metabolizado nos vertebrados. Estudos *in vivo* com mamíferos indicam que a via metabólica primária para FIP envolve a formação oxidativa de metabolitos sulfona. Estudos recentes com microsomas hepáticos humanos e isoformas do citocromo P450 (CYP) recombinantes demonstraram que a formação de sulfona é quase exclusivamente o resultado da atividade da CYP3A4, o metabolismo, embora limitado pela CYP2C19 também foi relatado. O metabolito sulfona, bem como o produto da fotodegradação, o fipronil-desulfonil, foram relatados como sendo mais tóxicos para os insetos, mamíferos, peixes e aves do que o composto FIP. A capacidade de produtos químicos para induzir enzimas metabólicas, incluindo CYP, tem sido considerada uma das respostas bioquímicas mais sensíveis para gerar toxicidade, uma vez que é mais comum que ocorra doses menores da substância química do que aquelas desconhecidas por causar efeitos tóxicos ou letais. Estudos recentes com hepatócitos humanos e de rato têm demonstrado que os praguicidas são capazes de induzir muitas enzimas metabólicas nestas células (DAS *et al.*, 2006).

Estudos com ratos mostraram que o FIP e o fipronil sulfona são significativamente mais tóxicos para hepatócitos do que outras classes de pesticidas. O FIP é um substrato da CYP3A4 e tem potencial significativo para induzir a CYP1A1 e CYP3A4, resultando em um aumento da interação entre uma ampla gama de xenobióticos e hormônios endógenos. Por causa da ausência de dados farmacocinéticos do FIP tanto em baixo nível de exposição quanto a longo prazo, é difícil chegar a conclusões sobre os potenciais riscos de exposição ao FIP para a população humana (DAS *et al.*, 2006).

Alguns autores consideram que o FIP possui uma ampla margem de segurança em virtude da diferença estrutural do receptor GABA dos invertebrados e dos vertebrados, apresentando especificidade bem maior pelos canais dos insetos, sendo bem mais tóxicos para estes parasitos do que para os mamíferos (HAINZL *et al.*, 1996; TINGLE *et al.*, 2000; MATSUDA *et al.*, 2001; PAYNE *et al.*, 2001; HOVDA; HOOSER, 2002). Isto justifica sua segurança em vertebrados e a aprovação do seu uso em cadelas e gatas gestantes ou em lactação e, em filhotes a partir de dois dias de idade, na forma de spray. (ANDRADE; SANTARÉM, 2002).

Ensaio de toxicidade demonstraram que FIP é considerado moderadamente tóxico por ingestão com DL_{50} oral de 97 mg/Kg em ratos e DL_{50} de 95 mg/Kg em camundongos. A aplicação tópica é pouco tóxica com uma DL_{50} maior que 2000 mg/Kg em rato e 354 mg/Kg em coelhos devido a sua baixa penetrabilidade dérmica (GUNASEKARA *et al.*, 2007; TINGLE *et al.*, 2000; U.S. EPA, 1998). Pode causar leve irritação na pele (categoria IV) e média irritação ocular (Categoria III) que geralmente desaparece em 24 horas. É moderadamente tóxico por inalação com CL_{50} de 0,390 a 0,682 mg/L em ratos. Sua toxicidade crônica foi avaliada a partir da administração de FIP na dieta de ratos por 52 semanas. A menor dosagem a apresentar efeito tóxico foi de 0,059 mg/Kg/dia para machos e 0,078 mg/Kg/dia para fêmeas. Dentre os efeitos observados incluem aumento da incidência de

convulsões e morte, alteração proteica e alterações nos níveis do hormônio tireoidiano (U.S. EPA, 1998).

Um estudo relacionado com a toxicologia crônica do FIP oral em cães Beagle, empregou $0,05\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, $2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ e $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, cada grupo composto por oito animais. Foi reportada morte de quatro dos oito animais que receberam a dose mais elevada. Nenhum sinal de toxicidade foi observado na dose mais baixa, na dose intermediária dois animais exibiram redução no consumo de alimento nas quatro primeiras semanas pós-tratamento. Os cães tratados com a dose mais elevada, nas três primeiras semanas pós-tratamento apresentaram sinais de toxicidade, foram perda de apetite, postura curvada e inatividade. Mais sinais, sugestivos para toxicidade foram relatados nesta dose durante as primeiras sete semanas, dentre eles, convulsões, tremores no corpo e balançar de cabeça. Os estudos hematológicos e de urinalise não mostraram alterações (ACP, 1999).

Segundo estudos, o maior problema que se tem com a utilização do FIP é que quando ingerido, seus resíduos podem ser depositados nas células do tecido adiposo, acarretando, conseqüentemente, uma acumulação ao longo da cadeia trófica, efeito ecotóxico (GUNASEKARA *et al.*, 2007; TINGLE *et al.*, 2003). Dessa forma, ficou comprovado que o FIP causa alterações no sistema nervoso dos organismos, porém estudos recentes têm mostrado que a sua ação, assim como de outros inseticidas e agrotóxicos, pode chegar, também, a outros órgãos e sistemas como, por exemplo, o caso da detecção de efeitos carcinogênicos no fígado e tireóide (HURLEY *et al.*, 1998).

Ensaio de carcinogenicidade em ratos demonstraram que administração de FIP na dieta em doses de 300 ppm por aproximadamente dois anos levaram a um aumento da incidência de células foliculares tumorais benignas e malignas na glândula tireóide para ambos os sexos. Baseado nesses estudos foi classificado no grupo carcinogênico C (possível carcinogênico humano). No entanto não há registros até o momento de efeitos carcinogênicos do FIP em humanos (U.S. EPA, 1998).

O FIP foi associado a efeitos reprodutivos em 95,4% dos ratos alimentados continuamente com 300 ppm de FIP na dieta. Com base em sinais clínicos de toxicidade, redução do tamanho da ninhada, diminuição do peso corporal, diminuição da percentagem de acasalamento dos animais, redução no índice de fertilidade, redução da pós- sobrevivência implantação e sobrevivência descendentes pós-parto e atraso no desenvolvimento físico foram observados (U.S. EPA, 1998).

2.4.2 Formas farmacêuticas de uso veterinário

Em medicina veterinária, o FIP é usado no tratamento e controle de ectoparasitos em cães e gatos (TAYLOR, 2001) e em bovinos. Para aplicação em cães e gatos com indicação contra pulgas (*Ctenocephalides felis felis*) e carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*), o FIP está disponível no mercado brasileiro sob forma de “spot-on” (Frontline® Top Spot e Fiprolex® Drop Spot) e sob a forma de spray (Frontline® Spray). Também está disponível em associação com metoprene sob a forma de “spot-on” (Frontline® Plus Top Spot). Para aplicação em bovinos estão disponíveis duas formulações: uma na forma de “pour-on” (Topline®) com indicação contra *R. (B.) microplus*, mosca do chifre (*Haematobia irritans*) e berne (*Dermatobia hominis*) e outra na forma de spray (Topline® Spray) com indicação para o tratamento preventivo e curativo de bicheiras (*Cochliomyia hominivorax*).

Devido sua alta lipofilicidade, quando aplicado topicamente, aparentemente se espalha pelo corpo, se difundindo para as glândulas sebáceas dos folículos pilosos (BIRCKEL, *et al.*, 1998). Estudos realizados após aplicação de formulação “spot on”, demonstraram que o FIP é amplamente distribuído no estrato córneo, epiderme e unidades pilos sebáceas, mas não na

derme e hipoderme. Nas unidades pilossebáceas se localiza preferencialmente nas glândulas sebáceas e ao redor dos pêlos, sendo liberado lentamente pelos ductos foliculares. A distribuição do FIP através da epiderme e das unidades pilossebáceas permite seu armazenamento nas glândulas sebáceas e sua gradual liberação via ductos foliculares. A migração do FIP é atribuída a um processo chamado translocação, que consiste numa difusão passiva através das secreções sebáceas presentes nos pêlos e na pele (TANNER *et al.*, 1997). Isso caracteriza um sistema fisiológico que permitiria liberação prolongada possibilitando em tese um aumento do período de proteção contra reinfestação por ectoparasitos.

Fármacos com esta característica geralmente possuem ação ectoparasiticida tópica, ou seja, que em contato com o ectoparásita consegue através das aberturas naturais do exoesqueleto dos parasitos penetrarem e atingir o sistema nervoso destes invertebrados. Desta forma, fármacos com características de ação tópica funcionam sobre os ectoparasitas hematófagos e não hematófagos.

Em contra partida se o mesmo fármaco for aplicado pela via sistêmica só irá ter ação sobre os ectoparasitas hematófagos, o que não deixa de ser um fator de relevância visto que os principais ectoparasitas são hematófagos. Consequentemente através de seu processo alimentar estarão ingerindo sangue do hospedeiro que contém o fármaco. Entretanto, esta via de aplicação apresenta algumas vantagens em relação à via tópica, como a preferência do proprietário e/ou veterinário pelo método de aplicação injetável e a questão do impacto ambiental. Outra vantagem está correlacionada com o fato de que produtos de uso tópico podem deixar resíduos nos pêlos do animal por um longo período de tempo. Este fato já comprovado cientificamente tem levantado grandes discussões sobre a transferência passiva destes fármacos quando do contato entre o animal e o homem. Fato este cada vez mais relevante no que diz respeito à exposição crônica do homem frente a fármacos que possam ter ação deletéria para o seu organismo. Portanto o uso sistêmico de um fármaco para o controle de ectoparasitos poderia minimizar esta exposição.

Além disso, produtos de uso tópico estariam mais expostos à degradação ambiental. Por exemplo, frente à ação da chuva com remoção mecânica do fármaco do pelame do animal e pela ação da incidência da luz solar que promove degradação de fármacos fotossensíveis. No caso específico do FIP, sabe-se que este sofre fotólise e hidrólise alcalina. Davey *et al.* (1999) demonstraram que o tempo de persistência contra reinfestação após uma única aplicação do FIP “pour-on” reduz significativamente com exposição à luz solar.

2.4.3 Eficácia

É usado no tratamento e controle de infestações por pulga e carrapatos em cães e gatos (TAYLOR, 2001). Também já demonstrou atividade contra *Sarcoptes scabiei* (CURTIS, 1996) *Otodectes cyanotis* (VINCHENZI; GAUCHI, 1997), *Trombiculacheyletiella* spp. (NUTTALL *et al.*, 1998) e *Trichodectes canis* (COOPER; PENALIGGON, 1996). Existem evidências que o FIP produz um efeito “knock-down” extremamente rápido que ocorre antes que as pulgas consigam se alimentar o que é interessante no caso de dermatite alérgica (CURTIS, 1999).

A formulação spray elimina os parasitos em até 48 horas, começa a exercer sua ação adulticida por contato e muitos ectoparasitos são mortos antes de se alimentarem (TANNER *et al.*, 1997). Quando os pelos dos animais tratados caem no ambiente exercem significativo controle sobre as formas imaturas (HUNTER *et al.*, 1994).

Davey *et al.*, (1998) demonstraram que o FIP aplicado sob a forma “pour-on” em tratamento único em bovinos infestados com *R. (B.) microplus* apresentou diminuição do

número, fecundidade e fertilidade das fêmeas ingurgitadas, sendo que na concentração de 1%, produziu uma proteção de 100% contra reinfestação larval por oito semanas após aplicação do tratamento no teste de estábulo. Entretanto, isto não foi observado em concentrações inferiores a 1%, indicando que tanto a eficácia carrapaticida quanto a persistência contra reinfestação foram dose dependente. Já em teste de campo com exposição à luz solar e ao tempo, objetivando controlar a infestação por *Boophilus annulatus* o tempo de persistência contra reinfestação após uma única aplicação do produto “pour-on” reduziu para duas a três semanas. Esse estudo também indicou que a repetida aplicação de FIP 1% em bovinos criados em pastagem foi altamente eficaz no controle, protegendo contra reinfestação larval, obtendo um intervalo entre as aplicações que variaram de seis a 13,5 semanas, e um ganho de peso dos animais tratados com FIP significativamente mais elevado em relação aos animais controle (DAVEY *et al.*, 1999).

Herrera e Izaguirre (2008) comprovaram eficácia de 90% contra o carrapato dos bovinos *R. (B.) microplus* e a mosca *H. irritans* através de aplicações tópicas do FIP 1%. Em outro estudo realizado por Bianchin *et al.*, (1997) para verificação da eficácia do FIP na concentração de 1%, formulação “pour on” sobre *H. irritans* em bovinos obtiveram um resultado de controle da mosca de 100% na primeira semana após o tratamento e um declínio para 62% na 5ª semana após tratamento.

Moya-Borja e Salani (1997a) avaliando a eficácia do FIP “pour-on” no controle das infestações naturais das larvas de *Dermatobia hominis*, em bovinos, indicaram que houve mortalidade de 98,7% das larvas de *D. hominis* um dia após o primeiro tratamento, elevando para 100% duas semanas pós-tratamento.

A avaliação do FIP na prevenção da infestação por larvas de *Cochliomyia hominivorax* em bovinos também já foi estudada, demonstrando eficácia de 96,6% após uma única aplicação do produto (MOYA-BORJA; SALANI, 1997b). Outro estudo demonstrou o efeito profilático de 95% e eficácia curativa de 100% do FIP “pour-on” 1% em miíases pós-castração causadas por *C. hominivorax* em bovinos (LIMA *et al.*, 2004).

2.5 Farmacocinética Clínica

Uma hipótese fundamental da farmacocinética clínica é que existe uma relação entre os efeitos farmacológicos de um fármaco e sua concentração na circulação sanguínea. Em outras palavras, a ação terapêutica de um fármaco é dependente de uma concentração eficaz deste no local de ação por um período de tempo. Uma vez que a concentração do fármaco no local de ação está em equilíbrio com a sua concentração na circulação sanguínea, para a maioria dos fármacos, a determinação da concentração no sangue, soro ou plasma se torna sua medida no local de ação, sendo a forma mais direta e objetiva para sua avaliação farmacocinética. O plasma é mais utilizado, já que o sangue total contém um número elevado de elementos celulares (células vermelhas e brancas, plaquetas e proteínas). O plasma inunda todos os tecidos corpóreos inclusive os elementos celulares. Considerando que o fármaco se encontra em equilíbrio dinâmico entre o plasma e os tecidos, alterações nas concentrações plasmáticas refletem na concentração tecidual (SHARGEL *et al.*, 2004).

O monitoramento do perfil de concentração do fármaco em função do tempo em um fluido fisiológico adequado permite a determinação de sua biodisponibilidade (fração do fármaco absorvido na circulação sanguínea), avaliando o efeito farmacológico em solução nos fluidos biológicos do local de absorção, sua estabilidade, permeabilidade e metabolismo pré-sistêmico sobre a velocidade e extensão de absorção (GOODMAN; GILMAN, 2003). O perfil de concentração em função do tempo também fornece informações sobre outros parâmetros farmacocinéticos, como distribuição (medida do espaço do organismo disponível para conter

o fármaco) e depuração (medida da eficiência da eliminação do fármaco pelo organismo). O método mais comumente utilizado para avaliação de biodisponibilidade envolve a construção de uma curva de concentração plasmática sanguínea em função do tempo (AULTON, 2005).

A partir da construção de uma curva de concentração plasmática alguns parâmetros farmacocinéticos podem ser determinados como o pico de concentração plasmática (C_{max}), tempo correspondente ao pico plasmático (t_{max}), área sob a curva (AUC), e meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) (SHARGEL *et al.*, 2004).

O C_{max} representa o máximo da concentração plasmática obtida após administração do fármaco. Para a maioria dos fármacos, existe uma relação entre o efeito farmacodinâmico e concentração plasmática. Esse parâmetro indica se o fármaco é suficientemente absorvido sistemicamente para prover uma resposta terapêutica ou até mesmo atingir possíveis níveis tóxicos. É expresso em unidades de concentração (mg/mL, ng/mL) (SHARGEL *et al.*, 2004).

O t_{max} corresponde ao tempo requerido para o fármaco alcançar o máximo de concentração após administração. No t_{max} , ocorre o pico de absorção e a taxa de absorção é exatamente igual a taxa de eliminação do fármaco. A absorção do fármaco continua após atingir o t_{max} , porém com uma taxa menor. É expresso em unidade de tempo (horas, minutos) (SHARGEL *et al.*, 2004).

A AUC é a medida da extensão da biodisponibilidade do fármaco. Reflete a quantidade total de fármaco ativo que atinge a circulação sistêmica. Pode ser determinada por um procedimento de integração numérico, como o método da regra do trapezóide. É expressa em unidades de concentração por tempo (mg. h. mL⁻¹) Para a maioria dos fármacos, a AUC é diretamente proporcional a dose (SHARGEL *et al.*, 2004).

A $t_{1/2}$ mede a taxa de remoção do fármaco absorvido na circulação sistêmica. É o tempo necessário para que as concentrações plasmáticas sejam reduzidas em 50%. É expressa em unidades de tempo (minutos, horas) (SHARGEL *et al.*, 2004).

A eficácia clínica de um determinado fármaco depende da liberação do mesmo a partir da forma farmacêutica, ou seja, a formulação influencia diretamente na biodisponibilidade do fármaco. Por consequência, estudos de curva de concentração plasmática de fármacos a partir da forma farmacêutica são cruciais na avaliação do desempenho de novas formulações.

Um estudo de curva de concentração plasmática a partir da administração subcutânea do FIP permite a avaliação de parâmetros farmacocinéticos, fornecendo informações cruciais que correlacionadas com resultados de estudos de eficácia podem dar suporte para o desenvolvimento de uma nova formulação para o controle do carrapato bovino. Para a obtenção de uma descrição exata da curva de concentração plasmática de um fármaco é crucial a utilização de um método analítico validado.

2.6 Metodologia Analítica para Determinação do Fipronil

2.6.1 Métodos de extração

A análise de matrizes complexas como o plasma animal requer etapas de extração e eliminação de impurezas além da medida da concentração do analito de interesse em um instrumento (COLLINS, 2006). O pré-tratamento de amostras biológicas, que abrange as etapas de extração, pré-concentração e purificação, tem sido requerido nas análises cromatográficas de fármacos, para eliminar interferentes (compostos endógenos ou outros fármacos administrados concomitantemente com os analitos) e aumentar a sensibilidade e seletividade analítica (QUEIROZ; LANÇAS, 2005).

Dentre as técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes no fluido biológico estão: Extração Líquido-Líquido (ELL), Extração em

Fase Sólida (EFS), Micro Extração em Fase Sólida (MEFS), Dispersão de Matriz em Fase Sólida (DMFS) e Extração com Fluido Supercrítico (EFSC).

A técnica de ELL é considerada uma técnica clássica de preparação de amostra e tem sido ainda muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em fluidos biológicos, pois extratos bastante limpos podem ser obtidos com alta seletividade para alguns analitos (QUEIROZ *et al.*, 2001). Na ELL ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. A ELL apresenta as vantagens de ser simples e poder utilizar um grande número de solventes puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade (QUEIROZ *et al.*, 2001).

No entanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, quando as amostras possuem grande afinidade pela água, e são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito. A utilização de solventes ultrapuros é requerida, uma vez que impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra. O grande volume de solvente utilizado acaba gerando problemas de descartes, além de ser um processo suscetível a erros e de difícil automação.

A EFS é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica. É uma técnica que apresenta vantagens quando comparada aos métodos clássicos como ELL e Soxhlet no diz respeito a gasto de solvente e tempo. Pode ser utilizada tanto para o isolamento do analito quanto para o isolamento da matriz. Quando se deseja isolar o analito, utiliza-se fase estacionária que tenha capacidade de reter o analito que será posteriormente eluído com solvente que tenha força eluotrópica suficiente para carregá-lo. Esse tipo de operação possibilita a remoção dos interferentes (que não tem afinidade pela fase estacionária) e também a concentração do analito a partir da adição de grandes volumes de amostras e eluição com volumes reduzidos de solvente. É o modo de operação em EFS mais indicado para extração de analitos em matrizes muito diluídas como água e também análise de resíduos em alimentos e plasma. Para melhores resultados em EFS é necessário trabalhar com algumas etapas essenciais. Primeiramente o condicionamento do cartucho que consiste na passagem de solvente apropriado para ativação da fase estacionária. Posteriormente, segue-se a etapa de adição da amostra que deve ser feita de forma quantitativa em fluxo lento para melhores resultados de recuperação. Em seguida, realiza-se a etapa de remoção dos interferentes também chamada de lavagem que deve ser feita com solvente que não remova o analito. E finalmente a eluição do analito que deve ser feita com solvente de maior força de eluição preferencialmente com pequenos volumes para evitar a diluição do analito (LANÇAS, 2004).

Os mecanismos de separação disponíveis para EFS são os mesmos encontrados na cromatografia líquida, adsorção, partição (normal e reversa), troca iônica e exclusão por tamanho. Existe uma grande variedade de fases sólidas disponíveis no mercado. Dentre elas estão as fases polares como sílica gel, alumina e florissil; as apolares como octadecil (C18), octil (C8), ciclohexil, fenil e ciano; e iônicas como ácido carboxílico, ácido sulfônico, amino (NH₂) e amina quaternária. Mais recentemente foram desenvolvidas as fases especiais como as de reconhecimento molecular, as fases mistas e as fases poliméricas. As primeiras são indicadas para separação e isolamento de metais. As fases mistas utilizam duas ou mais fases com mecanismos distintos como, por exemplo, C18 e NH₂, levando à melhores resultados de recuperação em análises de multirresíduos. Já as fases poliméricas são baseadas em poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) e apresentam vantagens em relação às colunas de sílica de fase ligada já que possuem maior seletividade, possibilidade de utilização em toda a faixa de

pH e com todos os solventes, a recuperação não é afetada pelo tempo de secagem entre as etapas da extração, resultando em melhores resultados de precisão e recuperação. O formato mais popular em EFS é o cartucho, mas outros formatos como discos, fibras e placas também são empregados (LANÇAS, 2004).

AMEFS foi desenvolvida para contornar problemas da EFS relacionados à dessorção do analito da fase sólida e variabilidade na qualidade do adsorvente de um fabricante para o outro. Baseia-se na sorção dos analitos por uma fibra de sílica modificada quimicamente, com posterior dessorção térmica dos analitos em um cromatógrafo a gás. O mecanismo de extração ocorre a partir do equilíbrio entre a fase aquosa e a fase orgânica estacionária. Seu modo de operação consiste na introdução de um dispositivo que contém a fibra na solução a ser analisada, seguida da exposição da fibra à solução por tempo determinado pelo método. A fibra é então recolhida e o dispositivo removido da amostra. O dispositivo é colocado no interior do cromatógrafo gasoso e a fibra é exposta para ocorrer dessorção térmica transferindo os analitos para a coluna cromatográfica. Apesar de ser considerada uma técnica relativamente simples do ponto de vista instrumental, apresenta limitações de aplicações já que tem uso restrito para amostras em água em determinações apenas por cromatografia gasosa (CG). Além disso, é considerada por alguns pesquisadores e agências reguladoras como técnica semi-quantitativa o que a limita para ser usada como técnica em métodos oficiais (LANÇAS, 2004).

A DMFS utiliza um suporte sólido contendo uma fase quimicamente ligada onde a amostra sofre dispersão formando uma fase mista proporcionando isolamento dos analitos presentes na matriz. O suporte age como abrasivo promovendo rompimento da arquitetura geral da amostra. No caso de uso de fases lipofílicas como C18, esta age como solvente e ajuda na ruptura das membranas celulares. Além disso, a mistura pode ser empacotada em coluna e ser eluída com solvente. Em DMFS o processo de extração acontece em duas etapas: o preparo do cartucho e eluição dos analitos. Para o preparo do cartucho, primeiramente a fase sólida e a amostra são trituradas até formação de uma pasta homogênea. Assim, forma-se um sistema contendo a amostra distribuída uniformemente sobre a superfície da fase sólida. Daí então a coluna é empacotada com a mistura e procede-se a eluição. As fases sólidas utilizadas em DMFS são as mesmas utilizadas em EFS e apresentam o mecanismo de extração semelhante. A proporção ótima para preparo da mistura amostra/ suporte sólido é de 4:1 (m/m). A DMFS tem grande aplicação na extração de analitos de amostras sólidas e semi-sólidas como tecidos biológicos (LANÇAS, 2004).

A EFSC consiste em uma técnica analítica que emprega como solvente extrator um fluido no estado supercrítico. A instrumentação básica empregada em EFSC é simples. Consiste em um sistema de pressurização para elevar a pressão do fluido a valores acima do crítico; um forno capaz de atingir e manter a temperatura desejada na cela de extração; um sistema de restrição para garantir a pressão desejada e controle da vazão do fluido de extração; e um sistema para coletar o extrato. Uma das principais vantagens é decorrente do uso do dióxido de carbono como agente extrator, que possui propriedades como ser atóxico nas condições de uso, não inflamável, fácil de ser obtido e purificado, baixo custo, fácil de ser eliminado ou reaproveitado, permitir a concentração do analito durante a etapa de extração, e permitir análises rápidas. Dentre as limitações do uso da EFSC estão o elevado custo dos equipamentos disponíveis comercialmente e a dificuldade de extração de analitos de polaridade intermediária e elevada (LANÇAS, 2002).

Os métodos descritos na literatura para análise de FIP em matrizes variadas utilizam mais comumente como métodos de extração a ELL (HADJMOHAMMADI *et al.*, 2006; RAVETON *et al.*, 2007) e a EFS em diferentes fases estacionárias (HAINZL *et al.*, 1998;

KADAR; FAUCON, 2006; FAUDER *et al.*, 2007; BICHON *et al.*, 2008; JIMÉNEZ, *et al.*, 2008, LACROIX, *et al.*, 2010). No entanto, MEFS (VILCHEZ *et al.*, 2001), Cromatografia de gel permeação (CGP) (BRENNAN *et al.*, 2009) e DMFS (MORZYCKA, *et al.*, 2002; JIMENEZ *et al.*, 2007; SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2008) também já foram utilizadas.

Como se pode observar, a escolha do método de extração depende das características da matriz e do analito de interesse, e do método analítico utilizado. Levando isso em consideração, em análises por cromatografia líquida (CL) de matrizes como o plasma, as técnicas mais indicadas seriam a ELL e EFS, já que a DMFS é indicada para amostras sólidas e a MEFS é indicada para analitos em água com análise estritamente por CG. Comparando a ELL e EFS, a primeira apresenta vantagens no que diz respeito a gasto de solvente e tempo. Além disso, a EFS ainda apresenta um custo inferior quando comparada a EFSC e MEFS.

2.6.2 Métodos analíticos

Devido seu uso extensivo como pesticida na agricultura, um grande número de trabalhos descreve a determinação do FIP em amostras de água, solo e alimentos. O FIP já foi detectado em amostras de solo e água por CG com detecção por espectrometria de massa (MS) (VILCHEZ *et al.*, 2001, RAVETON *et al.*, 2007), CL com detecção por ultravioleta (UV) (HADJMOHAMMADI *et al.*, 2006) e CG com detecção por captura de elétrons (DCE) (BRENNAN *et al.*, 2009). Sua determinação em amostras de abelhas, mel e pólen também já foi amplamente descrita por CG com detecção por nitrogênio-fósforo (DNF) (MORZYCKA *et al.*, 2002), CL com detecção por espectrometria de massa sequencial (MS/MS) (KADAR; FAUCON, 2006), CG - DCEMS (JIMENEZ *et al.*, 2007; JIMENEZ *et al.*, 2008; SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2008) e CL-UV (TOMASINI *et al.*, 2011). Metodologias para determinação de FIP em amostras de leite por CG-MS/MS (FAUDER *et al.*, 2007) e amostras de tecido animal por CG-DCE (HAINZL *et al.*, 1998) também já foram descritas. No entanto, encontra-se um número reduzido de trabalhos descrevendo a determinação de FIP em amostras de plasma animal por CG-MS/MS (BICHON *et al.*, 2008) e CL-UV-MS (LACROIX *et al.*, 2010).

Em métodos analíticos é comum a utilização do método do padrão interno (PI) onde um composto que não faz parte da amostra (PI) é adicionado em concentrações conhecidas e constantes à amostra antes de efetuar a análise para facilitar a determinação do analito. Desta forma eliminam-se fontes de erro associadas a variações dos processos de injeção e extração. O PI deve ser estruturalmente relacionado com o analito de interesse para assegurar o comportamento similar durante os procedimentos de extração e análise. Para os estudos de curva de concentração plasmática a utilização do PI é recomendada sempre que métodos cromatográficos são utilizados (ANVISA, 2003). O etiprole (Figura 4) é um praguicida pertencente à classe dos fenilpirazóis que difere do FIP estruturalmente por um grupo $-C_2H_5$ ao invés de um $-CF_3$ na função sulfinil (CABONI *et al.*, 2003). Devido a essa semelhança estrutural, já foi utilizado como PI em métodos desenvolvidos para determinação de FIP em plasma animal (LACROIX *et al.*, 2010).

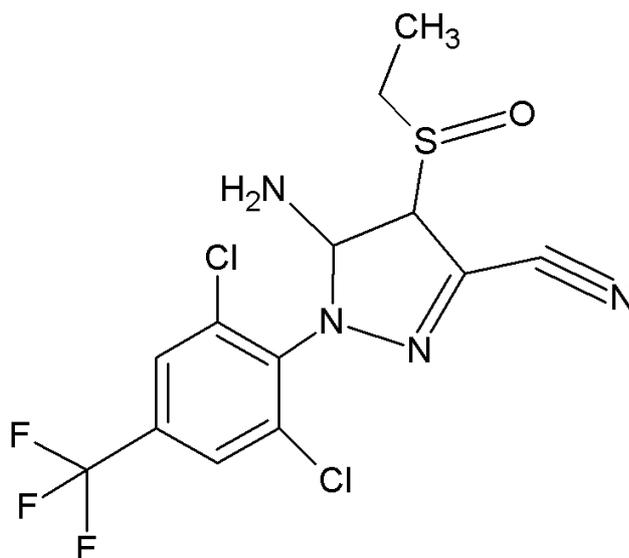


Figura 4. Estrutura química do etiprole

2.7 Validação de Métodos Bioanalíticos

Para confirmação de que um método produz resultados confiáveis e assim ser aplicado em análises de rotina, a validação deste é requerida. Validação é a avaliação da habilidade de um método analítico em produzir resultados consistentes com precisão e exatidão satisfatórias.

Agências reguladoras nacionais e internacionais disponibilizam guias para validação de métodos bioanalíticos (ANVISA, 2003; FDA, 2001; EMEA, 2011). Tais documentos são diretrizes, sendo, portanto passíveis de interpretação e tem sido tema de discussão em conferências e artigos científicos (CASSIANO *et al.*, 2009). Dentre os parâmetros geralmente envolvidos na validação de métodos bioanalíticos estão seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e estabilidade.

A seletividade de um método pode ser definida como a capacidade deste em produzir respostas distintas para cada componente da amostra. Sendo assim, este parâmetro visa garantir que a quantificação do analito de interesse não seja afetada pela presença de metabólitos, produtos de degradação, fármacos co-administrados ou componentes endógenos. A seletividade pode ser comprovada pela comparação analítica entre uma matriz isenta da substância de interesse e uma matriz adicionada de substâncias padrão, sendo que nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção da substância em estudo, ou seja, o pico cromatográfico de resposta seja exclusivamente do composto em estudo.

A capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse é definida como linearidade. Essa relação de proporcionalidade é expressa pela curva analítica, na qual parâmetros estatísticos, como coeficiente de correlação linear (r), obtido a partir da regressão linear da curva, são avaliados a fim de assegurar sua qualidade. De acordo com as normas atualmente em vigor, (ANVISA, 2003; FDA, 2001), se aceita um coeficiente de variação menor ou igual a 20% em relação a concentração nominal para o LIQ e menor ou igual a 15% para as demais concentrações. Além disso, o coeficiente de correlação linear (r) deve ser igual ou superior a 0,98.

A dispersão dos resultados entre ensaios independentes e repetidos de uma mesma amostra representa a precisão do método. Para processos de validação, a precisão é considerada em três níveis distintos: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, quais sejam, mesmo local, procedimento, analista, instrumento e repetições efetuadas em curto intervalo de tempo. A avaliação do efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, ou diferentes analistas, ou diferentes equipamentos, ou uma combinação destes fatores é medida pela chamada precisão intermediária. Tanto a repetibilidade como a precisão intermediária são expressas por meio da estimativa do desvio padrão relativo (DPR). A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas em diferentes laboratórios, portanto sob condições variadas, tais como diferentes operadores, local, equipamentos, entre outros. De acordo com Hartmann *et al.*, (1998), os estudos interlaboratoriais não são necessários quando a precisão intermediária é avaliada ou ainda quando o método não for utilizado por diferentes laboratórios. AANVISA (2003) também não exige a avaliação da reprodutibilidade do método para concessão de registros.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos mais utilizados para este fim envolvem o uso de substâncias químicas de referência (SQR), comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão. O método de recuperação, onde quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis ao branco da matriz, sem a substância de interesse, é avaliada por meio da proporção da quantidade da substância de interesse que é extraída e quantificada em relação à quantidade adicionada.

Os guias do FDA (2001) e da ANVISA (2003) preconizam que a precisão e a exatidão devem ser investigadas pela análise de, no mínimo, três amostras de controle de qualidade (CQ) analisados em cinco replicatas de preparo de amostra, com níveis de concentração baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) em relação ao intervalo de concentração da curva de calibração. As amostras de controle de qualidade devem ser preparadas na mesma matriz biológica para a qual o método foi desenvolvido.

O limite de quantificação (LIQ) representa a menor concentração que o método analítico é capaz de quantificar com precisão e exatidão. É utilizado para demonstrar a habilidade do método em quantificar baixas concentrações de um analito (CASSIANO *et al.*, 2009). Podem ser calculados pela relação sinal-ruído ou a partir dos parâmetros da curva analítica. As diretrizes do FDA (2001) e da ANVISA (2003) aceitam que o LIQ seja determinado com relação à menor concentração do analito que produza uma resposta de, no mínimo, cinco vezes a resposta da linha de base obtida pela amostra branco (CASSIANO, *et al.*, 2009).

Vários tipos de estabilidade devem ser avaliados para assegurar a manutenção da estabilidade do analito nas condições de preparo, análise e estocagem das amostras. Os guias do FDA (2001) e da ANVISA (2003) recomendam a avaliação da estabilidade do analito em solução padrão, e em matriz biológica que incluem estabilidade de ciclo de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade pós-processamento e estabilidade de longa duração. Para a ANVISA (2003), as amostras serão consideradas estáveis quando não apresentarem desvio superior a 10% e 15% do valor obtido para as amostras recém-preparadas para as amostras de solução padrão e matriz biológica respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental foi iniciada com a determinação do teor do FIP matéria-prima (FIP-MP) que foi utilizado em todos os ensaios do presente estudo. O FIP-MP foi padronizado frente a uma substância química de referência (S.Q.R.) adquirida comercialmente.

Para dar início aos ensaios de curva de concentração plasmática era necessário um método analítico adequado que assegurasse resultados válidos das concentrações plasmáticas nos tempos analisados. O método analítico para determinação do FIP em plasma bovino foi desenvolvido por CLAE-UV e validado baseado nos parâmetros descritos pela ANVISA, 2003.

Para os estudos de curva de concentração plasmática, FIP foi veiculado em excipientes que lhe conferissem adequada solubilidade e baixa viscosidade para ser administrado pela via subcutânea. Para a escolha dos tempos de coleta do estudo, foi feito um ensaio inicial com um número reduzido de animais.

Antes da execução do ensaio de eficácia carrapaticida *in vivo* do FIP administrado pela via SC foi adicionada uma etapa prévia para selecionar uma população do carrapato *R. (B.) microplus* sensível ao FIP. Foi então realizado um ensaio *in vitro* frente a três populações distintas. Um concentrado emulsionável (CE) a base de FIP foi desenvolvido para a realização do teste *in vitro*. A população mais sensível foi escolhida para ser testada no ensaio *in vivo*.

A avaliação da eficácia carrapaticida do FIP aplicado pela via subcutânea foi realizada com bezerros infestados com o carrapato bovino *R. (B.) microplus* empregando metodologia recomendada para testes carrapaticidas em ruminantes.

3.1 Localização da Experimentação

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Os animais que foram utilizados nos testes controlados de eficácia e curva de concentração plasmática foram mantidos na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W.O. NEITZ desta Instituição.

O desenvolvimento e validação da metodologia analítica para determinação do FIP nos estudos de curva de concentração plasmática foi realizado no setor de Farmacometria do LQEPV.

3.2 Padronização do Fipronil Matéria-prima

A determinação do teor do FIP-MP foi realizada frente a uma SQR adquirida comercialmente (Sigma), utilizando método descrito pelo certificado do fabricante da SQR por CLAE-UV.

3.2.1 Condições cromatográficas

- Sistema Cromatográfico: CLAE Dionex Ultimate 3000
- Coluna: Sunfire – C18 (5µm) 150 x 4,6 mm
- Fase móvel: Acetonitrila: Água (60:40, v/v)
- Comprimento de onda: 220 nm
- Fluxo: 1,40 mL/min

- Volume de injeção: 10 μ L
- Temperatura: 25°C
- Tempo de corrida: 10 minutos

3.2.2 Preparo da solução estoque de fipronil

Foram pesados, com precisão analítica, quantidades equivalentes a 25,00mg de FIP-SQR com teor 97,5% (Sigma-Aldrich Co.) e transferidos para um balão de 25,00mL, cujo volume foi completado com acetonitrila (ACN), resultando em solução estoque (SE) com concentração de 1000 μ g/mL.

3.2.3 Preparo da curva padrão

A partir da SE de 1000 μ g/mL, descrita no item acima, foram preparadas diluições com ACN, obtendo-se soluções com concentrações de FIP de 0,04; 0,1; 1; 10; 50 e 100 μ g/mL que foram analisadas utilizando condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.

3.2.4 Preparo da solução amostra

Uma quantidade equivalente a 25,00mg de FIP-MP foi pesada analiticamente, transferida para um balão de 25,00 mL, cujo volume foi completado com ACN, resultando em solução com concentração de 1000 μ g/mL. Uma alíquota de 200 μ L foi transferida para um balão volumétrico de 5,00mL, cujo volume foi completado com ACN e obteve-se uma solução de concentração de 40 μ g/mL. As soluções foram preparadas em triplicata e analisadas utilizando condições cromatográficas descritas no item 3.2.1. Após padronização do FIP-MP, este foi utilizado nos ensaios subsequentes.

3.3 Desenvolvimento da Metodologia Analítica para Quantificação do Fipronil em Plasma Bovino por CLAE-UV

3.3.1 Preparo da solução mãe de fipronil

Foram pesados, com precisão analítica, quantidades equivalentes a 25,0 mg de FIP com teor 95,55% e transferidos para um balão volumétrico de 25,00mL, cujo volume foi completado com ACN resultando em solução mãe (SM) com concentração de 1000 μ g/mL.

3.3.2 Preparo da solução mãe de padrão interno

O etiprole (Sigma-Aldrich Co.) foi utilizado como PI. Foram pesados, com precisão analítica, quantidades equivalentes a 5,0 mg de PI com teor 98,2% e transferidos para um balão volumétrico de 10,00mL, cujo volume foi completado com ACN, resultando SM com concentração de 500 μ g/mL.

3.3.3 Preparo da curva de calibração do padrão analítico

A partir da SM de FIP foram feitas diluições para obtenção de concentrações finais de 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000 e 10000 ng/mL. O PI foi adicionado às soluções na concentração final de 2500 ng/mL.

3.3.4 Preparo das amostras de controle de qualidade

O sangue foi coletado de bovinos que não foram submetidos a tratamento com antiparasitários por um período de no mínimo três meses. Para a coleta do sangue foram utilizados tubos heparinizados de 10 mL com vácuo. Os animais foram contidos e o sangue coletado através de punção venosa profunda da jugular. O plasma foi obtido através de centrifugação a 3000 rpm por 10 min a 4°C. O plasma foi então contaminado com solução contendo FIP para obtenção de concentrações finais de 5, 10, 50, 100, 250, 500 e 1000ng/mL.

O etiprole (PI) foi adicionado ao plasma na concentração final de 250 ng/mL. Após contaminação, o plasma foi aliqotado em volumes de 1,00 mL em eppendorfs e acondicionado em freezer (-20°C) até o momento da análise.

3.3.5 Extração das amostras de controle de qualidade

O procedimento de extração da amostra foi realizado utilizando a técnica de EFS. Para tal foram utilizados cartuchos de extração de fase polimérica HLB – Oasis (Waters) acoplados a manifold (Supelco) com capacidade para 12 cartuchos ligados a uma bomba a vácuo (Tecnal) a 10 mm de Hg. Primeiramente os cartuchos foram acondicionados com 2,0 mL de metanol e 2,0 mL de água. Em seguida foram adicionadas 1,0 mL de amostra (plasma) e depois se procedeu a etapa de lavagem utilizando 1,0 mL de água. A eluição foi feita com 1,0 mL de metanol. O eluato foi evaporado a secura a 40°C e reconstituído em 100 µL de acetonitrila. A evaporação do solvente foi realizada utilizando um Evaporador Tecnal TE-0197 (Tecnal).

3.3.6 Condições cromatográficas

- Sistema Cromatográfico: CLAE Dionex Ultimate 3000
- Software: Chromeleon 6.8
- Coluna: Symmetry C18 column (5 µm, 4.6 × 250 mm)
- Pré-coluna: Kromasil C18 (5 µm, 4.6 × 10 mm)
- Fase móvel: Acetonitrila: Água (60:40, v/v)
- Comprimento de onda: 210 nm
- Fluxo: 1,00 mL/min
- Volume de injeção: 10 µL
- Temperatura: 25°C
- Tempo de corrida: 15 minutos

3.4 Validação da Metodologia Analítica para Quantificação do Fipronil em Plasma Bovino por CLAE-UV

A metodologia desenvolvida foi validada avaliando-se parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limite de quantificação baseada nos critérios de aceitação descritos no guia para validação de métodos bioanalíticos (ANVISA, 2003).

3.4.1 Parâmetros cromatográficos

Amostras de controle de qualidade (CQ) em concentração próxima ao LIQ(CQB) foram analisadas utilizando o procedimento e as condições cromatográficas propostas e os parâmetros cromatográficos N (número de pratos teóricos); R (resolução); As (Assimetria) e S/R (relação sinal-ruído) foram avaliados.

3.4.2 Seletividade

Amostras de plasma de quatro bezerros, machos, mestiços de Gir x Holândes, sendo uma de cada animal e uma quinta que foi submetida ao processo próprio para promover a hemólise do sangue foram analisadas utilizando o procedimento e as condições cromatográficas propostas. Os resultados foram comparados com os obtidos com o padrão

analítico (P.A), em concentração próxima ao LIQ (CQB) e os parâmetros cromatográficos foram avaliados.

3.4.3 Estabilidade do padrão analítico

Amostras do P.A em ACN foram analisadas imediatamente após o preparo utilizando o método proposto. As amostras foram estocadas a temperatura ambiente, por no mínimo seis horas e analisadas novamente utilizando o método proposto. Os resultados obtidos foram comparados e o desvio padrão relativo (DPR%) entre as amostras foi calculado.

3.4.4 Estabilidade das amostras de controle de qualidade

Amostras de controle de qualidade nas concentrações baixa (CQB) (5ng/mL), média (CQM) (100 ng/mL) e alta (CQA) (500 ng/mL) foram avaliadas em algumas etapas descritas a seguir:

- **Análise inicial:** três amostras de cada concentração, CQB, CQM e CQA foram extraídas e analisadas logo após o preparo utilizando-se o método proposto.
- **Estabilidade pós-processamento:** três amostras de cada concentração CQB e CQA foram extraídas e estocadas a temperatura ambiente por 12h e após este período, analisadas utilizando-se o método proposto.
- **Estabilidade de curta duração:** três amostras de cada concentração CQB e CQA foram estocadas a temperatura ambiente por 24h e após este período, extraídas e analisadas utilizando-se o método proposto.
- **Estabilidade por ciclo de descongelamento:** três amostras de cada concentração CQB, CQM e CQA foram congeladas por um período de 24h, descongeladas totalmente e congeladas novamente por mais duas vezes, realizando três ciclos de congelamento/descongelamento. Ao fim deste processo as amostras foram extraídas e analisadas utilizando o método proposto.
- **Estabilidade de longa duração:** três amostras de cada concentração CQB e CQA foram congeladas a cada intervalo de um mês, foram extraídas e analisadas utilizando o método proposto por um período de três meses.

Os resultados analíticos de estabilidade foram comparados aos encontrados na análise inicial e o DPR% foi calculado.

3.4.5. Linearidade

Amostras de CQ nas concentrações de 5, 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng/mL, além de uma amostra branco e uma amostra zero foram extraídas e analisadas utilizando o método proposto em dois dias distintos. Em um dia a amostra CQB (5 ng/mL) foi analisada em quintuplicata (n=5). Os dados foram analisados através da construção do gráfico concentração x área e a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi realizada e o coeficiente de correlação linear, o coeficiente angular e o intercepto da reta foram calculados para os dois grupos de amostras. O DPR% e o desvio (%) em relação à concentração nominal foram calculados em todos os pontos da curva analítica para avaliação da precisão e exatidão.

3.4.6. Precisão

Três amostras de cada concentração CQB, CQM e CQA foram extraídas e analisadas utilizando o método proposto em dois dias distintos. Foi calculado o DPR% para cada nível de concentração de um mesmo dia (precisão intra-dia) e de dias diferentes (precisão inter-dia).

3.4.7. Exatidão

Três amostras de cada concentração CQB, CQM e CQA foram extraídas e analisadas utilizando o método proposto em dois dias distintos. Foi determinada a porcentagem de recuperação das amostras para cada nível de concentração de um mesmo dia (exatidão intra-dia) e de dias diferentes (exatidão inter-dia) através da comparação da concentração amostra com a concentração nominal.

3.5 Preparo do Fipronil para Aplicação Injetável

Foi preparada uma solução de FIP a 5% (p/v) utilizando gliceroformol e propilenoglicol como veículo nas seguintes concentrações:

Fipronil -----	5%
Gliceroformol -----	70%
Propilenoglicol ---q.sp.-----	100%

A escolha dos excipientes utilizados para a veiculação do FIP foi baseada na fórmula do medicamento IVOMEC®, que utiliza gliceroformol a 40% e propilenoglicol q.s.p 100%. Esta formulação a base de ivermectina é administrada pela via subcutânea na taxa de 1 mL a cada 50 kg de peso vivo no controle do carrapato bovino. O gliceroformol é uma mistura de 5-hidroxi-1,3-dioxano e 4-hidroximetil-1,3-dioxolano (60:40) que são éter cíclicos compostos por dois átomos de oxigênio na estrutura do anel e substituídos por grupo álcool. É um solvente de baixo odor e baixa toxicidade com uma ampla variedade de aplicações na indústria farmacêutica e cosmética incluindo preparações veterinárias antiparasitárias. O propilenoglicol é um líquido inodoro e incolor e reconhecidamente seguro pelo FDA para utilização como aditivo alimentar. É utilizado como excipiente (solvente inerte ou carreador) em preparações farmacêuticas e cosméticas.

3.6 Estudos da Curva de Concentração Plasmática

Os estudos da curva de concentração plasmática do FIP administrado subcutaneamente foram conduzidos de acordo com o guia de boas práticas clínicas (VICH, 2000). Toda parte experimental envolvendo os estudos da curva de concentração plasmática com os bovinos foi realizada na estação experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz da UFRRJ.

Visto que não foram encontrados na literatura estudos de curva de concentração plasmática com FIP administrado pela via subcutânea em nenhuma espécie animal, para a determinação dos tempos de coleta do estudo de curva de concentração plasmática foi realizado um ensaio inicial com um número reduzido de animais (n=4) com intervalos menores entre as coletas. Sendo assim, o estudo inicial foi conduzido utilizando os tempos de coleta de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 24, 48 horas, 3, 6 e 7 dias. A partir dos resultados do estudo inicial os tempos de coleta do estudo de curva de concentração plasmática foram escolhidos.

Foram utilizados 12 bezerros machos inteiros com peso vivo médio de 150 Kg, cruzados de Holândes e Gir, entre oito meses e um ano e dois meses, isentos de produtos parasiticidas por um período de 60 dias. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em baias individuais.

Um dia antes do tratamento, os animais foram pesados para calcular o volume da solução de FIP (preparada segundo descrito no item 3.5) a ser aplicada por animal. No dia do tratamento (dia 0), o volume da solução foi medido em seringas de 5,00 mL individualmente e aplicado através da administração subcutânea atrás da paleta, empregada na dose de 1mg/Kg de peso corporal (pc), correspondendo ao volume de 1mL/50 Kg pc.

O estado sanitário dos animais influencia na concentração plasmática do fármaco. Sendo assim, animais sadios diferem de animais parasitados no que diz respeito aos parâmetros farmacocinéticos. Os animais utilizados apresentaram bom estado sanitário e livre de parasitoses. As amostras de sangue heparinizados foram coletadas nos tempos 0, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 24, 36 e 48 horas e 3, 7, 14, 21 e 28 dias após tratamento seguido das etapas de extração antes de serem analisadas por CLAE-UV através de metodologia analítica desenvolvida e validada.

As medidas e os cálculos necessários para a obtenção dos parâmetros: pico de concentração plasmática (C_{max}), área sob a curva (AUC), tempo correspondente ao pico plasmático (t_{max}), meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$), taxa constante de eliminação (Tx Const. Elim.) foram realizadas pelo programa PK Functions for Microsoft Excel.

3.7 Atividade do Fipronil Frente a Diferentes Populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

3.7.1 Obtenção dos carrapatos

Para os testes *in vitro* foram utilizados exemplares de *R. (B.) microplus* de três populações distintas. A população UFRRJ foi obtida a partir de carrapatos oriundos de bovinos mantidos nos campos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A Cepa Lages foi obtida de propriedade rural em Santa Catarina e a Cepa RS foi cedida pelo Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (FEPAGRO - Rio Grande do Sul), respectivamente com histórico de pouca utilização de produtos a base de fipronil no controle de ectoparasitos de bovinos e foram replicada e mantida em infestações naturais em bezerros nas dependências do laboratório. As três populações foram replicadas em bezerros que foram mantidos estabulados individualizados alimentando-se de feno, ração e água *ad libitum*.

3.7.2 Preparo do concentrado emulsionável

Para avaliação da atividade do FIP frente a diferentes populações de *R. (B.) microplus* foi desenvolvido um concentrado emulsionável (CE) a base de FIP. O CE foi formulado a partir da solubilização do fármaco em solvente apropriado (etilglicol) e posterior incorporação do tensoativo (Triton X-100) nas seguintes concentrações:

Fipronil -----	10%
Etilglicol -----	80%
Triton X-100 ---- q.s.p.-----	100%

A escolha dos excipientes utilizados foi baseada no conceito básico de uma formulação deste tipo. Concentrados emulsionáveis (CE) são soluções concentradas oleosas de princípios ativos de baixa solubilidade que se destinam a ser diluídas em água formando uma emulsão relativamente estável para aplicação. A calda resultante da mistura do concentrado emulsionável com água tem uma aparência opaca ou leitosa. O agente emulsionante utilizado, com uma ação detergente, torna possível a suspensão de partículas de reduzida dimensão em água, formando uma suspensão.

O etilglicol é um líquido incolor de odor característico, miscível em água e alguns álcoois e baixa viscosidade em baixas temperaturas. É amplamente utilizado como solvente na indústria de tintas e têxtil e também pode ser utilizado na produção e formulação de pesticidas. O Triton X-100 é um tensoativo não iônico produzido pela polimerização do octilfenol e óxido de etileno.

3.7.3 Ensaio *in vitro*

Para a avaliação *in vitro* da eficácia carrapaticida do CE, teleóginas desprendidas naturalmente de *R. (B.) microplus* de bovinos naturalmente infestados foram coletadas. A seguir procedeu-se ao teste *in vitro* por imersão de teleóginas (DRUMMOND, 1973), onde após a imersão de teleóginas em diferentes concentrações de caldas contendo FIP foram avaliados parâmetros reprodutivos como, peso das teleóginas, peso das posturas, percentual de eclosão dos ovos sempre em comparação com o grupo imerso no branco (controle).

As teleóginas foram lavadas em água corrente e secas em papel toalha e então separadas em grupos homogêneos contendo 10 em cada placa de petri descartável.

O CE foi diluído em água, ajustando a concentração para valores usualmente utilizados baseado em experiências prévias. Foram testadas as concentrações de 400, 200, 100, 50 e 25 µg/mL.

Cada grupo de teleóginas foi submetido à imersão em Becker de 100 mL contendo 50 mL de carrapaticida na concentração a ser testada durante cinco minutos. O teste foi realizado em duplicata para cada concentração testada, duas repetições. Os grupos controles de teleóginas foram imersos em água destilada e outro grupo em veículo diluído em água (placebo) na mesma concentração do CE contendo FIP. Após a imersão o excesso de carrapaticida foi retirado com o auxílio de papel toalha. As teleóginas foram acondicionadas em placa de Petri descartável, devidamente identificada com data, dia experimental, grupo, peso e número de repetições e coladas nas placas de petri e fixadas com auxílio de uma fita dupla face. O material foi então incubado em câmara climatizada com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.), a $27 \pm 0,5$ °C de temperatura, umidade relativa do ar de $75 \pm 10\%$ por 21 dias. Após este período as posturas das teleóginas de cada placa foram pesadas e transferidas para seringas fechadas com algodão. As seringas devidamente identificadas retornaram à estufa B.O.D., nas mesmas condições de umidade e temperatura anteriores até a eclosão das larvas.

A eclodibilidade das larvas foi avaliada por estimativa de porcentagem em relação àquelas que não eclodiram. O cálculo da eficácia dos carrapaticidas sobre *R. (B.) microplus* foi feito a partir dos dados de peso das teleóginas, peso dos ovos e porcentagem de eclosão de acordo com Drummond (1973).

$$ER = \frac{\text{Peso dos ovos} \times \% \text{ eclosão} \times 20000}{\text{Peso das teleóginas}}$$

$$EIR = \frac{ER \text{ do grupo controle} - ER \text{ do grupo tratado} \times 100}{ER \text{ do grupo controle}}$$

Onde:

ER = Eficiência Reprodutiva

EIR = Eficácia da Inibição Reprodutiva

3.8 Estudos de Eficácia Clínica

O ensaio de eficácia clínica foi delineado para atender a Portaria nº 48 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de 12 de maio de 1997, no que diz respeito a teste de estábulo. Para avaliação da eficácia *in vivo* da formulação em teste contendo FIP a 5% aplicado subcutaneamente, foi empregada a metodologia desenvolvida por (HOLDSWORTH, 2006) e recomendada pela WAAVP – Associação Mundial para avanço da Parasitologia Veterinária (2006) – para testes carrapaticidas em ruminantes.

Toda parte experimental envolvendo os ensaios *in vivo* com os bovinos foram realizados na estação experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz da UFRRJ. Os animais foram alojados em dois galpões distintos onde os animais do grupo controle não tiveram contato com os animais tratados (Figura 5).

Foram usados 10 bezerros, cruzados de Holândes e Gir, entre oito meses e um ano e dois meses, isentos de produtos parasiticidas por um período de 60 dias. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em baias individuais, sobre estrados de madeira, para que os carrapatos pudessem ser coletados em intervalos de 24 horas (Figura 6).



Figura 5. Galpão onde foram mantidos os animais pertencentes ao grupo controle (animais à esquerda) e grupo tratado com FIPsubcutaneamente (animais à direita) durante o estudo de eficácia carrapaticida.



Figura 6. Baias individuais com estrados de madeira onde foram mantidos os animais durante todo período experimental do estudo de eficácia carrapaticida.

Todos os animais foram infestados com 2500 larvas não alimentadas de *R. (B.) microplus* oriundos de uma colônia mantida 27 °C, 75% UR antes da infestação, nos dias -23, -21, -19, -17, -15, -13, -11, -9, -7, -5, -3, -1. Este procedimento e intervalo de infestação garante que no momento do tratamento haja sobre o animal todos os estágios do carrapato (larva, ninfa e adulto).

Nos dias -3, -2, -1, as fêmeas ingurgitadas recuperadas de cada animal foram quantificadas e pesadas, sendo realizado o ranqueamento dos animais de acordo com o número de carrapatos recuperados. Os animais foram divididos em dois grupos com cinco animais cada. O grupo 1 foi mantido sem tratamento, grupo controle. O grupo 2 foi tratado com FIP subcutaneamente (preparado segundo descrito no item 3.5).

Um dia antes do tratamento, os animais foram pesados para calcular o volume da solução de FIP (preparada segundo descrito no item 3.5) a ser aplicada. No dia do tratamento (dia 0), o volume da solução foi medido em seringas de 5 mL individualmente e aplicado através da administração subcutânea atrás da paleta, empregada na dose de 1mg/Kg de peso corporal (pc), correspondendo ao volume de 1mL/50 Kg pc.

As fêmeas ingurgitadas foram coletadas e contadas diariamente nos dois grupos experimentais até o dia + 23. A eficácia do FIP foi calculada através da seguinte fórmula: $Eficácia = 100 - [100 \times (A \times D) / (B \times C)]$

Onde:

A = número médio de carrapatos do controle antes do tratamento (dia -3, -2 e -1);

D = número médio de carrapatos do tratado do dia de avaliação;

B = número médio de carrapatos do controle do dia de avaliação;

C = número médio de carrapatos do tratado antes do tratamento (dia -3, -2 e -1).

Todos os dados brutos obtidos (A, B, C e D) foram transformados em logaritmo para normalização dos dados. Posteriormente os dados dos grupos controle e tratado de cada dia de avaliação foram submetidos ao Teste t para amostras independentes. A análise estatística foi realizada utilizando o software Biostat 5.0.

Após a contagem dos carrapatos, foram separadas duas alíquotas com 10 teleóginas cada, proveniente de cada grupo experimental, onde foram avaliados os respectivos pesos, posturas e percentuais de eclosão. A eficácia da inibição reprodutiva foi avaliada a partir dos dados de peso das teleóginas, peso dos ovos e porcentagem de eclosão de acordo com Drummond (1973).

$$ER = \frac{\text{Peso dos ovos} \times \% \text{ eclosão} \times 20000}{\text{Peso das teleóginas}}$$

$$EIR = \frac{ER \text{ do grupo controle} - ER \text{ do grupo tratado} \times 100}{ER \text{ do grupo controle}}$$

Onde:

ER = Eficiência Reprodutiva

EIR = Eficácia da Inibição Reprodutiva

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padronização do Fipronil Matéria-prima por CLAE – UV

A seletividade do método pode ser demonstrada através da observação da ausência de interferentes nos cromatogramas do padrão e da amostra observados na Figura 7.

A Figura 8 representa a curva de calibração obtida a partir do FIP-SQR. A equação da reta é $y = 0,6776 x + 0,4034$ e o coeficiente de correlação $r = 0,9992$.

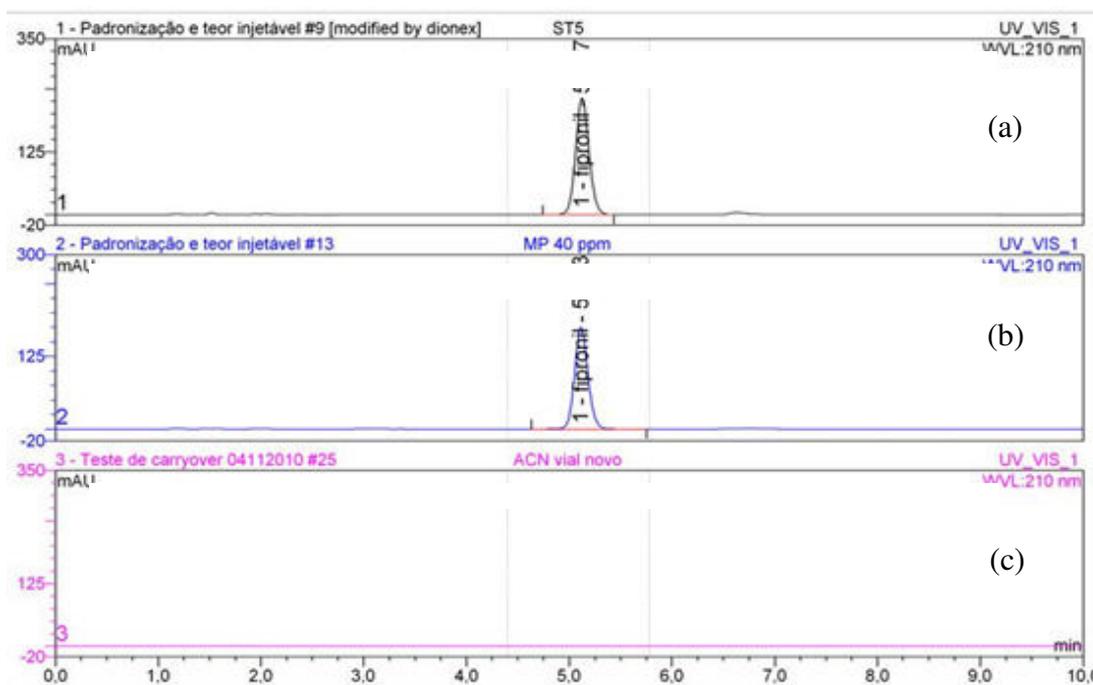


Figura 7. Seletividade do método para quantificação do Fipronil matéria-prima: cromatograma de injeção (a) padrão (Fipronil Substância Química de Referência), (b) amostra (Fipronil matéria-prima) e (c) branco (acetonitrila).

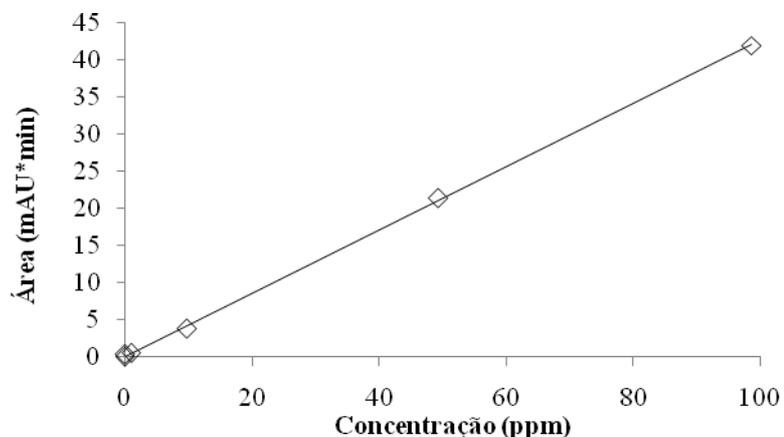


Figura 8. Curva de calibração do padrão (Fipronil Substância Química de Referência)

A Tabela 1 mostra os resultados de teor obtidos das amostras de FIP-MP frente à curva de calibração do FIP-SQR (Figura 8).

Tabela 1. Teor do Fipronil matéria-prima por CLAE – UV

Repetições	Teor (%)	Teor médio (%)	dp*	DPR (%)**
1	94,95			
2	95,54	95,55	0,6018	0,6298
3	96,15			

*desvio padrão

**desvio padrão relativo

É importante determinar o teor do fármaco para que este possa ser empregado como princípio ativo em formulações farmacêuticas. Para padronização do FIP-MP, o método descrito pelo certificado da SQR foi validado parcialmente no laboratório. O método foi reprodutível, demonstrando linearidade, seletividade e repetibilidade cumprindo os requisitos necessários para co-validação de metodologia analítica exigidos (ANVISA, 2003). A seletividade pode ser comprovada a partir da comparação dos cromatogramas de injeção do padrão (FIP-SQR.), amostra (FIP-MP) e do branco (ACN) (Figura 7). A linearidade pode ser observada pelo coeficiente de correlação linear obtido (0,9992) (Figura 8), estando acima do critério mínimo aceitável pela legislação vigente (ANVISA, 2003). O ensaio de teor, realizado em triplicata apresenta desvio padrão relativo (DPR%) de 0,63% (Tabela 1), inferior ao máximo permitido de 5% para ensaios de precisão (ANVISA, 2003), comprovando a repetibilidade do método. O teor médio encontrado de 95,55% (Tabela 1) mostrou-se adequado para o emprego do FIP como matéria-prima no desenvolvimento da formulação proposta no trabalho.

4.2 Desenvolvimento da Metodologia Analítica para Quantificação do Fipronil em Plasma Bovino por CLAE-UV

A utilização do detector de UV, apesar de não ser um detector muito sensível quando comparado principalmente com os detectores de espectrometria de massa, apresenta como vantagem baixo custo de aquisição e manutenção, sendo uma alternativa mais econômica. O comprimento de onda utilizado (210 nm) difere de outros trabalhos descritos para determinação do FIP por UV (280) (HADJMOHAMMADI *et al.*, 2006; LACROIX *et al.*, 2010).

A Figura 9 demonstra o espectro de absorção da solução padrão de FIP (FIP em ACN) na faixa de 190 a 400 nm, onde podemos observar uma maior absorção em 210 nm. Assim, temos um ganho de sensibilidade e também uma diminuição no LIQ em pelo menos 10 vezes. Os valores de LIQ encontrados estão abaixo dos descritos para o FIP por UV (HADJMOHAMMADI *et al.*, 2006; LEGHAIT *et al.*, 2009; LACROIX *et al.*, 2010) e também por DCE (JIMENEZ *et al.*, 2007) e DNF (MORZYCKA *et al.*, 2002), no entanto não atinge valores demonstrados por detecção por MS/MS (BICHON *et al.*, 2008)

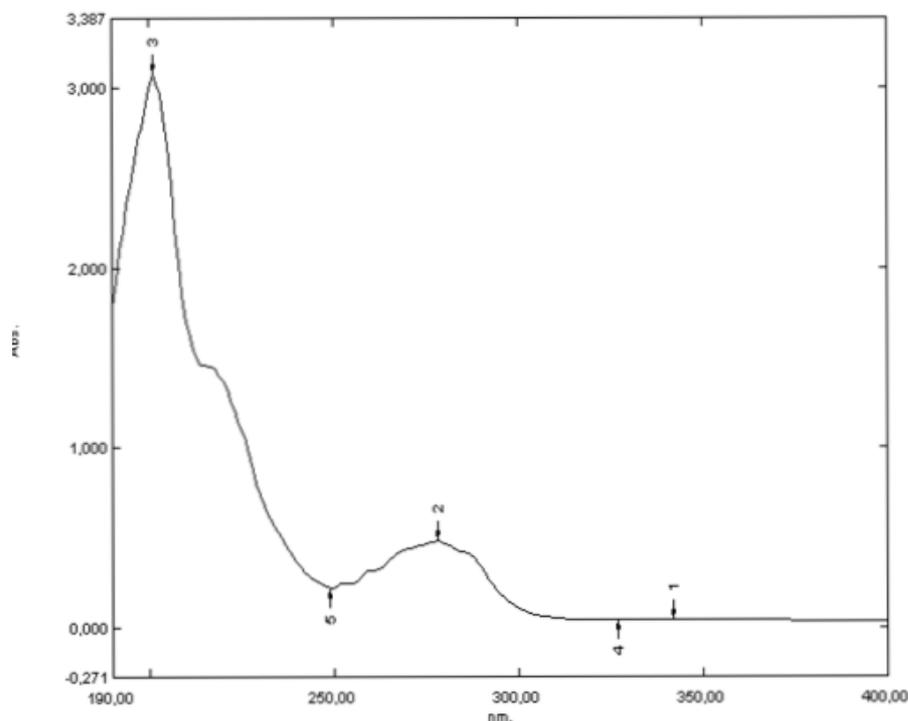


Figura 9.Espectro de absorção no ultravioleta do Fipronil em acetonitrila

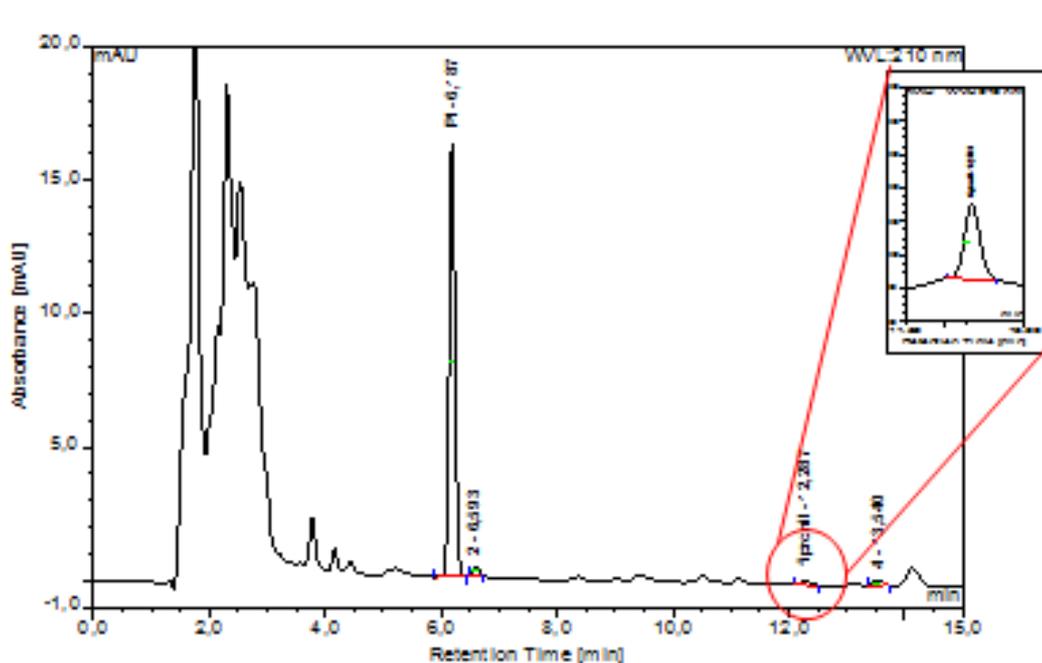
4.3 Validação da Metodologia Analítica para Quantificação do Fipronil em Plasma Bovino por CLAE-UV

O método foi validado baseadas recomendações para métodos bioanalíticos descritos pela ANVISA (2003) em termos de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade.

4.3.1 Parâmetros cromatográficos e limite de quantificação (LIQ)

A Figura 10 representa um cromatograma de amostra na concentração de 5 ng/mL (LIQ) e seus parâmetros cromatográficos.

Dentre os parâmetros cromatográficos avaliados, podemos observar que os picos do PI e do FIP demonstraram valores desejáveis de resolução ($R > 1,5$) e assimetria ($0,8 < A_s < 1,2$). Além disso, a eficiência da separação foi comprovada face aos valores de N (número de pratos teóricos) observados que foram de 25379 e 17670 para o FIP e para o PI respectivamente sendo o mínimo desejável de 2000. O LIQ foi determinado a partir da análise do valor de sinal-ruído da concentração de 5 ng/mL, já que esta se apresentou acima do valor mínimo aceitável ($S/R = 5$).



Nº pico	Tempo retenção (min)	Nome	Sinal-ruído	Área (mAU*min)	Assimetria	Resolução	Nº pratos teóricos
1	6,19	PI	566,7	1,910	1,06	1,97	17670
2	6,59	_	10,90	0,042	1,10	20,96	14071
3	12,29	FIP	6,3	0,028	1,06	3,99	25379
4	13,54	_	0,6	0,038	1,01	_	32056

Figura 10. Parâmetros cromatográficos para amostras (plasma bovino contaminado com fipronil e padrão interno) na concentração do limite de quantificação

4.3.2 Seletividade

A Figura 11 representa os cromatogramas de injeção da matriz (branco) em comparação com a injeção da matriz contendo FIP e PI (amostra) e com a injeção de solução padrão contendo FIP e PI na ausência da matriz (padrão).

Este ensaio mostra a capacidade do método de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (plasma). Não foram observados picos interferentes no tempo de retenção do FIP nas análises dos brancos analisados (quatro indivíduos diferentes e um hemolisado). Foram observados picos interferentes no tempo de retenção do PI nas análises dos brancos analisados. Os valores de área observados foram de 0,0053 para o indivíduo 1; 0,0062 para o indivíduo 2; 0,0075 para o indivíduo 3 e 0,070 para amostra hemolisada. Estes valores foram inferiores a 5% da área média do PI (1,6829) que corresponde a 0,0841 obedecendo ao critério de aceitação estabelecido para o teste de seletividade (ANVISA, 2003).

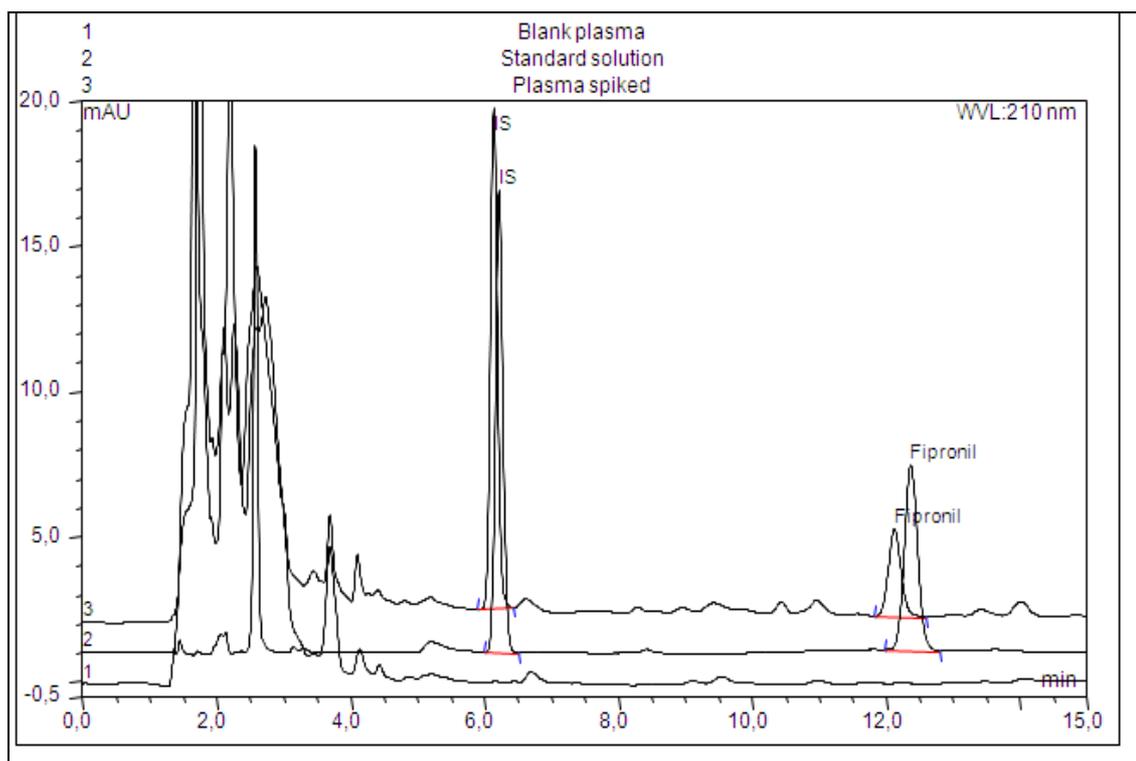


Figura 11. Cromatograma de injeção (1) plasma bovino (branco); (2) solução padrão contendo fipronil e padrão interno na ausência da matriz (padrão) e (3) plasma bovino contendo fipronil e padrão interno (amostra)

4.3.3 Estabilidade da solução padrão

A estabilidade da solução padrão de FIP foi avaliada a partir da análise de DPR(%) entre as respostas dos picos do FIP analisados diariamente no período de 10 dias. As amostras analisadas foram acondicionadas em frascos âmbar em temperatura ambiente. O DPR% apresentado foi inferior a 10%. Foi então estabelecido uma estabilidade da solução padrão do FIP por um período de 10 dias.

4.3.4 Estabilidade em matriz biológica (plasma)

A Tabela 2 demonstra os resultados do estudo de estabilidade das amostras de plasma contaminado (Amostras CQ).

Tabela 2. Estabilidade do fipronil em plasma bovino – análise inicial, pós-processamento, curta duração, ciclo de congelamento e descongelamento e longa duração.

Concentração (ng/mL)	Inicial	Pós-processamento	Curta duração	Ciclo congelamento descongelamento	Longa* duração
5	11,94	12,68	19,15	17,99	19,76
100	-	-	-	0,92	-
500	0,84	1,28	1,62	1,71	1,75

* (amostras mantidas em congelamento por três meses)

Os ensaios de estabilidade das amostras de plasma contaminado (Amostras CQ) (Tabela 2) mostraram valores comparáveis com as amostras recentemente preparadas em todas as condições testadas. As amostras podem ser consideradas estáveis já que apresentaram DPR (%) inferiores a 20% para as concentrações do LIQ e inferior a 15% para as concentrações obedecendo aos critérios de aceitação estabelecidos ANVISA (2003).

A avaliação da estabilidade das amostras biológicas é extremamente importante para uma aplicação segura do método na análise de amostras reais. A estabilidade de curta duração significa que as amostras podem ser acondicionadas em temperatura ambiente por 24 horas antes da análise sem alterações significativas no seu teor. Já a estabilidade pós-processamento garante que uma amostra já processada (após sofrer processo de extração) pode aguardar por até 12 horas para ser analisada. Isso garante que as amostras que ficam acondicionadas em “vial” aguardando para serem injetadas no cromatógrafo não perdem estabilidade por até 12 horas. A estabilidade de ciclo de congelamento e descongelamento garante a manutenção do teor da amostra em casos de descongelamento e congelamento, como em casos de falta de energia ou em casos da impossibilidade de processamento de uma amostra já descongelada. E finalmente a estabilidade de longa duração dá informações do período que a amostra pode ser mantida sob congelamento sem perder a estabilidade. No caso das amostras de FIP em plasma bovino, estas se mantiveram estáveis por três meses.

4.3.5 Linearidade

As curvas de calibração para métodos bioanalíticos são preparadas na própria matriz biológica para minimizar os desvios que podem ocorrer devido à influência da matriz.

A linearidade de um método analítico é sua capacidade de obter resultados de teste diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada faixa. A precisão e confiabilidade dos resultados de um ensaio ou teste de uma amostra desconhecida são baseadas na validade e eficiência da curva padrão, construída baseada em um modelo. Os modelos mais utilizados para construção desta relação são baseados em ajustes de equações matemáticas envolvendo o método dos mínimos quadrados (MMQQ), no qual a melhor curva será aquela que fornecerá o menor valor para a soma quadrática dos resíduos obtidos entre o sinal analítico medido (y_i) e o sinal analítico predito (\hat{y}_i), para um conjunto de N pontos experimentais (RIBEIRO *et al.*, 2008).

O ajuste da curva pelo método dos quadrados mínimos fornecerá os coeficientes de regressão (coeficiente angular e linear) determinando a curva de calibração: $y = ax + b$.

Onde:

x = variável independente

y = variável dependente

a = coeficiente linear da reta

b = coeficiente angular da reta

Uma vez determinada a curva de calibração a concentração de uma amostra desconhecida poderá ser calculada através de seu resultado analítico. A adequação do ajuste da curva é determinada pelo coeficiente de correlação r, que é a razão da covariância entre a concentração, x, e o sinal analítico, y, com o produto dos desvios padrões de x. Este coeficiente pode variar de -1 a 1. Valores próximos de 1 indicam alta correlação positiva, valores próximos a -1 indicam alta correlação negativa enquanto valores próximos a zero indicam total falta de correlação. Modelos de calibração com alto resíduo no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o

comportamento entre as variáveis dependente e independente (RIBEIRO *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2005).

Para evitar problemas de falta de ajuste durante a modelagem, faz-se necessária a análise cuidadosa do gráfico dos resíduos do sinal analítico e a aplicação de testes para determinar a faixa na qual a curva de calibração apresenta um comportamento linear.

Devido à ampla faixa de linearidade estudada, em geral mais de duas ordens de grandeza é de se esperar que a variância em cada ponto da reta seja diferente e a condição de homogeneidade de variância, designada por homocedasticidade, não seja cumprida. Assim as concentrações mais elevadas tendem a influenciar (ou “pesar”) a reta de calibração, resultando na perda da exatidão, especialmente nos seus pontos mais baixos, próximos ao LIQ. De fato, devido à ampla faixa de trabalho empregada neste estudo (5 a 1000 ng/mL; 4 ordens) valores discrepantes da variância dos resíduos foram encontrados durante a construção da curva de calibração. Estes resultados podem ser observados na Figura 12.

Para confirmar a heterocedasticidade do método foi utilizado o teste F de variância entre as concentrações extremas do método (5 e 1000 ng/mL). Os resultados estão descritos na Tabela 3 e determinam um p igual a 0,0000 indicando que a hipótese nula do teste deve ser rejeitada, ou seja, as variâncias são desiguais e o método é heterocedástico. Para a construção do gráfico de resíduo e teste F foram utilizados os dados das duas curvas de calibração feitas em matriz biológica. Para a construção dos gráficos de resíduo foi utilizado o programa estatístico MINITAB 15 enquanto para o teste F foi utilizado o programa EXCEL 2007.

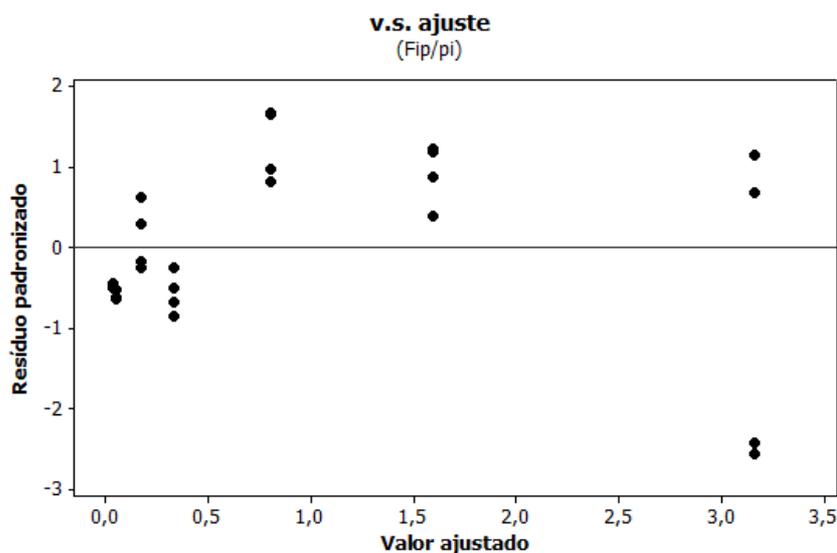


Figura 12. Dispersão de resíduo da curva de calibração do fipronil em plasma bovino empregando a regressão linear simples

Tabela 3. Resultado do teste F para a variância dos resíduos da curva de calibração do fipronil em plasma bovino por regressão linear simples

Estatística	Fipronil/Padrão interno		F _{calculado}	F _{crítico}	p-valor
	5 ng/mL	1000 ng/mL			
Media	0,01381	3,1267			
Variância	0,0000	0,0086	0,0000	0,1077	0,0000
N	4	4			
GL	3	3			

N- número de amostras; GL- grau de liberdade

Geralmente, o modelo de regressão linear simples assume que os valores da variável “x”, são fixos e são medidos sem erro associado e que os valores de “y”, são estatisticamente independentes e suas variâncias são iguais. Esta situação não ocorre em métodos heterocedásticos. Por este motivo o modelo dos MMQQ não é a melhor alternativa para descrever o método (SOUZA *et al.*, 2005). Nestes casos o melhor modelo a ser utilizado é a regressão linear ponderada (RLP), onde a uma das variáveis será ponderada a um fator para corrigir sua variância de resíduos. Uma curva bem ajustada deverá apresentar erros com distribuição uniforme, média zero, variância constante (homocedasticidade) e ausência de amostras atípicas (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Seis fatores de ponderação foram testados. São eles: $1/x$; $1/x^{0,5}$; $1/x^2$; $1/y$; $1/y^{0,5}$ e $1/y^2$. Cada uma das ponderações foram inseridas nas curvas de calibração anterior e os gráficos de resíduo gerados foram analisados juntamente com suas regressões (Tabela 4 e Figura 13). As ponderações $1/x^2$ e $1/x$ apresentaram as melhores dispersões de resíduos e os menores valores de erro relativo, porém a ponderação $1/x^2$ possui coeficiente de correlação inferior a 0,98 preconizado pelo guia da ANVISA. Desta forma a ponderação $1/x$ apresentou os melhores resultados sendo então utilizada para a construção das curvas de linearidade do método validado.

Tabela 4. Parâmetros da curva de calibração para os tratamentos testados de regressão linear ponderada

Ponderação	Coef. Linear (a)	Coef. Angular (b)	r^2	Erro Relativo
1	0,314	0,0219	0,998	31,71
$1/x^*$	0,325	-0,025	0,996	0,074
$1/x^{0,5}$	0,327	0,033	0,998	1,660
$1/x^2$	0,338	-0,042	0,973	0,000
$1/y$	0,323	-0,034	0,997	23,15
$1/y^{0,5}$	0,321	0,021	0,998	29,75
$1/y^2$	0,327	-0,042	0,978	19,28

* ponderação selecionada

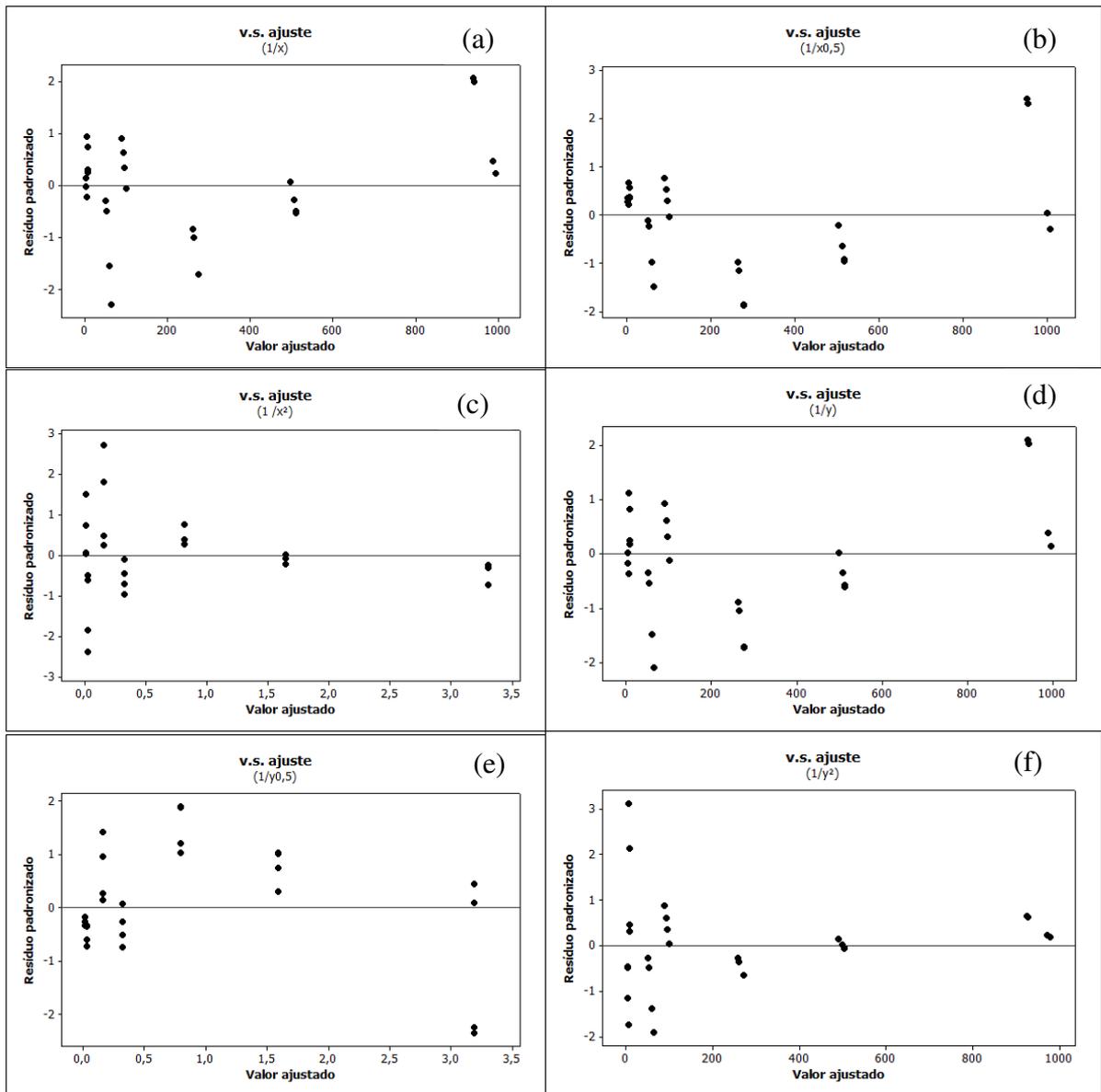


Figura 13. Gráficos de resíduo das regressões ponderadas. (a) $1/x$; (b) $1/x^{0,5}$; (c) $1/x^2$; (d) $1/y$; (e) $1/y^{0,5}$; (f) $1/y^2$.

Foi realizada a linearidade intra-dia e inter-dia do método através da construção da curva de calibração em matriz biológica. Na Figura 14 estão demonstrados os resultados obtidos para a comprovação da linearidade do método através da regressão linear ponderada ao fator de $1/x$.

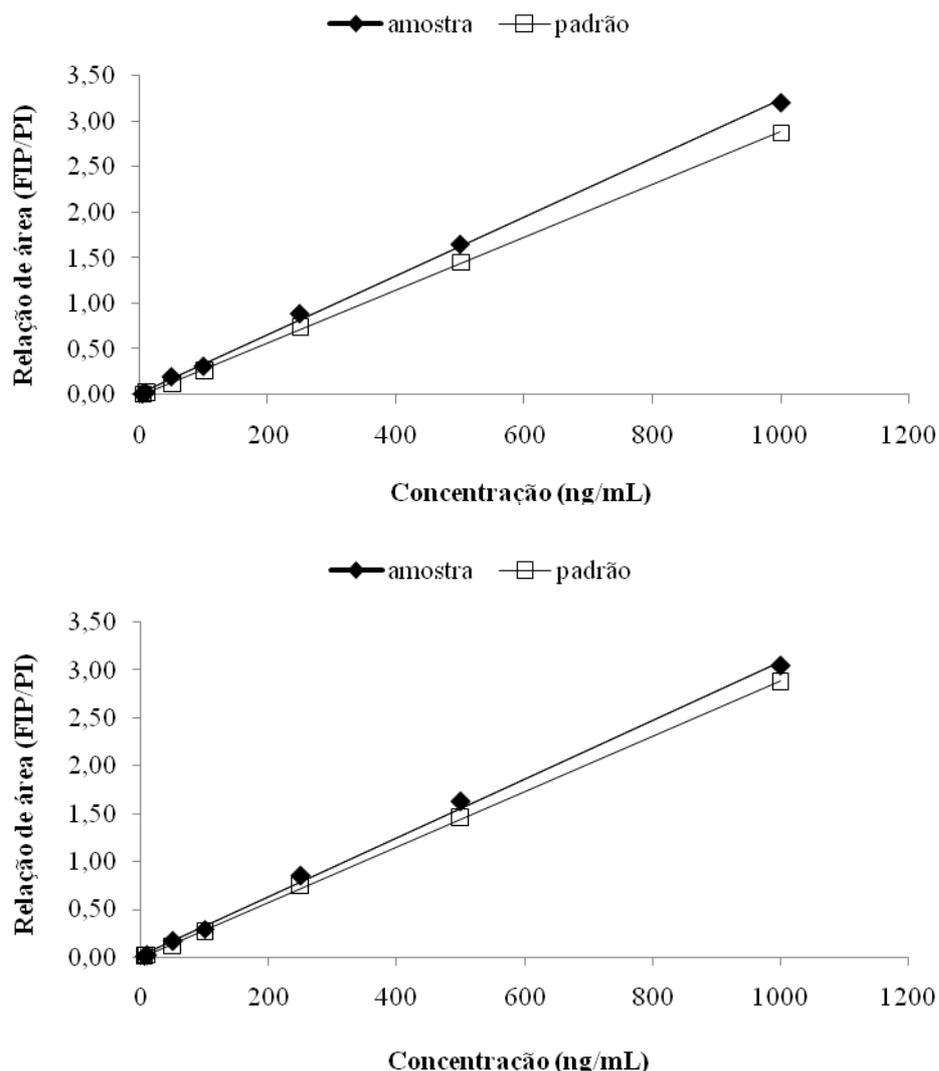


Figura 14. Curvas analíticas do padrão analítico (fipronil e padrão interno em acetonitrila) e amostra (fipronil e padrão interno em plasma bovino) do 1º e 2º dia de testes

Uma resposta linear foi observada na faixa de 5 a 1000 ng/mL com coeficiente de correlação linear (r) médio de $0,9993 \pm 0,0003$ ($n=2$). Os valores médios de inclinação e intercepto das curvas de calibração das amostras (FIP + PI em plasma) foram 0,331 e 0,0217 respectivamente.

Os dados apresentados na Figura 14 estão demonstrados na Tabela 5, com intuito de detalhar a linearidade do método.

A linearidade foi comprovada face aos valores de inclinação significativos e aos valores de coeficiente de correlação linear superiores a 0,98, precisão de 20% para o LIQ e 15% para as demais concentrações e exatidão na faixa de 80 a 120% para o LIQ e de 85 a 115% para pelo menos quatro concentrações incluindo a maior concentração da curva de calibração. Esses resultados estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos pela ANVISA (2003).

Tabela 5. Precisão e exatidão das amostras de controle de qualidade na faixa linear do método (5 a 1000 ng/ mL) em dois dias de testes

Concentração (ng/mL)	Dia	Média Relação área (FIP/PI) ± DP	Precisão inter-dia DPR (%)	Exatidão inter-dia (% recuperação)
5	1*	0,0129 ± 0,0008	7,08	84,97
	2	0,0143 ± 0,0009		
10	1	0,0214 ± 0,0014	3,82	81,75
	2	0,0270 ± 0,0003		
50	1	0,1681 ± 0,0031	3,82	134,14
	2	0,2024 ± 0,0117		
100	1	0,2970 ± 0,0062	2,50	114,76
	2	0,3171 ± 0,0092		
250	1	0,8537 ± 0,0062	0,39	103,62
	2	0,8930 ± 0,0004		
500	1	1,6255 ± 0,0176	0,58	101,63
	2	1,6542 ± 0,0013		
1000	1	3,0466 ± 0,0043	0,31	100,91
	2	3,2068 ± 0,0154		

* (n=5)

4.3.6 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão intra-dia e inter-dia foram estabelecidas através da análise de amostras (n=5) em três diferentes concentrações 5, 100 e 500 ng/mL, em dois dias separados. Os resultados da precisão e exatidão em plasma contaminado estão representados na Tabela 6.

A precisão para as amostras de 5, 100 e 500 ng/mL apresentaram valores de DPR% entre 1,6 e 12,2 %, portanto o método pode ser considerado preciso face aos valores de DPR% inferiores a 20% para o LIQ e 15% para as demais concentrações. O método também pode ser considerado exato face aos valores de recuperação observados para o LIQ e os demais pontos da exatidão intra e inter-dia entre 80 e 120% e 85 e 115% respectivamente. Todos os resultados de precisão e exatidão do método atendem aos requisitos exigidos pela legislação (ANVISA, 2003).

São poucos os métodos descritos na literatura para determinação de FIP em plasma animal. O FIP foi determinado por CLAE-UV fornecendo um processo simples e rápido para determinação deste composto em amostras de plasma bovino com boa reprodutibilidade e baixo limite de quantificação. O método de extração proposto, EFS, permite a performance da extração e limpeza das amostras de plasma em um único processo simples, requerendo baixos volumes de solvente. Sensibilidade e resolução adequadas e o curto tempo de análise (15 minutos) assim como a simplicidade do procedimento fazem deste método útil para utilização em análise de rotina, se tornando uma importante ferramenta investigativa na análise de curva de concentração plasmática do FIP no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas.

Tabela 6. Precisão e exatidão das amostras de controle de qualidade nos níveis baixo (5 ng/mL), médio (100 ng/mL) e alto (500 ng/mL) intra-dia e inter-dia

Concentração (ng/mL)	Exatidão *		Precisão **	
	(% recuperação)		(% DPR)	
	Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia
5	113,82	112,14	7,22	9,88
	110,29		12,20	
100	89,16	87,37	2,80	4,36
	85,37		2,73	
500	100,77	99,94	1,26	1,60
	99,11		1,51	

4.4 Estudo da Curva de Concentração Plasmática

No controle químico, a atividade antiparasitária está relacionada à concentração de um fármaco em sua forma ativa no local de ação, durante um período determinado, onde o parasito é considerado o elemento alvo desta interação (LIFSHITZ *et al.*, 1999). Dentro deste conceito, foi estudado o comportamento farmacocinético do fipronil administrado pela via subcutânea na dose de 1 mg/Kg de peso vivo em bovinos por meio da quantificação de suas concentrações plasmáticas em intervalos de tempos determinados.

A Figura 15 demonstra a curva de concentração plasmática obtida nos estudos iniciais.

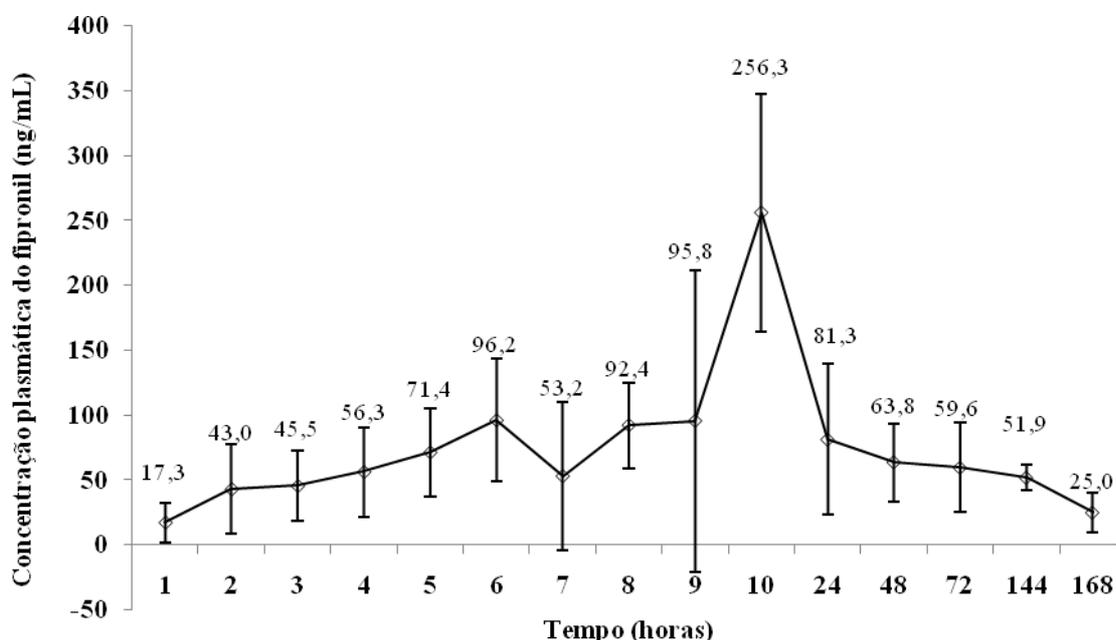


Figura 15. Estudos iniciais: curva de concentração plasmática média (n=4) em plasma bovino após administração via subcutânea de fipronil na dose de 1mg/Kg

A partir dos resultados iniciais, o perfil da curva de concentração plasmática do FIP administrado pela via subcutânea foi determinado. O t_{max} foi estabelecido em 10 horas. Sendo assim, foram escolhidos 4 tempos de coleta na subida da curva (1, 2, 4 e 8 horas) e 4

pontos na descida da curva (12, 24, 36 e 48 horas). Como no tempo de 168 horas (7 dias) ainda foram encontrados níveis plasmáticos quantificáveis de FIP, estendeu-se os tempos de coleta até 28 dias semanalmente (168, 336, 504 e 672 horas).

Estabelecidos os pontos de coleta, o estudo de concentração plasmática com 12 animais foi executado. Na Tabela 7 estão registrados os valores individuais de concentração de FIP nas amostras de plasma coletadas dos bovinos medicados. As médias e desvio padrões dos níveis plasmáticos individuais estão ilustrados na Figura 16.

Os estudos foram realizados até o dia +28 (672 horas) após tratamento, porém as concentrações individuais encontradas para este tempo de avaliação se encontraram abaixo do LIQ do método (5 ng/mL), por isso não foram levadas em consideração para a construção da curva de concentração plasmática e cálculo dos parâmetros farmacocinéticos. Em todos os demais tempos de avaliação as concentrações plasmáticas individuais se apresentaram acima do LIQ.

Pode-se observar que a concentração plasmática média variou de 23,79 ng/mL no último dia de avaliação +21 (504 horas) e atingiu seu máximo (378,06 ng/mL) em 10 horas (t_{max}) após administração. A partir do t_{max} a concentração plasmática cai drasticamente atingindo níveis aproximados de 50 ng/mL em 24 horas após o tratamento. Esses níveis são mantidos até o dia +7 (168 horas) e depois caem para a faixa de 20 ng/mL nos dias +14 (336 horas) e +21 (504 horas) até atingir níveis abaixo do LIQ (5 ng/mL) no dia +28 (672 horas).

A Tabela 8 representa os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da curva de perfil plasmático (Figura 16).

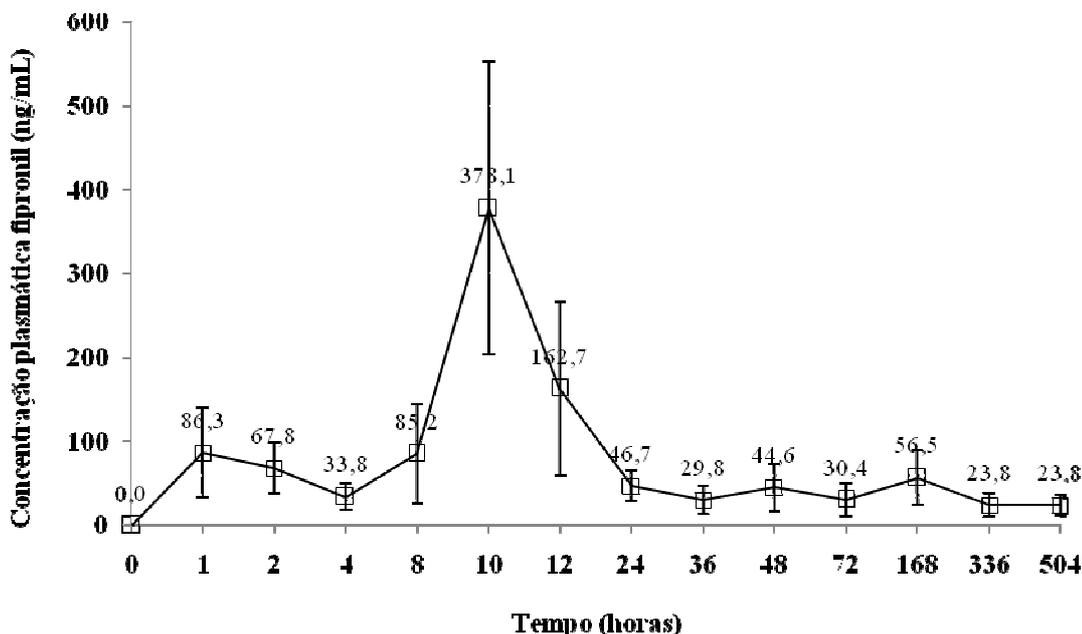


Figura 16. Curva de concentração plasmática média (n=12) em plasma bovino após administração via subcutânea de FIP na dose de 1mg/Kg.

Tabela 7. Concentração plasmática do fipronil (ng/mL) de cada animal (n=12) em cada tempo(horas) testado após administração subcutânea na dose de 1mg/Kg de peso vivo

Tempo (horas)	Concentração plasmática de fipronil (ng/mL) por animal												Média ± dp
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	171,13	16,90	36,41	96,52	54,91	54,95	44,12	144,79	98,12	164,26	19,52	133,36	86,25 ± 53,75
2	84,69	75,64	91,82	43,37	111,05	98,32	71,36	50,79	18,90	21,17	103,93	42,31	67,78 ± 30,48
4	50,03	21,96	45,46	8,40	50,07	41,31	25,25	2,60	32,31	40,78	48,63	39,18	33,83 ± 15,42
8	52,65	16,32	206,42	125,03	31,69	83,49	31,55	65,69	54,78	36,80	176,73	140,75	85,16 ± 59,82
10	453,29	542,77	176,28	386,68	174,09	189,12	764,58	242,79	241,15	462,97	523,54	379,45	378,06 ± 174,57
12	26,68	327,15	46,72	87,81	195,66	121,94	264,35	238,02	99,58	256,70	20,56	267,80	162,75 ± 103,05
24	12,88	38,42	54,82	20,96	57,94	34,40	62,94	44,19	40,07	41,68	75,36	76,18	46,65 ± 18,81
36	10,91	11,74	47,17	56,96	4,73	31,24	18,37	36,71	30,15	56,47	13,91	39,82	29,85 ± 17,31
48	60,48	13,26	84,39	16,22	90,35	66,58	22,36	45,75	14,40	28,25	17,34	76,28	44,64 ± 28,32
72	17,37	2,44	25,57	9,64	31,89	9,49	25,36	40,62	36,43	41,08	48,22	76,70	30,40 ± 19,55
168	13,86	118,06	51,33	62,63	100,31	32,20	104,64	46,37	57,67	26,78	31,46	32,47	56,48 ± 32,52
336	13,74	55,43	6,45	22,33	23,43	31,28	14,90	43,26	17,46	20,12	28,46	8,79	23,80 ± 13,60
504	17,31	9,80	6,11	18,53	35,47	24,18	30,43	18,37	31,47	52,68	14,60	26,53	23,79 ± 12,16

Tabela 8. Parâmetros farmacocinéticos para o fipronil após administração subcutânea em bovinos na dose de 1mg/Kg de peso vivo

Parâmetros	Média	Desvio
Cmax (ng/mL)	378,06	137,44
t max (h)	10,00	0,87
Auc0_t (ng.h.mL ⁻¹)	19388,64	7740,69
Tx. Const. Elim.	0,00277	0,00251
T _{1/2} (h)	288,17	91,58

Parâmetros farmacocinéticos do FIP já foram avaliados por outros autores, porém, em concentrações, dosagens e vias de administrações diferentes. Segundo Cerkvenik e Grabnar (2002), a comparação de resultados obtidos em condições experimentais distintas como raça, sexo, idade, via de administração, formulação, amostragem e método analítico se torna inconsistente. No entanto, é possível determinar uma média de resultados, principalmente em relação ao tempo médio de permanência do fármaco no plasma sanguíneo.

Leghait *et al.*, (2009) após administração diária de FIP pela via intra-gástrica em ratos na dose de 3 mg/Kg por 14 dias encontraram concentrações abaixo do limite de quantificação do método (100 ng/mL) nos dias avaliados. Em outro estudo, após administração oral de FIP na dose de 0,5 mg/Kg/dia em ratos durante quatro dias, Leghait *et al.*, (2010) encontraram concentrações abaixo do limite de quantificação do método (50 ng/mL) em todas os tempos avaliados durante 14 semanas.

Lacroix *et al.*, (2010) encontraram concentração plasmática para o FIP variando de $10,7 \pm 8,6$ ng/mL a $231,0 \pm 67,3$ ng/mL a partir de administração oral diária na dose de 3 mg/Kg por 13 dias em ratos.

Huet *et al.*, (2006) após administração intravenosa única de FIP na dose de 3mg/Kg em coelhos encontrou C_{max} de $3,48 \pm 0,52$ mg.L⁻¹ em modelo de dois compartimentos com t_{1/2α} de $0,32 \pm 0,11$ h e t_{1/2β} de $3,25 \pm 0,59$ h. A AUC encontrada foi $4,96 \pm 1,22$ mg.h.L⁻¹.

Não foram encontrados na literatura estudos envolvendo administração subcutânea do FIP em nenhuma espécie animal. Também não foram encontrados estudos farmacocinéticos com FIP em bovinos. A partir dos parâmetros farmacocinéticos encontrados no presente estudo pode-se assumir que o FIP administrado subcutaneamente na dose de 1mg/Kg apresentou rápida absorção, atingindo pico plasmático de $378,06 \pm 137,44$ ng/mL, com tempo correspondente ao pico plasmático (t_{max}) de $10 \pm 0,87$ horas e alta meia-vida de eliminação (t_{1/2} = 12 dias). Com isso, pode-se concluir que o FIP administrado pela via SC em bovinos atinge a circulação sistêmica, sendo rapidamente absorvido e sua eliminação ocorre de forma lenta mantendo níveis plasmáticos quantificáveis no sangue por até 21 dias após tratamento da dose de 1 mg/Kg.

4.5 Atividade do Fipronil Frente a Diferentes Populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* - Teste *in vitro*

A Tabela 9 representa os valores de peso médio das teleóginas, peso médio das posturas, média do percentual de eclosões e eficiência reprodutiva obtida para cada população em cada concentração testada.

A média do peso das teleóginas variou de 0,1908 a 0,2520 g para a Cepa RS, de 0,1825 a 0,2161 g para a Cepa UFRRJ e de 0,1836 a 0,2633 g para a Cepa LAGES. A análise destes valores nos permite inferir que a média do peso das teleóginas se apresentou de forma constate para todos os grupos testados. Analisando o peso das posturas pode-se observar uma redução nos valores médios de peso nos grupos tratados em relação ao grupo controle em

todas as populações testadas. Essa redução se mostrou diretamente proporcional à concentração, ou seja, quanto maior a concentração, maior a redução e consequentemente menor o peso médio das posturas. O mesmo pode ser observado para a média das eclosões e para a eficiência reprodutiva.

A partir dos dados representados na Tabela 9 foi calculada a eficácia média do FIP para cada população em cada concentração testada. Os valores de eficácia média do FIP estão demonstrados na Figura 17.

Tabela 9. Eficiência reprodutiva média das populações de *R. (B.) microplus* frente ao fipronil em diferentes concentrações.

Populações	Concentração (µg/mL)	Média peso teleóginas(g)	Média peso posturas (g)	Média eclosões (%)	Eficiência reprodutiva
RS	400	0,2185	0,126	52,00	59.972,54
	200	0,2258	0,119	40,00	42.161,20
	100	0,1908	0,394	64,00	264.318,66
	50	0,2520	0,162	60,00	77.142,86
	25	0,2388	0,508	74,00	314.840,87
	Controle		0,2511	1,115	94,00
UFRRJ	400	0,2064	0,511	57,00	282.238,00
	200	0,1825	0,241	76,00	200.723,29
	100	0,1971	0,450	74,00	337.899,54
	50	0,1837	0,394	86,00	368.905,82
	25	0,1902	0,410	80,00	344.900,11
	Controle		0,2161	1,006	92,00
LAGES	400	0,2633	0,092	32,00	22.362,32
	200	0,1881	0,273	79,00	229.314,19
	100	0,1836	0,547	76,00	452.854,03
	50	0,2119	0,356	81,00	272.166,12
	25	0,1937	0,354	75,00	274.135,26
	Controle		0,2010	1,452	90,00

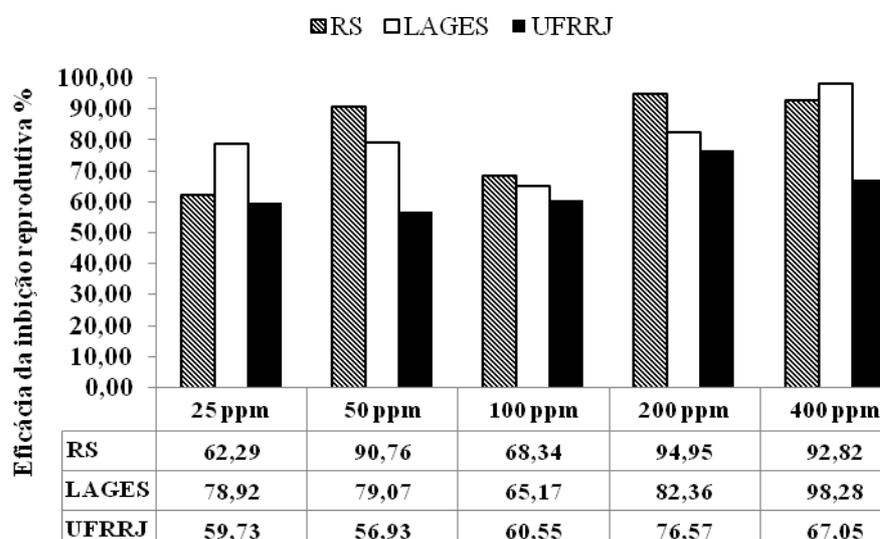


Figura 17. Resultados de eficácia na inibição reprodutiva para teleóginas de *R. (B.) microplus* imersas em diferentes concentrações de fipronil, frente a três populações distintas.

Pode-se observar que a cepa UFRRJ apresentou valores menores de eficácia quando comparada com as Cepas Lages e RS em todas as concentrações testadas, apresentando eficácia mínima de 56,93% para a concentração de 50 µg/mL e máxima de 76,57% para a concentração de 200 µg/mL. Comparando a Cepa Lages com a Cepa RS pode-se observar que a Cepa RS apresentou maiores valores de eficácia para três das cinco concentrações testadas. Foram observadas eficácias superiores a 90% nas concentrações de 50 µg/mL (90,76%), 200 µg/mL (94,95%) e 400 µg/mL (92,82%), caracterizando uma resposta linear desta poluição com o aumento da concentração. O maior valor de eficácia apresentado no estudo (98,28%) foi para a Cepa LAGES, porém isto foi observado apenas para a concentração de 400 µg/mL (maior concentração testada). Nas demais concentrações a Cepa LAGES apresentou valores de eficácia variando entre 65,17% (100 µg/mL) e 82,36% (200 µg/mL), com padrão de resposta quadrática com o aumento da concentração.

A ausência de produtos comerciais a base de FIP na forma de CE no mercado veterinário dificulta a condução de estudos *in vitro* em larga escala como se observa para os piretróides, organofosforados e amidinas, pois estes têm apresentações CE disponíveis. Estudos *in vitro* são uma importante técnica para monitorar o problema da resistência no campo, por exemplo, do carrapato bovino frente a acaricidas. Para o sucesso que qualquer estratégia de controle de infestações é necessário lançar mão de testes rápidos, práticos, econômicos e capazes de detectar a presença de fenótipos resistentes em populações alvo. Testes *in vitro* são relativamente de fácil execução, baixo custo e não requerem equipamentos sofisticados. Baseiam-se na fase parasitária (larva ou fêmea ingurgitada). As técnicas mais utilizadas para detecção de resistência do carrapato bovino são o teste de imersão de adultos (TIA) (WHITNALL AND BRADFORD, 1947; HITCHCOCK, 1953; DRUMMOND *et al.*, 1973), o teste de envelope de larvas (TEL) (STONE AND HAYDOCK, 1962) e o teste de imersão de larvas (TIL) (SHAW, 1966). Atualmente a FAO recomenda apenas o uso dos testes TIL e TIA para avaliação de resistência acaricida (FAO, 2004).

O FIP só está disponível no mercado veterinário em apresentações “pour-on” e “spray” de base alcoólica que não são apropriadas para a realização de estudos *in vitro*. Desta forma são escassos os trabalhos na literatura que fazem referência da avaliação *in vitro* de *R. (B.) microplus* frente ao FIP. Para a realização destes estudos o investigador tem que ter acesso ao FIP na forma de matéria prima farmacêutica, o que é muito difícil. Com a matéria prima pode-se formular CE que posteriormente servirão para estabelecer emulsões (caldas) em diferentes concentrações, ou a impregnação de papéis de filtro, desta forma permitindo a condução dos estudos *in vitro*.

A literatura descreve eficácia *in vivo* do FIP na forma de “pour-on” contra *R. (B.) microplus* em bovinos (DAVEY *et al.*, 1998). Vale ressaltar que as diferenças nos valores de eficácia variam de acordo com a região avaliada e também em relação ao desenvolvimento de populações resistentes.

Castro-Janer *et al.*, (2009) desenvolveram técnicas *in vitro* para o diagnóstico de resistência de carrapatos bovinos frente ao FIP utilizando três técnicas distintas, TIL, TEL e TIA. A partir dos resultados deste trabalho este mesmo grupo detectou populações resistentes ao FIP no Uruguai utilizando as três técnicas descritas anteriormente (CASTRO-JANER *et al.*, 2010a) e no Brasil utilizando a técnica TIL (CASTRO-JANER *et al.*, 2010b). Em todos os trabalhos o FIP foi diluído em acetona para realização dos testes.

O presente estudo apresenta um teste *in vitro* utilizando a técnica TIA com diluições seriadas de uma formulação CE a base de FIP, fato que facilita em muito a condução dos estudos com teleóginas através da metodologia de Drummond *et al.*, (1973). O desenvolvimento de um CE contendo FIP facilita a manipulação das diluições das caldas possibilitando a realização de testes *in vitro* com teleóginas de uma forma mais simples,

permitindo a determinação e monitorização da sensibilidade de populações de *R. (B.) microplus*.

As populações do RS e Lages foram as que se mostraram mais susceptíveis ao FIP. Em contra partida a população da UFRRJ mostrou-se com menor susceptibilidade, provavelmente por causadas condições climáticas no Rio de Janeiro favoráveis a este carrapato e a possibilidade que ele estabeleça até quatro gerações ao ano, além do fato de que os parasitos estejam sujeitos a uma maior pressão de seleção pelo uso intensivo de acaricidas no seu controle. Não foi possível efetuar uma comparação entre os resultados obtidos nos estudos *in vitro* por Castro-Janer *et al.*, (2010b), pois estes usaram metodologia diferente ao do presente estudo. Como a literatura é escassa e estudos avaliando a DL₅₀ do FIP, por hora da sua entrada no mercado veterinário na década de 90, não foram executados e publicados, fica difícil uma comparação para que se possa afirmar se as populações testadas são sensíveis ou não. A única afirmação que podemos realizar é a susceptibilidade comparativa entre as três populações. A população RS demonstrou uma susceptibilidade maior em relação às outras populações testadas e foi escolhida para a realização do teste de eficácia *in vivo* (eficácia clínica). Além do fato da suscetibilidade, esta população também demonstrou uma habilidade maior a se adaptar ao processo laboratorial de manutenção de populações.

4.6 Estudos de Eficácia Clínica

O número de teleóginas recuperadas para os grupos controle e tratado no período de pré-tratamento e pós-tratamento para cada animal está representado na Tabela 10.

A partir dos dados individuais para cada dia de avaliação do estudo, foram calculadas as médias do número de teleóginas do grupo controle e tratado e a eficácia diária (Tabela 11).

As médias das contagens de teleóginas recuperadas nos três dias pré-tratamento (-3, -2 e -1) foram de $9,73 \pm 2,70$ para o grupo controle e $12,67 \pm 2,47$ para o grupo tratado. O número médio de teleóginas recuperadas no período pós-tratamento variou de $16,00 \pm 15,22$ a $70,60 \pm 33,76$ para o grupo controle e de $0,20 \pm 0,45$ a $46,60 \pm 34,41$ para o grupo tratado. A análise estatística utilizada (teste t para amostras independentes) demonstrou que do dia -3 a 3 as médias do número de teleóginas dos grupos controle e tratado não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). A partir do dia 4 até o fim do estudo, estas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Os valores de eficácia mínimos foram observados no primeiro dia após tratamento (1,63%) atingindo o máximo de 99,39% no dia 9 pós-tratamento. A partir do décimo dia pós-tratamento a eficácia começa a diminuir gradativamente até atingir níveis de 73,83% no último dia de avaliação (dia +23).

Tabela 10. Número de teleóginas de *R. (B.) microplus* recuperadas dos animais dos grupos controle e tratado nos períodos pré-tratamento (dias -3 a -1) e pós-tratamento (dias 1 a 23) em estudo de eficácia carrapaticida do fipronil aplicado pela via subcutânea na dose de 1 mg/kg

Dias	Teleóginas recuperadas nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento											
	Controle						Tratado					
	149*	186*	177*	114*	144*	Total	134*	164*	157*	187*	172*	Total
-3	1	4	18	10	16	49	13	0	8	26	6	53
-2	1	3	14	7	10	35	13	4	7	13	23	60
-1	4	6	21	12	19	62	17	6	5	29	20	77
1	6	8	54	25	89	182	38	5	58	98	34	233
2	3	7	37	70	86	203	51	0	13	13	19	96
3	2	7	42	57	47	155	11	6	0	17	6	40
4	6	9	46	42	56	159	2	1	4	4	0	11
5	0	8	47	49	69	173	6	0	6	12	0	24
6	7	9	30	54	57	157	2	0	4	1	0	7
7	5	10	44	53	61	173	0	0	2	1	0	3
8	3	8	42	12	15	80	6	0	0	2	0	8
9	6	9	62	17	30	124	0	0	0	1	0	1
10	2	24	67	34	25	152	9	0	0	5	2	16
11	1	28	56	28	13	126	0	1	1	11	0	13
12	8	17	95	36	33	189	4	1	1	12	0	18
13	5	46	112	58	65	286	7	2	4	13	12	38
14	20	23	101	93	77	314	7	0	0	15	29	51
15	40	36	58	101	92	327	15	0	8	22	21	66
16	35	28	58	111	90	322	9	0	18	11	28	66
17	28	31	51	108	86	304	10	0	17	9	27	63
18	17	35	49	97	59	257	9	0	15	17	13	54
19	35	36	66	110	40	287	10	3	18	18	15	64
20	34	42	89	116	72	353	12	4	44	11	24	95
21	28	33	62	93	76	292	13	3	49	20	1	86
22	27	26	29	56	80	218	11	2	52	17	0	82
23	37	46	58	98	73	312	11	6	60	27	2	106

*Número de identificação do animal

Tabela 11. Média do número de teleóginas de *R. (B.) microplus* recuperadas dos animais dos grupos controle e tratado nos períodos pré-tratamento (dias -3 a -1) e pós-tratamento (dias 1 a 3) e eficácia diária em estudo de eficácia carrapaticida do fipronil aplicado pela via subcutânea na dose de 1 mg/kg

Dias	Número de teleóginas recuperadas (x ± dp)		Eficácia (%)
	Controle	Tratado	
-3	9,80 ± 7,36 ^a	10,60 ± 9,79 ^a	
-2	7,00 ± 5,24 ^a	12,00 ± 7,28 ^a	
-1	12,40 ± 7,57 ^a	15,40 ± 10,06 ^a	
Média -3 a -1	9,73 ± 2,70	12,67 ± 2,47	
1	36,40 ± 35,13 ^a	46,60 ± 34,41 ^a	1,63
2	40,60 ± 37,02 ^a	19,20 ± 19,08 ^a	63,58
3	31,00 ± 24,85 ^a	8,00 ± 6,36 ^a	80,12
4	31,80 ± 22,79 ^a	2,20 ± 1,79 ^b	94,67
5	34,60 ± 29,36 ^a	4,80 ± 5,02 ^b	89,31
6	31,40 ± 23,80 ^a	1,40 ± 1,67 ^b	96,57
7	34,60 ± 25,52 ^a	0,60 ± 0,89 ^b	98,66
8	16,00 ± 15,22 ^a	1,60 ± 2,61 ^b	92,30
9	24,80 ± 22,77 ^a	0,20 ± 0,45 ^b	99,38
10	30,40 ± 23,61 ^a	3,20 ± 3,83 ^b	91,89
11	25,20 ± 20,61 ^a	2,60 ± 4,72 ^b	92,05
12	37,80 ± 33,98 ^a	3,60 ± 4,93 ^b	92,66
13	57,20 ± 38,45 ^a	7,60 ± 4,83 ^b	89,77
14	62,80 ± 38,69 ^a	10,20 ± 12,19 ^b	87,49
15	65,40 ± 29,75 ^a	13,20 ± 9,26 ^b	84,45
16	64,40 ± 35,56 ^a	13,20 ± 10,47 ^b	84,21
17	60,80 ± 35,08 ^a	12,60 ± 10,06 ^b	84,04
18	51,40 ± 29,98 ^a	10,80 ± 6,72 ^b	83,82
19	57,40 ± 32,03 ^a	12,80 ± 6,38 ^b	82,82
20	70,60 ± 33,76 ^a	19,00 ± 15,72 ^b	79,27
21	58,40 ± 27,79 ^a	17,20 ± 19,37 ^b	77,32
22	43,60 ± 23,86 ^a	16,40 ± 21,05 ^b	71,03
23	62,40 ± 24,05 ^a	21,20 ± 23,68 ^b	73,83

^{ab} médias na mesma linha com letras iguais não diferem significativamente entre si (p>0,05)

O teste de estábulo tradicional visa a verificação da eficácia do produto como acaricida para as diferentes formas evolutivas de *R. (B.) microplus*. Essas formas são larva (não ingurgitada e ingurgitada), ninfa (não ingurgitada e ingurgitada) e adulto (não ingurgitada e ingurgitada). Lembrando que o ciclo parasitário é larva-ninfa-adulto (mais ou menos 21 dias, 7 dias para cada fase), depois se tem o ciclo não parasitário que começa no momento em que a teleóquina (ingurgitada) desprende-se do bovino e vai ao solo para efetuar a postura (mais ou menos 2.500 ovos), este período dura em média 21 dias. A larva precisa de 7 a 14 dias para endurecer seu exoesqueleto para conseguir subir no animal e fixar-se. Com base nestas características biológicas que estrutura-se o teste de estábulo. Durante 23 dias infesta-se dia sim dia não, com aproximadamente 2.500 larvas com 14 dias. Ao final de 21 dias têm-se todas as fases evolutivas do carrapato sobre o animal, ou seja, larva, ninfa e adulto (não ingurgitados e ingurgitados). No dia 0, quando se aplica o produto, pode-se avaliar a sua ação acaricida sob todas as formas evolutivas do carrapato. Esta avaliação é feita recuperando-se as teleóginas desprendidas dos animais até o dia + 23 após o tratamento. Em tese, as teleóginas desprendidas do dia +1 ao dia +7 relacionam-se a avaliação da eficácia acaricida sobre os

adultos que estavam instalados no animal. Se a recuperação de adultos ingurgitados é baixa significa que muitos morreram e não conseguiram chegar a fase de ingurgitamento. Quando se recolhem as teleóginas desprendidas do dia +8 ao dia +14, faz-se a avaliação da eficácia acaricida sobre as ninfas que estavam instaladas no animal. E quando se recolhem teleóginas desprendidas do dia +15 ao dia +23, faz-se a avaliação da eficácia acaricida sobre as larvas que estavam instaladas no animal. Desta forma, além da avaliação da eficácia geral do produto em teste, pode-se também estratificar a eficácia sobre as formas adulta, ninfa e larva. Desta forma, ao estratificar os resultados do teste de estábulo observa-se valores de eficácia de 73,47% para adultos, 91,21% para ninfa, 80,34% para larva e eficácia média de 81,42%. (Figura 18)

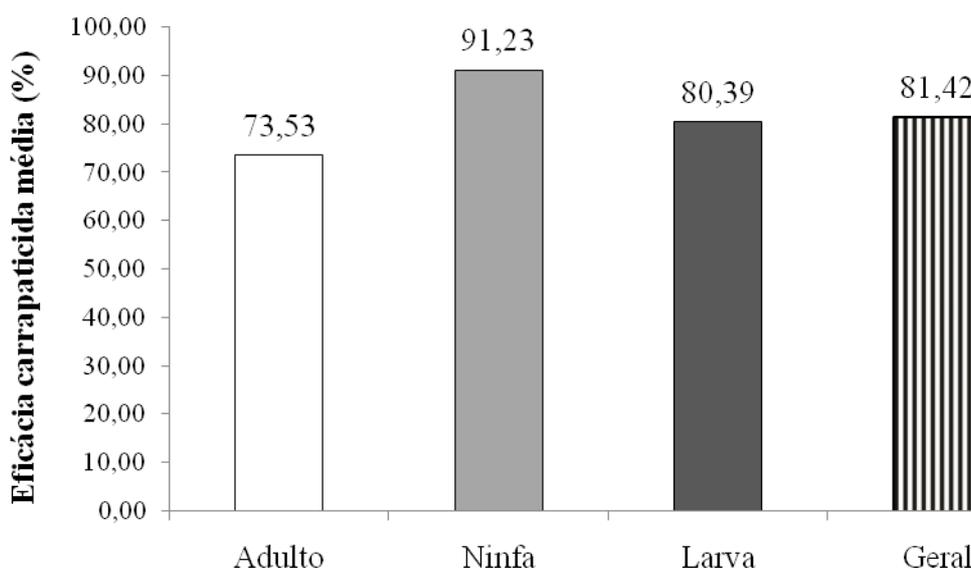


Figura 18. Eficácia carrapaticida média do Fipronil aplicado pela via subcutânea na dose de 1mg/kg pc em bovinos sobre as formas evolutivas

Pode-se verificar que a eficácia para adultos apresentou o menor valor comparado com as demais formas evolutivas. A hipótese é que como o FIP foi administrado por via subcutânea, o carrapato necessita ingerir o fármaco por via hematogênica para entrar em contato com o mesmo. E no momento do tratamento têm-se indivíduos adultos ingurgitados, parcialmente ingurgitados e não ingurgitados. Como, após sete dias todas estas indivíduos irão ter se desprendido do animal, esta fase tem pouco contato com o ativo. Pode-se observar nos resultados, que a partir do dia +4 após o tratamento ocorre um aumento dos níveis de eficácia, o que pode estar relacionado com a morte dos adultos que estavam parcialmente ingurgitados e não ingurgitados no momento do tratamento que sugaram mais sangue e consequentemente tiveram contato com mais fármaco.

Uma avaliação sob a mesma ótica da eficácia para ninfas estimula a ideia no sentido de que como esta fase demorará ainda sobre o animal, entre 7 e 14 dias, para chegar a teleóquina e cair, estaria mais tempo em contato com o fármaco, pois passaria mais tempo sugando sangue do animal. Explicando assim o bom resultado para ninfa.

Quanto à larva, o esperado não ocorreu que seria a fase mais sensível por que ficaria mais tempo sob o animal, de 14 a 23 dias e, portanto teria uma exposição maior ao produto. Entretanto, devido à rápida metabolização do FIP no sangue, têm-se concentrações elevadas biologicamente disponíveis no sangue próximo ao dia 0, período onde se tem fases muito jovens de larva que pouco se alimentam de sangue.

As fêmeas ingurgitadas coletadas diariamente nos dois grupos experimentais até o dia + 23, após a contagem dos carrapatos, foram separadas em duas alíquotas com 10 teleóginas cada (quando possível), proveniente de cada grupo experimental, onde foram avaliados os respectivos pesos, posturas e percentuais de eclosão.

A Tabela 12 representa o número de teleóginas, peso médio das teleóginas, peso médio das posturas, média do percentual de eclosões, eficiência reprodutiva para os grupos controle e tratado, e eficácia da inibição reprodutiva obtida para cada dia de avaliação do ensaio carrapaticida.

O número de teleóginas para o grupo controle foi igual a 10 em todos os dias avaliados, enquanto que no grupo tratado esse número variou de 2 a 10. A média do peso das teleóginas variou de 0,131 a 0,295 g para o grupo controle e de 0,162 a 0,345 g para o grupo tratado.

O peso das posturas variou de 0,100 a 0,146 para o grupo controle e de 0,040 a 0,1454 para o grupo tratado. Analisando o peso das posturas pode-se observar uma redução nos valores médios de peso nos grupos tratados em relação ao grupo controle a partir do quarto dia até o último dia de avaliação. Porém, o mesmo não ocorreu para a média do percentual de eclosão e para a eficiência reprodutiva. O percentual de eclosão variou de 97,0 a 99,5% para o grupo controle e de 80,5 a 96,0% para o grupo tratado com exceção dia 7 que obteve 0% de percentual de eclosão. Assim, a eficácia da inibição reprodutiva obteve resultados inferiores a 50% na maioria dos dias de avaliação, obtendo 100% apenas para o dia 7, levando a um valor médio de 35,69%. Esses resultados demonstraram que o FIP aplicado subcutaneamente na dose de 1mg/kg de peso vivo apresenta baixa eficácia na inibição reprodutiva.

Segundo a portaria nº 48 do MAPA no que diz respeito à eficácia carrapaticida – teste de estábulo, a eficácia média dos 23 dias após tratamento deve ser no mínimo de 95%. Nossos estudos atingiram eficácia média de 81,41% não atendendo à portaria. No entanto, existe uma grande discussão em relação a este critério exigido pelo MAPA para aprovação.

Em países do MERCOSUL, como a Argentina, houve um programa de erradicação do carrapato. Uma das ferramentas utilizadas neste contexto foi o critério extremamente restritivo adotado em relação à % de eficácia (95%) a ser atingida pelos antiparasitários no controle do carrapato bovino para fins de registro, além de implementação de programas de controle estratégico. À época, o MERCOSUL exigiu que estes critérios fossem aderidos por todos os países membros, incluindo o Brasil. Hoje, a Argentina conseguiu controlar o carrapato bovino, porém a erradicação não obteve sucesso.

No Brasil, problemas relacionados ao uso indiscriminado de antiparasitários e falta de programas de controle estratégico, associado à escassez de moléculas inovadoras com ação carrapaticida levam ao surgimento de resistência. Nesse cenário fica cada vez mais difícil atingir valores de eficácia acima de 95%.

Em países da Europa, infestações por carrapato não são um problema, portanto esse critério não é limitante para registro de produtos carrapaticidas. Na Europa, existem problemas relacionados às infecções por helmintos. Neste caso, o critério de aprovação, tanto de normas internacionais, quanto do MAPA é dividido em categorias: altamente efetivo (superior a 98%), efetivo (entre 90 e 98%), moderadamente efetivo (entre 80 e 89%) e insuficientemente ativo (inferior a 80%) (não registrável). Existe uma tendência no Brasil em aderir critérios semelhantes aos adotados na Europa para anti-helmínticos para registro de carrapaticidas.

Tabela 12. Eficácia na inibição reprodutiva diária para teleóginas de *R. (B.) microplus* coletadas após tratamento com fipronil aplicado subcutaneamente a 1mg/kg em bovinos

Dias	Número teleóginas		Peso médio teleóginas		Peso médio posturas		Percentual médio eclosão (%)		Eficiência reprodutiva		Eficácia da inibição reprodutiva (%)
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	
1	10	10	0,131	0,266	0,119	0,139	98,0	80,5	1773688	839737	52,66
2	10	10	0,247	0,205	0,105	0,119	98,0	82,0	831515	952000	0,00
3	10	10	0,236	0,218	0,138	0,105	97,0	94,0	1134407	905505	20,18
4	10	9	0,234	0,192	0,125	0,111	99,5	83,0	1065011	956772	10,16
5	10	10	0,253	0,239	0,114	0,096	98,5	85,0	887668	684969	22,84
6	10	4	0,254	0,340	0,115	0,145	98,0	85,0	889508	702354	21,04
7	10	2	0,219	0,345	0,115	0,145	98,5	0,00	1036606	0	100,00
8	10	6	0,204	0,300	0,118	0,060	98,0	92,0	1135746	373111	67,15
9	10	3	0,228	0,283	0,114	0,123	97,5	96,0	979276	835765	14,65
10	10	9	0,221	0,222	0,114	0,108	97,5	95,0	1010294	935911	7,36
11	10	10	0,252	0,210	0,106	0,110	96,5	94,5	815655	990000	0,00
12	10	10	0,280	0,192	0,131	0,125	98,0	92,0	917000	1202708	0,00
13	10	10	0,229	0,207	0,105	0,069	98,0	90,5	901002	606241	32,71
14	10	10	0,245	0,216	0,105	0,090	98,0	96,0	844000	798152	5,43
15	10	10	0,228	0,188	0,123	0,055	98,5	93,5	1067083	552048	48,27
16	10	10	0,221	0,210	0,101	0,040	97,5	94,0	889165	357245	59,82
17	10	10	0,197	0,291	0,110	0,042	98,5	91,5	1102203	266810	75,79
18	10	10	0,157	0,213	0,105	0,040	98,5	91,5	1323790	342857	74,10
19	10	10	0,176	0,225	0,100	0,078	98,5	93,0	1116147	643370	42,36
20	10	10	0,295	0,224	0,136	0,045	99,5	92,5	915871	370824	59,51
21	10	10	0,237	0,162	0,142	0,066	99,5	95,0	1194000	774074	35,17
22	10	10	0,271	0,216	0,146	0,082	98,0	93,5	1055941	708268	32,93
23	10	10	0,249	0,212	0,127	0,073	99,0	90,5	1013855	621788	38,67

C = grupo controle

T = grupo tratado

5 CONCLUSÕES

A padronização do FIP resultou em um teor médio de 95,55%, que se mostra adequado para o emprego do FIP como matéria-prima para que este fosse veiculado pela via SC em bovinos no presente estudo.

Um método analítico por CLAE-UV foi desenvolvido para determinação do FIP em amostras de plasma bovino fornecendo um processo simples e rápido com boa reprodutibilidade e baixo limite de quantificação. A validação do método analítico desenvolvido comprovou linearidade, seletividade, precisão, exatidão, sensibilidade e estabilidade demonstrando adequação do método para utilização em análise de rotina, se tornando uma importante ferramenta investigativa na análise da concentração plasmática do FIP em plasma bovino.

O FIP administrado pela via SC em bovinos atinge a circulação sistêmica ($C_{\max} = 378,06 \pm 137,44$ ng/mL), sendo rapidamente absorvido ($t_{\max} = 10 \pm 0,87$ horas) e sua eliminação ocorre de forma lenta ($t_{1/2} = 12$ dias) mantendo níveis plasmáticos quantificáveis no sangue por até 21 dias após tratamento da dose de 1 mg/kg.

Estudos de atividade *in vitro* demonstraram que o teste de imersão de teleóginas possibilita o estabelecimento da susceptibilidade comparativa entre as três populações. A população RS demonstrou uma susceptibilidade maior em relação às outras populações testadas e foi escolhida para a realização do teste de eficácia *in vivo*.

Os teste de eficácia carrapaticida *in vivo* comprovaram que o FIP aplicado pela via SC na dose de 1 mg/Kg em bovinos apresentou eficácia carrapaticida média de 81,42 % contra *R. (B.) microplus*. A eficácia da inibição reprodutiva média foi de 35,69 %.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Fazendo uma avaliação dos resultados de maneira global o FIP aplicado pela via subcutânea se mostrou eficaz no controle do carrapato bovino. A forma de aplicação subcutânea é uma inovação já que o FIP está disponível no mercado apenas na forma tópica (“pour on”). Uma formulação injetável, aplicada pela via subcutânea apresenta vantagens em relação às formulações aplicadas pela via tópica. Além de ser preferida pela maioria dos proprietários, é mais segura para o aplicador e para o ambiente. Em um cenário em que a preocupação com o meio ambiente está cada vez mais evidente esse fator é de enorme relevância.

Dentro do contexto da importância da pecuária no PIB tanto do Brasil quanto da Argentina e atentando para o fato de que o carrapato bovino é uma das principais causas de perda econômica na produção de leite, carne e couro, uma formulação inovadora para o combate deste carrapato poderá contribuir para uma redução aos prejuízos a agropecuária destes dois países.

O fato dos valores de eficácia atingidos não serem suficientes para o registro do produto como antiparasitário no MAPA-Brasil e na Argentina, não impede que a formulação continue a ser estudada. Atualmente o valor aceitável pelas autoridades Brasileiras é de 95%, entretanto a legislação atual está sendo revisada e na proposta a eficácia carrapaticida a ser atingida será de no mínimo 80%.

Uma possibilidade de melhoria da eficácia do FIP aplicado pela via SC seria o ajuste da dose. Estudos com maiores doses podem ser realizados na tentativa de atingir níveis mais altos de eficácia. Pois já foi demonstrada que a eficácia do FIP aplicado topicamente é dose dependente. Esse aumento da dose pode variar em até cinco vezes, pois já foi comprovada a segurança FIP em doses de até 5 mg/Kg por via oral em camundongos.

Sabe-se que a formulação influencia diretamente na liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica e conseqüentemente no seu comportamento farmacocinético. Sendo assim, alterações na formulação podem levar a melhorias dos parâmetros como manutenção de níveis plasmáticos mais altos por um período maior de tempo levando a um aumento da eficácia.

O objetivo do trabalho era comprovar que o FIP administrado pela via SC atingiria a circulação sistêmica em níveis plasmáticos suficientes para produzir efeito carrapaticida contra infestações de *R. (B.) microplus* em bovinos. Com a conclusão do trabalho, comprovou-se a hipótese. Com esses resultados em mãos, pode-se aprimorar a formulação e atingir melhores resultados no diz respeito à eficácia. A veiculação do FIP para administração SC foi feita utilizando veículos capazes de solubilizar o fármaco e mantê-lo em solução estável. Uma alternativa para a melhoria da performance da formulação seria talvez aumentar sua viscosidade com o auxílio de agentes espessantes. O aumento da viscosidade da formulação influencia diretamente nas propriedades reológicas da forma farmacêutica. De forma geral formas mais viscosas levam a uma diminuição do fluxo de liberação, ou seja, diminuem a cedência do fármaco a partir da forma farmacêutica. Isso caracteriza um sistema de liberação prolongada. O aumento da concentração do fármaco também influencia na cinética de liberação. Termodinamicamente, quanto maior a concentração do fármaco, maior o fluxo de liberação do mesmo a partir da forma farmacêutica. Assim, com o aumento da dose e o aumento da viscosidade, teriasse, teoricamente, uma maior cedência do fármaco inicialmente, devido a mais alta concentração do fármaco, e posteriormente uma liberação mais lenta devido ao aumento da viscosidade. Obtendo portanto, uma liberação mais imediata do

fármaco inicialmente e posteriormente uma liberação mais lenta, proporcionando manutenção de níveis plasmáticos mais altos por um período de tempo maior.

Outra alternativa farmacotécnica seria formular uma suspensão, que facilitaria a incorporação de maiores quantidades do fármaco (no caso de aumento da dose) e também proporcionaria uma liberação mais lenta prolongando níveis plasmáticos mais altos por um período maior de tempo.

O FIP aplicado pela via subcutânea tem potencial para se tornar uma formulação viável para inserção no mercado veterinário. Alguns ajustes de dose e na fórmula podem alcançar maiores níveis de eficácia. E também proteção contra reinfestação. Essa proteção ao que tudo indica deve ser ainda maior do que a do produto aplicado pela via tópica, pois se sabe que o FIP sofre fotólise e hidrólise alcalina, diminuindo seu tempo de persistência contra reinfestação em testes de campo, quando o gado é exposto às condições ambientais.

O método bioanalítico desenvolvido e validado por CLAE-UV é crucial para dar continuidade aos estudos de aprimoramento da formulação. Afinal, se trata de um método simples, rápido, com boa reprodutibilidade e baixo limite de quantificação. A ampla faixa linear permite quantificar amostras desde concentrações muito baixas (5 ng/mL) até concentrações mais altas (1000 ng/mL) o que garante a quantificação mesmo trabalhando com diferentes doses e tempos de coleta. A estabilidade apresentada pelas amostras biológicas também é uma grande vantagem, pois permite certa flexibilidade de manuseio das amostras.

Além dos estudos de aprimoramento da formulação, um estudo simplificado de relação concentração plasmática/efeito (pk/pd) pode ser executado para determinação da concentração plasmática correspondente ao melhor efeito. Nesse caso, o estudo de curva de concentração plasmática deve ser realizado concomitantemente aos estudos de eficácia clínica utilizando, portanto, indivíduos infestados. Apesar de não ser o recomendado pelas normas atuais para ensaios farmacocinéticos, um ensaio delineado desta forma permite a avaliação direta e precisa da relação concentração plasmática/efeito.

Apesar da aplicação do FIP pela via SC ser promissora no que diz respeito à eficácia carrapaticida em bovinos, segurança do aplicador, trazer facilidade quanto à aplicação, devemos aventar uma possível desvantagem. Provavelmente o período residual no leite será elevado e conseqüentemente não poderia ser empregado em vacas em lactação e que o leite seria empregado para o consumo humano. Está hipótese estaria relacionada já que foram encontrados níveis plasmáticos quantificáveis no sangue até 21 dias após o tratamento, o que se torna um fator limitante para emprego do FIP por essa via para vacas em lactação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAJOUD, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p.1347-1352, 2003.

ACP. **Evaluation of fipronil use as a public hygiene insecticide**. Advisory Committee on Pesticides. Food and Environmental Protection Act 1985, part III. York: Pesticides Safety Directorate, MAFF, 1999.

AGUIRRE, D.H.; VINABAL, A.E.; SALATIN, A.O.; CAFRUNE, M.M.; VOLPOGNI, M.M.; MANGOLD, A.J.; GUGLIEMONE, A.A. Susceptibility to two pyrethroids in *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae) populations in northwest Argentina: Preliminary Results. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p.329–334, 2000.

ANDRADE, S. F.; SANTARÉM, V. A. Endoparasitocidas e Ectoparasitocidas. In: ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2ª Edição, Editora Roca, São Paulo, 437 – 468p. 2002.

ALTON M.E., **Delineamento de formas farmacêuticas**, Editora Artmed, 2ª edição, Porto Alegre, RS, p.504, 2005.

ANVISA, Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br> Acesso em: 05 de dezembro de 2011.

BIANCHIN, I.; SALANI, E. C.; HENDERSON, D. Eficácia da formulação do Fipronil® a 1% “pour-on” sobre a mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans irritans*) em bovinos nelore naturalmente infestados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, suplemento1, p. 47, 1997.

BICHON, E.; RICHARD, C. A.; BIZEC, B. Le. Development and validation of a method for fipronil residue determination in ovine plasma using 96-well plate solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1201, p. 91-99, 2008.

BIRCKEL, P.; COCHET, P.; BERNARD, P.; WEIL, A. **Advances in Veterinary Dermatology**, Eds Kwochka, Willemse & von Tscherner, v. 3, p.571, Butterworth Heinemann, Oxford, 1998

BOBE, A.; COSTE, C. M.; COOPER, J.F. Factors influencing the adsorption of fipronil in soils, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.4861-4865, 1997.

BOBE, A.; COOPER, J.F.; COSTE, C.M.; MULLER, M.A. Behavior of fipronil in soil under Sahelian plain field conditions. **Pesticide Science**, v. 52, p. 275-281, 1998.

BRENNAN, A.A.; YOU, J.; LYDY, M.J. Comparison of cleanup methods for fipronil and its degradation products in sediment extract, **Talanta**, v.78, p. 408-1413, 2009.

BULL, M.S., SWINDALE, S., OVEREND, D.; HESS, E.A. Suppression of *Boophilus microplus* populations with fluazuron – an acarine growth regulator. **Australian Veterinary Journal**, v.74, p.468–470, 1996.

CAPRONI, L. Jr., UMEHARA, O.; MORO, E.; GONCALVES, L.C.B. Field efficacy of doramectin and ivermectina against natural infestations of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.7, p.151–155, 1998.

CASTRO-JANER, E.; RIFRAN, L.; PIAGGIO, J.; GIL, A.; MILLER, R.J.; SCHUMAKER, T.T.S. *In vitro* tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. **Veterinary Parasitology**, v.162, p.120–128, 2009.

CASTRO-JANER, E.; RIFRAN, L.; GONZÁLEZ, P.; PIAGGIO, J.; GIL, A.; SCHUMAKER, T.T.S.; *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by *in vitro* bioassays. **Veterinary Parasitology**, v.169, p.172–177, 2010 a.

CASTRO-JANER, E.; MARTINS J.R.; MENDES, M.C.; NAMINDOME A.; KLAFKE G.M.; SCHUMAKER, T.T.S. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using *in vitro* larval bioassays. **Veterinary Parasitology**, v.173, p.300–306, 2010 b.

CHANTON, P. F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M.; MEYRAN, J. C. Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropod fauna associated with subalpine mosquito breeding. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.52, p. 8–12, 2001.

CABONI, P.; SAMMELSON, R.E.; CASIDA, J.E., Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: ethiprole compared with fipronil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7055–1061, 2003.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B., Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v.32, n.4, p.1021–1030, 2009.

CAPANEMA, L.V.L. ; VELASCO, L.O.M. ; SOUZA, J.O.B. ; NOGUTI, M.B. Panorama da Indústria Farmacêutica Veterinária, **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n.25, p.15–174, 2007.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**, Editora Unicamp, São Paulo, 2006.

COOPER, P.R.; PENALIGGAN, E.J. Use of fipronil to eliminate recurrent infestation by *Trichodectes canis* in a pack of bloodhounds. **Veterinary Record**, v. 139, p.95, 1996.

CORGONZINHO, C. N. C., Desenvolvimento de vacina baseada em sistema de liberação sustentada contendo proteína recombinante, **Dissertação de mestrado USP**, Ribeirão - Preto, SP, 2008.

COUTINHO, C.F.B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

CURTIS, C.F. Use of 0.25 per cent fipronil spray to treat sarcoptic mange in a litter of five week old puppies. **Veterinary Record**, v. 139, p. 43–44, 1996

CURTIS, C. Use and abuse of topical dermatological therapy in dogs and cats. Part 2. **In Practice**, v.21 (8) p.448-454, 1999.

DAS, P. C., YAN, C., CHERRINGTON, N., HODGSON, E., ROSE, R. L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 164, p. 200–214, 2006.

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

DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E.; HUNTER III J.S.; JEANNIN, P. Evaluation of a pour-on formulation of fipronil against *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae) under natural South Texas field conditions. **Experimental & Applied Acarology**, v.23, p.351-364, 1999.

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

DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E. Efficacy of macrocyclic lactone endectocides against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infested cattle using different pour on application treatment regimes. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, p. 763–769, 2002

DEFRA. **Evaluation on: fipronil use as a public hygiene insecticide**. Department for Environment, Food and Rural Affairs, 1999. 116p.

DEMCHECK, D. K.; SKROBIALOWSKI, S. C. **Fipronil and degradation products in the rice-producing areas of the mermantau river basin**, louisiana, february-september 2000. Fact Sheet FS-010-03. National Water Quality Assessment Program. U.S.G.S. Baton Rouge, LA. 2003.

DRUMMOND, R.O.; ERNST, S.E.; TREVINO, J.L.; GLADNEY, W.J. & GRAHAM, O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66 (1): p.130-133, 1973.

EMA- European Medicines Agency – Science Medicines Health, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). **Guideline on bioanalytical method validation**, 2011.

FAO, Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants. Guidelines. 2004. Disponível em <http://www.fao.org/ag/aga.html>. Acesso em: 05 de Janeiro de 2012.

FAOUDER, J. Le; BICHON, E.; BRUNSCHWING, P.; LANDELLE, R.; ANDRE, F.; BIZEC, B. Le, Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. **Talanta**, v.73, p.710-717, 2007.

FDA - Food and Drug Administration, US Department of Health and Humans Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for Industry. **Bioanalytical Method Validation**, 2001.

FENET, H.; BELTRAN, E.; GADJI, B.; COOPER, J.F.; COSTE, C.M. Fate of a phenilpyrazole in vegetation and soil under tropical field conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 49, p.1293-1297, 2001.

FURLONG, J. **Diagnosis of the susceptibility of the cattle tick, *Boophilus microplus*, to acaricides in Minas, Gerais State, Brazil**. In Control de la Resistencia em Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria y Enfermedades que transmiten, IV Seminario Internacional de Parasitologia Animal (ed.Morales, G., Fragosa, H. & Garcia, Z.), pp. 41–46. Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico, 1999.

GANT, D.B.; CHALMERS, A.E.; WOLFF, M.A.; HOFFMAN, H.B.; BUSHEY, D.F. Fipronil: action at the GABA receptor. **Critical Reviews in Toxicology**, v.2, p.147-156, 1998.

GEORGE, J.E., DAVEY, R.B., AHRENS, E.H., POUND, J.M.; DRUMMOND, R.O. Efficacy of amitraz (Tactic[®] 12.5% EC) as a dip for the control of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) on cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.37,p.55–67, 1998.

GEORGE, J.E.; POUND, J.M.; DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, v. 129, p.353-366, 2004.

GOODMAN & GILMAN, **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 10^o edição, Editora Mc Graw-Hill, São Paulo, SP, Março 2003.

GUIMARÃES J. H.; TUCCI E. C.; BARROS-BATTESTI D. M., **Ectoparasitos de Importância Veterinária**, Ed. Plêiade, São Paulo, SP, Cap 2, p. 148-154, 2001.

GUNASEKARA, A.S.; TRUONG, T.; GOH, K.S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R.S. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**. Japan, v. 32, n. 3, p.198-199, 2007.

GOMES, A. **Controle do carrapato do boi: um problema para que cria raças européias**. Embrapa, Campo Grande, MS, n.31, ago. 1998.

HADJMOHAMMADI, M.R.; NIKOU, S.M.; KAMEL, K. Determination of fipronil residue in soil and water in the rice fields in north of iran by RP-HPLC method, **Acta Chimica Slovenica**, v.53, p.517-520, 2006

HAINZL, D.; CASIDA, J.E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, p.12764-12767, 1996.

HAINZL, D.; COLE, L.M. Cole; CASIDA, J.E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfanyl photoproduct, **Chemical Research Toxicology**, v.11, p.1529-1535, 1998.

HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L.; MC DOWALL, R.D. Validation of bioanalytical chromatographic methods, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.17: (2), p.193-218, 1998.

HERRERA, F. R.; IZAGUIRRE, L. R. **Evaluación de la Eficacia y la Tolerancia de una Solución Externa de Fenilpirazol (Fipronil) al 1% (Ectonil® Pour On) para el control de infestaciones por garrapatas (*Boophilus microplus*) y moscas (*Haematobia irritans*) en Ganado Vacuno de la Selva.** Agrovvet Market Animal Health, Juanjui, fev.2008. Disponível em: <http://www.agrovvetmarket.com> Acesso em: 01 dez. 2009.

HITCHCOCK, L.F., Resistance of cattle tick (*Boophilus microplus*, Canestrini) to benzene hexachloride. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.4, p.360-364, 1953.

HOLDSWORTH P.A., KEMP D., GREEN P., PETER R.J., DE BRUIN C., JONSSON N.N., LETONJA T., REHBEIN S., VERCRUYSEJ., World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants, **Veterinary Parasitology**, v.136, p.29–43, 2006.

HOVDA, L. R.; HOSER, S. B., Toxicology of newer pesticides for use in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 32, p. 455 – 467, 2002.

HU, G-X.; CHEN, X-Y.; ZHOU, H-Y.; QIU, X-J; CHEN, B-B; LU, Z-Q., Toxicokinetics of fipronil and fipronil sulfone in rabbits, **Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology** v.20, p.356-360, 2006.

HUNTER, J.S., KEISTER, D.M., JEANNIN, P. Fipronil: a new compound for animal health. In: **Proceeding of the American Association of Veterinary Parasitologists**, 39th Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, 1994, p. 40.

HURLEY, P. M.; HILL, R. N.; WHITING, R. J. Mode of Carcinogenic Action of Pesticides Inducing Thyroid Follicular Cell Tumors in Rodents. **Environmental Health Perspectives**, v.106, n.8, p. 437-445, 1998.

JIMENEZ, J.J.; BERNAL, J.L.; NOZAL, M.J.; MARTÍN, M.T.; MAYO, R. Comparative study of sample preparation procedures to determine fipronil in pollen by gas chromatography with mass spectrometric and electron-capture detection, **Journal of Chromatography A**, v.1146, n.1, p.8-16, 2007.

JIMENEZ, J.J.; BERNAL, J.L.; NOZAL, M.J.; MARTÍN, M.T.; MAYO, R., Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection, **Journal of Chromatography A**, v.1187, p.40-45, 2008.

JONSSON, N.N.; MATSCHOSS, A.L. Attitudes and practices of Queensland dairy farmers to the control of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, p. 746–751, 1998.

KADAR, A.; FAUCON, J.P. Determination of traces of fipronil and its metabolites in pollen by liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54:(26) p.9741-9646, 2006.

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

LANÇAS, F.M., Extração com fluido supercrítico: Quo Vadis? **Revista Analytica**, n° 2, p.30-37, 2002.

LANÇAS, F.M., **Extração em fase sólida (SPE)**, 1º Edição, Editora RiMa, São Carlos, SP, 2004.

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

LEGHAIT, J.; GAYRARD, V.; TOUTAIN, P-L.; PICARD-HAGEN, N.; VIGUIÉ, C., Is the mechanisms of fipronil-induced thyroid disruption specific of the rat: Re-evaluation of fipronil thyroid toxicity in sheep? **Toxicology Letters**, v. 194, p. 51–57, 2010.

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

MATSUDA, K.; BUCKINGHAM, S. D.; KLEIER, D.; RAUH, J. J.; GRAUSO, M.; SATTELLE, D. B. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. **Trends in Pharmacology Science**, v. 22, n. 11, p. 573-580. 2001.

MORZYCKA B. Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.982, p. 267-273, 2002.

MOYA-BORJA, G. E.; SALANI, E. C. Eficácia do Fipronil “pour-on” (Topline) no controle das infestações naturais do berne, *Dermatobia hominis* em bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, suplemento1, p. 59, 1997a.

MOYA-BORJA, G. E.; SALANI, E. C. Eficácia do Fipronil “pour-on” (Topline) na prevenção da infestação da bicheira, *Cochliomyia hominivorax* em bovinos castrados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, suplemento1, p. 66, 1997b.

NGIM, K. K.; CROSBY, D. G. Abiotic processes influencing fipronil and desthiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.20, p. 972-977, 2001.

NUTTALL, T. J.; FRENCH, A.T.; CHEETHAM, A.C.; PROCTOR, F. J. Treatment of *Trombicula autumnalis* infestation in dogs and cats with a 0.25 per cent fipronil pump spray. **Journal of Small Animal Practice**, v. 39, p. 237–9, 1998.

PAYNE, P. A.; DRYDEN, M. W.; SMITH, V.; RIDLEY, R. K. Effect of 0,29% w/w fipronil spray on adult flea mortality and egg production of three different cat flea, *Ctenocephalides felis* (Bouché), strains infesting cats, **Veterinary Parasitology**, v.102, p. 331-340, 2001.

PEREIRA M. C., LABRUNA M. B., SZABÓ M. P. J., KLAFKE G. M., **Rhipicephalus (Boophilus) microplus Biologia, Controle e Resistência**, Ed. MedVet, São Paulo – SP, 2008.

PESTICIDE ACTION NETWORK. PAN. Union King. Disponível em: <<http://www.pan-uk.org/pestnews/actives/fipronil.htm>>. Acesso em: 31 out. 2009.

POSTAL, J.M.R.; JEANNIN, P.C.; CONSALVI, P.J., Field efficacy of mechanical pump spray formulation containing 0,25% fipronil in the treatment and control of flea infestation and associated dermatological signs in dogs and cats, **Veterinary Dermatology**, v.3 (3): p.153-158, 1995.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida "no tubo" e cromatografia líquida de alta eficiência, **Química nova**, v. 28, n.5, p. 880-886, 2005.

RAUGH, J.J.; LUMMIS, S.C.R.; SATTELLE, D.B., Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors, **Trends in Pharmacology Science**, v.11, p.325-329, 1990.

RAVETON, M.P. Phototransformation of the insecticide fipronil: Identification of novel photoproducts and evidence for an alternative pathway of photodegradation, **Environmental Science and Technology**, v. 40, p. 4151-4157, 2006.

RHONE-POULENC AG COMPANY. Application for Registration. Volume No. 52062-071. Vol 1. Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency, Sacramento, CA, 1998.

RIBEIRO, F. A.; FERREIRA, M. M.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nove ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados, **Química nova**, 31, 164-171, 2008.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C; MIGUEL, E.; ALBERO, B.; TADEO, J.L. Determination of fipronil residues in honey and pollen by gas chromatography, **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.6, p.7-14, 2008.

SCHARF, M.E., SUITER, D.R. Insecticide mode of action, **Pest Control Technology**, Outubro, 2011. Disponível em www.caes.uga.edu/publications. Acesso em 10 de janeiro de 2012.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B.C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**, 5ª Edição, Editora McGraw-Hill, São Paulo, SP, 2004

SHAW, R.D., Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum, **Bulletin of Entomological Research**, v.56, n.4, p.398-405, 1966.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. **A procedure to assess linearity by ordinary least squares method**. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais/Faculdade de Farmácia/Departamento de Alimentos, 2005.

STONE, B.F.; HAYDOCK, R.P., A method for the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bulletin of Entomological Research**, v.53, p.563-578, 1962.

TANNER, P. A.; MEO, N. J.; SPARER, D.; BUTLER, S.; ROMANO, M. N.; KEISTER, D. M. Advances in the treatment of heartworm, fleas and ticks. **Canine Practice**, v. 22, n. 2 - 3, p. 40 - 47, 1997.

TAYLOR, M.A. Recent Developments in Ectoparasiticides, **The Veterinary Journal**, v. 161, p. 253-268, 2001.

THE PESTICIDE MANUAL. 12ª Edição, Editora C. D. S. Tomlin, The British Crop Protection Council. Surrey, U.K. pp. 413-415, 2000.

TINGLE, C.C.; ROTHER, J.A.; DEWHURST, C.F.; LAUER, S.; KING, W.J. **Health and environmental effects of fipronil**. Nov, 2000. Disponível em: <http://www.panuk.org/Publications/Briefing/fipronil.pdf>. Acesso em: 25/08/2009.

TINGLE, C. C.; ROTHER, J. A.; DEWHURS, C. F.; LAUER, S. KING, W. J. Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 176, p. 1-66, 2003.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M.R.F.; CARDOSO, L.V.; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E.G. Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and the modified QuEChERS method for determination of fipronil in honey by high performance liquid chromatography with diode-array detection, **Analytical Methods**, v.3, p.1893-1900, 2011.

U.S.EPA. Fipronil Pesticide fact sheet. EPA 737-F-96-005. **United States Environmental Protection Agency**, Washington, USA, 1996.

U.S.EPA. Memorandum: Fipronil -Review of incident reports for three products. DP Barcodes: D241621, D241622, D241623, and D245344. Cases 0124261, 046906, 060305, 014261. **United States Environmental Protection Agency**, Washington, 1998.

VICH - The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicine and Information Technology Unit, Topic GL9 (GCP), **Guideline for Good Clinical Practices**, 2000.

VÍLCHEZ, J. L.; PRIETO, A.; ARAUJO, L.; NAVALÓN, A. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 919, p.215-221, 2001

VINCENZI, P.; GAUCHI, C. Efficacy of fipronil against ear mites *Otodectes cyanotis* in dogs and cats. **Proceedings of the 14th Annual Congress ESVD-ECVD**, Pisa, Italy, September 5–7, p 117, 1997.

WAACK, R.S. **Fusões e aquisições na indústria farmacêutico-veterinária**. Caderno de Pesquisas em administração, São Paulo. v.7, n.3, jul./set. 2000.

WARE, G. W. **The Pesticide Book**. 5th ed. Thomson Publications. Fresno, CA. 2000. pp. 69.

WHITNALL, A.B.; BRADFORD, B., An arsenic resistant tick and its control with gammexane dips. **Bulletin of Entomological Research**, v.38, p.353-372, 1947.