

UFRRJ

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

TESE

**Fipronil Injetável para Bovinos:
Farmacocinética e Eficácia no Controle de *Haematobia
irritans* e *Dermatobia hominis***

VIVIANE DE SOUZA MAGALHÃES

2016



**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**

**FIPRONIL INJETÁVEL PARA BOVINOS: FARMACOCINÉTICA
E EFICÁCIA NO CONTROLE DE *Haematobia irritans* E
*Dermatobia hominis***

VIVIANE DE SOUZA MAGALHÃES

Sob orientação do professor
Fabio Barbour Scott

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
Março de 2016**

636.2089696

M188f

T

Magalhães, Viviane de Souza, 1982-

Fipronil injetável para bovinos: farmacocinética e eficácia no controle de *Haematobia irritans* e *Dermatobia hominis* / Viviane de Souza Magalhães. – 2016.

xvi, 93 f.: il.

Orientador: Fabio Barbour Scott.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária, 2016.

Bibliografia: f. 88-93.

1. Bovino - Parasito - Teses. 2. Inseticidas - Teses. 3. Mosca-do-chifre - Controle – Teses. 4. *Dermatobia hominis* - Controle - Teses. I. Scott, Fabio Barbour, 1966- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação 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**

VIVIANE DE SOUZA MAGALHÃES

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: 21/03/2016

Fábio Barbour Scott. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Bruno Gomes de Castro Dr. UFMT

João Ricardo de Souza Martins Dr. FEPAGRO

Isabella Vilhena Freire Martins Dr. UFES

Douglas Siqueira de Almeida Chaves Dr. UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, obrigada aos animais que participaram da parte experimental, sem eles todo o trabalho não poderia ter sido realizado.

Obrigada também a toda equipe de campo. Gabriela, Simone, Bárbara, Vinícius (Preto), Vinícius (BH), Cintia, Demir, Tiago e todos os outros que direta ou indiretamente participaram dos estudos *in vivo*. Sem a ajuda e dedicação de vocês seria impossível. Vocês são uma verdadeira equipe.

Obrigada a toda “família” LQEPV, pela dedicação, paciência e todo esforço empenhado nestes 4 anos.

Obrigada aos professores Fabio Barbou Scott, Thais Ribeiro Correia Azevedo, Katherina Coumendouros e Yara Peluso Cid por todo apoio e dedicação. Sou uma profissional melhor pelo empenho e exemplo de vocês.

A minha filha Luiza muito obrigada pela paciência e tantos momentos de ausência e confusões. Sua companhia foi a minha força para finalizar esse projeto.

Aos meus pais, não tenho palavras para agradecer toda dedicação e apoio. Vocês são meu porto seguro.

Ao meu namorado, Lodson, muito obrigada pela paciência e apoio neste projeto. Sua presença foi essencial.

A Thais Paes, meu braço direito e muitas vezes o esquerdo também, muito obrigada por toda ajuda. Em muitos momentos o trabalho só foi finalizado pelo seu empenho.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, obrigada por mais uma vez abrir as portas acadêmicas e proporcionar a possibilidade de meu aperfeiçoamento profissional e pessoal.

A todos os professores, funcionários e amigos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho obrigada.

A FAPUR e CAPES, pelo apoio financeiro necessário para realizar todo projeto.

BIOGRAFIA

Viviane de Souza Magalhães, filha de Roberto de Souza Magalhães e Neizi de Souza Magalhães, nascida em 22 de setembro de 1982 na cidade de Niterói, estado do Rio de Janeiro.

Cursou seu segundo grau na Escola Técnica Federal de Química do Rio de Janeiro, formando-se em como técnica em química, especialista em biotecnologia em julho de 2003. Trabalhou como bolsista de apoio técnico da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) com atividades na área de biologia molecular de agosto de 2001 a agosto de 2003.

No ano de 2004 ingressou no curso de Ciências Farmacêuticas da UFRJ diplomando-se em setembro de 2008 como Farmacêutica, e posteriormente, em junho de 2010, como Farmacêutica Industrial. Durante a graduação foi estagiária do Laboratório de Controle de Qualidade da UFRJ no período de novembro de 2005 a fevereiro de 2007 e analista de controle de qualidade microbiológico da Indústria Ranbaxy Farmacêutica no período de março de 2007 a agosto de 2009.

Em dezembro de 2009, foi aprovada no processo de seleção para o Mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), área de concentração Sanidade Animal, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), orientada pelo professor Fabio Barbour Scott tendo defendido dissertação intitulada “Avaliação da curva de concentração plasmática e eficácia da ivermectina oral em cães contra *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus*”. Foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de março de 2010 a fevereiro de 2012 obtendo o grau de Mestre em Ciências Veterinárias no fim deste período.

Em dezembro de 2011 foi aprovada no processo de seleção para o Doutorado do curso de Pós-graduação em Ciência Tecnologia e Inovação em Agropecuária (PPGCTIA) área de concentração Patobiologia Animal, da UFRRJ, orientada pelo professor Fabio Barbour Scott. Foi bolsista CAPES de março de 2012 a julho 2014.

Em junho de 2014, foi aprovada em concurso público nível superior, Técnico Administrativo, do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária da UFRRJ, tendo entrado em exercício em agosto de 2014 onde atualmente trabalha e realiza seu doutorado.

RESUMO GERAL

Magalhães, Viviane de Souza. **Fipronil injetável para bovinos: farmacocinética e eficácia no controle de *Haematobia irritans* e *Dermatobia hominis***. 2016. 93f 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, 2016.

O Brasil é o país pertencente ao MERCOSUL com o maior rebanho bovino, sendo também o primeiro lugar em número de abates e produção de carnes, por este motivo ocupa lugar de destaque no cenário internacional. Para manter esta produtividade se faz necessário investimentos em manejo, genética e sanidades. Quanto a sanidade as parasitoses desempenham um papel de relevância podendo determinar sérios prejuízos a saúde dos animais. Nas últimas três décadas não têm ocorrido o desenvolvimento pronunciado de novas moléculas com ação parasiticidas. O que se observa é o lançamento no mercado veterinário brasileiro de produtos que apresentam inovações em associações, apresentações, formulações, vias e formas de administração. Este estudo tem como objetivo desenvolver uma formulação injetável de fipronil e avaliar a sua biodisponibilidade e eficácia contra *Haematobia irritans* e *Dermatobia hominis*. Para isto, foram desenvolvidas 13 formulações (F1 a 13) e submetidas ao teste de estabilidade acelerada onde ao fim de 6 meses 5 eram estáveis (F3, F4, F5, F10 e F11). Foi construído o perfil plasmático das formulações estáveis de maior dosagem (F10 e F11) e comparadas a formulação tópica comercial. Para o desenvolvimento de métodos de análise, duas técnicas de preparação de amostras foram testadas. Ambas com análise por CLAE-UV. A técnica com utilização de coluna MAR não foi eficiente sendo validade a técnica com EFS com intervalo de 5 a 500 ng / mL para fipronil e de 10 a 500 ng / mL para fipronil-sulfona. Os valores de precisão média encontrados foram de 13,7 e 10,9 de fipronil e fipronil sulfona, respectivamente, e a exatidão média de 7,2 e 5,5% para o fipronil e fipronil sulfona, respectivamente. Com esta metodologia foi possível avaliar o perfil plasmático das formulações F10, F11 e comercial encontrando maiores biodisponibilidade na formulação injetável com menor quantidade de N-metilpirrolidona (F10). A presença do produto de metabolização fipronil sulfona só pode ser quantificada após aproximadamente 15 dias em todas as formulações e um tempo de meia-vida do fipronil de 37 horas para as formulações injetáveis (F10 e F11) e 100 horas para a formulação tópica comercial foi encontrado. A fim de testar a influência das formulações na interrupção do ciclo evolutivo de *H.irritans* de ovo a adulto foi realizado um teste de eficácia durante 21 dias. Neste teste foi coletada fezes de animais tratados. As amostras de fezes foram incubadas para avaliação da eclosão de ovos. Os resultados mostraram que as F10 e F11 foram formulações capazes de inibir a eclosão de ovos de *H.irritans* inibindo o ciclo de crescimento deste parasita. Para testar a eficácia contra larvas de *D.hominis* foi realizado um teste de eficácia com 10 bovinos durante 28 dias encontrando eficácias de 54, 65 e 72% para a formulação tópica comercial, F10 e F11 respectivamente após 7 dias de tratamento. Após 21 dias de tratamento, as eficácias aumentaram para 97, 99 e 98% para F10, F11 e formulação tópica comercial respectivamente, demonstrando que as formulações foram eficazes no controle *D.hominis* em bovinos. Com os dados obtidos neste trabalho fica demonstrado claramente que o fipronil possui ação ectoparasiticida por via subcutânea para o controle destes parasitas em bovinos. Podendo ser uma nova alternativa de tratamento.

Palavras-chave:

Fenilpirazol.

Ectoparasito.

Farmacotécnica

ABSTRACT

Magalhães, Viviane de Souza. **Fipronil injection for cattle: pharmacokinetics and effectiveness to control *Haematobia irritans* and *Dermatobia hominis***. 2016. 93p Thesis (Doctorate in Science, Technology and Innovation in Agriculture), Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Brazil is the country belonging to MERCOSUL with the largest cattle herd. It is the first in number of slaughter and meat production, therefore occupies a prominent place on the international scene. To maintain productivity is needed investments in management, genetics and sanities operations. When talk about sanities the parasitosis play a role of importance and may determine serious damage to health of animals. In the last three decades have not been a new development of molecules with fungicidal action only the introduce, in the veterinary market Brazilian products, innovations in associations, presentations, formulations, routes and forms of administration. The aim of this study is development an injectable formulation of fipronil and evaluate its bioavailability and efficacy to control *Haematobia irritans* e *Dermatobia hominis*. Thirteen formulations were developed (F1 to F13). It was performed accelerated stability test where after six months five formulations were stable (F3, F4, F5, F10 e F11). It studied the plasma profile of stable higher dosage formulations (F10 and F11) and compared with the topical commercial formulation. For the development of analytical methods, two sample preparation techniques were tested, both using HPLC-UV techniques. The use of RAM column was not efficient and the SPE technique was validated with a linear range of 5 to 500 ng / mL for fipronil and 10 a 500 ng / mL for fipronil sulfone. The precisions were 13.7 e 10.9 to fipronil and fipronil sulfone respectively and accuracy of 7.2 and 5.5% to fipronil and fipronil sulfone respectively. With this methodology it was possible to evaluate the plasma profile of the formulations F10, F11 and topical commercial formulation finding the higher bioavailability at injectable formulation with fewer N-metilpirrolidone (F10). The metabolism product, fipronil sulfone, was quantitated after approximately 15 days in all formulations and the half-life time of fipronil was 37 hours for injectable formulations (F10 e F11) and 100 hours for topical commercial formulation. To evaluate the influence of the formulations in the interruption of the life cycle of *H.irritans* was performed a efficacy test during 21 days. For this test was collected feces of treated animals. Faeces samples were incubated for evaluate of hatching eggs. The results show that F10 and F11 were able to inhibit the hatching eggs of *H.irritans*. To evaluate the efficacy to control *D.hominis* larvae was performed a efficacy test with 10 cattle during 28 days finding 54, 65 and 72% efficacy for commercial topical formulation, F10 and F11 respectively, 7 days after treatment. Twenty-one days after treatment, the efficacy increased to 97, 99 and 98% for F10, F11 and commercial topical formulation respectively demonstrating that the formulations were effective in controlling *D.hominis* in cattle. These results clearly demonstrate that subcutaneously fipronil action as a ectoparasiticide to control of these parasites in cattle and may be a new treatment alternative.

Keywords: Fipronil. Ectoparasites. Pharmaceutical Technology

RESUMEN AMPLIADO

Magalhães, Viviane de Souza. **Fipronil inyectable para bovinos: farmacocinética y efiácia em el control de *Haematobia irritans* y *Dermatobia hominis***. 2016. 93h Tesis (Doctorado en Ciencia, Tecnología e Inovación en Agropecuaria). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016

1.Introduction

Brasil es el país que pertenece al Mercosur con el mayor rodeo ganadero, estando también en primer puesto en número de faenas u producción de carne, siendo que por este motivo tiene posición de destaque en el escenario internacional. Para mantener esta productividad es necesario inversiones en el manejo, genérica y sanidad. En respecto a la sanidad las parasitosis poseen un papel fundamental llevando a serias pérdidas a la salud de los animales. Entre los parásitos externos podemos destacar la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) y la ura (*Dermatobia hominis*).

La *Haematobia irritans* descrita por Linnaeus, en 1758, y reconocida como una de las plagas de bovinos en Francia en 1830 fue introducida accidentalmente en países donde la producción de bovinos se encontraba en expansión y que se volvió actualmente como una de las plagas de la ganadería. La actividad hematófaga de la mosca del cuerno no es el mayor aspecto que lleva a más pérdidas. Su nombre en latín, “irritans” es aclarado como el principal efecto que este díptero proporciona que es la irritación causada en el animal infestado, dejando el mismo extremadamente agitado y llevando el animal al estado crítico de estrese, este sí responsable por las mayores pérdidas detectadas en los hatos infestados causando disminución de la ganancia de peso, de la producción de leche, del apetito y de la conversión alimentar, pudiendo llevar incluso a la muerte.

Para el control químico de este parasito fueren utilizados productos como organofosforados, avermectinas y el fipronil. Este con eficacia superior a 95% para una formulación al 1% *Pour On* utilizada en el control de *H. irritans* en vaquillonas. La *D. hominis* causadora de la miasis por infestaciones por larvas de este díptero en os tejidos animales. Estas infestaciones generan pérdidas para la ganadería brasileña porque las larvas se desarrollan en los tejidos superficiales de los hospederos promoviendo problemas diversos que van desde la reducción de la productividad, lesiones del cuero y mutilaciones, hasta gastos con productos utilizadas en su control. Los métodos de control son basados en la utilización de plaguicidas que en la mayoría de los casos no son eficaces en el control de las reinfestaciones.

En las últimas tres décadas no tiene ocurrido el desarrollo pronunciado de nuevas moléculas con acción parasitaria. Lo que se observa es el lanzamiento en el mercado veterinario brasileño de productos que presentan innovaciones en asociaciones, presentaciones, formulaciones además de vías y formas de administración. El delineamiento de formas farmacéuticas tiene como objetivo central obtener una respuesta terapéutica previsible en relación a un fármaco incorporado en una formulación.

En este sentido, características químicas del activo, vía de administración, tiempo total de eficacia, esquema de administración de las dosis, empaque adecuado y adhesión del tratamiento son puntos necesarios de evaluárselos antes de empezar un delineamiento. Una hipótesis fundamental de la farmacocinética clínica es que existe una relación entre los efectos farmacológicos de un fármaco y su concentración en la circulación sanguínea. El monitoreo del perfil de la concentración del fármaco en función del tiempo en un fluido fisiológico adecuado permite la determinación de su biodisponibilidad. Una evaluación comparativa de

los parámetros farmacocinéticos en nuevas formulaciones es de extrema importancia para la decisión de la mejor conducta para el tratamiento de los animales y efectividad del efecto clínico. Así los estudios de curva de concentración plasmática de fármacos a partir de la forma farmacéutica son fundamentales en la evaluación del desempeño de nuevas formulaciones.

Para la obtención de una descripción exacta de la curva de concentración plasmática de un fármaco es crucial la utilización de un método validado. Los análisis de las matrices complejas como el plasma animal requieren etapas de extracción y eliminación de impurezas además de la medida de la concentración del analito de interés en un instrumento. Diversas técnicas de preparo de muestras están disponibles cada cual con sus características. El fipronil es un fenilpirazole muy utilizado en la medicina veterinaria para el control de ectoparásitos en perros, gatos y en bovinos pudiendo ser una nueva alternativa en el control de estos parásitos.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar una formulación inyectable de fipronil teniendo como bases el resultado antes desarrollado en laboratorio. Desarrollar y validar un método bioanalítico para la cuantificación del fipronil y fipronil sulfona en plasma de bovinos utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a la detección por ultravioleta. Evaluar el comportamiento farmacocinético de las formulaciones y comparálas con una formulación tópica comercial. Evaluar la eficacia de las formulaciones inyectables y tópica en el control del ciclo evolutivo de *H. irritans* y testar la eficacia de estas formulaciones en el control de la *D. hominis*.

2. Materiales y Métodos

Fueron desarrolladas 13 formulaciones (F1 hasta F13) con fipronil a 5% y 10%. Los principales vehículos utilizados fueron el gliceroformol, el propilenglicol y la N-metilpirrolidona en diferentes proporciones. Las modificaciones de los excipientes tuvieron como objetivo el incremento de la solubilidad del fipronil y por consecuencia, incremento de la estabilidad.

Para evaluar la estabilidad fue realizado el teste de estabilidad acelerada de acuerdo con las directrices de la Instrucción Normativa 5/05 del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA) de Brasil.

Para la construcción del perfil plasmático fueron comparadas dos técnicas de preparación de muestras, la técnica de extracción *online* con el uso de una columna de medio de acceso restringido y la extracción *off-line* con el preparo de la muestra utilizando la extracción en fases sólida. En los dos casos las lecturas de las muestras fueron realizadas vía cromatografía líquida de alta definición con detección por ultravioleta. La técnica que presentó mejores resultados fue validada. Fue diseñado el perfil plasmático de las formulaciones estables de mayor dosificación y comparadas a la formulación tópica comercial. Para eso fueron utilizados 18 bovinos divididos en 3 grupos. Cada grupo fue tratado con una formulación. Muestras de sangre fueron colectadas en los tiempos 0, 4, 12h, 2, 7, 14, 15, 16, 17, 21, 28, 30 y 35 días. Las muestras fueron evaluadas por CLAE-UV para la cuantificación de fipronil y su producto del metabolismo la fipronil sulfona. Los valores encontrados de concentración fueron analizados a través del programa PK Solution para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos. Para el cálculo de la biodisponibilidad fueron utilizados 4 animales tratados con fipronil 5% y N-metilpirrolidona 30%. Muestras de sangre fueron colectadas en los tiempos 0, 4, 6, 12h, 2, 3, 4 y 5 días, y fueron analizadas por CLAE-UV.

Con el objetivo de testar la influencia de las formulaciones en la parada del ciclo evolutivo de la *H. irritans* fue realizado un teste de eficacia durante 21 días. Para este teste fueron utilizados 24 animales divididos en 4 grupos. Cada grupo fue tratado con una

formulación y un grupo ha quedado sin tratamiento. Fueran colectadas heces de los animales en los tiempos 0, 7, 14 y 21 días después del tratamiento. Después de la colecta el material fue incubado junto con huevos de la *H. irritans* para la observación de la evolución del ciclo biológico. Después de 48 horas de incubación fue evaluado la eclodibilidad de las larvas, con 8 días fueran separadas y cuantificadas las pupas y con 15 días de incubación fue realizado el conteo de emergencia de los adultos para el cálculo de la eficacia.

Para evaluar la eficacia contra larvas de la *D. hominis* fue realizado un teste de eficacia a campo de acuerdo a las directrices de la Portaria 48 de 12/05/1997 del MAPA. Fueran utilizados 40 bovinos cruzados divididos en 4 grupos. Cada grupo fue tratado con una formulación y un grupo ha quedado sin tratamiento. Fueran utilizadas las formulaciones estables con mayor dosificación de fipronil y la formulación tópica comercial. Los animales fueran evaluados para el conteo de los nódulos en los días 7, 14, 21 y 28 después del tratamiento.

3. Resultados y Discusión

Después de 6 meses de estudio a penas 5 formulaciones fueran estables (F3, F4, F5, F10 e F11). Las formulaciones estables con 5% de fipronil contenían 20, 30 y 40% de NMP (F3, F4 e F5). Las formulaciones estables con 10% de fipronil contenían 20 y 30% de NMP (F10 e F11). Los excipientes aislados no fueran capaces de solubilizar fipronil y la F12 con 10% de fipronil, y 40% de NMP no fue estable. Para dar continuidad a los estudios in vivo fue seleccionada la F10 y F11, los dos con 10% de fipronil, y 20 y 30% de NMP respectivamente.

Durante el desarrollo de un método bioanalítico para cuantificación de fipronil y fipronil sulfona los resultados encontrados para el método *online* no fueran satisfactorios y no pudieran ser validados. Además de eso el incremento de presión generada en el sistema volvió no viable su utilización. Para el método *offline* fue posible desarrollar y validar una metodología selectiva, linear con intervalo de 5 a 500ng/mL para el fipronil y 10 a 500ng/mL para el fipronil sulfona, con valores medios de precisión de 13,7 y 10,9 para fipronil y fipronil sulfona respectivamente, y exactitud media de 7,2 y 5,5% para fipronil y fipronil sulfona respectivamente.

Para la construcción del perfil plasmático de las formulaciones el Tmax de la SULF solamente fue alcanzado cerca de 400h, aproximadamente 16 días. Las F10 y F11 poseen T1/2 para el FIP próximo una vez que se trata de la misma droga, dosis y vía de administración. Cuando se ha realizado la relación de la AUC0- α de SULF/FIP encontramos los valores de 1,3; 15 y 1,5 para F10, F11 y FIP *pour-on* respectivamente. Estos valores indican la cantidad circulante en la corriente sanguínea de SULF en relación al FIP. Así se puede decir que el fin de 30 días para la F11 la cantidad de SULF es 15 veces mayor que la del FIP. Durante la construcción de los perfiles fue posible observar las fases de absorción, excreción y biotransformación en las tres formulaciones, siendo la F10 la formulación con la mayor biodisponibilidad.

Para el control de la *H. irritans* los resultados demostraran que después de 14 días del tratamiento las formulaciones F10 y F11 presentaran eficacia en la inhibición de la eclosión de huevos de 74 y 97%, respectivamente, en comparación a la formulación tópica comercial que no presentó ninguna eficacia.

Para el control de la *D. hominis* fueran encontradas eficacias de 54, 65 y 72% para F10, F11 y formulación comercial, respectivamente, después de 7 días del tratamiento. Después de 21 días del tratamiento los productos demostraran eficacia de 97, 99 y 98% para F10, F11 y formulación comercial respectivamente.

4. Conclusion

Estos resultados demostraran que las formulaciones F10 y F11 son capaces de inhibir el ciclo evolutivo de la *H. irritans* y de la *D. hominis* en bovinos demostrando claramente que el fipronil posee acción ectoparasiticida por la vía subcutánea para el control de estos parasitas pudiendo ser utilizado como una nueva alternativa de tratamiento.

Palabras-clave: Fipronil. Biodisponibilidad. Desarrollo Farmacéutico. Eficacia parasiticida

LISTA DE ABREVIACOES E SIMBOLOS

ACN	acetonitrila
ADME	administração, distribuição, metabolismo e eliminação
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilncia Sanitria
BOD	cmara de demanda de oxignio
CG	cromatografia gasosa cromatografia gasosa
CL	cromatografia líquida
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
C_{max}	concentração plasmática máxima
CONC	Concentração
CV	coeficiente de variação
DCE	detecção por captura de elétrons
DMFS	dispersão em matriz de fase sólida
DNF	detecção por nitrogênio-fósforo
EFS	extração em fase sólida
EFSC	extração por fluido super-crítico
ELL	extração líquido-líquido
EMA	European Medicines Agency
ET	Etioprol
FDA	Food and Drug Administration
FIP	Fipronil
IN	instrução normativa
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
LQ	limite de quantificação
LQEPV	Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAR	meio de acesso restrito
MEFS	microextração em fase sólida
MP	matéria-prima
MS	Massas
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
PC	peso corporal
RDC	resolução de diretoria colegiada
RE	Resolução
SC	solução combinada
SD	solução diluída
SM	solução mãe
SQR	substância química de referência
SULF	fipronil-sulfona
$T_{1/2}$	Tempo de meia-vida
T_a	tempo de desligamento
T_m	tempo de depleção de matriz
T_{max}	tempo onde ocorre o C_{max}
T_t	tempo de transferência
UR	umidade relativa
USDA	Departamento de agricultura dos Estados Unidos

UV
Vd

Ultravioleta
volume de distribuição

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tempo de meia-vida (h) para seis fármacos em diferentes espécies	9
Tabela 2: Composição das formulações injetáveis de fipronil	16
Tabela 3: Resultados do teste de estabilidade acelerada das formulações de fipronil.....	16
Tabela 4: Esquema de diluições para o preparo das soluções combinadas de fipronil e etioprol	36
Tabela 5: Esquema de diluições para o preparo das soluções combinadas de fipronil sulfona e etioprol	36
Tabela 6: Tabela de tempos de viragem de válvula do método <i>online</i>	37
Tabela 7: Resultados de precisão e exatidão apresentados pelo método <i>offline</i> para quantificação de fipronil	40
Tabela 8: Comparação dos custos unitários das análises do método <i>offline</i> e <i>online</i>	40
Tabela 9: Resultado do teste F para a variância dos resíduos de fipronil sulfona.....	41
Tabela 10: Resultado do teste F para a variância dos resíduos de fipronil.....	41
Tabela 11: Valores dos coeficientes da curva analítica e os erros relativos percentuais para cada ponderação	42
Tabela 12: Resultados de precisão e exatidão para fipronil	43
Tabela 13: Resultados de precisão e exatidão para fipronil sulfona.....	43
Tabela 14: Parâmetros farmacocinéticos de fipronil e fipronil sulfona para as formulações 10, 11 e fipronil pour-on	55
Tabela 15: Parâmetros farmacocinéticos para administração intravenosa de fipronil 5%	57
Tabela 16: Valores de biodisponibilidade absoluta de fipronil das formulações F10, F11 e Fipronil pour-on	58
Tabela 17: Resultados dos números de larvas, pupas e adultos de <i>Haematobia irritans</i> recuperados das fezes de bovinos não medicados e medicados com duas formulações de fipronil empregado por via subcutânea (F10 e F11) com uma formulação pour-on.	73
Tabela 18: Resultados de contagem média e eficácia contra <i>Dermatobia hominis</i> para F10, F11 e FIP pour-on	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cromatograma do Teste de Seletividade. 1- Placebo, 2- Formulação 10.....	15
Figura 2: Estrutura química do Fipronil	24
Figura 3: Modo de operação do sistema de cromatografia 2D: (A) <i>backflush</i> (B) <i>foreflush</i> , usando válvula seletora de seis vias e duas posições. As linhas contínuas indicam a orientação da válvula na posição A e as linhas pontilhadas indicam a orientação da válvula na posição B	28
Figura 4: Tempo de depleção da matriz	28
Figura 5: Tempo de desligamento do analito	29
Figura 6: Tempo de transferência.....	29
Figura 7: Esquema do método <i>online</i> de extração e separação em modo backflush	32
Figura 8: Esquema da válvula seletora para avaliação de T_m e T_a	33
Figura 9: Esquema de válvula seletora para avaliação do tempo de transferência (T_t)	33
Figura 10: Cromatograma de seletividade do método <i>online</i> para fipronil e etioptol. 1- branco, 2- 5ng/mL, 3- Acetonitrila	39
Figura 11: Cromatograma de seletividade de fipronil (A) e fipronil sulfona (B)	41
Figura 12: Curva de linearidade de fipronil. FIP 1, 2 e 3 são 1º, 2º e 3º dia de análise respectivamente.....	42
Figura 13: Curva de linearidade de fipronil sulfona. SULF 1, 2 e 3 são 1º, 2º e 3º dia de análise respectivamente.....	43
Figura 14: Curvas plasmáticas das cinco formulações de fipronil.....	55
Figura 15: Perfil plasmático de fipronil (FIP) e fipronil sulfona (SULF) para formulação F10	56
Figura 16: Perfil plasmático de fipronil (FIP) e fipronil sulfona (SULF) para a formulação F11	56
Figura 17: Perfil plasmático de fipronil (FIP) e fipronil sulfona (SULF) para fipronil pour-on	57
Figura 18: Perfil plasmático de fipronil e fipronil sulfona para F10.....	57
Figura 19: Eficácia na inibição do ciclo biológico de mosca-dos-chifres das formulações contendo fipronil	69
Figura 20: Correlação farmacocinética - farmacodinâmica da formulação F10	71
Figura 21: Correlação farmacocinética - farmacodinâmica da formulação F11	71
Figura 22: Correlação farmacocinética - farmacodinâmica da formulação tópica comercial..	72
Figura 23: Eficácia no controle de larvas de <i>Dermatobia hominis</i> das formulações de fipronil	84
Figura 24: Correlação farmacocinética – farmacodinâmica da formulação tópica comercial .	84
Figura 25: Correlação farmacocinética – farmacodinâmica da formulação F10	85
Figura 26: Correlação farmacocinética – farmacodinâmica da formulação F11	85

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES INJETÁVEIS DE FIPRONIL PARA BOVINOS	3
1. RESUMO	4
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUÇÃO	6
4. REVISÃO DE LITERATURA	7
4.1.Mercado de Produtos Veterinários	7
4.2.Delineamento Farmacêutico	8
4.3.Fipronil	10
5. MATERIAL E MÉTODOS	13
5.1.Padrões e Reagentes	13
5.2.Desenvolvimento de Metodologia Analítica	13
5.3.Desenvolvimento de Formulações	13
5.4.Seleção da Formulação	14
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
6.1.Desenvolvimento da Metodologia Analítica	15
6.3.Seleção da Formulação para Estudos <i>in vivo</i>	17
7. CONCLUSÃO	19
CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FIPRONIL EM PLASMA BOVINO.....	20
1. RESUMO	21
2. ABSTRACT	22
3. INTRODUÇÃO	23
4. REVISÃO DE LITERATURA	24
4.1.Fipronil	24
4.2.Técnicas de Preparo de Amostra <i>offline</i>	24
4.3.Técnicas de Preparo de Amostras <i>online</i>	27
4.4.Meio de Acesso Restrito (MAR)	29
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1.Equipamentos	31
5.2.Métodos de Preparo de Amostras Testados.....	31
5.2.1. Método <i>online</i>	31
5.4.Parâmetros de Validação	34
5.5.Tempo de Análise e Viabilidade Financeira do Método de Preparo.....	35
5.6.Preparo de Padrões e Amostras	35
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.1.Método <i>Online</i>	37

6.2.Método <i>offline</i>	40
7. CONCLUSÕES	44
CAPÍTULO III - COMPORTAMENTO FARMACOCINÉTICO DO FIPRONIL E SEU METABÓLITO NAS FORMULAÇÕES INJETÁVEIS.....	45
1. RESUMO	46
2. ABSTRACT	47
3. INTRODUÇÃO.....	48
4. REVISÃO DE LITERATURA	49
4.1.Farmacocinética	49
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
5.1. Pré-estudo para Determinação dos Pontos de Coleta.....	52
5.2. Construção do Perfil Plasmático Subcutâneo.....	52
5.3. Construção do Perfil Plasmático Intravenoso	53
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6.1. Pré-estudo para Determinação dos Pontos de Coleta.....	54
6.2. Construção do Perfil Plasmático Subcutâneo.....	55
6.3. Construção do Perfil Plasmático Intravenoso	57
7. CONCLUSÕES	59
CAPÍTULO IV - EFICÁCIA DAS FORMULAÇÕES INJETÁVEIS DE FIPRONIL NO CONTROLE DE FORMAS IMATURAS DE <i>Haematobia irritans</i> EM BOVINOS.....	60
1. RESUMO	61
2. ABSTRACT	62
3. INTRODUÇÃO.....	63
4. REVISÃO DE LITERATURA	64
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
5.1.Local do Estudo.....	67
5.2.Formação dos Grupos Experimentais	67
5.3.Avaliação da Eficácia Sobre a Emergência de Adultos	67
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÕES	74
CAPÍTULO V - EFICÁCIAS DE FORMULAÇÕES INJETÁVEIS DE FIPRONIL NO CONTROLE DE LARVAS DE <i>Dermatobia hominis</i> EM BOVINOS.....	75
1. RESUMO	76
2. ABSTRACT	77
3. INTRODUÇÃO.....	78
4. REVISÃO DE LITERATURA	79
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	81
5.1.Localização do Estudo.....	81
5.2.Delineamento Experimental	81
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÃO.....	86
CONCLUSÕES GERAIS	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
---	-----------

INTRODUÇÃO GERAL

O MERCOSUL é uma grande potência agrícola e o Brasil é o país pertencente a este grupo com o maior rebanho bovino, sendo também o primeiro lugar em número de abates e produção de carnes. Desta forma a pecuária brasileira ocupa lugar de destaque no cenário internacional, além de ter um grande potencial de crescimento. Diante deste quadro são crescentes os investimentos em medicamentos veterinários.

A produção na pecuária bovina é baseada em três vértices de uma pirâmide: manejo, genética e sanidades. No vértice sanidade as parasitoses desempenham um papel de relevância podendo determinar sérios prejuízos a saúde dos animais. Estimativas incriminam as parasitoses de bovinos como determinantes de bilhões de reais de prejuízo anual para a pecuária brasileira.

Nas últimas três décadas não têm ocorrido o desenvolvimento pronunciado de novas moléculas com ação parasiticidas. O que se observa é o lançamento no mercado veterinário brasileiro de produtos que apresentam inovações em associações, apresentações, formulações, vias e formas de administração.

Dentre as classes que apresentam ação ectoparasiticida que veem sendo empregados na pecuária merecem destaques a dos organofosforados, piretróides, amidinas, lactonas, fenilpirazoles e benzofeniluréias.

O fipronil, um fenilpirazole, é muito utilizado na medicina veterinária para o controle de ectoparasitos em cães, gatos e recentemente seu uso em bovinos tem aumentado em nosso País. O aumento do seu uso tem ocorrido principalmente em decorrência do aumento de indivíduos resistentes em populações do carrapato *Rhipicephalus microplus*, *Dermatobia hominis* e *Haematobia irritans* frente a outras classes de ectoparasiticidas

Uma das limitações para o uso do fipronil numa escala maior na pecuária bovina é a sua forma de aplicação. Atualmente no Brasil o mercado só dispõe de formulações tópicas pour-on. Embora este tipo de administração tenha vantagens como a praticidade no manuseio pode-se enumerar desvantagens como: os veículos empregados nestas formulações encarecem o preço final do produto e podem se tornar um fator limitante; existe uma preferência do mercado Brasileiro para produtos injetáveis; existe a possibilidade da exposição do profissional ao produto levando a uma possível intoxicação. Esta última é agravada pela infeliz realidade em nosso País quanto a negligência para utilização de equipamentos de proteção individual no momento do emprego de ectoparasiticidas tópicos em bovinos.

Uma formulação injetável poderia trazer algumas características desejáveis como a redução do custo do produto final, maior segurança para o profissional durante a administração do produto e uma maior utilização tendo em vista a preferência do mercado por este tipo de formulação. Não há disponível no mercado Brasileiro uma formulação injetável de fipronil.

Desta forma o estudo teve por objetivo desenvolver uma formulação injetável de fipronil para ser empregada em bovinos. Estudos anteriores realizados pela mesma equipe puderam demonstrar a eficácia do fipronil quando empregado por via subcutânea em bovinos no controle do carrapato *R. microplus*.

Para esta finalidade foram preparadas duas formulações distintas e procedeu-se a comparação de características farmacotécnicas, de disponibilidade plasmática e eficácia no controle das moscas *H. irritans* e *D. hominis*. Com o objetivo de facilitar o entendimento, este trabalho foi dividido em cinco (5) capítulos.

No primeiro capítulo, intitulado “Desenvolvimento de Formulações Injetáveis de Fipronil para Bovinos” estão descritas todas as etapas para o desenvolvimento e análise da estabilidade da formulação desenvolvida tendo como objetivo principal a escolha da formulação a ser utilizada nos testes *in vivo*.

No segundo capítulo, intitulado “Desenvolvimento de Metodologia Bioanalítica para Quantificação de Fipronil em Plasma Bovino” estão descritos os métodos de preparo de amostras e metodologias analíticas estudadas para quantificar o fipronil em plasma bovino tendo como objetivo principal desenvolver e validar uma metodologia analítica adequada para os estudos farmacocinéticos do capítulo seguinte.

No terceiro capítulo, intitulado “Comportamento Farmacocinético do Fipronil e seu Metabólito nas formulações injetáveis” foi avaliada a farmacocinética das formulações desenvolvidas no capítulo I com o uso da metodologia desenvolvida no capítulo II tendo como objetivo principal a determinação da curva de concentração plasmática do fipronil.

No quarto capítulo, intitulado “Eficácia das Formulações Injetáveis de Fipronil no Controle de Formas Imaturas de *Haematobia irritans* em Bovinos” foi avaliado o efeito do uso das formulações selecionadas no capítulo I no desenvolvimento do ciclo biológico da *H. irritans* e no quinto capítulo, intitulado “Eficácia de Formulação Injetáveis de Fipronil no Controle de Larvas de *Dermatobia hominis* em Bovinos” foi avaliada a eficácia das formulações no controle de larvas de *D. hominis*. Os resultados encontrados foram relacionados e descrevem uma formulação injetável capaz de atuar no controle de *H. irritans* e *D. hominis*.

CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES INJETÁVEIS DE FIPRONIL PARA BOVINOS

1.RESUMO

O delineamento de formas farmacêuticas tem como objetivo central obter uma resposta terapêutica previsível em relação a um fármaco incorporado em uma formulação. Neste sentido, características química do ativo, via de administração, tempo total de eficácia, esquema de administração das doses, embalagem adequada e adesão ao tratamento são itens necessários de serem avaliados antes de iniciar um delineamento. O presente estudo teve por objetivo desenvolver uma formulação injetável de fipronil tendo como base os resultados anteriormente desenvolvidos no laboratório. Os principais veículos utilizados foram o glicerolformol, o propilenoglicol e a N-metilpirrolidona em diferentes proporções. As modificações dos excipientes tiveram como objetivo o aumento da solubilidade do fipronil e por consequência, aumento da estabilidade. Para avaliar a estabilidade foi realizado o teste de estabilidade acelerada conforme as diretrizes da IN15/05 do MAPA. Foram preparadas 13 formulações (F1 a F13) com diferentes concentrações de fipronil, N-metilpirrolidona (NMP) e glicerolformol. Após 6 meses de estudo apenas 5 formulações foram estáveis (F3, F4, F5, F10 e F11). As formulações estáveis com 5% de fipronil continham 20, 30 e 40% de NMP (F3, F4 e F5). As formulações estáveis com 10% de fipronil continham 20 e 30% de NMP (F10 e F11). Os excipientes isolados não foram capazes de solubilizar o fipronil e a F12 com 10% de fipronil e 40% de NMP não foi estável. Desta forma, as formulações estáveis com maiores doses de fipronil foram selecionadas para utilização nos estudos *in vivo*.

Palavras-chave: Delineamento farmacêutico. Fipronil injetável. Bovinos

2.ABSTRACT

The Design and Manufacture of Medicines has a central propose obtain a predictable therapeutic response in relation to a drug incorporated in a formulation. In this respect, active chemical characteristics, route of administration, total effective time, management scheme of doses, proper packaging and adherence to treatment are necessary items to be evaluated before starting a design. This study aimed to develop an injectable formulation of fipronil based on the results previously developed in this laboratory. The main vehicles used were glicerolformol, propylene glycol and N-methylpyrrolidone in different proportions. Modifications of the excipients were aimed at increasing the solubility of fipronil and consequently increased stability. To evaluate the stability was performed accelerated stability test as IN15/05 of Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Thirteen formulations were prepared (F1 to F13) with different concentrations of fipronil, N-methylpyrrolidone, glicerolformol and propylene glycol. After six months five formulations were stable (F3, F4, F5, F10 e F11). The stable formulations with fipronil 5% have 20, 30 and 40% of NMP (F3, F4 e F5). The stable formulations with fipronil 10% have 20 and 30% of NMP (F10 e F11). Formulations containing only one of the excipients were not able to solubilize fipronil and F12 with fipronil 10% and NMP 40% was not stable. With this results, stable formulations with higher doses of fipronil were selected for use in *in vivo* studies

Keywords: Pharmaceutical delineation. Injectable fipronil. Cattle

3.INTRODUÇÃO

O avanço na pecuária Brasileira sustenta-se no melhoramento genético, na nutrição animal e no manejo sanitário. Diante deste quadro são crescentes os investimentos em medicamentos veterinários. Por outro lado, as perdas econômicas causadas pelos parasitos que afetam o bem-estar do gado e a produtividade no Brasil são enormes.

As diversidades de espécies com diferentes tamanhos corporais, com barreiras de absorção de fármacos distintas e que geralmente requeiram terapias com uma longa duração de ação e com poucas administrações é um grande desafio para o delineamento de formas farmacêuticas veterinárias.

A indústria farmacêutica veterinária enfrenta alguns desafios comuns das empresas de saúde humana no desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos. No entanto a diversidade das espécies e de raças, a grande diferença de tamanhos corporais, as diferenças ambientais, as diferenças no metabolismo e biologia, as diferenças sazonais e a economia se tornam um grande entrave no desenvolvimento de novas estratégias para as formulações veterinárias.

Na indústria dos animais de produção é necessário comparar os custos do tratamento com os benefícios que resultam do mesmo. O custo dos medicamentos deve ser acessível ao produtor para permitir uma gestão rentável da propriedade, logo medicamentos de uma única dose terão benefícios econômicos.

O principal objetivo do delineamento de formas farmacêuticas é obter uma resposta terapêutica previsível em relação a um fármaco incorporado em uma formulação. Para assegurar a qualidade do produto é necessário observar aspectos como estabilidade química e física, conservação apropriada contra contaminação microbiana, uniformidade de dose e aceitação por parte dos usuários.

Em geral, a estabilidade química de um fármaco está associada com a compatibilidade entre os componentes da fórmula assim como a embalagem primária. De um modo geral os fármacos sofrem decomposição como resultado de vários efeitos como calor, oxigênio, luz e umidade.

Antes de iniciar um delineamento farmacêutico, características químicas do ativo, assim como melhor via de administração, tempo total de eficácia, melhor esquema de administração, embalagem adequada e adesão ao tratamento devem ser detalhadamente estudadas e planejadas.

O fipronil é um inseticida pertencente à classe dos fenilpirazóis amplamente utilizado no controle de vários artrópodes domésticos e pragas agrícolas sendo apresentado em formulações comerciais como: isca, *spray*, pour-on e granulado. Sua formulação para via injetável ainda não está disponível comercialmente e pode ser uma nova alternativa para o tratamento antiparasitário de bovinos.

O objetivo do estudo foi desenvolver uma formulação injetável de fipronil para controle de ectoparasitos bovinos.

4.REVISÃO DE LITERATURA

4.1.Mercado de Produtos Veterinários

A década de 90 foi um período de muitas mudanças na economia e na agropecuária brasileira com redução de barreiras tarifárias e não tributárias. Essas mudanças impulsionaram o comércio internacional, estimulando um maior ingresso e participação de capital estrangeiro no Brasil. Desta forma o agronegócio brasileiro passou a ter uma maior participação de capital estrangeiro ampliando-se consideravelmente neste período. (ALVIM; MORAES, 2013).

Atualmente a pecuária bovina é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro e conseqüentemente da economia nacional (MAPA, 2014). O Brasil é o maior produtor e consumidor de carne bovina do mundo e maior exportador de carne bovina (USDA, 2016).

A cada ano, a participação brasileira no comércio internacional do agronegócio vem crescendo, com destaque para a produção de carne bovina, suína e de frango. Segundo o Ministério da Agricultura, até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial. Já a carne de frango terá 48,1% das exportações mundiais e a participação da carne suína será de 14,2%. Essas estimativas indicam que o Brasil pode manter posição de primeiro exportador mundial de carnes bovina e de frango (BRASIL, 2016).

A agropecuária tem papel fundamental no desenvolvimento da economia de um país. Suas funções nesse processo vão desde o fornecimento de alimentos a preços baixos para a população até a geração de emprego, renda e mercado consumidor para bens industrializados. No Brasil, onde as condições naturais fornecem vantagens comparativas aos produtos da agropecuária, sua segunda função é a geração de divisas para obtenção de insumos e bens de capitais necessários ao desenvolvimento das atividades econômicas (MAPA, 2014).

A pecuária brasileira ocupa lugar de destaque no cenário internacional, além de ter um grande potencial de crescimento. Nos últimos anos, o Brasil consolidou-se como um dos grandes fornecedores de proteína animal para o mundo. A indústria frigorífica nacional é um dos setores mais promissores da economia agroexportadora do país e, o complexo carne é destaque na diferenciação e segmentação de mercados, sendo uma das áreas do agronegócio brasileiro com maior dinâmica tecnológica e de conhecimento (MDIC, 2011).

O avanço na pecuária bovina sustenta-se no melhoramento genético, na nutrição animal e no manejo sanitário. Aliado a esses fatores, acrescenta-se a tecnologia aplicada à pecuária, que está cada dia mais presente no rebanho brasileiro através do desenvolvimento de pesquisas e técnicas específicas aos sistemas produtivos, que impulsionam os índices de produtividade e colaboram para uma pecuária cada dia mais eficiente e sustentável (OLIVEIRA; ZANINE; SANTOS, 2007)

A maioria dos fármacos veterinários foi inicialmente desenvolvida para potencial uso em humanos, principalmente após a década de 90 em que o mercado de medicamento da linha pet aumentou consideravelmente. As empresas já possuíam portfólio de medicamentos humanos consagrados no mercado, percebendo a oportunidade de introduzir o mesmo fármaco para uso veterinário tornando-se responsável também por prover a saúde e o bem-estar de animais domésticos. Assim a indústria de saúde animal tornou-se responsável, portanto, por manter a saúde e a produtividade dos animais domésticos e diversos rebanhos

em todo o mundo, bem como por assegurar a sanidade e a abundância do alimento que produzem (CAPANEMA et al., 2007; RATHBONE, 2000).

De acordo com o Sindicato Nacional de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN), o mercado de medicamentos veterinários está dividido nos segmentos de biológicos, antimicrobianos, ectoparasiticidas, endectocidas, terapêuticos, tônicos e fortificantes, desinfetantes, dermatológicos, além de produtos como suplementos nutricionais e embelezadores.

Dados da indústria mundial de produtos de saúde animal mostram a participação relativa dos diversos grupos de produtos no mercado, dentre eles os produtos de origem biológicas que contribuem com 27%; os antiparasitários com 22%; os antimicrobianos com 17%; os terapêuticos com 11%; os suplementos com 13%; outros produtos contribuem com 10% no mercado. Vale ressaltar que os antiparasitários ficam atrás somente dos produtos biológicos, tendo em vista, a maior necessidade de vacinas para atender ao rebanho bovino, do qual a vacina para a febre aftosa é o produto com vendas mais expressivas no país (SINDAN, 2014).

O mercado farmacêutico veterinário mundial atingiu US\$ 22,5 bilhões em 2012, com crescimento médio de 8% ao ano, desde 2002. O crescimento da demanda mundial tem sido liderado pelo segmento de animais de companhia, que atualmente representa 40% do mercado, sendo o restante destinado a animais de produção (FERNANDES et al., 2013). De acordo com o Sindan (2014), os Estados Unidos e Brasil são, nessa ordem, os dois maiores produtores de proteína animal e os maiores mercados veterinários do mundo, com participações de 40% e 8%, respectivamente.

O Brasil tem uma participação ativa em âmbito global, representando 8% do mercado de saúde animal. Segundo ainda o SINDAN, o mercado brasileiro de saúde animal cresce, desde 2008, uma média 11% ao ano e movimentou R\$ 4 bilhões em 2014. Apesar do maior dinamismo do mercado de animais de companhia, que vem ganhando participação ao longo dos anos, o segmento de animais de produção ainda representa um percentual significativamente superior do mercado, isso se deve ao aumento da demanda interna de criação de gado e exportação de carne no país (FERNANDES et al., 2013).

Quando se trata da distribuição de produtos, no mercado brasileiro, de acordo com a espécie animal, os ruminantes disparam na frente, com mais de 55% do mercado nacional; em seguida vem os produtos para aves, com 14,8%; para cães e gatos, com 14,8%; suínos, com 12,6%; equinos, com 2,1%; e outras espécies representam 0,1% do mercado (FERNANDES et al., 2013).

As perdas econômicas causadas pelos parasitos que afetam o bem-estar do gado e a produtividade no Brasil, foram estimadas em pelo menos \$13,96 bilhões (GRISI et al., 2014), sendo a eficácia nos tratamentos um grande desafio para as cadeias produtivas de carne e leite, causando grandes prejuízos por conta da queda da produtividade dos animais (GRISI et al., 2002).

4.2. Delineamento Farmacêutico

O medicamento veterinário é fundamental para a promoção da saúde e bem-estar animal, para o controle de doenças com potencial de transmissão ao homem, sendo considerado também um fator de produção principalmente nas espécies pecuárias, já que sua utilização pode interferir diretamente no aumento ou diminuição na produção agropecuária. Sendo, desta forma, seu uso é de importância vital para uma produção animal sustentável (BARBOSA, 2010).

No âmbito nacional os produtos veterinários são regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Internacionalmente os órgãos de maior atuação são o FDA, o EMA e a WHO.

A análise de risco do medicamento de uso veterinário relaciona-se com o efeito na espécie alvo e no ambiente, segurança do manuseador e para animais de produção a persistência dos resíduos existentes nos seus subprodutos (BARBOSA, 2010).

Na medicina veterinária existe uma diversidade enorme de espécies com diferentes tamanhos corporais, com barreiras de absorção de fármacos distintas e que geralmente requerem terapias com uma longa duração de ação e com poucas administrações. Deste modo, a utilização de princípios biofarmacêuticos e farmacocinéticos no delineamento de formas farmacêuticas de liberação modificada é essencial para o desenvolvimento racional de produtos veterinários (AHMED, 2002).

Um dos grandes desafios ao desenvolvimento de medicamentos de uso veterinário se dá pelo fato de existirem características distintas entre as diversas espécies que modificam as propriedades de absorção, distribuição, metabolização e eliminação (ADME) dos fármacos. Estas diferenças podem ser exemplificadas na Tabela 1. Os tempos de meia-vida (T1/2), de fármacos variam entre as diversas espécies (BARBOSA, 2010).

Tabela 1: Tempo de meia-vida (h) para seis fármacos em diferentes espécies (AHMED, 2002)

	Bovino	Equino	Canino	Felino	Humano
Pentobarbital	0,8	1,5	4,5	4,9	22,3
Anfetamina	0,6	1,4	4,5	6,5	10 – 15
Salicilato	0,8	1,0	8,6	35	4 – 8
Sulfadimetoxina	9,0	11,3	13,2	10,2	40
Trimetoprim	0,8	3 – 2	3	-	10,6
Fenilbutazona	4,3	3 – 6	2,5 – 6	-	72

Devido as diferenças de características biofarmaceuticas entre as espécies o desenvolvimento de uma formulação para múltiplas espécies é dificultado e deve ser caracterizado em relação cada espécie-alvo respeitando os testes de bioequivalência entre espécies (MARTINEZ et al., 2002).

Suspensões e soluções de liberação controladas são formulações em que o fármaco se encontra dissolvido ou em suspensão num veículo oleoso e tendem a formar um depósito no local da injeção. A velocidade de liberação deste depósito pode ser modificada através da adição de excipientes, da mudança do veículo oleoso e da variação do processo de fabricação. A viscosidade da formulação pode ser alterada para aumentar e modular a liberação através do uso de agentes suspensores (como ésteres do glicerol) ou espessantes (como cera branca de abelha, monoestearato de alumínio) (BARBOSA, 2010).

O conceito de excipiente tem se modificado deixando de ser encarado como uma substancia inerte para ser tratado como um adjuvante e auxiliar a eficácia do medicamento. Possuindo funções como auxiliar ativo a promover sua atividade via liberação da forma farmacêutica, garantir estabilidade da preparação pela conservação microbiológica ou química, melhorar as características organolépticas, favorecer a adesão ao tratamento entre outras. Atualmente existem uma grande variedade de excipientes disponíveis no mercado, na última edição do *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, relaciona-se mais de 700 monografias, o grande número de excipientes existentes pode ser explicado pela variedade de funções que estes desempenham e pelos avanços constantes da área farmacotécnica (FERREIRA, 2010).

A indústria farmacêutica veterinária enfrenta alguns desafios comuns das empresas de saúde humana no desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos. No entanto a diversidade

das espécies e de raças, a grande diferença de tamanhos corporais, as diferenças ambientais, as diferenças no metabolismo e biologia, as diferenças sazonais e a economia tornam-se um grande entrave no desenvolvimento de novas estratégias para as formulações veterinárias (AHMED, 2002).

Deste modo, apesar das semelhanças em longas investigações nas indústrias farmacêuticas humana e veterinária a avaliação da segurança e eficácia do medicamento humano é um processo bastante lento, que consiste em estudos pré-clínicos em modelos animais, seguidos de diversas investigações. Em contraste, os ensaios clínicos de medicamentos veterinários são facilitados pela capacidade de se estabelecer de forma mais rápida a segurança e a eficácia nas espécies-alvo, evitando a necessidade de ensaios pré-clínicos. No entanto, as formulações veterinárias são geralmente mais complexas e mais diversificadas. Raramente é reconhecido que os desafios de desenvolvimento de formulações de produtos para uso veterinário compreendem uma maior proporção no custo global do que os produtos farmacêuticos de uso humano (AHMED, 2002).

Na indústria dos animais de produção é necessário comparar os custos do tratamento com seus benefícios. O custo dos medicamentos tem que ser considerado de forma a permitir uma gestão rentável logo, medicamentos de uma única dose proporcionarão benefícios econômicos (BARBOSA, 2010).

Os fármacos são raramente administrados como substâncias químicas puras. Em geral são utilizados na forma de formulações. Estas podem variar em sua composição com adjuvantes que possuem diversas funções farmacêuticas como solubilizar, suspender, espessar, conservar, emulsionar entre outras. O principal objetivo do delineamento de formas farmacêuticas é obter uma resposta terapêutica previsível em relação a um fármaco incorporado em uma formulação. Para assegurar a qualidade do produto é necessário observar aspectos como: estabilidade química e física, conservação apropriada contra contaminação microbiana, uniformidade de dose e aceitação por parte dos usuários (AULTON, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define estabilidade farmacêutica como a capacidade do produto farmacêutico manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo o seu prazo de validade (WHO, 1996).

Em geral a estabilidade química do fármaco está associada com a compatibilidade entre os componentes da fórmula assim como a embalagem primária. De um modo geral os fármacos sofrem decomposição como resultado de vários efeitos como calor, oxigênio, luz e umidade (AULTON, 2005).

Antes de iniciar um delineamento farmacêutico características químicas do ativo, assim como melhor via de administração, tempo total de eficácia, melhor esquema de administração, embalagem adequada e adesão ao tratamento devem ser detalhadamente estudadas e planejadas.

4.3. Fipronil

O fipronil (FIP) é um inseticida pertencente à classe dos fenilpirazóis (TINGLE et al., 2003). Foi descoberto pela Rhône-Poulenc Ag Company em 1987, apresentado em 1993 (GUNASEKARA; TROUNG, 2007) 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 (RAVETON et al., 2007). Devido ao seu amplo espectro de ação possui recomendações de uso agrícola, saneante, veterinário e domissanitário (TINGLE et al., 2000).

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 exhibe 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; TROUNG, 2007).

Quanto 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 (RAVETON et al., 2007).

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 grave e morte do inseto (AAJOUDE; RAVANEL; TISSUT, 2003; BOBE et al., 1998).

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 (RAVETON et al., 2007). Os produtos de degradação do FIP são altamente tóxicos para invertebrados. Fipronil-sulfona (SULF), 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 cloro dos vertebrados, porém demonstra toxicidade similar ao composto de origem em mamíferos (LACROIX et al., 2010). 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 (GUNASEKARA; TROUNG, 2007).

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 (TINGLE et al., 2000). 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; SANTAREM, 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 ratos e 354 mg/Kg em coelhos devido a sua baixa penetrabilidade dérmica (GUNASEKARA; TROUNG, 2007; TINGLE et al., 2000; USEPA, 1998). Pode causar leve irritação na pele e média irritação ocular 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 (USEPA, 1998).

Um estudo relacionado com a toxicologia crônica, com duração de 13 semanas até um ano de tratamento, do FIP oral em cães Beagle, empregou 0,05 mg/kg/dia, 2 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia, 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 urinálise não mostraram alterações (DELLARCO; ROWLAND; MAY, 2010; TINGLE et al., 2003).

Um dos problemas com a utilização do FIP relaciona-se a seus resíduos que podem ser depositados nas células do tecido adiposo, acarretando, conseqüentemente, uma acumulação ao longo da cadeia trófica, promovendo um efeito ecotóxico (GUNASEKARA; TROUNG, 2007; TINGLE et al., 2003). Dessa forma, o FIP pode causar alterações no sistema nervoso dos organismos e atingir a outros órgãos e sistemas provocando efeitos carcinogênicos no fígado e na tireóide (HURLEY, 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) (USEPA, 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 (USEPA, 1998).

Em medicina veterinária, o FIP é usado no tratamento e controle de ectoparasitos em cães, gatos e em bovinos (TAYLOR, 2001). Para aplicação em bovinos estão disponíveis comercialmente três formulações: duas na forma de pour-on (Topline® e Superhion®) com indicação contra o carrapato *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*) (SINDAN, 2016).

A indústria farmacêutica veterinária produz medicamentos com a finalidade de manter a saúde e a produtividade de diversos rebanhos, bem como assegurar a sanidade e a abundância do alimento que estes animais produzem. Assim, em animais de produção, a utilização de produtos veterinários visa não somente à prevenção de doenças, mas também o aumento de produtividade do rebanho. Os produtos geralmente são adicionados na água ou ração e as formulações possuem liberação lenta de seus princípios ativos, evitando, desta forma, gastos e estresse com o manejo constante dos animais. O uso da via parenteral apresenta uma série de vantagens como maior biodisponibilidade, menor contaminação ambiental e segurança ao manipulador. Devido as grandes vantagens do uso de formas injetáveis de liberação sustentada, retardada, repetida e prolongada em animais de produção, vários sistemas de liberação vêm sendo estudados, como suspensão em base óleo, soluções em veículo não aquoso ou de solubilidade não controlada, micropartículas injetáveis, implantes sólidos, entre outros (SPINOSA; PALERMO-NETO; GÓRNIK, 2014).

5.MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da formulação foram preparadas pré-formulações e submetidas os testes de estabilidade acelerada com análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta (CLAE-UV) nos tempos zero (0), três (3) e seis (6) meses. Para realizar estas análises foi necessário desenvolver e validar um método cromatográfico determinando linearidade, precisão, exatidão e seletividade.

5.1.Padrões e Reagentes

Os reagentes utilizados para o preparo das formulações foram adquiridos da Sigma-Aldrich com grau PA.

O Fipronil matéria-prima (FIP-MP) foi gentilmente doado pela empresa Ouro Fino Saúde Animal LTDA e seu teor foi calculado previamente (110,7%) pela equipe do setor de farmacometria do LQEPV frente a uma substância química de referência (SQR) adquirida comercialmente (Sigma-Pestanal).

Foram preparadas soluções estoques de FIP-MP na concentração de 1 mg/mL. A partir desta foram preparadas diluições nas concentrações 1, 10, 50, 100 e 150 µg/mL utilizando acetonitrila como diluente. As amostras foram preparadas diluindo as formulações em acetonitrila até concentração de 10 e 20µg/mL para as formulações de 5 e 10% respectivamente. O mesmo preparo foi realizado com os placebos para o teste de seletividade.

5.2.Desenvolvimento de Metodologia Analítica

A validação do método foi realizada com base na resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003 (Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos), da ANVISA levando em consideração os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e seletividade. As análises de teor foram realizadas por CLAE com as seguintes condições cromatográficas: coluna de fase reversa Nucleosil C18 de 150X46mm - 5µm – 100A, fase móvel acetonitrila, água na proporção 60:40 com fluxo de 1,4mL/min e detecção por UV a 220nm. Estes parâmetros foram determinados em trabalho anterior pela equipe do setor de Farmacometria.

5.3.Desenvolvimento de Formulações

Para o preparo das formulações foi utilizado como base os excipientes da formulação comercial injetável de ivermectina, uma mistura de gliceroformal e propilenoglicol. Visando aumentar a solubilidade do ativo e desta forma incorporar uma maior quantidade de fipronil na formulação foi utilizado N-metilpirrolidona como diluente substituindo o gliceroformal. Desta forma, as formulações preparadas possuem variações na quantidade de gliceroformol, propilenoglicol, N-metilpirrolidona e fipronil.

Todas as formulações foram envasadas em ampolas de vidro e seladas com tampa de borracha e anel de metal.

Uma vez preparadas as formulações foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada conforme preconizado pela Instrução Normativa nº 15, 09 de maio de 2005 do MAPA. Para este teste, as formulações foram armazenadas em câmara climática a temperatura 40° C ± 2° C/75 % ± 5 % de umidade relativa, por um período de seis meses e

analisadas nos tempos zero (0), três (3) e seis (6) meses. As formulações que apresentaram variação dos resultados menores ou iguais a 5% ao final de seis meses foram consideradas estáveis por 2 anos. Durante os testes foram analisados a aparência, presença de partículas em suspensão a vista desarmada, pH, teor e volume final da formulação.

5.4. Seleção da Formulação

Foram aprovadas no teste de estabilidade as formulações que cumpriram com os requisitos da IN15/05 do MAPA. Estas serão selecionadas para o teste *in vivo* com um número reduzido de animais.

6.RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1.Desenvolvimento da Metodologia Analítica

A metodologia foi validada avaliando-se a seletividade, linearidade, precisão, exatidão. O método se mostrou linear no intervalo de 1 a 150µg/mL. A precisão e a exatidão media foram de 1,32% e 104% respectivamente. A equação da linearidade média foi $y=0,3633x + 0,3039$ com um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9993, demonstrando a linearidade do método. Não foi observada a presença de um pico interferente no tempo de retenção do FIP (Figura 1) demonstrando ser um método seletivo e capaz de analisar os teores de FIP das formulações preparadas com confiabilidade dos resultados.

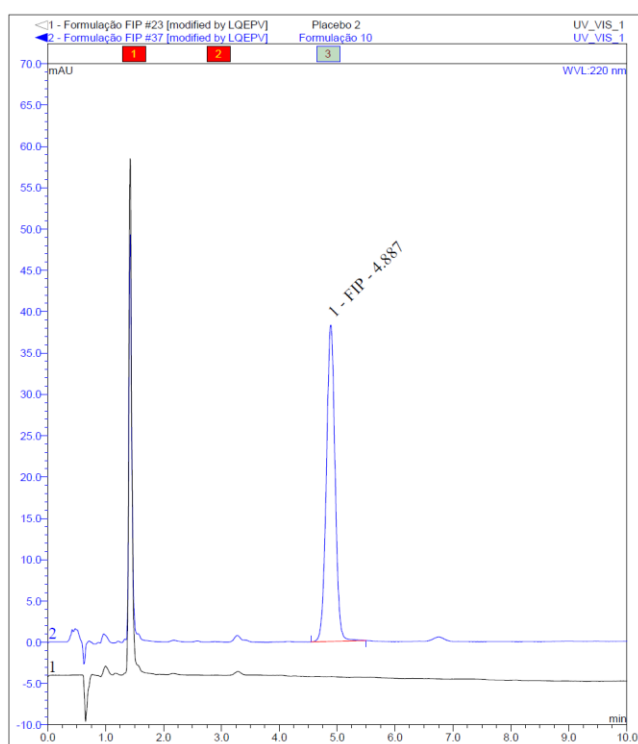


Figura 1: Cromatograma do Teste de Seletividade. 1- Placebo, 2- Formulação 10

6.2.Desenvolvimento da Formulação

Foram preparadas 13 formulações (Tabela 2). Estas foram analisadas quanto a sua estabilidade físico-química por 48 horas a temperatura ambiente e 48 horas em geladeira (8 a 10°C). As formulações que não apresentaram modificações visíveis a olho nu foram encaminhadas para o estudo de estabilidade acelerada.

As formulações dois (2), seis (6), sete (7), oito (8), nove (9), 12 e 13 não apresentaram estabilidade nas primeiras 48 horas e por este motivo não foram utilizadas na estabilidade acelerada.

As demais formulações foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada. Os resultados encontrados demonstram que as formulações três (3), quatro (4), cinco (5), 10 e 11 foram estáveis (Tabela 3). A formulação um (1) foi estável, porém em estudos anteriormente

desenvolvidos no laboratório demonstrou valores de eficácia inferiores ao preconizado (inferior a 90%) para o controle de carrapatos bovinos e por este motivo foi utilizado apenas como meio de comparação as demais formulações.

Tabela 2: Composição das formulações injetáveis de fipronil

Formulações	Composição			
	Fipronil	Gliceroformol	Propilenoglicol	N-metilpirrolidona
1	5%	70%	q.s.p.	---
2	5%	---	q.s.p.	10%
3	5%	---	q.s.p.	20%
4	5%	---	q.s.p.	30%
5	5%	---	q.s.p.	40%
6	5%	---	---	q.s.p.
7	5%	q.s.p.	---	---
8	10%	70%	q.s.p.	---
9	10%	---	q.s.p.	10%
10	10%	---	q.s.p.	20%
11	10%	---	q.s.p.	30%
12	10%	---	q.s.p.	40%
13	10%	---	---	q.s.p.

q.s.p. – quantidade suficiente para

Tabela 3: Resultados do teste de estabilidade acelerada das formulações de fipronil

Formulação	Testes	Resultado			Média*	DP	DPR	Conclusão
		T0	T3	T6				
F1	Aparência	Sol. límpida amarelada			5,64	0,17	3,0	Não Estável
	Partículas	Ausente						
	pH	5,83	5,60	5,50				
	Conc (%)	6,10	5,22	5,00				
	Volume	5mL						
F3	Aparência	Sol. límpida amarelada			5,84	0,20	3,5	Estável
	Partículas	Ausente						
	pH	5,90	6,00	5,61				
	Conc (%)	4,89	4,67	3,53				
	Volume	5mL						
F4	Aparência	Sol. límpida amarelada			5,65	0,28	5,0	Estável
	Partículas	Ausente						
	pH	5,90	5,70	5,34				
	Conc (%)	4,69	4,63	4,72				
	Volume	5mL						
F5	Aparência	Sol. límpida amarelada			5,90	0,21	3,5	Estável
	Partículas	Ausente						
	pH	5,90	6,10	5,69				
	Conc (%)	4,63	4,90	4,82				
	Volume	5mL						
F10	Aparência	Sol. límpida amarelada			4,97	0,05	1,0	Estável
	Partículas	Ausente						
	pH	5,00	5,00	4,91				
	Conc (%)	9,08	9,30	9,31				
	Volume	5mL						
F11	Aparência	Sol. límpida amarelada						
	Partículas	Ausente						

pH	5,40	5,00	4,98	5,13	0,24	4,6	Estável
Conc (%)	9,04	9,13	8,87	9,02	0,13	1,5	
Volume	5mL						

T0, T3, T6= resultados dos testes nos tempos imediatamente após o preparo da formulação, três meses e 6 meses após início do teste de estabilidade acelerada respectivamente; DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo
* média aritmética

6.3. Seleção da Formulação para Estudos *in vivo*

Nas formulações um (1) e oito (8) o FIP foi solubilizado em 70% de glicerofórmol e propilenoglicol q.s.p. nas concentrações de 5 e 10% respectivamente. Esta mistura não foi capaz de solubilizar o FIP a 10% na formulação oito (8). Para aumentar a solubilização do FIP foi utilizada a NMP ao invés do glicerofórmol matendo-se o propilenoglicol como co-solvente e tensoativo sendo utilizado em q.s.p.

Não foi possível solubilizar perfeitamente o FIP em 10% de NMP e desta forma as formulações dois (2) e nove (9) precipitaram em apenas 48 horas. Assim como somente o glicerofórmol, sem a adição do propilenoglicol não foi capaz de solubilizar o FIP na formulação sete (7) e apenas a NMP também não foi capaz de solubilizar o FIP nas formulações seis (6) e 13.

As formulações quatro (4), 10 e 11 sofreram menores alterações em seus teores e por este motivo foram selecionadas para o teste *in vivo*. Por motivos comparativos a formulação três (3), estável ao fim do teste, também foi incluída.

Um estudo demonstrou que o glicerofórmol é um solvente orgânico inerte sem efeito tóxico na dose de 1500mg/kg quando administrado em ratos via intraperitoneal ou na dose de 4g/kg via oral, podendo ser utilizado como solvente para testes de toxicidade (SANDERSON, 1959). Devido as suas características de baixa toxicidade tem sido amplamente utilizado como solvente não aquoso em formulações parenterais veterinárias (PIVNICHNY, 1984).

O propilenoglicol é amplamente utilizado como solvente, tensoativo e preservante em formulações parenterais e não parenterais. É um solvente melhor que a glicerina para solubilizar corticoides, fenóis, sulfas, barbitúricos, vitaminas (A e D), alcalóides e alguns anestésicos locais. Em formulações parenterais tem seu uso indicado como solventes na faixa de 10 a 60% (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Apesar destas características a mistura glicerofórmol/propilenoglicol não foi eficiente para solubilizar o FIP em maiores doses.

As pirrolidonas e *N*-metilpirrolidonas são rotineiramente utilizadas como solventes em formulações injetáveis veterinárias. Estes excipientes tem melhor poder de solubilização do que a glicerina, o propilenoglicol e o etanol. Seu uso em formulações parenterais, orais e tópicas humanas também é sugerido. Seu uso em formulações de liberação controlada tem sido investigado pela sua capacidade de fazer depósitos em algumas formulações (JOUYBAN; FAKHREE; SHAYANFAR, 2010). As pirrolidonas são quimicamente estáveis por aproximadamente um ano se conservadas em frascos fechados, protegido da luz e em temperaturas inferiores a 20°C (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Estas características auxiliaram na estabilidade das formulações preparadas. Porém nenhum dos excipientes mencionados isoladamente foi capaz de solubilizar o FIP. Os mecanismos de solubilização da NMP são ambíguos e a teoria mais recente é que este solvente atuará como co-solvente e agente complexante simultaneamente. Por ser um reagente biodegradável seu uso é mais aceito na química verde aumentando ainda mais sua indicação. Apesar de ser considerado um excipiente seguro possui potencial mutagênico e teratogênico e seu uso não é totalmente indicado em gestantes, devendo sua segurança ser melhor avaliada com novos estudos (JOUYBAN; FAKHREE; SHAYANFAR, 2010).

Altas quantidades de NMP também tornam as formulações instáveis durante o teste de estabilidade acelerada. Conforme descrito anteriormente é de se esperar a estabilidade por aproximadamente um ano para a NMP quando conservadas ao abrigo da luz e temperaturas menores que 20°C. Estas condições são bem diferentes do teste de estabilidade acelerada o que explica a falta de estabilidade com o aumento da concentração da NMP e FIP (formulação 12) sugerindo uma possível reação de degradação. Este excipiente pode desempenhar papéis importantes em reações químicas, tais como a hidrólise, oxidação, condensação, polimerização e O-alquilação (JOUYBAN; FAKHREE; SHAYANFAR, 2010).

Em um estudo anterior o FIP a 5% foi veiculado em gliceroformal/propilenoglicol para a construção do perfil plasmático e teste de eficácia contra *R.b.microplus* e apesar de atingir a corrente sanguínea o FIP não foi capaz de alcançar os níveis de eficácia preconizados pela normativa do MAPA (CID et al., 2016), por este motivo foram desejadas formulações com 10% de FIP a fim de aumentar a dose e conseqüentemente melhorar a eficácia do produto desenvolvido.

As formulações 3, 4, 10 e 11 possuem 20 e 30% de NMP e se apresentaram estáveis desta forma os testes iniciais de perfil plasmático foram realizados com as formulações contendo 5 e 10% de FIP e 20 e 30% NMP, sendo elas F3 e F4 as duas com 5% de FIP e 20 e 30% de NMP respectivamente e F10 e F11 com 10% de FIP e 20 e 30% de NMP respectivamente.

7.CONCLUSÃO

Conforme determinado pela normativa do MAPA as formulações com variações menores de 5% ao fim de 6 meses do teste de estabilidade acelerada possuem validades de 2 anos. Desta forma, as formulações três (3), quatro (4), cinco (5), 10 e 11 são estáveis por dois anos e as formulações três (3), quatro (4), 10 e 11 serão utilizadas para os estudos *in vivo* e obtenção dos parâmetros farmacocinético e de eficácia parasiticida.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA BIOANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FIPRONIL EM PLASMA BOVINO

1.RESUMO

O fipronil é muito utilizado na medicina veterinária para o controle de ectoparasitos em cães, gatos e em bovinos. A forma farmacêutica influencia diretamente na biodisponibilidade do fármaco, logo na sua eficácia. Por consequência, estudos de curva de concentração plasmática de fármacos a partir da forma farmacêutica são cruciais na avaliação do desempenho de novas formulações. Para a obtenção de uma descrição exata da curva de concentração plasmática de um fármaco é crucial a utilização de um método analítico validado. 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. Diversas técnicas de preparo de amostras estão disponíveis cada qual com suas características. O presente trabalho teve por objetivo comparar duas técnicas de preparo de amostra de fipronil em plasma bovino, desenvolver a melhor técnica e validar os resultados encontrados. Para realizar este trabalho foi comparada a técnica de extração *online* com uso de uma coluna de meio de acesso restrito e a extração *offline* com o preparo de amostra utilizando a extração em fase sólida. Nos dois casos a leitura das amostras foi realizada via cromatografia líquida de alta definição com detecção por ultravioleta. Os resultados para o método *online* não foram satisfatórios e não puderam ser validados. Além disso o aumento de pressão gerado no sistema tornou inviável sua utilização. Para o método *offline* foi possível desenvolver e validar uma metodologia seletiva, linear com intervalo de 5 a 500ng/mL para o fipronil e 10 a 500ng/mL para o fipronil sulfona, como valores médios de precisão de 13,7 e 10,9 para fipronil e fipronil sulfona respectivamente e exatidão média de 7,2 e 5,5% para fipronil e fipronil sulfona respectivamente.

Palavras-chave: Fipronil. EFS. Bioanalítico

2.ABSTRACT

Fipronil is widely used in veterinary medicine to control ectoparasites in dogs, cats and cattle. The pharmaceutical form directly influences the bioavailability of the drug, then in its effectiveness. Consequently, the study of drug plasma concentration curve from the dosage form is crucial to evaluate the performance of the new formulations. To do it is essential a validated bioanalytical method. The analysis of complex matrices such as animal plasma requires steps of extraction and elimination of impurities follow of measure the concentration of the analyte of interest. Several sample preparation techniques are available each with its own characteristics. The aim of this study is compare two techniques of sample preparation to quantify fipronil in bovine plasma, develop the best technical and validate the results found. To carry out this work was compared to online extraction technique with use of a RAM column and the "offline" extraction with sample preparation using the solid phase extraction. Both technics use HPLC-UV to identify and quantify the fipronil and fipronil sulfone. Results for the online method were not satisfactory and could not be validated. Additionally, the increase in backpressure systems made it impossible to use. For the offline method was possible to develop and validate a selective methodology with linear range of 5 to 500ng/mL for fipronil and 10 to 500ng/mL for fipronil sulfone, precision of 13.7 and 10.9 for fipronil e fipronil sulfone respectively and accuracy of 7.2 and 5.5% for fipronil e fipronil sulfone respectively.

Keywords: Fipronil. SPE. Bioanalytical

3.INTRODUÇÃO

O fipronil é um fenilpirazol amplamente utilizado no controle de vários artrópodes domésticos e pragas agrícolas. Em medicina veterinária é usado no tratamento e controle de ectoparasitos em cães, gatos e em bovinos. 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.

Para a obtenção de uma descrição exata da curva de concentração plasmática de um fármaco é crucial a utilização de um método analítico validado. Devido seu uso extensivo como praguicida na agricultura, um grande número de trabalhos descreve a determinação do fipronil em amostras de água, solo e alimentos, no entanto, encontra-se um número reduzido de trabalhos descrevendo sua determinação em amostras de plasma animal.

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. Diversas técnicas de preparo de amostras estão disponíveis cada qual com suas características. Após escolha e desenvolvimento da metodologia de extração e análise do fipronil os resultados devem ser validados. A validação é o processo que tem por objetivo garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

O presente trabalho teve por objetivo comparar duas técnicas de preparo de amostra de fipronil em plasma bovino, desenvolver a melhor técnica e validar os resultados encontrados para tornar possível a construção da curva de concentração plasmática de novas formulações injetáveis de fipronil para tratamento de parasitoses em bovinos.

4.REVISÃO DE LITERATURA

4.1.Fipronil

O fipronil (Figura 2), é um fenilpirazol amplamente utilizado no controle de vários artrópodes domésticos e pragas agrícolas (GUNASEKARA; TROUNG, 2007).

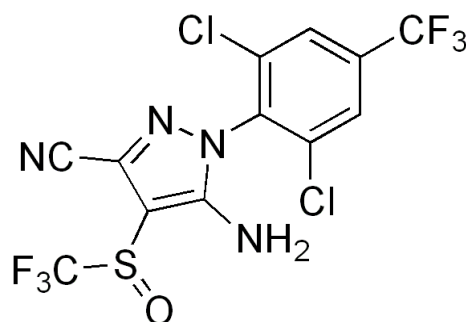


Figura 2: Estrutura química do Fipronil

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 (GOODMAN; GILMAN, 2006). Por consequência, estudos de curva de concentração plasmática de fármacos a partir da forma farmacêutica são cruciais na avaliação do desempenho de novas formulações (AULTON, 2005). Para a obtenção de uma descrição exata da curva de concentração plasmática de um fármaco é crucial a utilização de um método analítico validado (STORPIRTIS; MARCOLONGO, 2004).

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 cromatografia gasosa (CG) com detecção por espectrometria de massa (MS) (RAVETON et al., 2007; VÍLCHEZ et al., 2001), cromatografia líquida (CL) com detecção por ultravioleta (UV) (HADJMOHAMMADI; NIKOU; KAMEL, 2006) e CG com detecção por captura de elétrons (DCE) (BRENNAN; YOU; LYDY, 2009). Sua determinação em amostras de abelhas, mel e pólen também já foi amplamente descrita por CG com detecção por nitrogênio-fósforo (DNF) (MORZYCKA, 2002), CL com detecção por espectrometria de massa sequencial (MSMS) (KADAR; FAUCON, 2006), CG - DCE/MS (JIMÉNEZ et al., 2008; SÁNCHEZ-BRUNETE et al., 2008) e CL-UV (TOMASINI et al., 2011). Metodologias para determinação de FIP em amostras de leite por CG-MSMS (LE FAUDER et al., 2007) e amostras de tecido animal por CG-DCE (HAINZL; COLE; CASIDA, 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; RICHARD; BIZEC, 2008) e CL-UV-MS (LACROIX et al., 2010).

4.2.Técnicas de Preparo de Amostra *offline*

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; BRAGA; BONATO, 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; COLLINS; JARDIM, 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; COLLINS; JARDIM, 2001).

No entanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens, como: amostras com grande afinidade pela água são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito. Grande volume de solvente utilizado gerando problemas de descartes. É um processo suscetível a erros e de difícil automação (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

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 que diz respeito ao 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. 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 multiresíduos. Já as fases poliméricas são baseadas em poli-estireno-divinilbenzeno 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).

A MEFS 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 (QUEIROZ et al., 2003).

Os métodos descritos na literatura para análise de FIP em matrizes variadas utilizam mais comumente como métodos de extração a ELL (HADJMOHAMMADI; NIKOU; KAMEL, 2006; RAVETON et al., 2007) e a EFS em diferentes fases estacionárias (BICHON; RICHARD; BIZEC, 2008; HAINZL; COLE; CASIDA, 1998; JIMÉNEZ et al., 2008; KADAR; FAUCON, 2006; LACROIX et al., 2010; LE FAOUDER et al., 2007). No entanto, MEFS (VÍLCHEZ et al., 2001), Cromatografia de gel permeação (CGP) (BRENNAN; YOU;

LYDY, 2009) e DMFS (JIMÉNEZ et al., 2008; MORZYCKA, 2002; SÁNCHEZ-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.

4.3. Técnicas de Preparo de Amostras *online*

Os métodos de extração citados anteriormente são realizados com manipulação direta do analista, o que pode levar a contaminações e perda de amostra. As separações com acoplamento de colunas, consideradas como um tipo de separação multidimensional e também chamadas de cromatografia em duas dimensões, inerentemente compatibilizam o preparo de amostras com a análise cromatográfica. Nesse tipo de abordagem a primeira coluna extrai e, então, o sistema direciona a fração da amostra contendo os analitos para a separação na segunda dimensão. Essa abordagem é confiável, robusta e mais barata que outras alternativas de automação (SANTOS NETO et al., 2006).

Enquanto a automatização de outras técnicas de preparo de amostras exige a robotização de diversas atividades, o sistema de cromatografia 2D pode ser automatizado simplesmente pela adição de uma válvula seletora de colunas a um cromatógrafo líquido contendo um amostrador automático. Geralmente os sorbentes usados em cromatografia 2D apresentam algum tipo de seletividade e compatibilidade com a injeção direta de fluidos biológicos permitindo, assim, que as pré-colunas sejam utilizadas repetidas vezes (BUHRMAN; PRICE; RUDEWICZ, 1996).

Em cromatografia 2D, o sistema é integrado, e a amostra é injetada diretamente no cromatógrafo, para extração e separação do analito desejado. Com uso de duas bombas e uma válvula seletora, o sentido do fluxo pode ser controlado. Esse sistema trabalha com duas colunas, uma extratora e outra analítica. O uso de duas bombas e uma válvula seletora faz com que possa existir mais de um modo de operação.

A Figura 3 ilustra os modos de operação do sistema de cromatografia 2D. No primeiro modo, a bomba A impulsiona água através do amostrador e coluna extratora, quando a válvula é mantida na posição A. Ao mesmo tempo uma fase móvel adequada de eluição e separação é impulsionada pela bomba B, condicionando a coluna analítica e o detector. Enquanto a válvula é mantida na posição “A”, a injeção de amostra é realizada e as macromoléculas hidrofílicas do plasma são excluídos através da coluna extratora. Depois de um tempo adequado, a válvula seletora é girada para a posição B, e a fase móvel impulsionada pela bomba B é direcionada pelo sentido inverso da coluna extratora. Nesse momento, os analitos são eluídos da coluna extratora em direção a coluna analítica, através da qual são separados, atingindo o detector. Este modo é também conhecido como *blackflush*, pois elui o analito com o fluxo em sentido contrário ao da limpeza da amostra.

No segundo modo, a válvula seletora é usada para selecionar o solvente dispensado pela bomba A. Durante esta etapa, água é selecionada para a bomba A, enquanto a bomba B impulsiona fase móvel com a mesma composição daquela utilizada para eluição e separação dos analitos, de maneira a condicionar a coluna analítica e detector. Após a injeção e exclusão das macromoléculas, a válvula seletora de solventes passa a direcionar o conteúdo da linha B através da bomba A e a válvula seletora de coluna gira para a posição B. Assim a fase móvel de eluição e separação é impulsionada através da coluna extratora, no mesmo sentido que a fase móvel anterior, eluindo os analitos e separando através da coluna analítica. Depois da eluição, a válvula seletora volta para a posição inicial e é feita a limpeza da coluna extratora.

Depois ela é recondicionada. Este modo é também chamado *foreflush*, pois elui o analito com fluxo no mesmo sentido da limpeza da amostra.

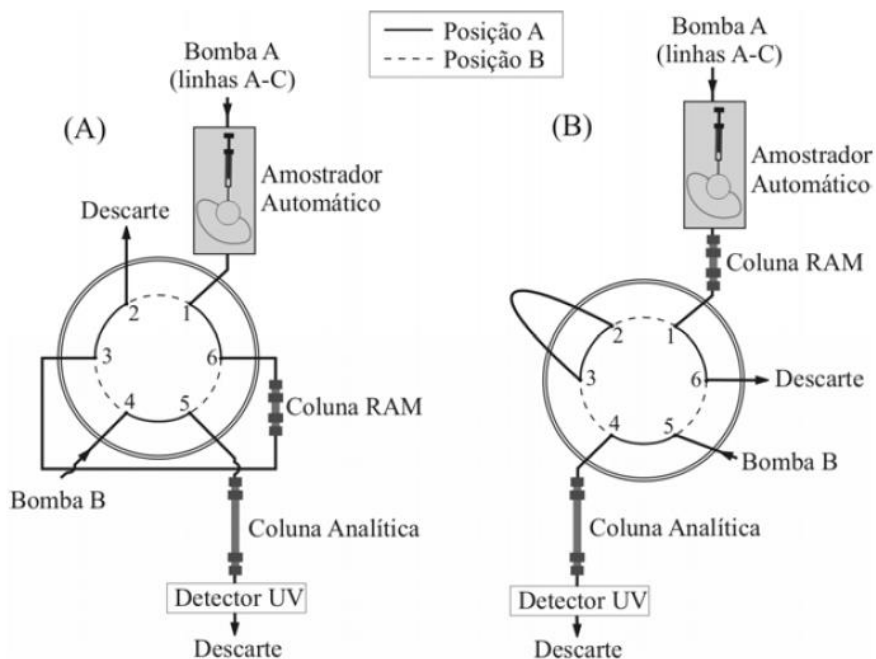


Figura 3: Modo de operação do sistema de cromatografia 2D: (A) *backflush* (B) *foreflush*, usando válvula seletora de seis vias e duas posições. As linhas contínuas indicam a orientação da válvula na posição A e as linhas pontilhadas indicam a orientação da válvula na posição B (SANTOS-NETO et al., 2008)

Para o desenvolvimento dos métodos cromatográficos através desta técnica, é necessário o conhecimento dos valores de tempo de depleção da matriz (t_M), tempo de desligamento do analito (t_A) e tempo de transferência (t_T).

O t_M é o tempo necessário para o fluxo de fase móvel eluir completamente a matriz da amostra da coluna extratora. Este será detectado quando o sinal retornar a linha de base (figura 4).

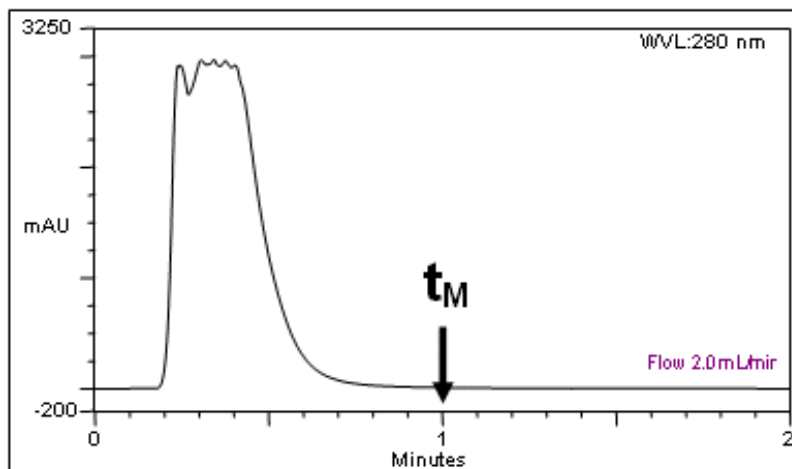


Figura 4: Tempo de depleção da matriz (DIONEX, 2008)

O t_A é o tempo necessário para o fluxo de fase móvel começar a eluir o analito da coluna extratora, ou seja, é o momento do início de desligamento do analito da coluna extratora. O t_A é importante para determinação do tempo de mudança da posição da válvula para que não ocorra perdas do analito (Figura 5).

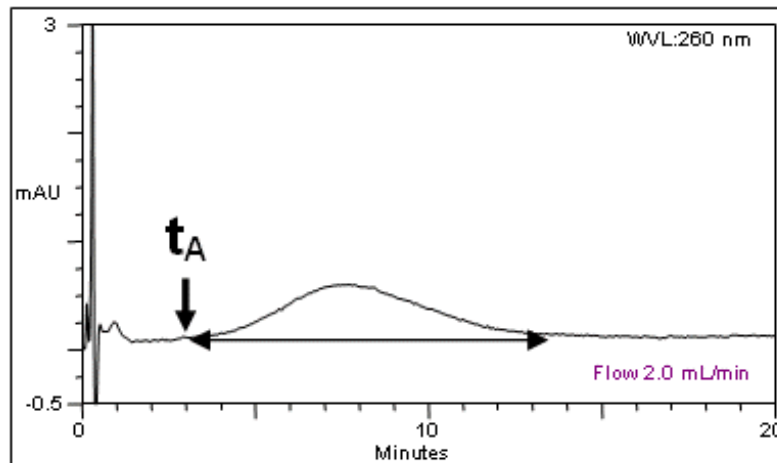


Figura 5:Tempo de desligamento do analito (DIONEX, 2008)

O t_T é o tempo necessário para completa transferência do analito da coluna extratora para a coluna analítica, ou seja, é o intervalo de tempo entre o início e o fim da detecção do analito (Figura 6).

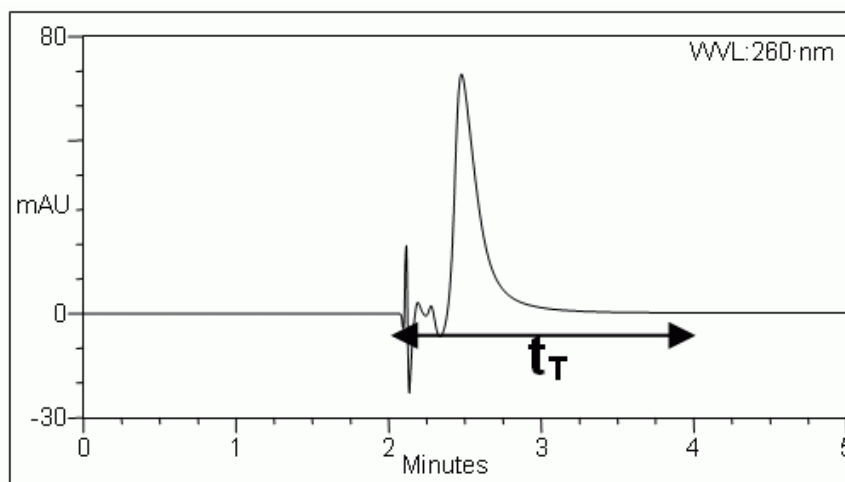


Figura 6:Tempo de transferência (DIONEX, 2008)

4.4.Meio de Acesso Restrito (MAR)

A expressão meio de acesso restrito foi introduzida por DESILETS et al. 1991, como um termo geral para suportes cromatográficos que permitem a injeção direta de fluidos e limitam a interação dentro dos poros, apenas para moléculas pequenas.

Inicialmente, as fases MAR foram classificadas de acordo com o princípio de exclusão macromolecular. As fases com barreira física usam o tamanho do poro, para evitar a difusão

de proteínas, já as fases com barreira química utilizam uma rede polimérica para evitar o acesso de macromoléculas ao interior dos poros (DE LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

Há diferentes tipos de materiais com a mesma finalidade de atuar como MAR. Esses materiais apresentam características sortivas mistas, permitindo a combinação dos princípios da cromatografia por exclusão para macromoléculas hidrofílicas, e da cromatografia em fase reversa ou troca iônica para as moléculas pequenas. Esses sorbentes previnem o acesso das macromoléculas aos sítios de retenção, devido a existência de uma barreira física e/ou química, evitando a sorção irreversível dessas moléculas. Dessa forma, apenas para as pequenas moléculas, é garantida a interação com a fase extratora presente na superfície protegida das partículas (DE LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

As colunas de acesso restrito (MAR) tem se destacado na análise de fármacos em biofluidos (plasma, leite, urina) por CLAE, pois permitem injeções diretas e repetitivas de amostras não tratadas no sistema cromatográfico uma vez que promovem a exclusão não absorviva de macromoléculas com retenção das micromoléculas de interesse (DE LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

4.5. Validação do Método Analítico

A etapa de desenvolvimento e validação de um método bioanalítico é importante em um estudo farmacocinético. O método deverá garantir a confiabilidade dos resultados obtidos a partir da análise de amostras em concentrações desconhecidas. O pesquisador deve desenvolver e validar este método bioanalítico de maneira criteriosa e os resultados devem ser avaliados de forma conjunta e não isoladamente (STORPIRTIS et al., 2009)

A validação é o processo que tem por objetivo garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

Diversos procedimentos de validação intralaboratorial são descritos na literatura. No Brasil, os três (3) órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos e bioanalíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Internacionalmente o Food and Drug Administration (FDA), nos EUA, e a European Medicine Agency (EMA), na Europa, são os órgãos de regulamentação com maior força. Estas agências são responsáveis pela publicação dos guias contendo os parâmetros para serem avaliados e seus critérios de aceitação.

Embora nestes documentos haja concordância sobre quais parâmetros devam ser avaliados, existe uma grande diversidade e até falta de informações sobre como estes experimentos são delineados e avaliados em termos de estatísticas e respectivas premissas que necessitam ser testadas (SOUZA et al., 2007).

Uma validação padrão de método bioanalítico inclui teste de precisão e exatidão, linearidade, limite de detecção e quantificação, seletividade, recuperação e estabilidade do fármaco na matriz biológica a ser estudada (STORPIRTIS et al., 2009).

5.MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia desenvolvida foi avaliada observando-se os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, tempo de análise e viabilidade financeira. Os parâmetros de validação foram avaliados segundo os critérios descritos no guia para validação de métodos bioanalíticos da ANVISA, RDC nº 27 de 22 de maio de 2012.

Todos os ensaios foram realizados no setor de farmacometria do LQEPV e o plasma utilizado foi retirado de animais, sem tratamento prévio, do setor experimental do mesmo laboratório. Todas as amostras foram congeladas a -20°C após serem preparadas e antes de serem extraídas.

5.1.Equipamentos

Os equipamentos, vidrarias e materiais volumétricos empregados neste estudo foram calibrados. Os padrões e reagentes utilizados foram pesados em balança analítica com precisão de 0,0001 g (BTEC210A, TECNAL). Volumes inferiores a 1 mL foram pipetados com pipetas automáticas calibradas (LABMATE +, HTL). Foram ainda utilizados no desenvolvimento do método e preparo das amostras os seguintes equipamentos: agitador de tubos PHOENIX AP-56, TECNAL; centrífuga refrigerada CT6000R, CIENTEC; capela de exaustão; concentrador de amostras TE-0197, TECNAL; bomba à vácuo TECNAL; banho de ultra-som USC2800, UNIQUE; cromatógrafo líquido ULTIMATE 3000 DIONEX, equipado com duas bomba quaternária ULTIMATE 3000 DIONEX, válvula de sete vias, forno para coluna ULTIMATE 3000 DIONEX, detector UV-VIS ULTIMATE 3000RS DIONEX e software CHROMELEON 6.80 DIONEX. Para pesagem dos animais foi utilizada a balança KM3, COIMMA.

5.2.Métodos de Preparo de Amostras Testados

Foram testados dois métodos de preparo de amostras. O primeiro *online*, onde o plasma foi injetado diretamente no CLAE e a amostra foi extraída em uma coluna de meio de acesso restrito para posteriormente ser direcionada para a coluna analítica e ocorrer à separação e quantificação dos analitos de interesse. O segundo método, *offline*, foi utilizando a extração em fase sólida para posterior análise cromatográfica, baseado em um método desenvolvido anteriormente no próprio laboratório. A tentativa de utilizar o método *online* teve como principal objetivo diminuir o tempo total de preparo e análise da amostra e diminuir os erros de preparo observados nas técnicas *offline*.

5.2.1.Método *online*

- Modo em backflush (Figura 7)
- Coluna MAR1: SPS ODS C18 - 5 µm 500x46 mm Regis® (Tedia)
- Coluna MAR2: LiChrospher® ADS (Merck) C18 - 25µm - 400 x 40 mm
- Coluna analítica: Nucleosil® (Sigma Aldrich) C18 3,5µm-100A, 150x46mm

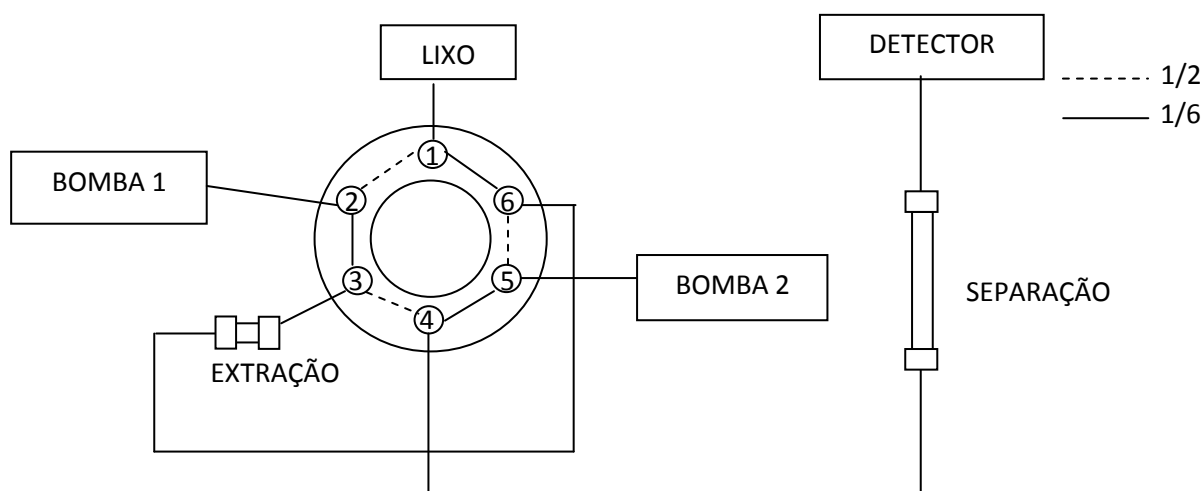


Figura 7: Esquema do método *online* de extração e separação em modo backflush

5.2.2. Método *offline*

- Cartucho de extração de fase sólida: Oasis HLB® 3cc (Waters)
- Coluna analítica: Nucleosil® (Sigma Aldrich) C18 3,5µm-100A, 150x46mm

5.3. Desenvolvimento do Método de Análise

5.3.1. Método *online*

As condições cromatográficas para o acoplamento da coluna analítica foram baseadas em um método para análise de fipronil utilizando extração *offline* anteriormente desenvolvido no laboratório (CID et al., 2012). Para o preparo das amostras foram acopladas duas colunas analíticas via uma válvula seletora de sete (7) vias conforme Figura 7. Na posição 1/6, a bomba 1 carrou o analito juntamente com a matriz para a coluna MAR. Como o solvente utilizado (água) não possuía afinidade pelo analito e sim pela matriz, o analito ficou localizado no interior das partículas da coluna MAR (C18) e os componentes hidrofílicos da matriz foram carreados para o lixo. Quando o tempo de limpeza da matriz (T_m) foi atingido, a válvula foi girada para a posição 1/2. A bomba 2, que estava anteriormente condicionando a coluna analítica, passou a eluir o analito, em sentido contrário da coluna extratora (*backflush*), fazendo sua transferência para coluna analítica ($T_a + T_t$). Ao fim da transferência a válvula foi novamente girada retornando a posição 1/6 e ocorrendo a separação dos analitos na coluna analítica e o acondicionamento da coluna MAR para uma nova injeção.

Para a determinação do tempo de limpeza da matriz (T_m) foi injetada uma amostra de 300µL plasma branco na coluna MAR e Foi observado o tempo necessário para o sinal retornar a linha de base (Figura 8). Durante o teste o detector foi ajustado para 280nm.

Para determinar o tempo de desligamento foi injetada 300µL de padrão com a mesma configuração para T_m . Durante o tempo de lavagem não deve ser observado nenhum sinal analítico. Após T_m foi trocada a fase móvel para ACN:água 60:40 e observou-se o tempo necessário para o analito ser lido pelo detector, ou seja, o tempo necessário para se desligar da coluna MAR. Neste teste o comprimento de onda utilizado foi de 210nm (Figura 8).

Para determinação dos tempos de transferência, foi trocada a coluna analítica por uma união. Foi realizada uma injeção de padrão com lavagem até t_M e girando a válvula em t_A . Observou-se o tempo total entre o início e o fim dos sinais analíticos. Neste teste o comprimento de onda utilizado foi de 210nm (Figura 9).

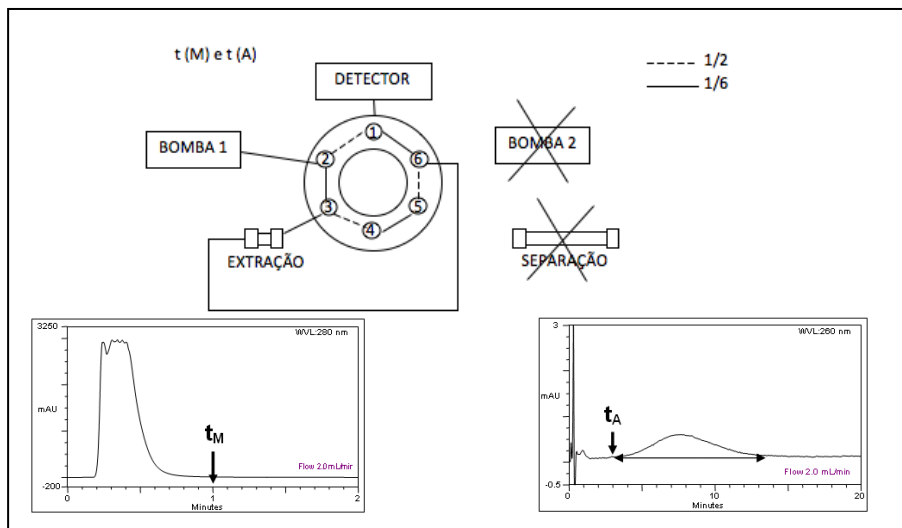


Figura 8:Esquema da válvula seletora para avaliação de t_M e t_A

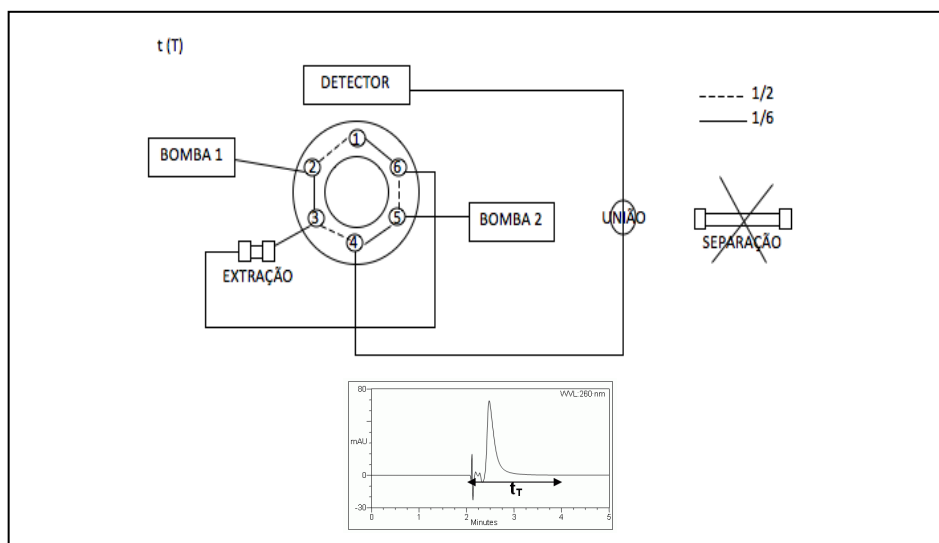


Figura 9:Esquema de válvula seletora para avaliação do tempo de transferência (t_T)

Para a lavagem, foi utilizada água e para eluição foi utilizada a fase móvel da coluna analítica. O fluxo foi mantido em 1mL/min durante todo o processo nas duas bombas. Para poupar o uso do padrão de SULF foram utilizados apenas FIP e ET para desenvolvimento e avaliação do método *online*.

5.3.2.Método *offline*

Tendo como base o método já desenvolvido e validado no laboratório foi utilizada a extração em fase sólida com posterior secagem a vácuo. Para tal foram utilizados cartuchos de extração de fase polimérica HLB – Oasis (Waters) acoplados a um manifold (Supelco) com capacidade para 12 cartuchos ligados a uma bomba a vácuo. 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 previamente contaminado) e depois se procedeu à etapa de lavagem utilizando 1,0 mL de água. A eluição foi feita com 1,0 mL de metanol. O eluato foi evaporado a securo a 40°C e reconstituído em 100 µL de acetonitrila.

5.3.3. Separação analítica

A análise cromatográfica foi realizada da seguinte forma:

- Coluna analítica: Nucleosil® (Sigma Aldrich) C18 3,5-100, 150x46mm
- Pré-coluna: Nucleosil® (Sigma Aldrich) C18 3,5-100, 40x46mm
- Fluxo coluna analítica: 1 mL/min
- Fase móvel: Acetonitrila:água 60:40
- Temperatura: 25°C
- Volume de injeção: 10 µL
- Comprimento de onda (λ): 210nm
- Tempo de corrida: 12 minutos

5.4. Parâmetros de Validação

Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa Excel® 2007. Para a construção dos gráficos e avaliação da linearidade foi utilizado o programa Minitab 16®.

5.4.1. Seletividade

É a capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito (FIP e SULF) e o padrão interno (ET) na presença de outros componentes da amostra. Foi determinada através da análise de 5 amostras brancas distintas, sendo 4 normais e 1 hemolisada, e comparados os valores de área das amostras e do LQ nos tempos de retenção de FIP, SULF e ET. Foi considerado seletivo quando as amostras brancas apresentaram ausência de picos nos tempos de retenção de FIP, SULF e ET ou áreas menores que 20% do LQ para FIP e SULF e 5% para ET.

5.4.2. Linearidade

É a capacidade de um método de gerar resultados proporcionais a um sinal analítico dentro de uma faixa de trabalho. Foi avaliada através de análise de 6 concentrações diferentes de FIP e SULF independentemente. Foi utilizada a faixa de trabalho de 5 a 500ng/mL para FIP e 10 a 500ng/mL para SULF. Todas as amostras foram preparadas em plasma branco bovino. Foram analisadas amostras em 3 dias diferentes. A cada dia foi construída uma curva de concentração versus relação de área. Para análises de FIP foi utilizada a relação FIP/ET enquanto para análise do SULF foi utilizada a relação SULF/ET. As 3 curvas construídas foram agrupadas e avaliadas a linearidade, o coeficiente de correlação, a homogeneidade da variância dos erros e as ponderações necessárias. Os coeficientes da curva de calibração foram calculados com os dados de todos os dias para a ponderação que apresentar menor soma de erros relativos dos valores nominais. Não foi aceito coeficiente de correlação menor que 0,98 e erros relativos nominais fora da faixa de 20% para o LQ e 15% para os demais pontos.

5.4.3. Precisão

É a capacidade de um método de apresentar resultados próximos obtidos através de repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz. Foi avaliada através das analisadas 5 amostras independentes em 3 dias seguidos de 5, 100 e 500ng/mL para validação do FIP e 10, 100 e 500ng/mL para validação do SULF. Os resultados foram avaliados quanto ao coeficiente de variação em cada nível de concentração dentro do mesmo dia e entre os 3 dias. O método foi considerado preciso quando apresentou coeficiente de variação inferior a 20% para o LQ e 15% para os demais níveis de concentração.

5.4.4.Exatidão

É a capacidade de um método em gerar resultados em concordância com o valor de referência. Foi avaliada através das analisadas 5 amostras independentes em 3 dias seguidos de 5, 100 e 500ng/mL para validação do FIP e 10, 100 e 500ng/mL para validação do SULF. Os resultados foram avaliados quanto ao erro padrão relativo (EPR) obtido em cada nível de concentração dentro do mesmo dia e entre os 3 dias não sendo admitido valores fora da faixa de $\pm 20\%$ para o LQ e $\pm 15\%$ para os demais pontos. O erro padrão relativo é obtida através da seguinte fórmula:

$$\text{EPR} = \frac{(\text{concentração média experimental} - \text{valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

5.4.5.Limite de quantificação (LQ)

É a menor concentração do analito capaz de ser quantificada com precisão e exatidão. Foi determinada através da análise de 5 amostras de 5 e 10ng/mL para FIP e SULF respectivamente. Foi analisada a relação sinal ruído das amostras não sendo admitido valores inferiores e 5.

5.5.Tempo de Análise e Viabilidade Financeira do Método de Preparo

Foram avaliados também o tempo total para finalizar uma amostra, ou seja, a soma do tempo de extração mais o tempo de análise cromatográfica e a viabilidade financeira dos dois métodos. A avaliação dos resultados analíticos aliados ao tempo de preparo e a viabilidade financeira foram determinantes na escolha de método de melhor custo/benefício.

5.6.Preparo de Padrões e Amostras

Foram preparadas soluções estoques de FIP e ET nas concentrações de 1mg/mL utilizando acetonitrila como diluente e chamadas de solução mãe (SMF e SME respectivamente). O SULF foi adquirido comercialmente da Accustandard em uma solução de 1mL de acetona na concentração de 100 μ g/mL esta foi chamada de SMS. O SULF vem contaminado com FIP e se degrada facilmente sendo conservado o tempo todo a -20°C e manipulado em bloco de gelo. Com o objetivo de evitar contaminações cruzadas de FIP oriundo do padrão SULF foi preparado amostras independentes de FIP e ET e analisadas primeiro. Posteriormente foram preparadas amostras de SULF e ET e analisadas independente. As amostras de FIP e ET foram preparadas através da contaminação de 990 μ L de plasma com 10 μ L de soluções combinadas (SC) de diferentes concentrações. As SC foram preparadas através de diluições da solução mãe conforme Tabela 4. Para os valores de

concentração de SC de 5 e 10ng/mL foi utilizada uma solução de FIP de 100µg/mL chamada de SDF. Para obtenção do plasma foi coletado sangue de bovinos sem tratamento prévio em tubos heparinizados e centrifugadas a 756 x g por 15 minutos.

Tabela 4: Esquema de diluições para o preparo das soluções combinadas de fipronil e etioprol

Concentração SC (ng/mL)	Ponto da curva (ng/mL)	Volume SMF (µL)	Volume SDF (µL)	Volume SME (µL)	Volume Final (mL)
0	BR	0	0	0	
0	PI	0	0		
0,5	5 – LQ	50	0		
1	10	100	0		
5	50	0	50	250	10
10	100	0	100		
25	250	0	250		
50	500	0	500		

SC= solução combinada; SMF= solução mãe de fipronil; SDF= solução diluída de fipronil; SME= solução mãe de etioprol; LQ= limite de quantificação

As amostras de SULF e ET foram preparadas com a contaminação de 10µL de SC em 990µL plasma (Tabela 5) exceto a concentração de 500ng que foi preparada pela adição de 5µL SMS e 5µL de solução de ET a 50µg/mL em 990µL de plasma. Para a SC de 10ng/mL foi utilizada uma solução de SULF de 10µg/mL chamada de SDS.

Tabela 5: Esquema de diluições para o preparo das soluções combinadas de fipronil sulfona e etioprol

Concentração SC (ng/mL)	Ponto da curva (ng/mL)	Volume SMS (µL)	Volume SDS (µL)	Volume SDE (µL)	Volume SDE 2 (µL)	Volume Final (mL)	Diluyente
0	BR	0	0	0			
0	PI	0	0				
1	10 – LQ	0	100				
2,5	25	25	0				
5	50	50	0	250		1	ACN
10	100	100	0				
25	250	250	0				
50	500	5	0	0	5		Plasma

SC= solução combinada; SMS= solução mãe de fipronil-sulfona; SDS= solução diluída de fipronil-sulfona; SDE= solução diluída de etioprol; LQ= limite de quantificação; ACN= acetoneitrila

6.RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1.Método *Online*

6.1.1.Determinação dos tempos de viragem da válvula

Como todo o processo de extração e análise ocorrem no interior do HPLC, era necessário ajustar os tempos em que a válvula seletora deveria fazer a troca de fluxo e com isso fazer o analito limpo ser transferido para a coluna analítica. A tabela 6 demonstra os tempos de 10 (Tm) e 4,6 (Ta + Tt) para a coluna SPS®. Estes tempos indicam que a injeção deve ser iniciada no tempo zero com a válvula na posição 6/1. A primeira viragem deve ser em 10 minutos para a posição 1/2 e a segunda viragem em pelo menos 14,6 minutos para retornar a posição 1/6. Para a coluna Lichrosphere, os tempos encontrados foram 15 (tm) e 3,5 (Ta + Tt) assim a primeira virada deve ser em 15 minutos e a segunda em pelo menos 18,5 minutos.

Tabela 6: Tabela de tempos de viragem de válvula do método *online*

Coluna MAR	Tempo (min.)					
	Tm	V1 (1/2)	Ta	Tt	V2 (6/1)	Tempo corrida
SPS®	10	10	0,6	4	15	20
Lichrosphere®	15	15	0,5	3	19	30

Tm = tempo de limpeza da matriz; V1 = virada da válvula de 6/2 para 1/2; Ta = tempo de desligamento do analito; Tt = tempo de transferencia; V2 = virada da válvula de 1/2 para 6/2

6.1.2.Parâmetros de validação para o método *online*

Durante a determinação dos Tm, Ta e Tt para a coluna SPS® os valores de pressão do sistema passaram de 4000psi. Este fato pode ser relacionado ao diâmetro de sua partícula de 5µm e as proteínas do plasma que não são completamente retiradas durante a lavagem. Estes valores impossibilitam o uso desta coluna para estudos farmacocinéticos onde o número de amostras biológicas é elevado.

A coluna Lichrosphere® possui um diâmetro de partícula de 25µm. Isto a faz capaz de aguentar volumes de carregamentos maiores sem um grande incremento na pressão do sistema. Com esta coluna foi possível realizar a análise de amostras para a validação. Durante essas análises a pressão do sistema ainda subia a valores acima de 4000psi após 20 amostras.

Para solucionar este problema foi instalado um filtro de 2 µm na entrada da coluna MAR. Este teria como objetivo de criar uma barreira física para a entrada de moléculas ou impurezas maiores do plasma. Desta forma este filtro poderia ser trocado e a coluna MAR ser preservada por um número maior de amostras. Ainda assim não foram atingidos valores de pressão aceitáveis.

Como última alternativa foi realizada a diluição do plasma 1:1 e sua posterior filtragem em membrana HV de 0,22 µm. Permanecendo com o filtro em linha e a coluna com maior diâmetro de partícula (Lichrosphere®).

Nestas condições foi possível iniciar a validação com a troca do filtro a cada 30 amostras em média.

O método testado foi:

- Coluna MAR: LiChrospher® ADS (Merck) C18 - 25µm - 400 x 40 mm
- Fase móvel bomba 1: Água 100% (para limpeza da amostra)
- Fluxo bomba 1: 1,0 mL/min
- Temperatura MAR: ambiente
- Virada 6/1 → 1/2: 15min
- Virada 1/2 → 6/1: 19min
- Volume de injeção: 300 µL com 3 carregamento de 100 µL em 0; 1,5 e 4 minutos
- Coluna analítica: Nucleosil® (Sigma Aldrich) C18 3,5-100, 150x46mm
- Fase móvel bomba 2: ACN:água 60:40 v/v
- Fluxo bomba 2: 1,0 mL/min
- Temperatura analítica: 25°C
- Comprimento de onda (λ): 210nm
- Tempo de corrida: 30 minutos

Não foi possível alcançar a seletividade necessária neste método. Existe a presença de um pico interferente maior que 20% do LQ no tempo de retenção do FIP (Figura 10).

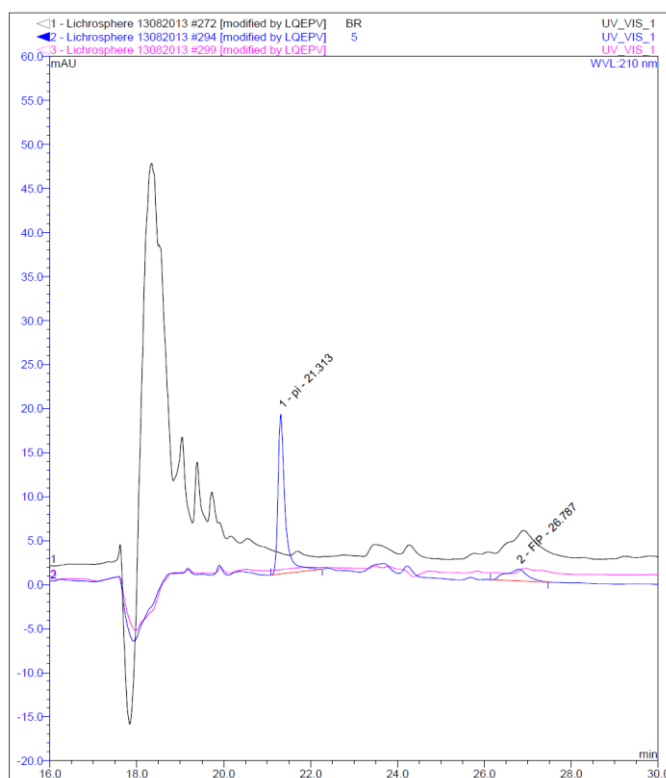


Figura 10: Cromatograma de seletividade do método *online* para fipronil e etiprol. 1- branco, 2- 5ng/mL, 3- Acetonitrila

O método se mostrou linear no intervalo de 5 a 500ng/mL com coeficiente de correlação de 0,9971, e seguinte curva de calibração: $y = 0,0064x + 1,3458$.

Os valores de precisão e exatidão não atenderam aos critérios desejados (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados de precisão e exatidão apresentados pelo método *offline* para quantificação de fipronil

Amostra	Precisão (DPR)	Exatidão (%)
5 ng/mL	28,9	151
100 ng/mL	41,6	70
500 ng/mL	18,3	75

DPR= desvio padrão relativo

6.2.3 Viabilidade financeira e tempo de análise

As colunas MAR possuem um alto valor, logo devem ser utilizadas pelo maior número de amostras possíveis para tornar viável seu uso nas análises.

A coluna SPS® é vendida em média a US\$900,00 a unidade. A Lichrosphere® a US\$2000,00 o pacote com 3 unidades, saindo a uma média de 650 dólares a unidade.

Os filtros em linha possuíam dois fornecedores, Dionex e Merck, sendo comercializado o pacote de 10 unidades a uma média de 320 e 160 dólares respectivamente. Em 2014 a Merck deixou de fabricar os filtros permanecendo apenas a opção mais cara.

A caixa com 100 cartuchos de extração em fase sólida é comercializada na média de US\$450,00.

Seguindo a tabela abaixo é possível entender que os custos individuais da análise só se equiparam quando a coluna MAR é capaz de realizar até 200 análise. Neste cálculo não está incluído os gastos com adequação do equipamento e treinamento. Infelizmente não foi possível fazer 200 amostras sem que a pressão do sistema ficasse extremamente alta inviabilizando a continuidade do uso da coluna. Problemas com aumento de pressão durante as análises de rotina são comuns em sistemas on-line e podem impedir o uso desta técnica na rotina laboratorial (ROGEBERG et al., 2014).

Tabela 8: Comparação dos custos unitários das análises do método *offline* e *online*

Coluna	Nº amostras analisadas	Custo da coluna US\$	Custo do Filtro US\$	Custo unitário análise US\$
Lichrosphere®	100	650	107	7,57
	200	650	213	4,32
Oasis HLB®	100	450	0	4,50
	200	900	0	4,50

Analisando o tempo total da análise ocorre grandes vantagem do método *online* uma vez que é capaz de fazer o preparo e a análise de uma amostra em 30 minutos enquanto o método *offline* necessita de 24h apenas para o preparo da amostra devido à etapa de secagem.

6.2. Método *offline*

6.2.1. Parâmetros de validação

O método utilizado foi:

- Coluna analítica: Nucleosil® (Sigma Aldrich) C18 3,5-100, 150x46mm
- Fase móvel: ACN:água 60:40 v/v
- Fluxo: 1,0 mL/min
- Temperatura: 25°C
- Comprimento de onda (λ): 210nm

- Volume de injeção: 10µL
- Tempo de corrida: 12 minutos

O método foi seletivo para FIP e SULF com ausência de sinal analítico nos respectivos tempos de retenção (Figura 11).

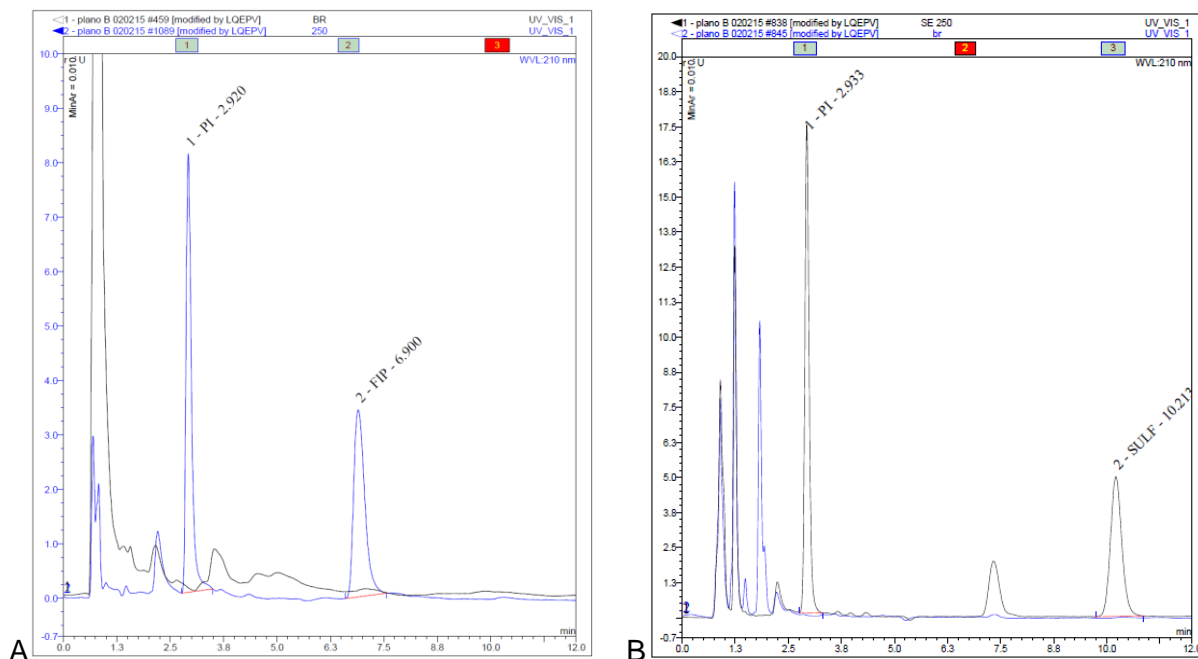


Figura 11: Cromatograma de seletividade de fipronil (A) e fipronil sulfona (B)

O método foi linear para FIP e SULF na faixa de análise de 5 a 500ng/mL para FIP e 10 a 500ng/mL para SULF, porém os resíduos apresentam variâncias diferentes caracterizando os métodos como heterocedásticos. Os resultados do teste de F podem ser observados nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Resultado do teste F para a variância dos resíduos de fipronil sulfona

Estatística	SULF/ET		Fcalculado	Fcrítico	p-valor
	500ng/mL	10ng/mL			
Média	1,4745	0,0028	189,1234	5,0503	0,0000
Variância	0,0031	0,0000			
N	6	6			
Gl	5	5			

n= número de amostras; gl= gral de liberdade

Tabela 10: Resultado do teste F para a variância dos resíduos de fipronil

Estatística	FIP/ET		Fcalculado	Fcrítico	p-valor
	500ng/mL	5ng/mL			
Média	1,4890	0,0868	75,4000	5,0503	0,0001
Variância	0,0209	0,0003			
N	6	6			
Gl	5	5			

n= número de amostras; gl= gral de liberdade

Devido à variância dos resíduos, a regressão linear não pode ser calculada pelo método dos mínimos quadrados sendo necessário realizar a ponderação para ajustar a exatidão nos pontos mais baixos da faixa linear. A escolha da melhor ponderação foi baseada nos erros padrões relativos (EPR) e no coeficiente linear. Conforme demonstrado nos valores da tabela 11 foi selecionada a ponderação $1/x$ para FIP e $1/x^2$ para SULF. Estas apresentaram os menores erros padrões relativos no intervalo estudado. Uma vez ponderada foi determinada as equações da curva de calibração $y = 0,00312x - 0,00204$, para SULF onde x é a concentração de SULF e y é a relação de área SULF/ET e $y = 0,00287x + 0,06300$, para FIP onde x é a concentração de FIP e y é a relação de área FIP/ET. Na figura 12 e 13 estão demonstradas a curvas de linearidade de FIP e SULF respectivamente nos três dias consecutivos.

Tabela 11: Valores dos coeficientes da curva analítica e os erros relativos percentuais para cada ponderação

W	FIP			SULF		
	$1/x^*$	$1/x^{0,5}$	$1/x^2$	$1/x$	$1/x^{0,5}$	$1/x^{2*}$
A	0,00287	0,00292	0,00209	0,00299	0,00295	0,00312
b	0,06300	0,0458	0,06539	0,00185	0,00529	-0,00204
R	0,98	0,98	0,54	0,99	0,99	0,98
EPR	0,0000	0,0089	0,0010	0,0001	0,0012	0,0000

a= coeficiente angular; b= coeficiente linear; r= coeficiente de correlação; w= ponderações; EPR= erro padrão relativo;*= ponderação selecionada

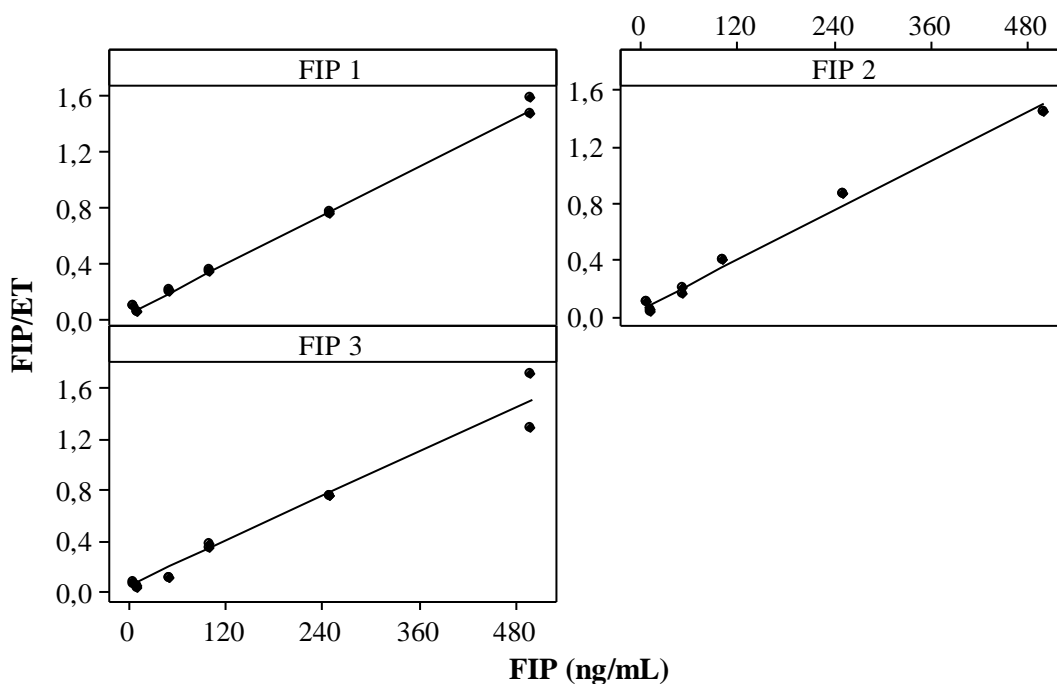


Figura 12: Curva de linearidade de fipronil. FIP 1, 2 e 3 são 1º, 2º e 3º dia de análise respectivamente

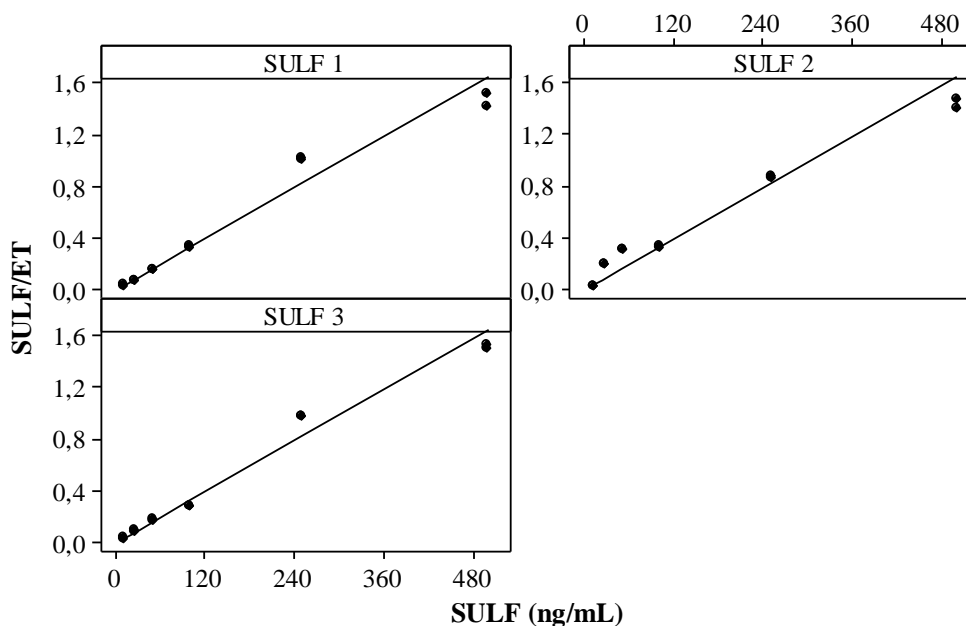


Figura 13: Curva de linearidade de fipronil sulfona. SULF 1, 2 e 3 são 1°, 2° e 3° dia de análise respectivamente

Todas as amostras das curvas analíticas no ponto mais baixo, o LQ, apresentaram uma relação sinal/ruído superior a 5 confirmando o LQ de 5 e 10ng/mL para FIP e SULF respectivamente. O método para FIP possui precisão de 13,7% e exatidão de 7,2% enquanto o SULF apresenta os valores de precisão e exatidão de 10,9 e 5,5% respectivamente (Tabela 12 e 13). Estes resultados demonstram que os métodos utilizando a extração em fase sólida são capazes de gerar resultados confiáveis e podem ser utilizados para quantificar FIP e SULF em plasma bovino nas faixas já descritas.

O FIP e SULF foram quantificados o detector de UV e MS. Os resultados analíticos foram comparados. O método utilizando o detector de MS foi 20 vezes mais sensível, sendo capaz de quantificar aproximadamente 2,5ng/mL de FIP e SULF enquanto o detector de UV alcançou um limite de quantificação em torno 50ng/mL para FIP e SULF (LACROIX et al., 2010). Os limites de quantificação encontrados para estes métodos foram muito próximos ao encontrados para a quantificação por MS comprovando a capacidade analítica do método.

Tabela 12: Resultados de precisão e exatidão para fipronil

Teste	Dia	5ng/mL (LQ)			100ng/mL			500ng/mL			Média
Precisão (DPR)	<i>Inter</i>	16,1	14,8	12,0	15,3	14,6	7,9	5,7	7,9	13,4	13,7
	<i>Intra</i>		16,8			12,8			11,5		
Exatidão (EPR)	<i>Inter</i>	22,5	13,2	17,3	11,7	15,8	4,4	3,4	5,7	12,0	7,2
	<i>Intra</i>		7,8			10,6			3,3		

DPR= desvio padrão relativo; EPR= erro padrão relativo

Tabela 13: Resultados de precisão e exatidão para fipronil sulfona

Teste	Dia	10ng/mL (LQ)			100ng/mL			500ng/mL			Média
Precisão (DPR)	<i>Inter</i>	20,0	11,1	10,9	11,5	4,9	6,4	4,2	3,4	8,4	10,9
	<i>Intra</i>		14,4			8,0			10,4		
Exatidão (EPR)	<i>Inter</i>	23,9	12,7	0,1	1,3	2,8	3,2	9,5	9,7	7,5	5,5
	<i>Intra</i>		12,2			0,3			3,9		

DPR= desvio padrão relativo; EPR= erro padrão relativo

7.CONCLUSÕES

O método *online* apresenta desvantagem frente ao *offline* que inviabilizam seu uso em estudo com um número elevado de amostras.

O método *offline* pode ser validado na faixa de 5 – 500ng/mL e 10 – 500ng/mL para FIP e SULF respectivamente e pode ser utilizado para estudos farmacocinéticos com segurança.

CAPÍTULO III

COMPORTAMENTO FARMACOCINÉTICO DO FIPRONIL E SEU METABÓLITO NAS FORMULAÇÕES INJETÁVEIS

1.RESUMO

Uma hipótese fundamental da farmacocinética clínica é que existe uma relação entre os efeitos farmacológicos de um fármaco e sua concentração na circulação sanguínea. O monitoramento do perfil de concentração do fármaco em função do tempo em um fluido fisiológico adequado permite a determinação de sua biodisponibilidade. Uma avaliação comparativa dos parâmetros farmacocinéticos em novas formulação é de extrema importância para a decisão da melhor conduta para o tratamento no animais e efetividade do efeito clínico. O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento farmacocinético das formulações injetáveis F10 e F11 e compará-las com a formulação tópica comercial. Para isso foram utilizados 18 bovinos divididos em 3 grupos. Cada grupo foi tratado com uma formulação. Amostras de sangue foram coletas nos tempos 0, 4, 12h, 2, 7, 14, 15, 16, 17, 21, 28, 30 e 35 dias. As amostras foram analisadas por CLAE-UV para quantificação de fipronil e seu produto de metabolismo fipronil sulfona. Os valores encontrados de concentração foram analisados através do programa PK Solution para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos. Para o cálculo da biodisponibilidade foram utilizados 4 animais tratados com fipronil 5% e N-metilpirrolidona 30%. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 4, 6, 12h, 2, 3, 4 e 5 dias e foram analisadas por CLAE-UV. Nas três formulações o Tmax da SULF só foi alcançado em torno de 400h, aproximadamente 16 dias. As F10 e F11 possuem T1/2 para o FIP próximo uma vez que o se trata da mesma droga, dose e via de administração. Quando se realiza a relação da AUC 0- α de SULF/FIP encontramos os valores de 1,3; 15 e 1,5 para F10, F11 e FIP pour-on respectivamente. Estes valores indicam a quantidade circulante na corrente sanguínea de SULF em relação ao FIP. Assim pode-se dizer que ao fim de 30 dias para a F11 a quantidade do SULF é 15 vezes maior que a do FIP. Durante a construção dos perfis foi possível observar as fases de absorção, excreção e biotransformação nas três formulações sendo a F10 a formulação com maior biodisponibilidade.

Palavra-chaves: Fipronil. Farmacocinética. Farmacotécnica

2.ABSTRACT

A fundamental hypothesis of clinical pharmacokinetics is that a link exists between the pharmacological effects of a drug and its concentration in the bloodstream. The monitoring of the drug concentration profile in function of time in a suitable physiological fluid allows the determination of bioavailability. A comparative evaluation of pharmacokinetic parameters in new formulation is extremely important for the decision of the best approach for the treatment in animals and effectiveness of clinical effect. The aim of this study was evaluate the pharmacokinetic behavior of injectable formulations F10 and F11 and compare them with commercial topical formulation. For this evaluation were used 18 cattle divided into 3 groups. Each group was treated with a formulation. Blood samples were collected at 0, 4, 12h, 2, 7, 14, 15, 16, 17, 21, 28, 30 and 35 days. The samples were analyzed by HPLC-UV to quantify fipronil and fipronil sulfone. The concentrated values were analyzed by PK solution software for the calculation of pharmacokinetic parameters. To calculate the bioavailability were used 4 animals treated with fipronil and 5% N-methylpyrrolidone 30%. Blood samples were collected at 0, 4, 6, 12h, 2, 3, 4 e 5 days and analyzed by HPLC-UV. In all the formulations the Tmax of fipronil sulfone was reached around 400h, was approximately 16 days. The formulations F10 e F11 have a similar T1/2 for fipronil since it is the same drug dose, and route of administration. When analyzing the relationship of AUC 0- α SULF/FIP show the values 1.3; 15 and 1.5 for F10, F11 and commercial topical formulation respectively. These values indicate the amount of fipronil sulfone compared to fipronil in the bloodstream. In the other words, after 30 days the amount of fipronil sulfone at animals treated with F11 formulations was 15 times higher than the fipronil. During construction the profiles was observed phases of absorption, excretion and biotransformation in the three formulations and the F10 formulation had higher bioavailability

Key word: Fipronil. Pharmacokinetics. Pharmaceutical Technology

3.INTRODUÇÃO

Uma hipótese fundamental da farmacocinética clínica é que existe uma relação entre os efeitos farmacológicos de um fármaco e sua concentração na circulação sanguínea. O monitoramento do perfil de concentração do fármaco em função do tempo em um fluido fisiológico adequado permite a determinação de sua biodisponibilidade.

A RDC 60 de 10 outubro de 2014 da ANVISA determina que a biodisponibilidade é o termo farmacocinético que indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo proveniente de uma forma farmacêutica, a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina, medida com base no pico de exposição e na magnitude de exposição ou exposição parcial.

O método mais comumente utilizado para avaliação de biodisponibilidade envolve a construção de uma curva de concentração plasmática sanguínea em função do tempo. Uma avaliação comparativa dos parâmetros farmacocinéticos em novas formulação é de extrema importância para na decisão da melhor conduta para o tratamento no animais e efetividade do efeito clínico, além é claro de fornecer informações valiosas quanto a características de cada formulação permitindo assim uma tomada de decisão mais adequada no momento da escolha de qual deverá prosseguir no processo de desenvolvimento.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento farmacocinético das formulações injetáveis F10 e F11 e compará-las com a formulação comercial de maior aceite no mercado.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Farmacocinética

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 (GOODMAN; GILMAN, 2006).

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 preenche 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; WU-PONG; YU, 1981).

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, 2006).

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 RDC 60 de 10 outubro de 2014 da ANVISA determina que a biodisponibilidade é o termo farmacocinético que indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo proveniente de uma forma farmacêutica, a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina, medida com base no pico de exposição e na magnitude de exposição ou exposição parcial.

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; WU-PONG; YU, 1981).

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; WU-PONG; YU, 1981).

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 tmax, porém com uma taxa menor. É expresso em unidade de tempo (horas, minutos)(SHARGEL; WU-PONG; YU, 1981).

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; WU-PONG; YU, 1981).

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; WU-PONG; YU, 1981).

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 (SHARGEL; WU-PONG; YU, 1981).

4.2.Fipronil

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 quatro (4) a seis (6) horas após sua ingestão e começa a declinar lentamente. 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%) (DEFRA, 1999; USEPA, 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 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 (USEPA, 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 (USEPA, 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 os 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 do metabolito sulfona. Estudos recentes com microsomas hepáticos humanos e isoformas do citocromo P450 (CIP) recombinantes demonstraram que a formação de sulfona é quase exclusivamente o resultado da atividade da CIP3A4, o metabolismo, embora limitado pela CIP2C19 também foi relatado. O metabolito sulfona, bem como o produto da fotodegradação, o fipronil-desulfenil, 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 CIP, 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 aqueles conhecidos por causar efeitos tóxicos ou letais. Estudos recentes com hepatócitos humanos e de ratos 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 SULF 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).

5.MATERIAL E MÉTODOS

Para realizar o estudo de farmacocinética foram utilizados bovinos mestiços, machos e fêmeas, localizados na estação experimental da UFRRJ. Todos os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob número 014/2014.

5.1.Pré-estudo para Determinação dos Pontos de Coleta

Para a determinação dos pontos corretos de coleta de amostras e melhor delineamento para a construção da curva plasmática foram selecionados cinco (5) grupos de três (3) animais da seguinte forma:

- Grupo F3 (GF3) - Foram medicados com a F3 no volume de 1mL para cada 50 Kg de pc, correspondendo a dose de 1 mg/Kg de pc.
- Grupo F4 (GF4) - Foram medicados com a F4 no volume de 1mL para cada 50 Kg de pc, correspondendo a dose de 1 mg/Kg de pc
- Grupo F10 (GF10) - Foram medicados com a F10 no volume de 1mL para cada 50 Kg de pc, correspondendo a dose de 2 mg/Kg de pc.
- Grupo F11 (GF11) - Foram medicados com a F11 no volume de 1mL para cada 50 Kg de pc, correspondendo a dose de 2 mg/Kg de pc
- Grupo FIP pour-on (GFPO) - Os animais foram medicados com uma formulação comercial de FIP pour-on¹ com o volume de 1mL/10Kg de pc, correspondendo a dose de 1 mg/Kg.

O quinto grupo foi tratado com FIP através de formulação disponível comercialmente com boa aceitação pelo mercado via tópica, pour-on. Este grupo foi utilizado como base de comparação para as demais formulações.

Antes do tratamento foi coletada uma amostra de sangue de cada animal, estas foram chamadas de tempo zero. Após o tratamento foram coletadas novas amostras nos tempos 0, 4, 8, 10, 12, 24, 30, 36h, 2, 3, 6, 8, 10, 13 e 15 dias. Durante a coleta de sangue foram utilizados tubos heparinizados vacuntainer de 6mL (BD[®]) e agulha múltipla descartável 25x8 (BD[®]). Após coletadas as amostras foram analisadas conforme descrito no capítulo II e foi quantificado apenas o fipronil. Os níveis de sulfona foram monitorados pelo aumento da área encontrada nos tempos de retenção do fipronil sulfona nas amostras analisadas.

Os resultados encontrados foram comparados entre si para determinar os melhores tempos de coleta para construção do perfil plasmático da formulação e sua comparação com a formulação disponível comercialmente.

5.2.Construção do Perfil Plasmático Subcutâneo

Para a determinação do perfil plasmático das formulações F10, F11 e FIP pour-on foram selecionados 18 bovinos machos com peso corporal variando de 117 a 544 kg, adultos, mestiços de Red Angus X Nelore. Com base no peso corporal, obtidos através da pesagem

¹ TopLine[®] RED pour-on (Merial Brasil); Lote:098/14; Fabricação:AGO14; Validade:AGO17

individual com balança eletrônica da marca Coima, os animais foram randomizados em três (3) grupos de oito (8) animais da seguinte forma:

- Grupo F10 (GF10) - Foram medicados com a F10 no volume de 1mL para cada 50 Kg de pc, correspondendo a dose de 2 mg/Kg de peso corporal.
- Grupo F11 (GF11) - Foram medicados com a F11 no volume de 1mL para cada 50 Kg de pc, correspondendo a dose de 2 mg/Kg de peso corporal.
- Grupo FIP pour-on (GTL) - Os animais foram medicados com uma formulação comercial de fipronil pour-on com o volume de 1mL/10Kg de pc, correspondendo a dose de 1 mg/Kg pc.

Antes do tratamento foi coletada uma amostra de sangue de cada animal, estas foram chamadas de tempo zero. Após o tratamento foram coletadas novas amostras nos tempos 0, 4, 12h, 2, 7, 14, 15, 16, 17, 21, 28, 30 e 35 dias. Durante a coleta de sangue foram utilizados tubos heparinizados vacuntainer de 6mL (BD[®]) e agulha múltipla descartável 25X8 (BD[®]). Após coletadas as amostras foram analisadas conforme descrito no capítulo II e foram quantificados fipronil e fipronil sulfona.

Os valores de concentração plasmática encontrados foram analisados individualmente para cada animal. A construção da curva de concentração plasmática versus tempo foi realizada através do programa PK Solutions 2.0 (Ashland, 1999). Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados utilizando o modelo dos métodos independente para a determinação dos parâmetros farmacocinético de concentração máxima absorvida (Cmax), tempo onde ocorre o Cmax (Tmax), tempo de meia-vida (T1/2), área sobre a curva de zero até a última concentração possível de ser quantificada (AUC 0-t) e área sobre a curva de zero a infinito (AUC 0- ∞). Os resultados foram expressos em relação à média geométrica \pm CV.

5.3. Construção do Perfil Plasmático Intravenoso

Para a construção perfil plasmático intravenoso e conseqüente determinação do fator de biodisponibilidade, foram selecionados 4 animais.

Devida a falta de solubilidade do fipronil em soluções aquosas foi preparada uma formulação 5% no veículo com maior quantidade de N-metilpirrolidona, ou seja, 30%. Esta foi administrada via intravenosa na dose de 1mL para cada 50kg de peso vivo. Antes do tratamento foi coletada uma amostra de sangue de cada animal, estas foram chamadas de tempo zero. Após o tratamento foram coletadas novas amostras nos tempos 0, 4, 6, 12h, 2, 3, 4 e 5 dias. Durante a coleta de sangue foram utilizados tubos heparinizados vacuntainer de 6mL (BD[®]) e agulha múltipla descartável 25x8 (BD[®]). Após coletadas as amostras foram analisadas conforme descrito no capítulo II e foram quantificados fipronil e fipronil sulfona.

Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados conforme descrito no item anterior.

O cálculo da biodisponibilidade (F) foi realizado utilizando-se a via intravenosa como referência, já que toda medicação é absorvida nesta via, de acordo com a seguinte fórmula:

$$F (\%) = \frac{AUC_{0-\infty} \text{ teste} \times Dose_{\text{referência}}}{AUC_{0-\infty} \text{ referência} \times Dose_{\text{teste}}}$$

6.RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1.Pré-estudo para Determinação dos Pontos de Coleta

Após análises das amostras coletadas foram construídos os gráficos com para as concentrações de FIP e as áreas de SULF (Figura 14). É possível perceber que a formulação F11 apresentou um perfil similar ao fipronil pour-on (GFPO). As formulações com 10% de FIP alcançam maiores concentrações de SULF quando comparadas as de 5%. Quanto maior a concentração de NMP menor a concentração plasmática de FIP.

As concentrações plasmáticas de SULF continuam aumentando após 15 dias. O Cmax de FIP foi alcançado em até 48h. Existem registros na literatura que descrevem o SULF com um metabólito ativo, pois são inibidores do canal GABA e dos receptores de glutamato, sendo o SULF um inibidor ainda mais efetivo e com maior persistência na corrente sanguínea uma vez que o FIP é rapidamente metabolizado via CYP a SULF (BLAGBURN; DRYDEN, 2009; LACROIX et al., 2010; PRULLAGE et al., 2011; ROQUES et al., 2012). Como as formulações 10 e 11 apresentaram perfis com áreas crescentes do SULF estas foram escolhidas para a construção do perfil plasmático e comparação ao produto comercial.

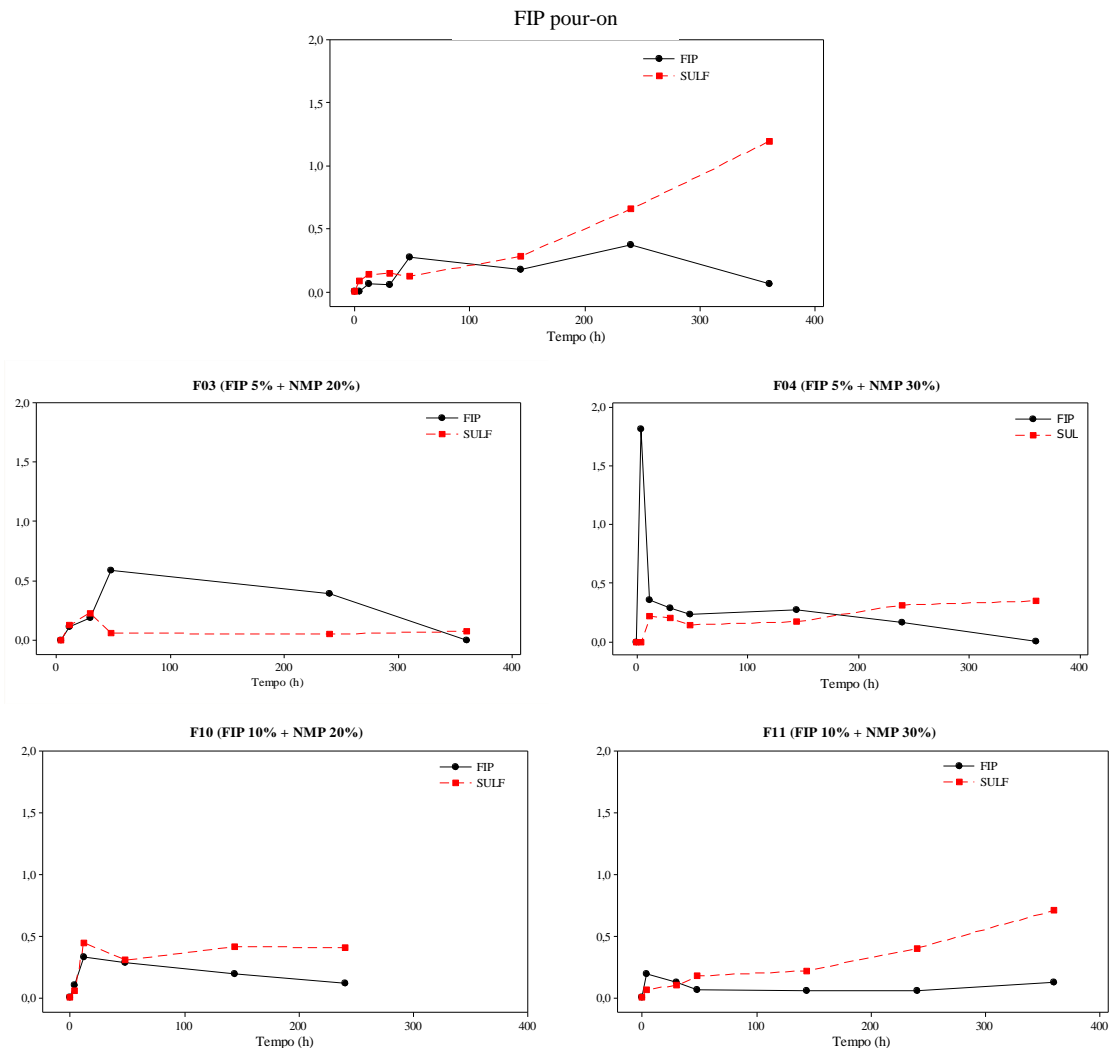


Figura 14: Curvas plasmáticas das cinco formulações de fipronil

6.2. Construção do Perfil Plasmático Subcutâneo

Para a construção do perfil plasmático dos grupos GF10, GF11 e GFPO cada animal foi analisado individualmente. Após a transformação logarítmica do eixo Y não foi observada a presença de dois compartimentos logo foi utilizado o modelo não compartimental assumindo a premissa de que a droga está uniformemente distribuída pelo corpo. A tabela 14 e figuras 15 e 16, descrevem os dados farmacocinéticos encontrados após análise do sangue dos animais tratados com F10, F11 e GFPO. Novamente os resultados demonstram um Cmax de SULF superior ao do FIP na F11 e o perfil inverso na F10 e GFPO. Quando comparamos a AUC e o Cmax apresentados pelas F10 e F11 os valores apresentados em F11 são sempre inferiores. Estes dados indicam que a o aumento da NMP provocam uma liberação mais lenta do FIP para a circulação sanguínea. Aliada a estes dados em F11 ocorre um grande aumento do Vd do FIP sugerindo um segundo compartimento, provavelmente pela formação de um depósito da formulação. O Vd de SULF é maior em F10 e menor em F11 quando comparado aos valores encontrados de Vd para FIP e Os Tmax de FIP e SULF se encontram mais distantes na F11 do que na F10. Estes dados também sugerem que o aumento da NMP desacelerou a biotransformação de FIP para SULF, corroborando com a ideia da formação de um depósito da formulação no local de aplicação.

Nas três formulações o Tmax da SULF só foi alcançado em torno de 400h, aproximadamente 16 dias. Este é o tempo necessário para que ocorra a biotransformação do FIP em SULF, com esta cinética e possível afirmar que a biotransformação não é pré-sistêmica, sendo necessário o monitoramento das duas moléculas.

As F10 e F11 possuem T1/2 para o FIP próximo uma vez que o se trata da mesma droga, dose e via de administração. Quando realizamos a relação da AUC 0- α de SULF/FIP encontramos os valores de 1,3; 15 e 1,5 para F10, F11 e FIP pour-on respectivamente. Estes valores indicam a quantidade circulante na corrente sanguínea de SULF em relação ao FIP. Assim pode-se dizer que ao fim de 30 dias para a F11 a quantidade do SULF na circulação sanguínea é 15 vezes maior que a do FIP. Este fato pode ajudar na eficácia antiparasitária da formulação uma vez que a SULF é um metabolito ativo (RAVETON et al., 2007).

Tabela 14: Parâmetros farmacocinéticos de fipronil e fipronil sulfona para as formulações 10, 11 e fipronil pour-on

Parâmetro	F10		F11		FIP pour-on	
	FIP	SULF	FIP	SULF	FIP	SULF
Cmax (ng/mL)	683,9 ± 2466,2	242,7 ± 100,9	17,0 ± 3,4	178,7 ± 66,6	143,2 ± 122,2	102,9 ± 87,1
Tmax (h)	407,1 ± 0,8	431,8 ± 112,1	126,7 ± 203,6	409,5 ± 44,6	47,9 ± 0,1	391,9 ± 20,8
AUC 0-t (ng.h/mL)	99172,0 ± 208405,0	76830,3 ± 36742,8	4645,1 ± 2020,0	55910,3 ± 32458,1	26727,6 ± 43779,9	28040,1 ± 22121,3
AUC 0- α (ng.h/mL)	99407,9 ± 208925,6	129063,9 ± 84390,8	5084,6 ± 2525,8	76297,4 ± 82555,6	27352,4 ± 44300,0	39808,8 ± 32993,8
T1/2 (h)	36,9 ± 38,2	422,4 ± 398,6	38,7 ± 41,1	217,5 ± 245,4	100,8 ± 48,6	153,2 ± 78,1
Vd (mL/Kg)	1067,2 ± 794,6	9412,3 ± 24929,6	21568,4 ± 11227,5	8115,7 ± 3062,0	5316,0 ± 5199,3	9264,3 ± 11101,5

Cmax= concentração máxima; Tmax= tempo em que foi detectada a concentração máxima; T1/2= tempo de meia-vida; AUC= área sob a curva; Vd= volume de distribuição; FIP= fipronil; SULF=fipronil sulfona

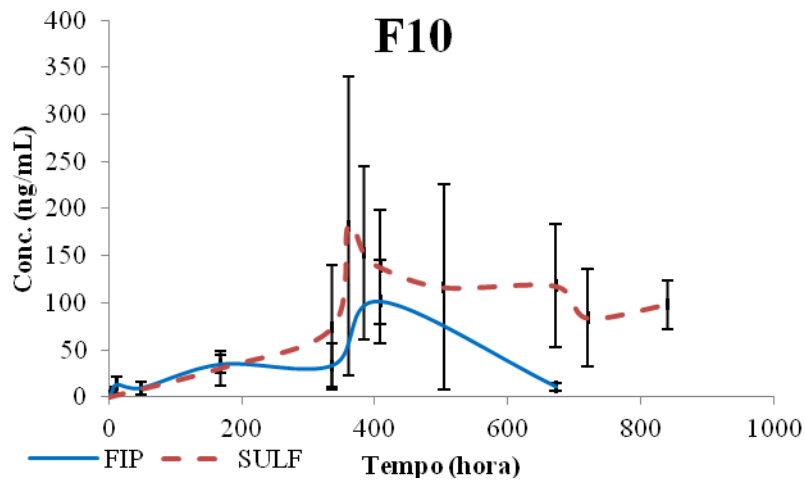


Figura 15: Perfil plasmático de fipronil (FIP) e fipronil sulfona (SULF) para formulação F10

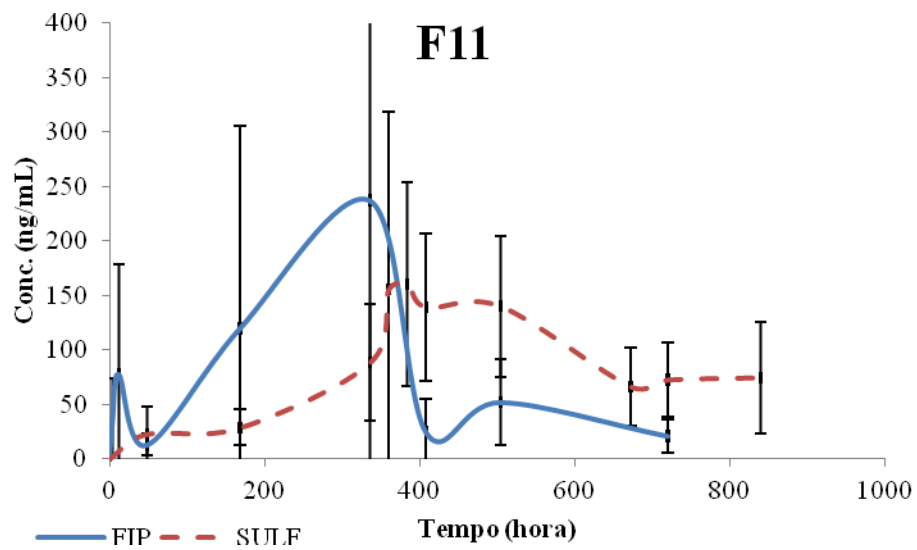


Figura 16: Perfil plasmático de fipronil (FIP) e fipronil sulfona (SULF) para a formulação F11

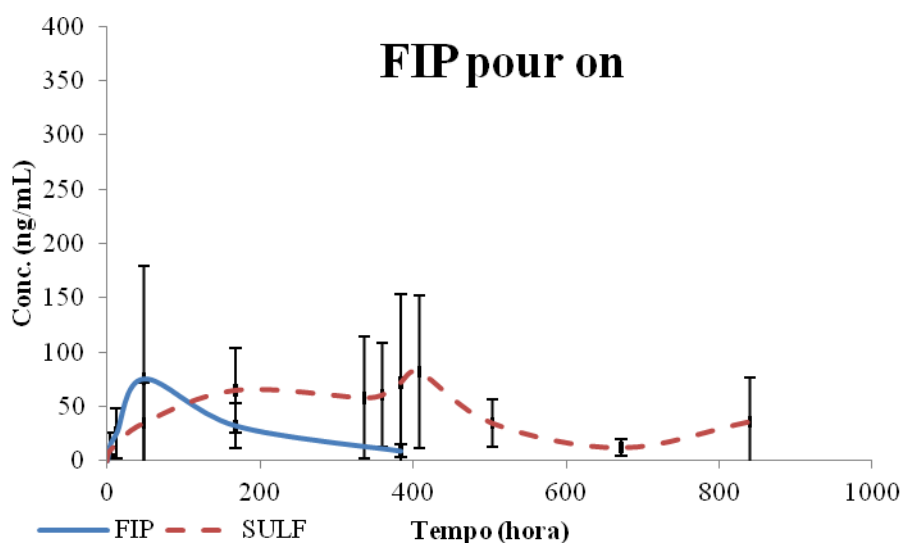


Figura 17: Perfil plasmático de fipronil (FIP) e fipronil sulfona (SULF) para fipronil pour-on

6.3. Construção do Perfil Plasmático Intravenoso

Para a construção do perfil plasmático o resultado de cada animal foi analisado individualmente. O modelo utilizado foi o não compartimental.

Através das AUC e doses administradas foi calculada a biodisponibilidade de 10,3; 0,5 e 0,3% para F10, F11 e GFPO respectivamente (Tabela 16).

Tabela 15: Parâmetros farmacocinéticos para administração intravenosa de fipronil 5%

Parâmetro	IV 5%
C _{max} (ng/mL)	159,8 ± 197,8
C _{inicial} (ng/mL)	148,2 ± 204,9
AUC 0-t (ng.h/mL)	4032,3 ± 3037,3
AUC 0-∞ (ng.h/mL)	6498,8 ± 3060,6
T _{1/2} (h)	22,6 ± 43,4
V _d (mL/Kg)	4972,7 ± 10075,8

C_{max}= concentração máxima; C_{inicial}= concentração inicial; T_{1/2}= tempo de meia-vida; AUC= área sob a curva; V_d= volume de distribuição; IV= intravenoso

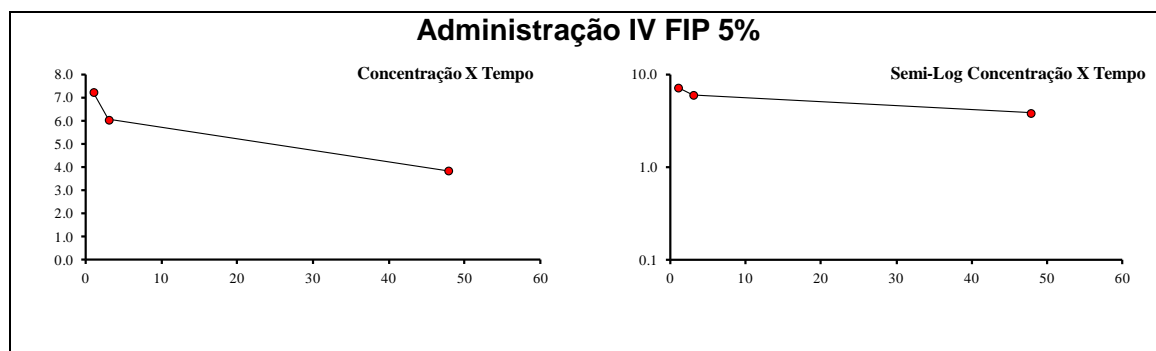


Figura 18: Perfil plasmático de fipronil e fipronil sulfona para F10

Tabela 16: Valores de biodisponibilidade absoluta de fipronil das formulações F10, F11 e Fipronil pour-on

Formulações	Doses	AUC 0-α	F
F10	10%	99407,9	10,3%
F11	10%	5084,6	0,5%
FIP pour-on	1%	27352,4	0,3%
IV	5%	4830,7	---

AUC= área sob a curva; F= biodisponibilidade; IV= intravenoso

Outros autores já avaliaram os parâmetros farmacocinéticos do FIP. 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 todos os tempos avaliados durante 14 semanas. LACROIX et al., (2010) encontraram concentração plasmática para o FIP variando de 10,7 ng/mL a 231,0 ng/mL a partir de administração oral diária na dose de 3 mg/Kg por 13 dias em ratos. GUO-XIN et al., (2006) após administração intravenosa única de FIP na dose de 3 mg/Kg em coelhos encontrou Cmax de 3,48 mg/L em modelo de dois compartimentos com $t_{1/2\alpha}$ de 0,32h e $t_{1/2\beta}$ de 3,25 h. A AUC encontrada foi 4,96 mg.h/L. Um estudo envolvendo a administração de FIP na dose de 1mg/kg via subcutânea encontrou Cmax de 378ng/mL com o Tmax de 10h, um T1/2 de 12 dias (288h) e a AUC_{0-t} em 19388 ng.h/mL(CID et al., 2016). Os valores de Cmax encontrados para a F10 são aproximadamente o dobro (683ng/mL) do descrito por Cid, 2016 e a AUC é de 99172ng.h/mL, valor bem maior. Isto pode ser explicado pela dose administrada ser de 2 mg/kg e as diferenças dos veículos empregados. Como descrito anteriormente o uso da NMP aumentou a solubilidade do FIP, possibilitando ser veiculado a 10% e provavelmente diminuiu a liberação do ativo do seu local de aplicação aumentando o Tmax. Os aumentos nos valores de T1/2 também podem ser associados a alta lipofilicidade do FIP que tende a formar depósitos em tecidos adiposos (TINGLE et al., 2003).

7.CONCLUSÕES

O aumento de NMP diminui a distribuição do FIP e aumenta a concentração de SULF. A formulação F10 possui a maior biodisponibilidade quando comparadas a F11 e FIP pour-on.

Para a F10 o FIP administrado via SC atinge a sua concentração máxima em aproximadamente 17 dias com um C_{max} de 683 ng/mL enquanto o SULF leva 18 dias alcançando um C_{max} de 242 ng/mL. Os valores de AUC são 99172 e 76830 ng.h/mL para FIP e SULF respectivamente com T_{1/2} de 36 h para FIP e 422 h para SULF.

Para a F11 o FIP administrado via SC atinge a sua concentração máxima em aproximadamente 5 dias com um C_{max} de 17 ng/mL enquanto o SULF leva 17 dias alcançando um C_{max} de 178 ng/mL. Os valores de AUC são 4645 e 55910 ng.h/mL para FIP e SULF respectivamente com T_{1/2} de 38 h para FIP e 217 h para SULF.

Para a FIP pour-on o FIP administrado via tópica atinge a sua concentração máxima em aproximadamente 2 dias com um C_{max} de 143 ng/mL enquanto o SULF leva 16 dias alcançando um C_{max} de 102 ng/mL. Os valores de AUC são 26727 e 28040 ng.h/mL para FIP e SULF respectivamente com T_{1/2} de 100 h para FIP e 153 h para SULF.

CAPÍTULO IV

EFICÁCIA DAS FORMULAÇÕES INJETÁVEIS DE FIPRONIL NO CONTROLE DE FORMAS IMATURAS DE *Haematobia irritans* EM BOVINOS

1.RESUMO

A mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) descrita por Linnaeus em 1758 e reconhecida como uma praga de bovinos na França em 1830 foi introduzida acidentalmente em países onde a bovinocultura encontrava-se em expansão, tornando-se uma das principais pragas da pecuária na atualidade. A atividade hematófaga da mosca-dos-chifres não é seu aspecto mais nocivo. O epíteto específico da espécie em latim, “irritans”, é explicado pelo principal efeito que este díptera proporciona que é a irritação causada ao animal infestado, deixando-o extremamente agitado, e conduzindo o animal ao estado crítico de estresse, este sim responsável pelos maiores prejuízos observados em rebanhos infestados causando diminuição do ganho de peso, da produção de leite, do apetite e da conversão alimentar, pode levar os animais à morte. Para o controle químico deste parasito foram utilizadas drogas como organofosforados e avermectinas. Foi demonstrada a eficácia superior a 95% da formulação fipronil 1% pour-on para a controle de *H.irritans* em novilhas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia das formulações F10 e F11 no combate a *H.irritans* através do controle do ciclo evolutivo deste parasita e comparar os resultados com a formulação tópica comercial disponível. Para isso foram utilizados 24 animais divididos em 4 grupos. Cada grupo foi tratado com uma formulação e um grupo permaneceu sem tratamento. Foram coletadas fezes dos animais nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias. Após a coleta o material foi incubado junto a ovos de *H.irritans* para observação da evolução do ciclo biológico. Após 48 horas de incubação foi avaliado a eclodibilidade das larvas, com 8 dias foram separadas e quantificadas as pupas e com 15 dia de incubação foi realizada a contagem da emergência de adultos utilizada para o cálculo da eficácia. Os resultados demonstraram que após 14 dias de tratamento as formulações F10 e F11 foram eficazes para o controle de *H.irritans* com eficácia na inibição da eclosão de ovos de 74 e 97% respectivamente enquanto formulação tópica comercial não apresentou nenhuma eficácia. Estes resultados demonstram que as formulações F10 e F11 são capazes de inibir o ciclo evolutivo de *H.irritans* em bovinos.

Palavras-chave: Fipronil. Eficácia. Mosca-dos-chifres

2.ABSTRACT

The horn fly (*Haematobia irritans*) described by Linnaeus in 1758 and recognized as a cattle plague in France in 1830 was accidentally introduced in countries where the cattle was in expansion, becoming one of the major pests of livestock in today. The hematophagous activity of the horn fly is not its most harmful aspect. The Latin name, "irritans" is explained by the main effect that this diptera provides an irritation, leaving him extremely agitated, and leading the animal to the critical state of stress. It is responsible for the greatest damage observed causing depressed weight gain, low milk production, lack of appetite and food conversion, may lead animals to death. For chemical control of this parasite were used drugs as organophosphates and avermectin. It was demonstrated efficacy up to 95% for fipronil formulation 1% pour-on to control *H.irritans* in heifers. The aim of this study was evaluated the efficacy of F10 and F11 formulations to control *H.irritans* by controlling of the evolutionary cycle of the parasite and compare the results with commercial topical formulation available. Twenty-four animals divided into four groups were used. Each group was treated with one formulation and a group was without treatment. Animal feces were collected at 0, 7, 14 and 21 days. After collecting the material was incubated at *H.irritans* eggs to observe the evolution of the biological cycle. After 48 hours of incubation larvae hatchability was evaluated, with 8 days were quantified pupae and 15 days after incubation was performed adult eclosion count used to calculate efficiency. The results showed that after 14 days of treatment formulations F10 and F11 were effective for controlling *H.irritans* with efficiency in inhibiting hatching of eggs the 74 and 97% respectively while commercial topical formulation showed no efficacy. These results demonstrate that formulations F10 and F11 are able to inhibit the life cycle of *H.irritans* in cattle.

Keywords: Fipronil. Effectiveness. Horn fly

3.INTRODUÇÃO

A mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) descrita por Linnaeus em 1758 e reconhecida pela primeira vez como uma praga de bovinos na França em 1830. Foi introduzida acidentalmente em países onde a bovinocultura encontrava-se em expansão, tornando-se uma das principais pragas da pecuária na atualidade. A atividade hematófaga da mosca-dos-chifres não é seu aspecto mais nocivo.

O epíteto específico da espécie em latim, “irritans”, é explicado pelo principal efeito que este díptera proporciona que é a irritação causada ao animal infestado, deixando-o extremamente agitado, e conduzindo o animal ao estado crítico de estresse este sim responsável pelos maiores prejuízos observados em rebanhos infestados causando diminuição do ganho de peso, da produção de leite, do apetite e da conversão alimentar, pode levar os animais à morte. Este parasito é incriminado com causador de milhões de reais prejuízos anuais para nossa pecuária bovina.

Para o controle químico deste parasito vem sendo utilizados grupamentos como os organofosforados piretróides, fenilpirazoles e avermectinas empregadas por via tópica sob a forma de pulverização, pou-on ou brincos impregnados. Existem algumas publicações indicando que as lactonas empregadas por via sistêmica (injetável) teriam ação sobre as formas evolutivas deste díptero em desenvolvimento no bolo fecal. A ação seria determinada pela excreção dos metabólitos ativos das avermectinas que são eliminadas pela via hepática (biliar), impedindo assim o desenvolvimento da fase do ciclo evolutivo que ocorre no bolo fecal dos bovinos.

O fipronil, única molécula pertencente ao grupo dos fenilpirazoles empregada em bovinos no Brasil, quando empregada por via tópica apresenta eficácia sobre as formas evolutivas presentes no animal, caracterizando assim seu efeito mosquicida para adultos. Não foram encontrados relatos na literatura consultada da atuação dos metabólitos do fipronil presente nas fezes de bovinos e uma possível correlação com ação larvicida sobre as formas evolutivas de *H. irritans* presentes no bolo fecal.

O objetivo do presente estudo foi avaliar se fipronil empregado por via injetável por via subcutânea em bovinos seria capaz de interferir de forma significativa no desenvolvimento das formas evolutivas de *H. irritans* presentes nas fezes inibindo o desenvolvimento larva a adulto.

4. REVISÃO DE LITERATURA

Nos Estados Unidos da América (EUA), a presença de *Haematobia irritans* foi relatada inicialmente no Estado da Filadélfia no século XIX, entre os anos de 1884 e 1886 vindas com animais importados do Sul da Europa, difundiu-se por toda a América do Norte, surgindo posteriormente no Canadá (no ano de 1900), Havaí e ilhas do Caribe. A presença da mosca-dos-chifres foi constatada na América do Sul no início do século XX, mais precisamente na Venezuela e Colômbia na segunda metade da década de 1930 (BIANCHIN; ALVES, 2002).

No Brasil, constatou-se a presença da mosca dos chifres inicialmente em Roraima entre 1976 e 1977. Devido a presença de propriedades produtoras de bovinos localizadas em regiões com vegetação de cerrado, o clima tropical com verões chuvosos e a predominância do gado Nelore criado de forma extensiva sua disseminação foi bastante rápida no então Território de Roraima. A partir de 1984, a expansão pelo Brasil foi mais rápida, atingindo regiões tradicionais na pecuária nas regiões Sul e Centro-Oeste (BRITO et al., 2005).

O adulto de *H. irritans* é uma mosca pequena, medindo entre 2 a 5 mm. Os ovos apresentam coloração marrom-escura com aproximadamente 1,20 mm de comprimento e 0,32 mm de largura. A pupa possui forma de barril, com aproximadamente 3,3 mm de comprimento por 1,4 mm de largura (OLIVEIRA; BRITO, 2005).

Seu ciclo biológico é semelhante ao de outros muscídeos, sendo muito rápido quando em condições favoráveis de temperatura e umidade. A fêmea grávida deposita seus ovos profundamente nas fezes frescas dos bovinos. As larvas de primeiro ínstar penetram profundamente no esterco, protegendo-se da ação dos raios solares e permanecem neste estágio por aproximadamente 10 horas, quando passam a larvas de segundo ínstar, e depois de 18 horas, em média, alcançam o terceiro ínstar larval. À medida que ocorre a dessecação do esterco, as larvas migram para as partes ainda úmidas do bolo fecal e após aproximadamente 64 horas eclodem dos ovos (OLIVEIRA; BRITO, 2005).

A abundância de moscas-dos-chifre está relacionada tanto a fatores bióticos, como a predação, competição e parasitismo, como a fatores abióticos. O parasitismo aumenta nos meses com muita precipitação e altas temperaturas, podendo ser considerado sazonal (OLIVEIRA; BRITO, 2005).

Ao longo de mais de um século de convivência, inúmeras tentativas foram feitas para o combate da mosca-dos-chifres nos EUA, sendo considerada a maior praga para os bovinos mesmo diante da alta tecnologia aplicada à pecuária neste país (BIANCHIN; ALVES, 2002). No Brasil, a perda de peso vivo em função da ação da mosca-dos-chifres permite estimar que um animal com uma infestação média anual de 500 moscas pode sofrer perda de peso vivo anual de aproximadamente 40 kg determinando perda total de carne para o Brasil na ordem de milhões de toneladas/ano (BRITO et al., 2005).

Os primeiros compostos utilizados no controle químico de *H. irritans* tinham ação repelente e foram misturados com graxa utilizada em mecânica ou com óleo queimado, sendo utilizados como ativos óleo de pinho, óleo de peixe, alcatrão, querosene, emulsão de fumo, alcatrão de pinho creosotado, pó de piretro e rotenona. Os primeiros agentes químicos utilizados com sucesso no controle da mosca-dos-chifres foram o piretro e o pó de fumo, sendo o piretro utilizado por pulverização com muito sucesso até o advento do DDT (Dicloro Difênil Tricloro Etano) em 1944, quando houve uma grande revolução no controle químico

dos ectoparasitas. Após a 2ª Guerra Mundial, com o advento dos hidrocarbonetos clorados como o DDT, hexacloro de benzeno, chlordane, toxaphene, metoxychlor, lindane e carbaryl, passou-se a fazer um controle mais eficiente. O DDT foi muito utilizado durante as décadas de 1940 e 1950 por ser uma droga muito persistente e possuir amplo espectro, controlando também outros ectoparasitas. Os organoclorados causam uma hiperexcitabilidade neuromuscular, que causa a morte do inseto (BRITO et al., 2005).

Na década de 50 foi desenvolvido um novo grupo de inseticidas, os organofosforados como o dioxathion, coumaphos e o clorpyrifos, utilizados sob a forma de pulverização, pour-on. Os organofosforados inibem algumas enzimas, principalmente a acetilcolinesterase, pela fosforilação do sítio de esterificação da enzima, o que acarreta no bloqueio da transmissão colinérgica do parasito, levando-o a uma paralisia espástica. Entre os anos de 1970 e 1980 foram desenvolvidos os piretróides em uso corrente até a atualidade em todo o mundo. Os piretróides apresentam como características: a baixa toxicidade tanto ao homem como aos animais, facilidade de degradação ambiental e inicialmente uma alta eficácia no controle de insetos, sendo que foram também utilizados de diversas formas: pulverização, brincos impregnados e polvilhamento (BRITO et al., 2005).

Na mesma época do advento dos piretróides, outras drogas foram sintetizadas para o controle das larvas de *H. irritans* nas fezes, conhecidas como reguladoras de crescimento, as quais foram utilizadas por via oral, como o methropene ou inibidores da formação de quitina, como o diflubenzuron. Estas drogas são muito específicas para dípteras e não afetam o crescimento das larvas de besouros e outros insetos úteis para a desintegração e incorporação ao solo do bolo fecal (BRITO et al., 2005).

As avermectinas representam uma moderna classe de lactonas macrolíticas, que têm demonstrado atividades nematocida, acaricida e inseticida produzidas a partir de secreções naturais produzidas por um actinomiceto, o *Streptomyces avermetillis*, que inicialmente foi isolado no Japão em uma amostra de solo da cidade de Kawana, em 1976. Esta classe de inseticidas tem influenciado muito o arsenal químico utilizado no controle de artrópodes, tanto na agricultura como em parasitas de mamíferos (BRITO et al., 2005).

Doramectina empregada por via subcutânea na dose de 200mcg/kg de pc demonstrou ser eficaz na inibição do desenvolvimento larva-adulto nas fezes de bovinos naturalmente infestados por *H. irritans*. Estudo *in vitro* foi desenvolvido empregando-se fezes dos animais medicadas e controle negativo que foram inoculados com ovos de *H. irritans* em diferentes momentos experimentais (ANZIANI; FLORES; GUGLIELMONE, 2000). Da mesma forma outro estudo estabeleceu a eficácia da ivermectina empregada por via pour-on em bovinos na interrupção do desenvolvimento larva-adulto de *H. irritans* em fezes. Através de ensaio *in vitro*, demonstraram eficácia variando de 100% (dia +4) a 58% (dia +58) (MARLEY; HALL; CORWIN, 1993).

Com relação ao fipronil foi demonstrada a eficácia superior a 95% da formulação fipronil 1% pou-ron para a controle de *H. irritans* em novilhas (GUGLIELMONE et al., 2000)

Durante pelo menos cem anos, inúmeras tentativas foram feitas para combater a mosca-dos-chifres nos EUA. No entanto, a mosca voltava a reinfestar os rebanhos, tornando-se cada vez mais importante quanto aos prejuízos causados. Pelo menos dois fatores foram responsáveis por tal fato: o aumento do número de bovinos e o emprego de produtos químicos cada vez mais sofisticados, culminando com os inseticidas industriais amplamente usados (BRITO et al., 2005).

O primeiro registro de resistência da mosca-dos-chifres às drogas utilizadas no seu controle foi feito por McDuffie (1960), que observou um decréscimo na eficiência do toxophene, uma droga da classe dos organoclorados que em concentração de 0,5% e aplicado por pulverização não alcançou o controle antes observado. A resistência aos organofosforados (fenchlovos (ronnel)) foi demonstrada após o uso intensivo por três anos consecutivos da

droga sob a forma de “backrubbers”. Sheppard (1983) constatou após um ano e meio de uso de tetraclorvinphos por via oral o aparecimento da resistência em uma população de *H. irritans* na Geórgia (EUA), sendo que este mesmo autor também detectou diminuição da eficiência de brincos impregnados com tetraclorvinphos, levantando a suspeita da possível resistência das moscas à este produto. Ensaios conduzidos por Sheppard (1984) demonstraram que após quatro anos da utilização de brincos impregnados com fenvalerato a eficácia do produto foi declinando sucessivamente (apud BRITO et al., 2005).

No Brasil populações resistentes de *H. irritans* foram identificadas (BARROS et al., 2013; CASTRO-JANER et al., 2009).

A presença da mosca-dos-chifres sobre o rebanho bovino nacional é motivo de preocupação, dada a necessidade na manutenção sanitária dos rebanhos, bem como a competitividade da cadeia produtiva bovina, por isso devem ser buscadas soluções pró-ativas viáveis para a manutenção dos limiares econômicos na exploração da pecuária bovina no que refere ao controle das ectoparasitoses bovinas (BIANCHIN; ALVES, 2002; BIANCHIN; KOLLER; DETMANN, 2006; BRITO et al., 2005).

5.MATERIAL E MÉTODOS

5.1.Local do Estudo

O estudo foi realizado na área de campo da unidade da PESAGRO-SEROPÉDICA, localizada no município de Seropédica, no Estado do Rio de Janeiro, foram empregados 24 bovinos mestiços de Gir e Holandeses, fêmeas, não gestantes, não lactantes

Os animais foram separados por piquetes após o tratamento. Permanecendo um grupo em cada piquete. Todos os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob número 014/2014.

5.2.Formação dos Grupos Experimentais

Os animais foram ranqueados em quatro grupos experimentais de seis animais cada com base no peso corporal.

Para formação dos grupos experimentais, os animais foram listados em ordem decrescente do peso corporal. Os quatro animais com peso mais elevado foram destinados a repetição 1, os quatro seguintes a repetição 2, até que tivesse sido formado 10 repetições. Dentro de cada repetição, cada animal foi destinado por sorteio (ao acaso) a cada um dos grupos de tratamento.

Os grupos formados foram:

- Grupo Controle (GC)
- Grupo F10 (GF10), os animais foram medicados com a formulação F10 contendo 10% de FIP no volume de 1mL/50Kg de peso corporal por via injetável subcutânea, correspondendo a dose de 2mg/Kg pc.
- Grupo F11 (GF11), os animais foram medicados com a formulação F11 contendo 10% de FIP no volume de 1mL/50Kg de peso corporal, por via injetável subcutânea, correspondendo a dose de 2mg/Kg pc.
- Grupo Fipronil pou-on (GFPO), os animais foram medicados com uma formulação comercial pour-on contendo 1% de FIP (Top line) no volume de 1mL/10Kg de pc, por via tópica, correspondendo a dose de 1mg/Kg pc

No dia imediatamente anterior ao tratamento, os animais foram pesados e o volume a ser administrado foi calculado. Em caso de volume fracionado, este foi arredondado para baixo. A formulação comercial utilizada foi a mesma descrita no capítulo anterior.

5.3.Avaliação da Eficácia Sobre a Emergência de Adultos

Para a avaliação dos metabólitos do fipronil excretados pelas fezes e seus efeitos sobre o desenvolvimento da larva a adulto de *H. irritans*, fezes foram coletadas diretamente do reto de cada animal para cada tomada de tempo de dia 0 (antes do tratamento), dias +7, +14 e +21 (após o tratamento). Após a coleta o material foi acondicionado em isopor com gelo reciclado e remetido para o laboratório.

Para a avaliação *in vitro* da emergência de adultos de *H. irritans*, foram utilizados ovos provenientes de moscas coletadas de bovinos oriundos do plantel de animais do LQEPV, que estivessem sem tratamento antiparasitário, por no mínimo 90 dias. Com auxílio de puçá entomológico confeccionado de organza, as moscas foram coletadas e, imediatamente

acondicionadas em sacos plásticos transparentes, medindo 40X60cm, para oviposição, seguindo metodologia adaptada de Mochi (2009). Após 4 horas, os sacos com as moscas e os ovos foram submetidos rapidamente à baixa temperatura em freezer por 1 minuto, para redução do metabolismo das moscas.

Após a queda de metabolismo, os adultos foram retirados do saco plástico. Este foi aberto, os ovos foram coletados com auxílio de luminária e pincel número zero umedecido em água ultrapura, acondicionados em placa de petri descartável (10x10x2cm) e misturados em água ultrapura para auxiliar na separação das massas de ovos e facilitar a avaliação da eclodibilidade.

Para incubação dos ovos, foram utilizados quadrados de papel filtro medindo 2cm de lado, copos plásticos descartáveis, medindo 4,5x7,0x4,5cm e fezes dos bovinos pertencentes aos grupos experimentais.

As amostras de fezes coletadas foram montadas em duas repetições para cada grupo animal de cada grupo experimental. Foram colocados 10g de fezes no fundo do copo plástico descartável previamente pesado em balança de precisão da marca Marte®, e, sobre este, delicadamente, o papel filtro contendo 30 ovos. As amostras foram fechadas com tecido sintético TNT preto e elástico de borracha natural e acondicionadas em estufa tipo BOD com temperatura de $27,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $65 \pm 5\%$ UR.

Após 48 horas da incubação das amostras, o papel filtro com os ovos foi retirado do substrato para a realização da avaliação da eclodibilidade das larvas. Após este procedimento as amostras foram reacondicionadas em estufa nas mesmas condições climáticas descritas acima.

A avaliação da eclodibilidade dos ovos foi realizada com o auxílio de estilete parasitológico confeccionado com agulha de calibre 25X0,7mm e microscópio estereoscópica. Os ovos foram pressionados para visualização de possível conteúdo embrionário e consequente classificação como ovo não eclodido.

No oitavo dia, as amostras foram observadas para que fosse possível a obtenção, separação e quantificação de pupas. O substrato foi amolecido em água ultrapura em quantidade suficiente para formar uma solução, posteriormente foi agitado em seguida observou-se a presença de pupas na superfície da solução. As pupas flutuam em água pois são receptáculos emerticamente fechados e que contem ar no seu interior. Com auxílio de pinça entomológica, as pupas foram recolhidas do substrato e delicadamente acomodadas sobre almofada de algodão umedecido com água ultrapura dentro de placas plásticas de petri (10x10x2cm) que foram fechadas com fita crepe com 2cm de largura. Após este procedimento as amostras retornaram para estufa nas mesmas condições já descritas.

No décimo quinto dia após a incubação dos ovos, as placas de petri contendo as pupas foram observadas para a contagem da emergência dos adultos de *H. irritans*.

A eficácia foi calculada com a fórmula:

$$\text{Eficácia} = (\text{NMC} - \text{NMM}) / (\text{NMC}) \times 100$$

Onde: NMC = número de moscas emergidas do grupo controle

NMM = número de moscas vivas emergidas do grupo medicado

Para análise estatística os números médios das contagens de adultos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os dados normais foram submetidos ao teste-t e os dados anormais foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 95%. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Bioestat 5.0.

6.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos números de ovos eclodidos, pupas e adultos recuperados de *H. irritans* estão contidos na Tabela 17. As comparações da eficácia na eclosão de adultos estão descritas na Figura 19.

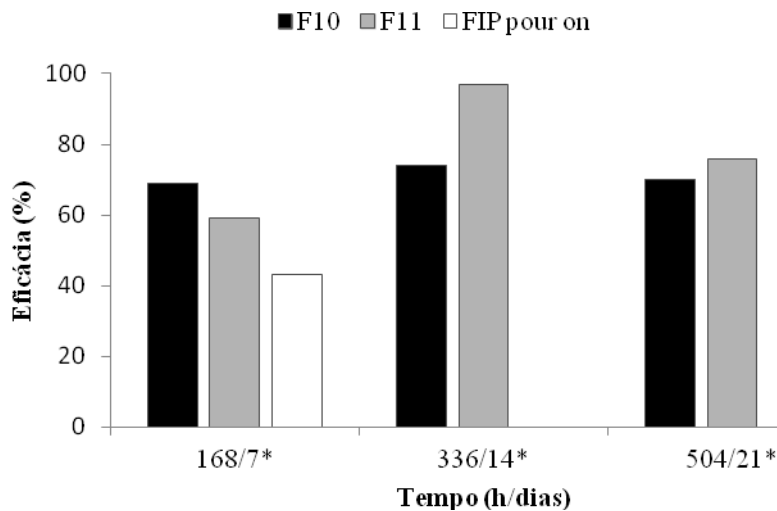


Figura 19: Eficácia na inibição do ciclo biológico de mosca-dos-chifres das formulações contendo fipronil. (* = diferença estatística de eficácia)

As observações obtidas para o dia 0, data anterior ao tratamento, demonstraram que os animais envolvidos no estudo estavam isentos de ação de ectoparasiticidas que pudessem interferir no desenvolvimento da fase de larva a adulto de *H. irritans*. É possível verificar uma eclosão média de ovos de 37,7 para o GC, 47,0 para o GFPO, 45,5 para o GF10 e 36,7 para o GF11. Para a recuperação de pupas foi possível observar valores médios de 15,7 para o GC, 20,0 para o GFPO, 16,8 para o GF10 e 16,7 para o GF11. Quanto a moscas adultas a recuperação média foi de 13,0 para o GC, 16,3 para o GFPO, 13,3 para o GF10 e 13,7 para o GF11. A comparação estatística dos entre os valores médios de recuperação de moscas adultas não demonstrou ocorrer diferença significativa no nível de 95% de significancia. Desta forma pode-se afirmar que os grupos estavam devidamente ranqueados e livres de possíveis interferências intrínsecas que pudessem promover um viés dos resultados (Tabela 17).

No dia +7 após o tratamento as emergências médias de adultos dos pupários para cada grupo experimental foram de 11,5 para o GC; 6,5 para o GFPO; 3,5 para o GF10; e 4,7 para o GF11. As eficácias na inibição do desenvolvimento larva a adulto observadas foram de: 43,5% para o GFPO; 69,6% para o GF10; e 58,9% para o GF11. A análise estatística das comparações dos valores de médias de emergência de adultos demonstrou que para o dia +7 após o tratamento constatou-se diferença significativa entre a média do GC e do GF10 e GF11. Não foi constado diferença significativa entre o GC e o GFPO. Não foi observado diferença significativa entre as medias GF10 e GF11 (Tabela 17).

No dia +14 após o tratamento as emergências médias de adultos dos pupários para cada grupo experimental foram de: 26,2 para o GC; 29,0 para o GFPO; 6,8 para o GF10; e 0,7 para o GF11. As eficácias na inibição do desenvolvimento larva a adulto observadas foram de: 0% para o GFPO; 73,9% para o GF10; e 97,5% para o GF11. A análise estatística das comparações dos valores de médias de emergência de adultos demonstrou que para o dia +14 após o tratamento constatou-se diferença significativa entre a média do GC e GF11. Não foi constatado diferença significativa entre as medias GC e o GFPO. Não foi observado diferença significativa entre as medias GF10 e GF11 (Tabela 17).

No dia +21 após o tratamento as emergências médias de adultos dos pupários para cada grupo experimental foram de 20,7 para o GC; 22,8 para o GFPO; 6,2 para o GF10; e 4,8 para o GF11. As eficácias na inibição do desenvolvimento larva a adulto observadas foram de: 0% para o GFPO; 70,2% para o GF10; e 76,6% para o GF11. A análise estatística das comparações dos valores de médias de emergência de adultos demonstrou que para o dia +21 após o tratamento constatou-se diferença significativa entre a média do GC e GF11. Não foi constatado diferença significativa entre o GC e o GFPO. Não foi observado diferença significativa entre o GF10 e GF11 (Tabela 17).

As observações numéricas permitem afirmar que o GF11 foi o que apresentou os melhores resultados para a inibição do desenvolvimento larva a adulto nas fezes de bovinos quando comparado aos outros grupos experimentais que foram medicados. Entretanto estatisticamente não foi possível comprovar no nível de 95% esta diferença numérica para GF10 (Tabela 17).

A metabolização do fipronil após aplicação em mamíferos ocorre no fígado levando a formação do metabólito fipronil sulfona que posteriormente vem a ser eliminado pela urina. Aproximadamente 45% a 75% de fipronil intacto é excretado através das fezes (GUNASEKARA; TROUNG, 2007).

As diferenças observadas entre os níveis de eficácia para os GF10 e GF11 com relação ao GFPO estão correlacionadas as características de biodisponibilidade observadas para cada grupo descrito no Capítulo III deste estudo.

Para o GF10 pode-se perceber a maior eficácia junto ao Cmax de fipronil, produto excretado preferencialmente via fezes, local onde se observa a eficácia do produto. No último tempo de coleta de fezes, onde a concentração de fipronil sulfona (excretado preferencialmente via urina) é superior a de fipronil a eficácia na eclosão de adultos começa a diminuir (Figura 20).

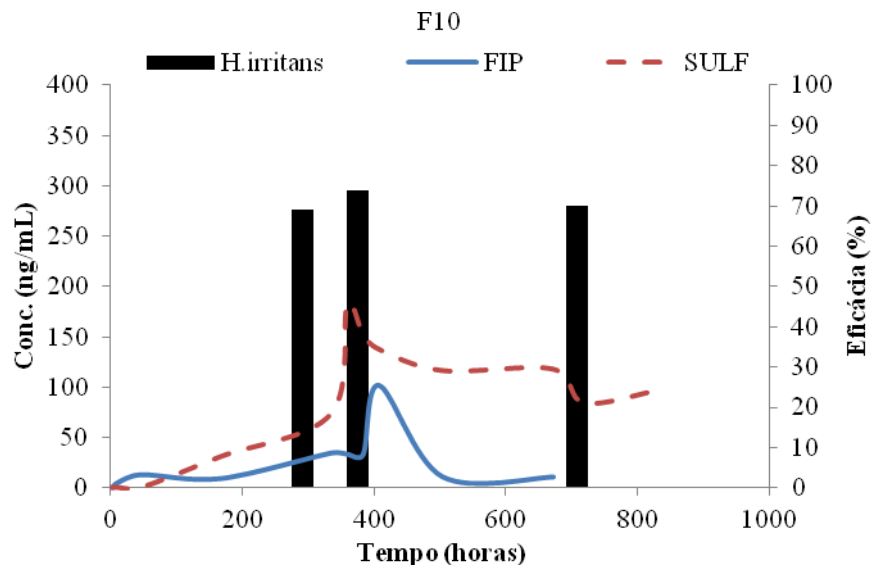


Figura 20: Correlação farmacocinética - farmacodinâmica da formulação F10

O mesmo comportamento pode ser observado no GF11 (Figura 21).

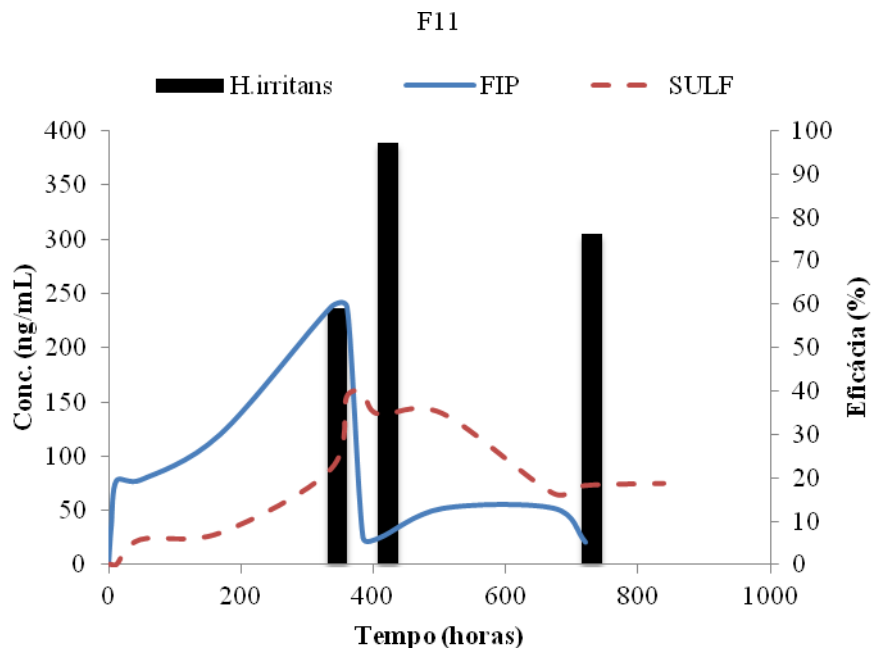


Figura 21: Correlação farmacocinética - farmacodinâmica da formulação F11

Para o GFPO, onde as concentrações de fipronil são muito inferiores a eficácia só foi observada no primeiro tempo de coleta (+7), após este tempo a concentração de fipronil na corrente sanguínea está muito baixo, porém ainda se observa concentrações do fipronil sulfona. A falta de eficácia encontrada nos tempos seguintes (+14 e +21) pode ser atribuída a via de excreção do produto de metabolismo ser urinária e o efeito de inibição do ciclo biológico do parasita ser nas fezes (Figura 22).

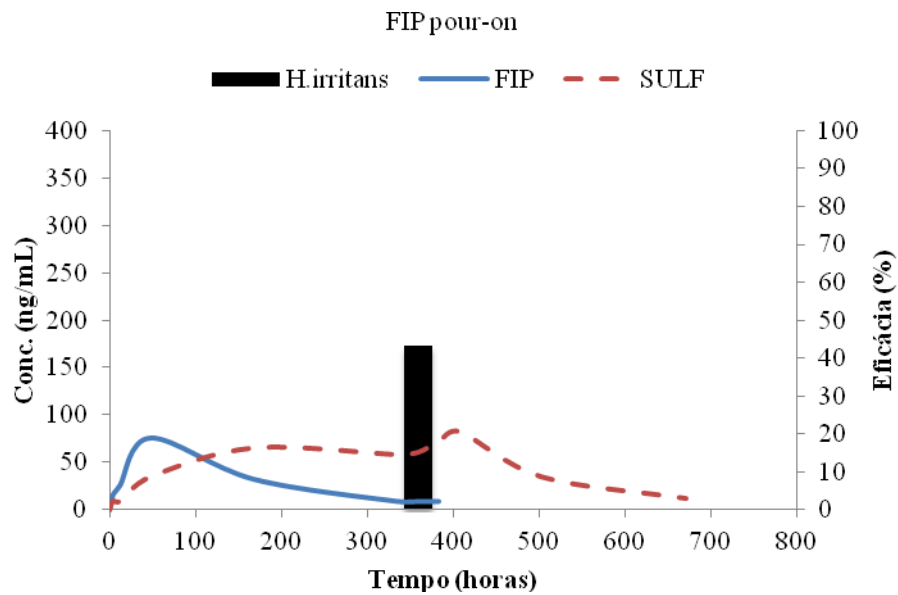


Figura 22: Correlação farmacocinética - farmacodinâmica da formulação tópica comercial

Guglielmone et al.(2000), demonstraram a ação tópica do fipronil sobre as formas adultas de *H. irritans* observando níveis superiores a 95% de eficácia quando empregado na dose de 1mg/Kg pc. Desta forma a ação mosquicida do fipronil já havia sido reportada. Entretanto não se encontrou dados na literatura pesquisada que demonstrassem a eficácia do fipronil empregado por via subcutânea e pour-on sobre o desenvolvimento de larva a adulto para *H. irritans*. Tal achado já havia sido relatado nos trabalhos de Guglielmone et al. (2000) para doramectina injetável e Corwin et al (1993) para ivermectina pou-on, demonstrando a eficácias destas lactonas na inibição do desenvolvimento larva a adulto de *H. irritans*, em ensaios com metodologias similares.

A possibilidade da utilização de fipronil por via injetável para o controle das formas imaturas presentes nas fezes dos animais, onde se processa boa parte do ciclo evolutivo, e consequentemente é a porta de reinfestação dos animais, abre novas perspectivas para o controle da *H. irritans* em bovinos.

Tabela 17: Resultados dos números de larvas, pupas e adultos de *Haematobia irritans* recuperados das fezes de bovinos não medicados e medicados com duas formulações de fipronil empregado por via subcutânea (F10 e F11) com uma formulação pour-on.

Formulação	Animal	Peso (kg)	Vol, adm, (mL)	Número total de formas evolutivas recuperadas das repetições para cada tempo de desafio											
				Dia 0			+7			+14			+21		
				Ovo s	Pupas	Adultos	Ovo s	Pupas	Adultos	Ovo	Pupas	Adultos	Ovo	Pupas	Adultos
Sem tratamento	456	490	-	41	13	12	24	12	11	59	42	24	56	38	30
	256	385	-	29	20	16	23	13	11	52	30	20	53	34	17
	655	380	-	36	14	10	26	18	17	54	43	34	53	35	24
	742	295	-	46	26	24	31	0	0	59	7	6	57	0	0
	944	290	-	43	5	5	22	15	15	54	41	36	48	25	19
	105	270	-	31	16	11	20	15	15	59	50	37	48	35	34
				Média*	37,7	15,7	13,0^a	24,3	12,2	11,5^a	56,2	35,5	26,2^a	52,5	27,8
			Desvio	6,2	6,5	5,9	3,5	5,8	5,6	2,9	14,0	11,0	3,5	13,1	11,0
Fipronil pour-on*	243	485	48,4	49	16	14	33	4	4	49	31	28	49	27	18
	322	390	39	49	0	0	40	0	0	49	2	0	25	1	0
	416	380	38	42	27	19	48	9	8	53	30	27	46	26	20
	548	300	30	47	28	20	40	20	8	52	35	30	56	42	35
	988	285	28,4	51	13	13	55	15	14	58	55	51	54	39	36
	107	275	27,4	44	36	32	29	5	5	55	48	38	51	32	28
				Média*	47,0	20,0	16,3^a	40,8	8,8	6,5^a	52,7	33,5	29,0^a	46,8	27,8
			Desvio	3,1	11,8	9,6	8,7	6,8	4,3	3,2	16,8	15,4	10,3	13,3	12,3
			Eficácia%						43,5			0,00			0,00
F10	167	490	9,8	44	15	12	41	0	0	54	0	0	55	0	0
	287	385	7,6	46	15	12	18	1	1	44	2	1	52	4	3
	590	385	7,6	44	20	16	38	6	5	54	1	1	49	0	0
	654	305	6	47	21	18	30	6	5	51	37	33	52	27	25
	876	290	5,8	44	19	13	48	7	7	49	7	4	54	1	1
	109	280	5,6	48	11	9	29	5	3	54	3	2	53	25	8
				Média*	45,5	16,8	13,3^a	34,0	4,2	3,5^b	51,0	8,3	6,8^{ac}	52,5	9,5
			Desvio	1,6	3,5	2,9	9,6	2,7	2,4	3,7	13,0	11,8	1,9	11,8	8,9
			Eficácia%						69,6			73,9			70,2
F11	164	485		37	14	11	50	2	2	24	5	4	56	0	0
	235	480		39	22	19	33	2	2	48	1	0	58	3	3
	377	385		34	17	16	33	7	7	59	32	0	56	24	18
	405	310		40	18	14	42	1	1	54	1	0	53	6	2
	631	380		45	14	11	36	6	6	0	0	0	50	9	6
	104	275		25	15	11	46	12	10	43	14	0	59	0	0
				Média*	36,7	16,7	13,7^a	40,0	5,0	4,7^b	38,0	8,8	0,7	55,3	7,0
			Desvio	6,2	2,8	3,0	6,5	3,8	3,3	20,3	11,4	1,5^{bc}	3,0	8,3	6,2
			Eficácia%						58,9			97,5			76,6

CV= coeficiente de variação; *= média aritmética; a,b,c = letras diferentes indicam diferença estatística

7.CONCLUSÕES

O fipronil empregado por via subcutânea na dose de 2mg/kg pc demonstrou ação inseticida capaz de inibir o desenvolvimento de larva a adulto de *H. irritans*.

Não foi possível determinar qual formulação F10 ou F11 obteve os melhores níveis de eficácia.

O fipronil empregado por via pou-on na dose de 1mg/kg pc demonstrou baixa ação inseticida capaz de inibir o desenvolvimento de larva a adulto de *H. irritans*

CAPÍTULO V

EFICÁCIAS DE FORMULAÇÕES INJETÁVEIS DE FIPRONIL NO CONTROLE DE LARVAS DE *Dermatobia hominis* EM BOVINOS

1.RESUMO

Míases são definidas como infestações dos tecidos humanos ou de animais por larvas de dípteros. Estas infestações geram prejuízos para pecuária brasileira. As larvas desenvolvem-se nos tecidos superficiais dos hospedeiros, provocando problemas diversos que vão desde redução da produtividade, lesões no couro e mutilações a gastos com medicamentos utilizados no seu controle e até perda de animais. Os métodos de controle são baseados em utilização de pesticidas em muitos casos com longos períodos residuais. O presente estudo tem por objetivo testar a eficácia no fipronil a 10% injetável no controle de *Dermatobia hominis* e comparar os resultados encontrados com a formulação tópica comercial. Para isto foi realizado um teste de eficácia a campos segundo as diretrizes da Portaria nº 48 de 12/05/1997 do MAPA. Foram utilizados 40 bovinos mestiços divididos em 4 grupos. Cada grupo foi tratado com uma formulação e um grupo permaneceu sem tratamento. Foram utilizadas as formulações F10, F11 e formulação tópica comercial. Os animais foram avaliados para contagem de nódulos nos dias 7, 14, 21 e 28 após o tratamento. Foram encontradas eficácias de 54, 65 e 72% para F10, F11 e formulação comercial, respectivamente, após 7 dias de tratamento. Após 21 dias de tratamento os produtos demonstraram eficácia de 97, 99 e 98% para F10, F11 e formulação comercial respectivamente. Estes valores indicam que o fipronil injetável a 10% pode ser utilizado para o controle de *Dermatobia hominis* em bovinos.

Palavra-chave: Dermatobios. Berne. Fipronil

2.ABSTRACT

Myiasis are defined as infestations of human tissues or animals by larvae of diptera. These events create losses for Brazilian cattle. This larva develops in the superficial tissues of the host, causing several problems as reduced productivity, leather injuries, mutilations, spending with drugs used to control and even loss of animals. Control methods are based on the use of pesticides, in many cases with long residual periods. The aim of this study was evaluated the efficacy of injectable fipronil 10% to control *Dermatobia hominis* and compared results with the commercial topical formulation. For this proposed was carried out a field trial effectiveness according to the guidelines Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (Ordinance no 48 of 12/05/1997). Forty cattle divided into 4 groups were used. Each group was treated with a formulation and a group remained untreated. Formulations F10, F11 and commercial topical formulation were used. The animals were evaluated for nodule count on days 7, 14, 21 and 28 after treatment. After 7 days efficiencies found were 54, 65 and 72% for F10, F11 and the commercial formulation respectively. After 21 days of treatment products showed efficacy of 97, 99 and 98% for F10, F11 and a commercial formulation respectively. These results indicate that injectable Fipronil 10% can be used to control *Dermatobia hominis* in cattle.

Keyword: Dermatobiosis. Berne. Fipronil

3.INTRODUÇÃO

Míases são definidas como infestações dos tecidos humanos ou de animais por larvas de dípteros. Estas infestações geram prejuízos para pecuária brasileira. As larvas desenvolvem-se nos tecidos superficiais dos hospedeiros, provocando problemas diversos que vão desde redução da produtividade, lesões no couro e mutilações a gastos com medicamentos utilizados no seu controle e até perda de animais. Os métodos de controle são baseados em utilização de pesticidas em muitos casos com longos períodos residuais.

O Brasil possui o principal rebanho bovino comercial do mundo, com cerca de 212,3 milhões de animais. A busca de eficiência, a redução de custos de produção e o aumento de produtividade e de lucratividade constituem hoje a proposta de gestão da maioria dos produtores brasileiros.

O presente estudo tem por objetivo testes a eficácia no fipronil a 10% injetável no controle de *D.hominis*.

4. REVISÃO DE LITERATURA

Miíases são definidas como infestações dos tecidos humanos ou de animais por larvas de dípteros. Apesar de serem enfermidades consideradas rotineiramente como de pequena importância, os prejuízos gerados por elas são consideráveis. As larvas desenvolvem-se nos tecidos superficiais dos hospedeiros, provocando problemas diversos que vão desde redução da produtividade, lesões no couro e mutilações a gastos com medicamentos utilizados no seu controle e até perda de animais. Os gastos com medicamentos utilizados em tratamentos curativos e preventivos também são apontados como uma das principais geradoras de prejuízos (OLIVEIRA; BRITO, 2005).

Dados da pesquisa Produção de Pecuária Municipal de 2014, indicam o Brasil possuindo o principal rebanho bovino comercial do mundo, com cerca de 212,3 milhões de animais (IBGE, 2015). A busca de eficiência, a redução de custos de produção e o aumento de produtividade e de lucratividade norteiam a gestão dos produtores brasileiros (OLIVEIRA; BRITO, 2005).

A mosca *Dermatobia hominis* é encontrada do México à Argentina e em todo território brasileiro, concentrando-se em regiões quentes e úmidas com vegetação abundante e com altitudes inferiores a 1000 m. Os insetos adultos de *D. hominis* são moscas relativamente grandes, com cerca de 15 mm de comprimento, e vivem de 3 a 19 dias. Os insetos adultos copulam nas primeiras 24 horas após a emergência do pupário. As fêmeas realizam a postura no abdome de moscas de outras espécies, que são capturadas no ar. As espécies mais utilizadas como vetores são a mosca-doméstica (*Musca domestica*), a mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*), a mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*). O período médio de incubação dos ovos é de seis dias, onde são depositados cerca de 30 ovos no abdome da mosca vetora. O total de ovos produzidos por uma fêmea durante o seu período fértil pode chegar a 700 unidades. A infestação dos bovinos ocorre quando os insetos vetores pousam no corpo desses animais. As larvas recém-eclodidas penetram ativamente na pele íntegra ou nos folículos pilosos do hospedeiro e com o uso de enzimas proteolíticas invadem os tecidos do animal, se estabelecem e se alimentam. Os parasitas migram até o tecido subcutâneo, onde iniciam o desenvolvimento larval, que dura de 29 a 45 dias. A presença da larva no tecido subcutâneo leva à formação de uma lesão nodular furunculosa, que apresenta um orifício (fístula), utilizado para respiração do parasita. A larva de terceiro estágio cai no solo e inicia a fase de pupação. A fase de pupa dura cerca de 30 dias em condições ótimas de temperatura e umidade, mas pode se estender por até 120 dias em condições pouco favoráveis, quando a pupa entra em estado de dormência. Todo o ciclo de desenvolvimento de *D. hominis* pode se completar em 100 a 140 dias (OLIVEIRA; BRITO, 2005).

O tamanho dos nódulos ou furúnculos aumentam à medida que as larvas crescem e as secreções purusanguinolentas excretadas através das aberturas dos furúnculos atraem um maior número de moscas, aumentando assim a possibilidade de reinfestação. Em certas ocasiões quando as infestações da *D. hominis* são altas, as feridas deixadas pelas larvas demoram a cicatrizar e facilitam a infestação com larvas da bicheira, *Cochliomyia hominivorax* (MOYABORJA, 2004).

Devido à ovoposição da mosca nas feridas a melhor recomendação para o controle parasitário é evitar feridas desnecessárias e dar preferência a procedimentos como castrações, marcações, descornas e nascimento de bezerros em épocas de parasitismo baixo pois uma vez parasitados, o tratamento químico é a única alternativa (BORJA, 2003).

Os inseticidas organofosforados são utilizados no controle da bicheira e entre os mais usados tem-se o coumaphos, ronnel, chlorpyrifos, chlorfenvinfos e trichlorfon. Estes inseticidas têm uma eficácia residual relativamente curta e os animais devem ser inspecionados e tratados com frequência para evitar reinfestações. Nos últimos anos foram descobertas as avermectinas com excelentes propriedades endectocidas. A doramectina tem demonstrado alta eficácia no controle da bicheira. Uma dose única de 200 µg de doramectina por kg de peso vivo dos bovinos, causa 100% de mortalidade das larvas durante duas semanas (BORJA, 2003) esta molécula também pode ser utilizada no controle da *C. hominivorax* (OLIVEIRA; BRITO, 2005).

Alguns princípios ativos utilizados para controlar os carrapatos nos bovinos podem atuar sobre moscas vetoras dos ovos de *D. hominis*, reduzindo a taxa de infestação dos animais tratados. As ivermectinas e as doramectinas também atuam de maneira eficiente sobre os bernes e principalmente as doramectinas podem ser utilizadas para controle tanto desse parasita como das bicheiras (OLIVEIRA; BRITO, 2005).

A retirada das larvas individualmente, por meio da obstrução do orifício fistular, tem sido utilizada em casos de infestações baixas em rebanhos pequenos sendo geralmente de baixa eficiência e não evitando os problemas secundários. Em grandes rebanhos esta estratégia é impraticável (OLIVEIRA; BRITO, 2005).

O fipronil é um inseticida do grupo químico fenilpirazol utilizado no controle de várias pragas agrícolas, parasitas de pequenos animais e também contra as bicheiras dos bovinos. Estudos recentes mostraram que o tratamento tópico à base de fipronil pour-on a 1% na dose de 10 mg/kg de peso, aplicados simultaneamente à castração, apresentou eficiência de 95% na prevenção das miíases por larvas de *C. hominivorax* por cerca de 17 dias após a castração. Nas miíases por *C. hominivorax*, o número de larvas presentes nas lesões pode chegar a várias dezenas, enquanto no caso das infestações por larvas de *D. hominis* esse número se restringe a uma larva por lesão (OLIVEIRA; BRITO, 2005).

5.MATERIAL E MÉTODOS

5.1.Localização do Estudo

O estudo foi realizado na área de campo da unidade da PESAGRO-SEROPÉDICA, localizada no município de Seropédica, no Estado do Rio de Janeiro. Foram empregados 40 bovinos mestiços de Gir e Holandes, fêmeas, não gestantes, não lactantes naturalmente infestados por *D.hominis*.

Todos os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob número 014/2014.

5.2.Delineamento Experimental

Para formação dos grupos experimentais, os animais foram listados em ordem decrescente do número de larvas. Os quatro animais com contagem de larvas mais elevada foram destinados a repetição 1, os quatro seguintes a repetição 2, até que tivesse sido formado 10 repetições. Dentro de cada repetição, cada animal foi destinado por sorteio (ao acaso) a cada um dos grupos de tratamento. Os grupos formados foram:

- Grupo Controle (GC), sem tratamento;
- Grupo F10 (GF10), os animais foram medicados com a formulação F10 contendo 10% de FIP no volume de 1mL/50Kg de peso corporal por via injetável subcutânea, correspondendo a dose de 2mg/Kg pc;
- Grupo F11 (GF11), os animais foram medicados com a formulação F11 contendo 10% de FIP no volume de 1mL/50Kg de peso corporal, por via injetável subcutânea, correspondendo a dose de 2mg/Kg pc;
- Grupo Fipronil pou-on (GFPO), os animais foram medicados com uma formulação comercial pour-on contendo 1% de FIP pour-on no volume de 1mL/10Kg de pc, por via tópica, correspondendo a dose de 1mg/Kg pc.

No dia imediatamente anterior ao tratamento, os animais foram pesados e o volume a ser administrado foi calculado. Em caso de volume fracionado, este foi arredondado para baixo.

O ensaio foi realizado tendo como base as diretrizes da Portaria nº 48 de 12/05/1997 do MAPA.

Nos dias 7, 14, 21 e 28, após o tratamento foram efetuadas contagens de larvas vivas em todo o animal, sempre pelo mesmo avaliador, pelo período da manhã. Durante todo o estudo os animais foram acompanhados clinicamente. Para o cálculo da eficácia do tratamento foram comparados os números totais de larvas vivas contadas dos animais medicados, com os animais controle. O cálculo da eficácia foi realizado conforme a equação:

$$\text{Eficácia} = (\text{NLC}-\text{NLT})/\text{NLC} \times 100$$

Onde: NLC = número médio de larvas vivas do grupo controle (testemunha)

NLT = número médio de larvas vivas do grupo tratado

A interpretação da eficácia foi realizada de acordo com os percentuais de eficácia atingidos, conforme preconizado na legislação vigente. O número de nódulos de *D. hominis*

de cada animal em cada grupo foi submetido à análise pelo teste Mann Whitney para amostras independentes pelo programa estatístico computacional BioStat 5.0. O nível de confiança considerado foi de 95% ($p \leq 0,05$).

6.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das médias das contagens individuais dos números de bernes antes e após o tratamento e a eficácia dos produtos testados estão relatados na Tabela 18.

As médias de larvas vivas antes do tratamento (dia -2) encontradas foram de: 28,5 para o grupo controle; 28,9 para o GF10, 29 para o GF11 e 28,5 para GFPO. Não foi observada diferença significativa entre os valores de média para os três grupos. Estes resultados permitem afirmar que os animais foram ranqueados de forma adequada (Tabela 18).

Os níveis de eficácia bernicida encontrados para o GFPO foram de: 72,3% para o dia +7; 91,8% para o dia +14; 98,0% para o dia +21; e 96,5% para o dia +28 (Tabela 18).

Os níveis de eficácia bernicida encontrados para o GF10 foram de: 54,1% para o dia +7, 90,6% para o dia +14, 97,1% para o dia +21 e 98,2% para o dia +28 (Tabela 18).

Os níveis de eficácia bernicida encontrados para o GF11 foram de: 65% para o dia +7, 94,6% para o dia +14, 99,0% para o dia +21 e 99,2% para o dia +28 (Tabela 18).

A análise estatística permitiu afirmar que ocorreram diferenças significativas entre o grupo controle e todos o grupo medicados. Não foi detectado diferença significativa entre os valores médio de larvas vivas dos grupos medicados.

Tabela 18: Resultados de contagem média e eficácia contra *Dermatobia hominis* para F10, F11 e FIP *pour-on*

Formulação		Dias				
		-2	7	14	21	28
F10	Média±cv	28,9±14,7	14,4±7,6	4±1,5	1,4±1,1	0,9±0,9
	Eficácia (%)		54,1	90,6	97,1	98,2
	p-valor		0,4057	0,0025	0,0002	0,0002
F11	Média±cv	29±14,3	10,9±5,7	2,3±1,3	0,5±0,5	0,4±0,7
	Eficácia (%)		65	94,6	99,0	99,2
	p-valor		0,1509	0,0017	0,0002	0,0002
TopLine	Média±cv	28,5±17,3	8,7±2,8	3,5±2,1	1,0±0,7	1,7±2,5
	Eficácia (%)		72,3	91,8	98,0	96,5
	p-valor		0,0588	0,0025	0,0002	0,0002
Controle	Média±cv	28,5±18,7	31,4±29,5	42,5±38,1	48,9±36,7	48,8±38,1

CV= coeficiente de variação

A análise dos resultados de eficácia bernicida demonstra que o GFPO apresentou níveis de eficácia mais elevados no dia +7 contrastando com os GF10 e GF1 (Figura 23). Nos demais tempos os valores de eficácia para os três grupos são estatisticamente iguais.

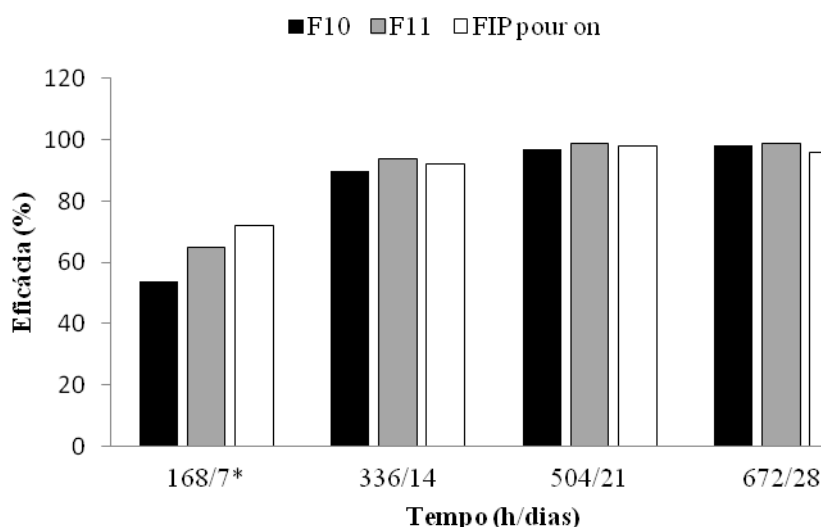


Figura 23: Eficácia no controle de larvas de *Dermatobia hominis* das formulações de fipronil (* existe diferença estatística entre as medias dos três grupos)

Tal observação deve estar associada com os achados obtidos no Capítulo III do presente estudo onde observou-se para o GFPO um Cmax maior de FIP nos tempos iniciais após o tratamento. Ao que parece o emprego do FIP por via subcutânea (F10 e F11) determina uma liberação mais tardia deste quando comparado com o FIP pour-on.

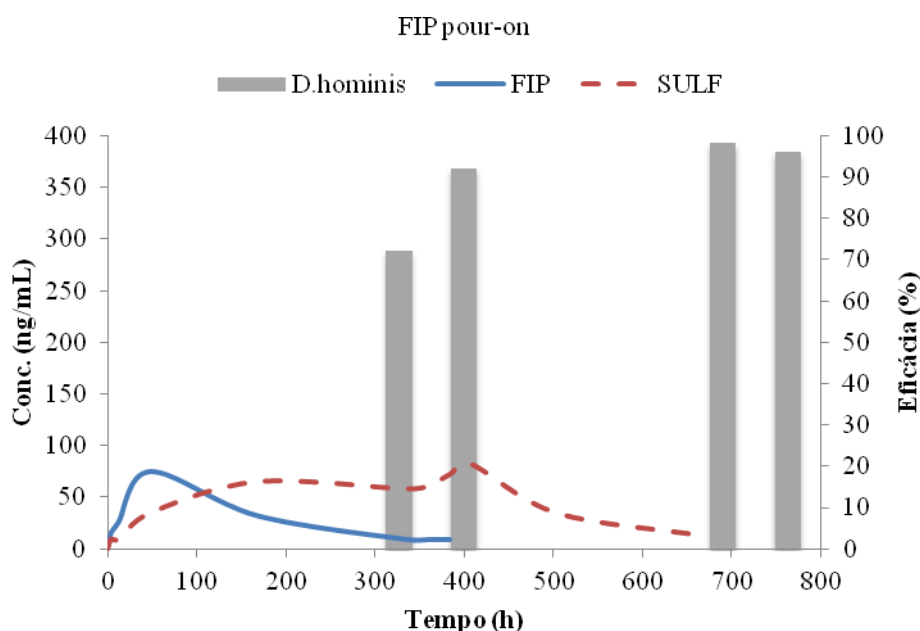


Figura 24: Correlação farmacocinética – farmacodinâmica da formulação tópica comercial

Quando comparamos o perfil plasmático de fipronil e fipronil sulfona gerado pela formulação comercial com os resultados de eficácia é possível perceber que existe eficácia no controle de larvas de *D. hominis* mesmo com baixas concentrações de fipronil. Neste caso o efeito farmacológico deve estar associado a presença do metabolito sulfona na corrente sanguínea (Figura 24) para os tempos 14, 21 e 28 dias.

A partir do dia +14 os níveis de eficácia observados para os GF10 vão se elevando gradativamente até atingirem o valor máximo com 28 dias. Ao observarmos os dados de

farmacocinéticos presentes no Capítulo III poderemos perceber uma elevação abrupta nos valores de FIP e SULF após 14 dias (Figura 25). Entretanto para o GF11 os níveis se elevam no início e vão declinando gradativamente (Figura 26).

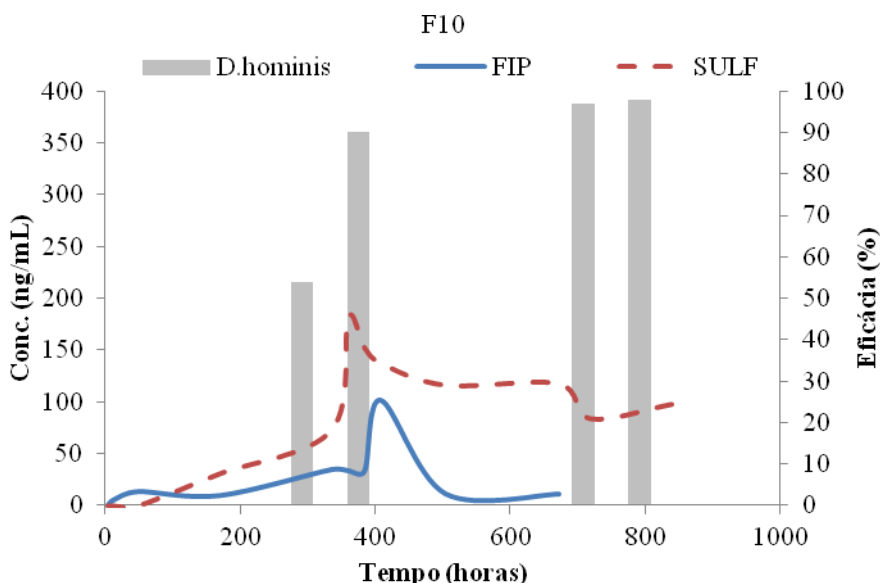


Figura 25:Correlação farmacocinética – farmacodinâmica da formulação F10

A moderada eficácia bernicida observada no primeiro tempo após o tratamento pode estar relacionada a característica não só da formulação, mas também do FIP, lipofílico realizando depósito no tecido adiposo.

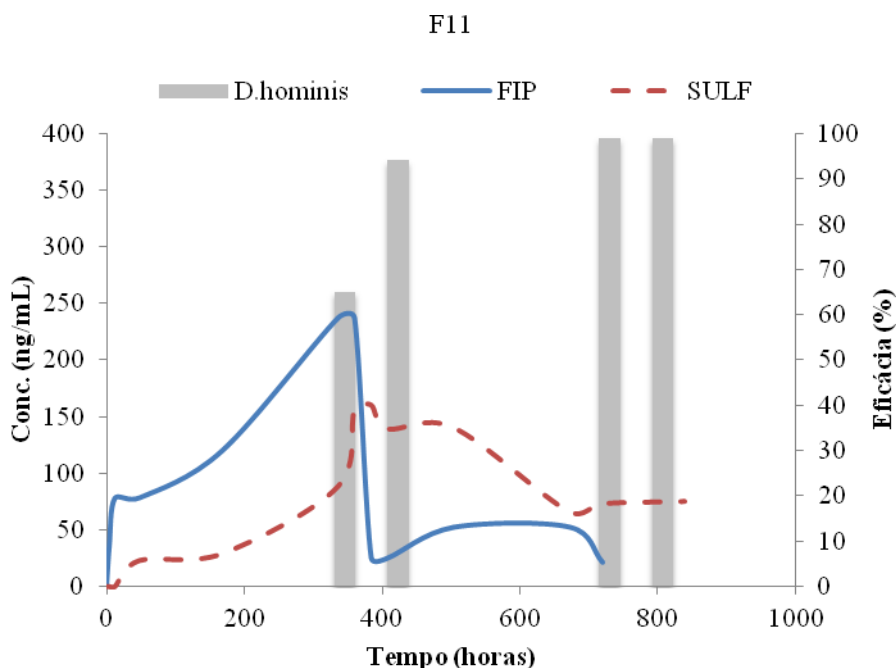


Figura 26:Correlação farmacocinética – farmacodinâmica da formulação F11

Não foi encontrado na literatura relatos de eficácia no controle de larvas de *D.hominis* com o uso de fipronil. Porém seu uso já foi indicado na profilaxia de *C. hominivorax* (LIMA et al., 2004). Considerando os resultados encontrados as formulações F10 e F11 são eficazes no controle da larva de *D. hominis*.

7. CONCLUSÃO

O fipronil empregado por via subcutânea na dose de 2mg/Kg pc apresenta eficácia bernicida que se pronuncia após 14 dias do tratamento.

CONCLUSÕES GERAIS

É possível preparar uma formulação injetável de fipronil com estabilidade de 1 ano.

É possível desenvolver um método de análise de FIP e SULF via EFS e CLAE-UV.

As formulações desenvolvidas foram eficazes para o controle de *D.hominis* e *H.irritans*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O momento em que vivemos, tem demonstrado que a cada dia que se passa, o número de produtos novos frutos de novas moléculas com atividades parasiticidas para serem empregados no combate de parasitoses de bovinos veem se rarefazendo.

O elevado custo de desenvolvimento, a falta de políticas públicas em diversos países que protejam a propriedade industrial e intelectual associado as questões do aumento da incidência de populações resistentes de parasitos aos principais grupamentos empregados no seu controle; somados a necessidade de aumento exponencial da produção agropecuária em todo o mundo para atender a demanda da população; tudo isto dentro do contexto de uma busca cada vez maior por uma pecuária sustentável, onde se busque o aumento da produtividade, mas sem o aumento das áreas de pastagem, mas sim pela otimização destas, um melhor controle sanitário, uma melhora do potencial genético do rebanho, além de questões de manejo e respeito ao meio ambiente; nos levam dentro da nossa área de atuação, a busca por novos produtos com ação parasiticida, a nos enveredar por uma otimização das moléculas com este potencial e que já estão disponíveis no mercado para tal fim.

Dentro deste contexto o grupamento dos fenilpirazoles é um dos últimos a emergir no cenário do controle de ectoparasitos de bovinos. Portanto ainda há muito o que se fazer em termos de explorarmos suas características farmacodinâmicas e farmacocinéticas com manipulações farmacotécnicas no sentido de buscarmos novos caminhos para seu emprego efetivo no controle do carrapato, da moscas-dos-chifes, do berne, da bicheira e dos piolhos em bovinos.

Um dos fatores que é impeditivo do emprego mais acentuado do fipronil no controle de ectoparasitoses de bovinos no Brasil, conforme já foi dito anteriormente, estaria atrelado a disponibilidade somente da forma farmacêutica pour-on em nosso mercado, fato que determinaria um custo elevado em decorrência do impacto dos veículos e frascos de envase, além de considerações negativas quanto ao risco do aplicador, do impacto ambiental e talvez o mais significativo que seria a preferência do mercado por formulações injetáveis.

Com os dados obtidos neste trabalho associados ao já obtidos anteriormente pela mesma equipe intitulado “Veterinary Parasitology Injectable fipronil for cattle: Plasma disposition and efficacy against *Rhipicephalus microplus*”, de autoria de Cid, Yara P.; Ferreira, Thais P.; Magalhães, Viviane S.; Correia, Thais R. e Scott, Fábio B., publicado em 2016 na revista *Veterinary Parasitology*, vol.220 pag. 4 - 8, fica demonstrado claramente que o fipronil é possuidor de ação ectoparasiticida quando empregado por via sistêmica.

Ficando comprovado o potencial do fipronil por via subcutânea para o controle de ectoparasitos de bovinos.

Fatos relevantes como a utilização de diferentes veículos interferindo na farmacocinética do FIP em bovinos e por consequência modificar nos níveis de eficácia ectoparasiticida, nos levam a acreditar que restam ainda caminhos a serem percorridos para alcançar os pontos abaixo.

-a busca por uma formulação que seja capaz de obter equilíbrio quanto a bio-disponibilidade de fipronil e sulfona ao longo de todo o período de tratamento;

-o refinamento do método analítico de quantificação de fipronil e sulfona no plasma com limites de quantificação menores;

-a busca por formulações que sejam capazes de determinar um menor período residual na carne e no leite;

-todas questões relacionadas a segurança clínica para as diferentes categorias de bovinos; e

-a ampliação das questões relacionadas a eficácia ectoparasiticida.

Esses são alguns dos pontos que julgamos ser importantes para ser explorados no futuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAJOUND, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil Metabolism and Dissipation in a Simplified Aquatic Ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1347–1352, 26 fev. 2003.
- AHMED, I. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 6, p. 871–882, 4 out. 2002.
- ALVIM, A. M.; MORAES, S. L. Os investimentos estrangeiros diretos no agronegócio brasileiro. **Indicadores Econômicos**, v. 40, n. 3, p. 105–120, 2013.
- ANDRADE, S. F.; SANTAREM, V. A. Endoparasitocidas e ectoparasitocidas. In: **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 437–468.
- ANZIANI, O. S.; FLORES, S. G.; GUGLIELMONE, A. A. Activity of Injectable Doramectin Against Haematobia Irritans in Cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 115–118, 2000.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêutica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BARBOSA, Catarina Inês Oliveira Gama Nunes. **Novas Formas Farmacêuticas Para Uso Veterinário**. 2010. 62 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2010.
- BARROS, A. T. M.; SHUMAKER, T. T. S.; KOLLER, W. W.; KLAFKE, G. M.; ALBUQUERQUE, T. A.; GONZALEZ, R.. Mechanisms of pyrethroid resistance in Haematobia irritans (Muscidae) from Mato Grosso do Sul state , Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 136–142, 2013.
- BIANCHIN, I.; ALVES, R. G. O. Mosca-dos-chifres , Haematobia irritans : comportamento e danos em vacas e bezerros Nelore antes da desmama 1. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 109–113, 2002.
- BIANCHIN, I.; KOLLER, W. W.; DETMANN, E. Sazonalidade de Haematobia irritans no Brasil Central. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 79–86, jun. 2006.
- 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, n. 2008, p. 91–99, 2008.
- BLAGBURN, B. L.; DRYDEN, M. W. Biology, Treatment, and Control of Flea and Tick Infestations. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1173–1200, 2009.
- BOBE, A.; COOPER, J. J. M.; COSTE, C. M.; MULLER, M. A. Behavior of fipronil in soil under Sahelian plain field conditions. **Pesticide Science**, v. 52, p. 275–281, 1998.
- BORJA, G. E. M. Erradicação ou manejo integrado das miíases neotropicais das Américas? **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 131–138, 2003.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento**. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

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.

BRITO, L. G.; BORJ, G. E. M.; OLIVEIRA, M. C. S.; NETTO, F. G. S. Mosca-dos-chifres: aspectos bio-ecológicos, importância econômica, interações parasito-hospedeiro e controle. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, v. 302, p. 1–16, 2005.

BUHRMAN, D. L.; PRICE, P. I.; RUDEWICZ, P. J. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 7, n. 11, p. 1099–1105, nov. 1996.

CAPANEMA, L. X. DE L.; VELASCO, L. O. M.; SOUZA, J. O. B.; NOGUTI, M. B. Panorama da indústria farmacêutica veterinária. **BNDES Setorial**, v. 25, p. 157–174, 2007.

CASTRO-JANER, E.; RIFAN, 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, n. 1-2, p. 120–128, maio 2009.

CID, Y. P.; FERREIRA, T.P.; MEDEIROS, D. M. V. C.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, N. C. C.; MAGALHÃES, V. S.; SCOTT, F. B. Determination of fipronil in bovine plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2063–2066, 2012.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Unicamp, 2006.

DAS, P.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, R. L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 164, n. 3, p. 200–214, dez. 2006.

DE LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína-imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 72–78, 2006.

DEFRA. **Evaluation on: fipronil use as a public hygiene insecticide**, 1999.

DELLARCO, V. L.; ROWLAND, J.; MAY, B. A retrospective analysis of toxicity studies in dogs and impact on the chronic reference dose for conventional pesticide chemicals. **Critical reviews in toxicology**, v. 40, n. 1, p. 16–23, jan. 2010.

DESILETS, C. P.; ROUNDS, M. A.; REGNIER, F. E. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography**, v. 544, n. 1-2, p. 25–39, 17 maio 1991.

DIONEX. **LCi Solutions for UltiMate™ 3000 Systems operating instructions**, 2008.

FERNANDES, M. J.; LANDIM, A.; PIMENTEL, V. P.; GOMES, R. P.; PIERONI, J. P. A evolução recente da indústria farmacêutica veterinária brasileira. **Banco Nacional do**

Desenvolvimento - Bndes, n. 27, p. 1–6, 2013.

FERREIRA, A. D. O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 4. ed. São Paulo: Pharmabook editora, 2010.

GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamerica do Brasil, 2006.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A hora veterinária**, v. 21, n. 2, p. 8 – 10, 2002.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; ANDREOTTI, A. T. M. B.; CANÇADO, R.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150 – 156, 2014.

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

GUNASEKARA, A. S.; TROUNG, T. **Environmental Fate of Fipronil** Sacramento, USA, 2007.

GUO-XIN, H.; XIAO-YU, C.; HONG-YU, Z.; XIANG-JUN, Q.; BING-BING, C.; ZHONG-QIU, L. Toxicokinetics of fipronil and fipronil sulfone in rabbits. **Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 20, n. 4, p. 356–360, 2006.

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. **acta chimica Slovenica**, v. 53, p. 517–520, 2006.

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

HURLEY, P. M. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. **Environmental health perspectives**, v. 106, n. 8, p. 437–45, ago. 1998.

IBGE. **PPM 2014: rebanho bovino alcança 212,3 milhões de cabeças**. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&idnoticia=3006&busca=1&t=ppm-2014-rebanho-bovino-alcanca-212-3-milhoes-cabecas>>. Acesso em: 8 jul. 2016.

JIMÉNEZ, 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, n. 1-2, p. 40–45, 2008.

JOUYBAN, A.; FAKHREE, M. A. A.; SHAYANFAR, A. Review of pharmaceutical applications of N-methyl-2-pyrrolidone. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 4, p. 524–535, 2010.

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, n. 26, p. 9741–6, 27 dez. 2006.

- LACROIX, M. Z.; PUEL, S.; TOUTAIN, P. L.; VIGUIÉ, C. Quantification of fipronil and its metabolite fipronil sulfone in rat plasma over a wide range of concentrations by LC/UV/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 22, p. 1934–1938, 2010.
- LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2004.
- LE FAOUDER, J.; BICHON, E.; BRUNSHWING, P.; LANDELLE, R.; ANDRE, F.; LE BIZEC, B. Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. **Talanta**, v. 73, n. 4, p. 710–717, 2007.
- LEGHAIT, J.; GAYRARD, V.; PICARD-HAGEN, N.; MARION, C.; PERDU, E.; TOUTAIN, P.; VINGUIÉ, C. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**, v. 255, n. 1, p. 38–44, 2009.
- LEGHAIT, J.; GAYRARD, V.; TOUTAIN, P.; PICARD-HAGEN, N.; VINGUIÉ, 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, n. 3, p. 51–57, 2010.
- LIMA, W. S. S.; MALACCO, M. A. F.; BORDIN, E. L.; OLIVEIRA, E. L.; Evaluation of the prophylactic effect and curative efficacy of fipronil 1 % pour on (Topline 1) on post-castration scrotal myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3, p. 373–377, 2004.
- MAPA. **Plano Mais Pecuária**. 1. ed. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2014.
- MARLEY, S. E.; HALL, R. D.; CORWIN, R. M. Ivermectin cattle pour-on: duration of a single late spring treatment against horn flies, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) in Missouri, USA. **Veterinary Parasitology**, v. 51, n. 1-2, p. 167–172, 1993.
- MARTINEZ, M.; AUGSBURGER, L.; JOHNSTON, T.; JONES, W. W. Applying the Biopharmaceutics Classification System to veterinary pharmaceutical products: Part I: Biopharmaceutics and formulation considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 6, p. 805–824, 2002.
- MDIC. **MDIC**. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/sitio>>. Acesso em: 6 abr. 2015.
- 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. Controle biológico do berne, *Dermatobia hominis* e de seus foréticos: crise e perspectiva. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, 2004.
- OLIVEIRA, J. S. DE; ZANINE, A. DE M.; SANTOS, E. M. Fisiologia, manejo e alimentação de bezerros de corte. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 10, n. 1, p. 39–48, 2007.
- OLIVEIRA, M. C. DE S.; BRITO, L. G. DE. Mífase dos Bovinos. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, v. 56, n. Novembro, p. 2–11, 2005.
- PIVNICHNY, J. V. Separation and determination of the two components of glycerol formal by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 2, n. 3-4, p. 491–500, 1984.

- PRULLAGE, J. B.; TRAN, H. V.; TIMMONS, P.; HARRIMAN, J.; CHESTER, S. T.; POWELL, K. The combined mode of action of fipronil and amitraz on the motility of *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 4, p. 302–310, 2011.
- QUEIROZ, M. E. C.; VALADÃO, C. A. A.; FARIAS, A.; CARVALHO, D.; LANÇAS, F. M. Determination of amitraz in canine plasma by solid-phase microextraction-gas chromatography with thermionic specific detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 794, n. 2, p. 337–342, 2003.
- 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.
- 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.
- RATHBONE, M. J. The pharmaceutical scientists’ role in animal production: An historical and future look at the evolving area of controlled drug delivery in animal production. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, 2000.
- RAVETON, M.; AAJOUND, A.; WILLISON, J.; CHERIFI, M.; TISSUT, M.; RAVANEL, P. Soil distribution of fipronil and its metabolites originating from a seed-coated formulation. **Chemosphere**, v. 69, n. 7, p. 1124–1129, 2007.
- ROGEBERG, M.; MALEROD, H.; ROBERG-LARSEN, H.; AASS, C.; WILSON, S. R. On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 120–129, 2014.
- ROQUES, B. B.; LACROIX, M. Z.; PUEL, S.; GAYRARD, V.; PICARD-HAGEN, N.; JOANIN, I.; PERDU, E.; MARTIN, P. G.; VINGUIÉ, C. CYP450-Dependent biotransformation of the insecticide fipronil into fipronil sulfone can mediate fipronil-induced thyroid disruption in rats. **Toxicological Sciences**, v. 127, n. 1, p. 29–41, 2012.
- ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.
- 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, n. SPEC. ISS., p. 7–14, 2008.
- SANDERSON, D. M. A Note on Glycerol Formal as a Solvent in Toxicity Testing. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 1, p. 150–156, set. 1959.
- SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; FERNANDES, C.; TITATO, G. M.; ALVES, C.; LANÇAS, F. M. Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 71–76, 2006.
- SANTOS-NETO, A. J.; BERGQUIST, J.; LANÇAS, F. M.; SJOBERG, P. J. R. Simultaneous analysis of five antidepressant drugs using direct injection of biofluids in a capillary restricted-access media-liquid chromatography-tandem mass spectrometry system. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1-2, p. 514–522, 2008.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. **Annals of Internal Medicine**, v. 94, n. 6, p. 826, 1 jun. 1981.

SINDAN. **SINDAN**. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

SINDAN. **Compêndio de Produtos Veterinários**. Disponível em: <<http://www.cpv.com.br/cpv/pesquisar.aspx>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

SOUZA, S. V. C. DE; LIMA, J. A.; TEODORO, J. C.; JUNQUEIRA, R. G. Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 823–836, dez. 2007.

SPINOSA, H. DE S.; PALERMO-NETO, J.; GÓRNIK, S. L. **Medicamentos em Animais de Produção**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

STORPIRTIS, S.; GANÇALVES, J. E.; CHANG, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 15, n. 9-10, p. 51–56, 2004.

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

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Health and Environmental Effects of Fipronil. **Pesticide Action Network UK**, 2000.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, 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 the determination of fipronil in honey by high performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytical Methods**, v. 3, n. 8, p. 1893, 2011.

USDA. **USDA**. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

USEPA. **New Pesticide Fact Sheet** Washington DC, 1996.

USEPA. **Fipronil - Review of incident report for three products** Washington, 1998.

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.