

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

TESE

**Fluazuron no Controle do Carrapato *Amblyomma sculptum*: Eficácia,
Farmacocinética e Palatabilidade Utilizando *Cavia porcellus* (Cobaio) Como
Modelo Experimental**

DEBORA AZEVEDO BORGES

2023



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

**FLUAZURON NO CONTROLE DO CARRAPATO *Amblyomma sculptum*:
EFICÁCIA, FARMACOCINÉTICA E PALATABILIDADE
UTILIZANDO *Cavia porcellus* (COBAIO) COMO MODELO
EXPERIMENTAL**

DEBORA AZEVEDO BORGES

sob a orientação do professor
Fabio Barbour Scott

sob a coorientação da professora
Yara Peluso Cid

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2023

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

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

B732f Borges, Debora Azevedo, 1988-
Fluazuron no Controle do Carrapato *Amblyomma*
sculptum: Eficácia, Farmacocinética e Palatabilidade
Utilizando *Cavia porcellus* (Cobaio) Como Modelo
Experimental / Debora Azevedo Borges. - Seropédica,
2023.
131 f.

Orientador: Fabio Barbour Scott.
Coorientadora: Yara Peluso Cid.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2023.

1. Medicina Veterinária. 2. Artropodologia. 3.
Ectoparasitos. 4. Carrapatos. 5. Controle de
carrapatos. I. Scott, Fabio Barbour, 1966-, orient.
II. Cid, Yara Peluso , 1982-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.



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



ATA Nº 297 / 2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.022458/2023-47

Seropédica-RJ, 13 de abril de 2023.

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

DÉBORA AZEVEDO BORGES

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

TESE APROVADA EM 30/03/2023

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

(Assinado digitalmente em 21/04/2023 10:42)

FABIO BARBOUR SCOTT
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: 1173660

(Assinado digitalmente em 13/04/2023 21:32)

THAIS RIBEIRO CORREIA AZEVEDO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: 2929889

(Assinado digitalmente em 14/04/2023 12:45)

NORMA VOLLMER LABARTHE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 495.623.637-91

(Assinado digitalmente em 14/04/2023 14:04)

JOSÉ RECK
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 998.883.860-34

(Assinado digitalmente em 13/04/2023 19:42)

GEORGE REGO ALBUQUERQUE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 034.240.467-95

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **297**, ano: **2023**, tipo: **ATA**, data de emissão: **13/04/2023** e o código de verificação: **45d27343db**

“... E quando o calor da primavera toca o nosso
rosto, sentimos como se quem partiu ainda
estivesse conosco, nos desejando felicidade.
Supúnhamos que estávamos sozinhos, mas nos
damos conta de que não estamos.”

Haemin Sunim

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, amigos e família.

Aos meus amados pais Rosemary Sá de Azevedo (*in memoriam*) e Cezar José Ururahy Borges (*in memoriam*), por terem me dado todo o amor do mundo.

À minha madrasta Silvana Amorim Crespo, por ser como uma mãe e me amar como uma filha. O melhor presente que meu pai me deu.

À minha família, que me apoia, incentiva e compreende quando preciso me ausentar.

Ao André de Paula Peixoto, meu amor, meu amigo, meu companheiro para toda vida nas aventuras e nos momentos de seriedade.

Ao Professor Dr. Fábio Barbour Scott, pela orientação, incentivo, ensinamentos, apoio e, acima de tudo, por confiar em mim para realizar parte do sonho que o Prof. Dr. Laerte Grisi (*in memoriam*) compartilhava com você, que era este trabalho.

Ao Prof. Dr. Laerte Grisi (*in memoriam*), um agradecimento especial por nos deixar este sonho como herança.

À Professora Dr^a Yara Peluso Cid, pela coorientação, ensinamentos, paciência infinita e dedicação.

À Professora Dr^a Thais Ribeiro Correia Azevedo, não só por me ajudar desde sempre em tudo que precisei, mas sem dúvida, pelos inúmeros cafezinhos quentinhos ao longo desses anos.

À Isabelle Vilela Bonfim e Juliana Pereira de Freitas, não só pela ajuda essencial na execução deste trabalho, mas pela amizade, carinho e por sempre me estenderem a mão.

À Melina Cardilo Campos Alves e Ingrid Lins Raquel de Jesus, por toda ajuda que me deram nas etapas realizadas no setor de farmacometria e, principalmente, por terem tornado esse momento tão leve e divertido.

À Clara Rodrigues Dutra por ter aceitado participar das etapas finais desse trabalho e ter se dedicado à sua execução e aos animais como se fosse seu próprio trabalho.

Aos demais membros da equipe que me deram ajuda essencial neste trabalho: Thaís Paes Ferreira, Viviane de Sousa Magalhães, Rayane Monteiro, Rayane Christine Pereira de Assis, Fernando Rocha Miranda, Paula Carvalho Marins, Juliana de Moraes Intriéri, SoYin Nak, Gabriela Pereira Salça de Almeida, Marisa Beatriz da Silva Rocha, Emily Andressa Santos

Lima, Roxanne Marina Roque, Eduardo Felipe Melo Santos Soares, Victor Hugo Machado Luque Dias e Thalita Xavier de Araújo da Silva.

À minha amiga desde a época da residência, Paula de Abreu Moraes, por sempre me ajudar na formatação dos meus trabalhos finais.

Aos estagiários, residentes, mestrandos, doutorandos, técnicos administrativos, funcionários da limpeza, administradores e professores, que ainda estão ou já passaram pelo LQEPV, obrigada pelo aprendizado que cada um me deu.

Aos porquinhos-da-índia por cada “cui, cui” de alegria ao me ver, que derretiam meu coração todas as manhãs.

A todos os animais do plantel do LQEPV, mas especialmente aos “meus filhos” beagles, que fizeram parte da minha vida todos os dias por mais de oito anos.

Às capivaras do Lago do Instituto de Agronomia da UFRRJ, que nos inspiraram em todas as etapas deste trabalho.

Ao curso de Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, seu corpo docente, coordenação e administração, que oportunizaram esse momento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa ofertada.

A Fundação de Apoio a Pesquisa da Universidade Rural (FAPUR), pelo suporte financeiro.

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

A UFRRJ por toda a infraestrutura disponibilizada para concretização do trabalho.

À vida, que continue repleta do que nos faz bem.

BIOGRAFIA

Debora Azevedo Borges nasceu na cidade do Rio de Janeiro, no dia 30 de novembro de 1988, filha única de Rosemary Sá de Azevedo e Cezar José Ururahy Borges. cursou o 1º e 2º graus no Colégio Pedro II, no Rio de Janeiro, onde se formou no ano de 2006. Em 2009 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estácio de Sá (UNESA) – Vargem Pequena, Rio de Janeiro, RJ. Durante a graduação foi monitora das disciplinas de Imunologia em animais no ano de 2012 sob orientação do professor Dr. Ary Elias Aboud-Dutra, de Protozoologia e artropodologia de parasitos nos anos de 2012 e 2013 e de Epizootiologia das parasitoses no ano de 2013, ambas sob orientação da professora MSc. Luciana Guerim. Foi estagiária remunerada de cirurgia de pequenos animais, pela prefeitura do Rio de Janeiro, no ano de 2013. Ganhou a primeira edição do prêmio Professor Luiz Celso Hygino da Cruz pela participação ativa em diversos trabalhos de pesquisa na UNESA. Graduou-se em Medicina Veterinária em dezembro de 2013. Em março de 2014 ingressou no Programa de Residência em Medicina Veterinária (PRMV), na Área de Diagnóstico em Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e o concluiu em fevereiro de 2016, sob orientação do professor Dr. Fabio Barbour Scott. Logo após, foi aprovada em terceiro lugar em processo de seleção e ingressou no Mestrado, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UFRRJ em março de 2016, sob orientação do professor Dr. Fabio Barbour Scott. Em 2017 foi eleita e atuou como representante discente dos colegiados executivo e pleno do PPGCV. Concluiu seu mestrado em fevereiro de 2018, que deu origem a seu primeiro artigo como primeira autora publicado em revista de alto impacto científico intitulado “Efficacy of a dinotefuran, pyriproxyfen and permethrin combination product against *Ctenocephalides felis felis* (Bouche, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae) on artificially infested rabbits”. Em março de 2018 foi aprovada em segundo lugar e ingressou no Doutorado também pelo PPGCV, sob orientação do professor Dr. Fabio Barbour Scott. Durante todo seu período acadêmico (2016 até os dias de hoje), já participou em mais de 60 projetos de pesquisa junto a seu orientador, atuou e ainda atua como preceptora do PRMV, na Área de Diagnóstico em Parasitologia Animal da UFRRJ, participou de diversas bancas de processo seletivo e de defesa de monografia dos residentes do PRMV, também de bancas de defesa de monografia a nível de graduação e em comissões de avaliação de bolsas do programa de iniciação científica em instituições privadas. Atuou como membro de comissão julgadora do Programa Institucional de Doutorado Sanduíche no Exterior, como membro do Comitê de Estudos para Reestruturação do PPGCV para instituir processos

de autoavaliação e na organização de alguns dos Simpósio Internacional da Ciências Veterinárias (SINCVET). Possui mais de 20 artigos publicados em revistas científicas e 80 resumos publicados em anais de eventos, tendo sido, até hoje, o artigo desta tese, sua publicação em revista de maior impacto.

RESUMO

BORGES, Debora Azevedo. **Fluazuron no Controle do Carrapato *Amblyomma sculptum*: Eficácia, Farmacocinética e Palatabilidade Utilizando o Porquinho-da-índia Como Modelo Experimental.** 2023. 115. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

O carrapato *Amblyomma sculptum* é conhecido pelo fato de sua picada causar lesões extremamente pruriginosas e por ser a espécie transmissora da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira no homem. Qualquer uma de suas fases parasitárias podem ser encontradas em animais domésticos, selvagens e até mesmo no homem, mas a capivara é um de seus hospedeiros preferenciais. Devido à semelhança da capivara com porquinhos-da-índia, esta segunda espécie foi utilizada para a execução desse trabalho em substituição à primeira. O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a eficácia do fluazuron no controle do carrapato *A. sculptum* em porquinhos-da-índia infestados artificialmente com larvas do carrapato. Para isso, o trabalho foi dividido em seis etapas que ocorreram de forma cronológica (Estudo I ao VI). No Estudo I foi determinada a influência de três diferentes doses de fluazuron administrado por gavagem na concentração plasmática e na eficácia no controle de *A. sculptum* em porquinhos-da-índia. No Estudo II foi realizada a farmacocinética descritiva do fluazuron após sua administração por gavagem para porquinhos-da-índia. Com os resultados obtidos nos dois primeiros estudos, no Estudo III, foram desenvolvidas diferentes formulações em isca que passaram por avaliações das características organolépticas e de resistência à diferentes temperaturas e umidades. O fluazuron foi incorporado na formulação escolhida, que passou por testes de uniformidade de dose. Em seguida, foi realizado o Estudo IV para avaliar a palatabilidade da formulação desenvolvida para porquinhos-da-índia, onde foram oferecidas iscas contendo (grupo tratado) e não contendo (grupo placebo) fluazuron. No Estudo V as iscas foram administradas para porquinhos-da-índia para determinar a farmacocinética descritiva do fluazuron, seguindo a mesma metodologia aplicada no Estudo II. Por fim, a última etapa (Estudo VI), determinou a eficácia da isca contendo fluazuron administrada para porquinhos-da-índia no controle do carrapato *A. sculptum*. Nesta etapa, os animais foram divididos em grupos onde cada um recebeu a isca contendo fluazuron em dose única em dias experimentais pré-infestação distintos. No Estudo I, os resultados de eficácia mostraram que mesmo a dose mais baixa alcançou 100% de eficácia contra a muda das larvas ingurgitadas. Quanto a biodisponibilidade plasmática, ocorreu um aumento na concentração plasmática de fluazuron com o aumento da dose no dia +1. No entanto, do dia +4 até o último dia de avaliação (+21), as concentrações plasmáticas médias não diferiram significativamente entre os grupos. Nos Estudos II e V, as concentrações plasmáticas de fluazuron aumentaram rapidamente, indicando absorção rápida e eliminação lenta. Os resultados permitiram o desenvolvimento de uma isca resistente à diferentes temperaturas e umidade, a qual o fluazuron foi incorporado e aprovado nos testes de uniformidade de dose (Estudo III). No Estudo IV as iscas placebo e tratado foram palatáveis para porquinhos-da-índia em, pelo menos, 92% das vezes. A eficácia obtida das iscas foi 64,99% para os animais tratados 21 dias antes da infestação, de 61,88% para os animais tratados 14 dias antes da infestação e de 59,31% para os animais tratados 7 dias antes da infestação. O fluazuron foi eficaz no controle do carrapato *A. sculptum* em porquinhos-da-índia.

Palavras-chave: Controle de carrapatos, carrapato estrela, benzoilfenil ureias.

ABSTRACT

BORGES, Debora Azevedo. **Fluazuron in the Control of *Amblyomma sculptum* Tick: Efficacy, Pharmacokinetics and Palatability Using the Guinea Pig as an Experimental Model.** 2023. 115. Thesis (PhD in Veterinary Sciences) Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The tick *Amblyomma sculptum* is known for the fact that its bite causes extremely itchy lesions and for being the transmitting species of the bacterium *Rickettsia rickettsii*, which causes Brazilian Spotted Fever in humans. Any of its parasitic stages can be found in domestic and wild animals and even in humans, but the capybara is one of its preferred hosts. Due to the similarity between capybaras and guinea pigs, this second species was used to carry out this work, replacing the first one. The general objective of this work was to evaluate the efficacy of fluazuron in the control of the tick *A. sculptum* in guinea pigs artificially infested with larvae. The work was divided into six stages that occurred chronologically (Study I to VI). In Study I, the influence of three different doses of fluazuron administered by gavage on plasma concentration and efficacy in controlling *A. sculptum* in guinea pigs was determined. In Study II, the descriptive pharmacokinetics of fluazuron was performed after its administration by gavage to guinea pigs. With the results obtained in the first two studies, in Study III, different bait formulations were developed that underwent evaluations of organoleptic characteristics and resistance to different temperatures and humidity. Fluazuron was incorporated into the chosen formulation, which underwent dose uniformity tests. Subsequently, Study IV was conducted to assess the palatability of the formulation developed for guinea pigs, where baits containing fluazuron (treated group) and placebo group (not treated) were offered. In Study V the baits were administered to guinea pigs to complete the descriptive pharmacokinetics of fluazuron, following the same methodology applied in Study II. In this step, the animals were divided into groups where each received the bait containing fluazuron in a single dose on different pre-infestation experimental days. In Study I, the efficacy results showed that even the lowest dose achieved 100% efficacy against molting engorged larvae. As for plasma bioavailability, there was an increase in the plasma concentration of fluazuron with the increase in dose on day +1. However, from day +4 to the last day of evaluation (+21), mean plasma concentrations did not differ significantly between groups. In Studies II and V, fluazuron plasma concentrations increased rapidly, indicating rapid absorption and slow elimination. The results allowed the development of a bait resistant to different temperatures and humidity, which fluazuron was incorporated and approved in the dose uniformity tests (Study III). In Study IV the placebo and treated baits were palatable to guinea pigs at least 92% of the time. In Study VI, the efficacy obtained was 64.99% for the treated animals 21 days before the infestation, 61.88% for the animals treated 14 days before the infestation and 59.31% for the animals treated 7 days before the infestation. Fluazuron was effective in controlling the *A. sculptum* tick in guinea pigs.

Key words: Tick control, star tick, benzoylphenylureas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos realizados e seus respectivos protocolos de autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais.	38
Tabela 2. Avaliação das larvas desprendidas e do processo de muda de larvas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> recuperadas de porquinhos-da-índia artificialmente infestados para os grupos controle e tratados com fluazuron por gavagem por 15 dias consecutivos.	62
Tabela 3. Média \pm DP da concentração plasmática do fluazuron (ng.mL^{-1}) em porquinhos-da-índia tratados por gavagem com doses múltiplas (1mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg).	65
Tabela 4. Parâmetros farmacocinéticos do fluazuron em porquinhos-da-índia após administração oral de fluazuron (10mg/kg) (n=8).	69
Tabela 5. Características organolépticas de seis formulações em iscas desenvolvidas para porquinhos-da-índia.	71
Tabela 6. Avaliação da resistência à água de seis diferentes formulações em iscas para porquinhos-da-índia.	72
Tabela 7. Avaliação de resistência à diferentes temperaturas em seis formulações em iscas para porquinhos-da-índia.	73
Tabela 8. Peso médio de 20 iscas contendo fluazuron para porquinhos-da-índia.	74
Tabela 9. Doseamento de iscas contendo fluazuron para porquinhos-da-índia.	75
Tabela 10. Avaliação da uniformidade de conteúdo de iscas contendo fluazuron.	77
Tabela 11. Avaliação da uniformidade de doses por variação de peso de iscas contendo fluazuron.	78
Tabela 12. Avaliação da palatabilidade de iscas placebo e com fluazuron (5mg) para porquinhos-da-índia.	79
Tabela 13. Média \pm DP da concentração plasmática do fluazuron (ng.mL^{-1}) em porquinhos-da-índia tratados com dose única de um bloco medicamentoso contendo fluazuron (10mg/kg).	81
Tabela 14. Parâmetros farmacocinéticos do fluazuron em porquinhos-da-índia após administração oral de bloco medicamentoso contendo fluazuron (10mg/kg) (n=12).	82
Tabela 15. Avaliação da recuperação e do processo de muda de larvas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> recuperadas de porquinhos-da-índia artificialmente infestados para o grupo controle e tratados com isca contendo fluazuron (10mg/kg) (n=32) em diferentes tempos antes da infestação.	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica das seis espécies pertencentes ao Complexo <i>Amblyomma cajennense</i> de acordo com Nava et al., 2014. * <i>Amblyomma cajennense</i> s.s.; † <i>Amblyomma tonelliae</i> n. sp.; ‡ <i>Amblyomma interandinum</i> n. sp.; # <i>Amblyomma patinoi</i> n. sp.; <i>Amblyomma mixtum</i> ; 0 <i>Amblyomma sculptum</i> (NAVA et al., 2014).....	6
Figura 2. Eficácia do fluazuron “pour-on” após simulação de chuva no controle do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> em bovinos (ZAPA et al., 2020).....	25
Figura 3. (A) Introdução da sonda por via oral em cobaias para administração de solução contendo fluazuron por gavagem; (B) sonda uretral nº8 acoplada a uma seringa de 1mL, contendo a solução de fluazuron, sendo introduzida por via oral em cobaias.....	42
Figura 4. Tubo de heparina contendo sangue total e microtubo Eppendorf contendo 500µL de plasma em após centrifugação do sangue total.....	42
Figura 5. Região dorsal de porquinho-da-índia tricotomizada para fixação do capuz de pano.	43
Figura 6. Capuz de pano fixado com cola Unna e esparadrapo em porquinho-da-índia.....	43
Figura 7. Seringas (5mL) contendo aproximadamente 1000 larvas não alimentadas de <i>Amblyomma sculptum</i> utilizadas para a infestação dos porquinhos-da-índia.	44
Figura 8. Porquinho-da-índia com capuz de pano fixado ao dorso, sendo infestado com aproximadamente 1000 larvas (35 dias de idade) de <i>Amblyomma sculptum</i>	44
Figura 9. (A) Capuz de pano em porquinhos-da-índia sendo fechado com esparadrapo para evitar a fuga das larvas de <i>Amblyomma sculptum</i> ; (B) Capuz de pano em porquinho-da-índia sendo identificado com o número do microchip do animal e grupo experimental.....	45
Figura 10. Larvas de <i>Amblyomma sculptum</i> alimentadas observadas dentro de capuz de pano fixado em porquinho-da-índia.	45
Figura 11. Larvas de <i>Amblyomma sculptum</i> despejadas sobre bandeja branca (círculo vermelho) após completo repasto sanguíneo em porquinho-da-índia.	46
Figura 12. Frascos contendo solução de fluazuron utilizada para aplicação por gavagem em porquinhos-da-índia. Da esquerda para direita, o primeiro frasco corresponde ao G1 (1mg/Kg de fluazuron), o segundo frasco corresponde ao G2 (5mg/Kg de fluazuron) e o terceiro frasco corresponde ao G3 (10mg/Kg).	47
Figura 13. Cartuchos acondicionados sob vácuo (com auxílio de uma bomba).	48
Figura 14. Transferência do plasma contaminado com clorfluazuron para os cartuchos.	49
Figura 15. Etapa de pré-evaporação até a secura em centrífuga a vácuo.	50
Figura 16. Massa homogeneizada em graal de cerâmica.	52
Figura 17. Massa sendo tamisada.....	52
Figura 18. Massa após ser tamisada.	53
Figura 19. Quatro diferentes tipos de ceras utilizadas: (A) Parafina alimentícia granulada; (B) Parafina para vela; (C) Cera de abelha; e (D) Cera vegetal de coco.	54
Figura 20. Média ± desvio padrão da concentração plasmática do fluazuron após administração por gavagem por 15 dias consecutivos de fluazuron nas doses 1, 5 e 10mg/kg para porquinhos-da-índia (n=8).	66
Figura 21. Média ± desvio padrão da concentração plasmática do fluazuron após administração oral de fluazuron (10mg/Kg) para porquinhos-da-índia (n=8).....	69
Figura 22. Média± DP da concentração plasmática do fluazuron após administração oral de fluazuron na dose única de 10 mg/kg para porquinhos-da-índia (n = 12).....	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	Carrapatos e Sua Importância	4
2.2	O Complexo <i>Amblyomma cajennense</i>	5
2.3	O Carrapato <i>Amblyomma sculptum</i>	6
2.3.1	Taxonomia	6
2.3.2	Morfologia	7
2.3.3	Biologia	7
2.4	A Febre Maculosa Brasileira e o Papel da Capivara	9
2.5	Família Caviidae	10
2.5.1	Capivaras	11
2.5.2	Porquinhos-da-índia	12
2.6	Principais Grupamentos Antiparasitários Usados No Controle De Carrapatos Em Animais	13
2.6.1	Amidinas	13
2.6.2	Organofosforados	14
2.6.3	Lactonas macrocíclicas	14
2.6.4	Piretroides	15
2.6.5	Fenilpirazóis	15
2.6.6	Isoxazolinás	16
2.6.7	Reguladores/Disruptores do Crescimento de Insetos	16
2.6.7.1	Análogos do hormônio juvenil	17
2.6.7.2	Inibidores da deposição de quitina	18
2.6.7.3	Inibidores de síntese de quitina	18
2.7	O Uso do Fluazuron Pela Via Tópica No Controle De Carrapatos Em Animais 20	
2.8	O Uso do Fluazuron Pela Via Oral nNo Controle De Ectoparasitos Em Animais 25	
2.9	Sistemas de Liberação de Fármacos para Animais Selvagens	26
2.10	Sistema de Liberação de Fármacos Ectoparasiticidas em Iscas para Animais Selvagens	28
2.11	Desenvolvimento De Blocos Parafinados E Testes De Bancada	32
2.12	Estudos de Palatabilidade e Aceitação para Animais	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Estudo I: Farmacocinética e eficácia do fluazuron administrado por gavagem no controle de <i>Amblyomma sculptum</i>	39

3.1.1	Seleção dos hospedeiros	39
3.1.2	Obtenção dos carrapatos <i>Amblyomma sculptum</i>	40
3.1.3	Delineamento experimental	40
3.1.4	Preparo das formulações contendo fluazuron	47
3.1.5	Análise farmacocinética	47
3.1.6	Procedimentos analíticos.....	48
3.2	Estudo II: Farmacocinética descritiva do fluazuron administrado por gavagem 50	
3.2.1	Delineamento experimental	51
3.3	Estudo III: Desenvolvimento de formulação em iscas.....	51
3.3.1	Composição e preparo da massa das iscas	51
3.3.2	Ceras testadas e preparo das iscas	53
3.3.3	Avaliação das características organolépticas das iscas	54
3.3.4	Avaliação da resistência das iscas à água e à diferentes temperaturas	54
3.3.5	Teste de uniformidade de dose e de determinação do teor de fluazuron	55
3.3.5.1	Determinação do peso médio	55
3.3.5.2	Doseamento	55
3.3.5.3	Uniformidade de conteúdo.....	56
3.3.5.4	Uniformidade de dose por variação de peso	56
3.4	Estudo IV: Aceitação voluntária da isca.....	56
3.4.1	Delineamento experimental	56
3.5	Estudo V: Farmacocinética descritiva do fluazuron administrado em isca.....	58
3.5.1	Delineamento experimental	58
3.6	Estudo VI: Avaliação da eficácia do fluazuron administrado em isca no controle de <i>Amblyomma sculptum</i>	59
3.6.1	Delineamento experimental	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	Estudo I: Farmacocinética e eficácia do fluazuron administrado por gavagem no controle de <i>Amblyomma sculptum</i>	61
4.2	Estudo II: Farmacocinética descritiva do fluazuron administrado por gavagem 68	
4.3	Estudo III: Desenvolvimento de formulação em iscas.....	69
4.4	Estudo IV: Aceitação voluntária da isca.....	78
4.5	Estudo V: Farmacocinética descritiva do fluazuron administrado em isca.....	80
4.6	Estudo VI: Avaliação da eficácia do fluazuron administrado em isca no controle de <i>Amblyomma sculptum</i>	82

5	CONCLUSÕES	87
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1 INTRODUÇÃO

O carrapato *Amblyomma sculptum* é um ixodídeo pertencente ao Complexo *Amblyomma cajennense* e qualquer uma de suas fases parasitárias podem ser encontradas em animais domésticos, selvagens e até mesmo no homem. É conhecido pelo fato de sua picada causar lesões extremamente pruriginosas e por ser a espécie transmissora da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira (FMB) no homem. Esta espécie pode ser encontrada em várias áreas da América do Sul.

Diversas espécies de carrapatos com esse mesmo perfil de parasitar diferentes hospedeiros (incluindo animais selvagens) e atuar como vetores de agentes patogênicos ao homem, podem ser encontradas em outros continentes.

O controle de ectoparasitos em animais selvagens, principalmente roedores, é complexo, já que são animais que se reproduzem rapidamente, muitos vivem em locais remotos e inacessíveis e cada espécie de roedor pode possuir um comportamento diferente. Esses fatores fazem com que seja necessário conhecer o hospedeiro-alvo afim de implementar medidas específicas para o controle de ectoparasitos em cada espécie de hospedeiro.

Alguns estudos já foram realizados a campo com o objetivo de controlar ectoparasitos em roedores, mas os autores ainda se deparam com muitas dificuldades que, às vezes, comprometem os resultados esperados. Muitos desses problemas poderiam ser minimizados se, primeiramente, fossem realizados estudos controlados, com infestações artificiais e utilizando uma espécie de roedor (animal de laboratório) como modelo experimental.

Atualmente o animal mais utilizado na experimentação animal e considerado seu símbolo é o camundongo. No entanto, um outro roedor, por ter sido utilizado para fins de pesquisa desde o século XVIII, foi considerado por muito tempo o símbolo da experimentação animal: o porquinho-da-índia.

Na língua inglesa é chamado de “guinea pig”, mas em português é conhecido, principalmente, por “porquinho-da-índia” ou por “cobaia”. Devido à sua popularidade na pesquisa, tanto o termo em inglês quanto o último termo em português são frequentemente utilizados para se referenciar a qualquer animal, inclusive humanos, que sejam objeto de experimentação.

Apesar de ser um roedor, sua susceptibilidade a infecções e a semelhança de seu sistema imunológico ao do humano, os tornaram modelos experimentais ideais para estudos de doenças infecciosas.

Além dos humanos, também possui muitas semelhanças com outros roedores, como por exemplo, as capivaras. Ambos pertencem à mesma família (Caviidae) e compartilham muitas características anatômicas, fisiológicas e comportamentais. No entanto, enquanto os porquinhos-da-índia pesam entre 0,5 e 1,5kg, as capivaras pesam cerca de 80kg. Quem já viu um porquinho-da-índia e uma capivara, provavelmente notou que o primeiro parece uma miniatura do segundo.

Essa semelhança pode abrir precedentes para o uso do porquinho-da-índia como modelo experimental em estudos em substituição à capivara, em um primeiro momento.

Estudos em capivaras são necessários, por exemplo, para o controle do carrapato *A. sculptum*, um de seus principais ectoparasitos. No entanto, o controle de carrapatos em capivaras é complexo, pois são animais semiaquáticos, o que impossibilita o uso de acaricidas tópicos. Por serem animais selvagens, a administração de acaricidas por outras vias (injetável ou oral) implica na necessidade de sua captura, dificultando ainda mais este processo.

Inicialmente, para o caso do controle de carrapatos, o uso de porquinhos-da-índia em substituição às capivaras em um estudo controlado é mais palpável, devido ao custo mais baixo, por não precisar de instalações tão grandes e por serem animais de mais fácil manejo, já que são mais dóceis e de menor tamanho.

Dentre os trabalhos com controle de carrapatos em animais selvagens publicados até hoje, muito se observa uso de moléculas com atividade na síntese de quitina de artrópodes funcionando de forma eficaz, como por exemplo, o fluazuron.

Com isso, diante da necessidade de desenvolver métodos de administração de carrapaticidas para o controle de *A. sculptum* em capivaras, tendo em vista sua relevância para a saúde pública, desenvolveu-se este estudo.

O objetivo geral primário deste trabalho foi avaliar a eficácia do fluazuron no controle de *A. sculptum* em porquinhos-da-índia, tendo como objetivos específicos: 1- Determinar a influência de três diferentes doses de fluazuron administrado por gavagem na concentração plasmática e na eficácia no controle de *A. sculptum* em porquinhos-da-índia (análises farmacocinéticas e farmacodinâmicas – PK/PD); 2- Determinar a farmacocinética descritiva do fluazuron administrado por gavagem em porquinhos-da-índia; 3- Desenvolver uma formulação em isca contendo fluazuron, palatável e resistente

à diferentes temperaturas e umidades; 4- Avaliar a aceitação voluntária da formulação desenvolvida para porquinhos-da-índia; 5- Determinar a farmacocinética descritiva do fluazuron após administração da isca palatável para porquinhos-da-índia; 6- Avaliar a eficácia no controle de *A. sculptum* em porquinhos-da-índia após a administração da isca. E, por fim, como objetivo secundário, verificar o potencial do uso de porquinhos-da-índia como modelo experimental para avaliações iniciais da administração de fármacos para o controle de carrapatos em roedores selvagens.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carrapatos e Sua Importância

Os carrapatos estão amplamente distribuídos em todos os continentes, totalizando cerca de 951 espécies e são divididos em três famílias (Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae) (DANTAS-TORRES et al., 2018).

Os pertencentes a família Ixodidae são conhecidos por “carrapatos duros”, devido a sua região dorsal ser recoberta total ou parcialmente por quitina (GUGLIELMONE; ROBBINS, 2018). Totalizam 733 espécies (DANTAS-TORRES et al., 2018), sendo 120 de ocorrência em regiões neotropicais e possuindo os gêneros de maior importância médica e médico-veterinária: *Ixodes* spp., *Amblyomma* spp., *Rhipicephalus* spp., *Dermacentor* spp., *Haemaphysalis* spp., *Cosmiomma* spp., *Aponomma* spp., *Margaropus* spp., *Rhipicentor* spp. e *Hyalomma* spp (BRITES-NETO et al., 2015).

Já os “carrapatos moles”, pertencem a família Argasidae, que é composta por aproximadamente 216 espécies. A família Nuttalliellidae possui uma única espécie (DANTAS-TORRES et al., 2018).

Os ixodídeos se alimentam obrigatoriamente de sangue de vertebrados, principalmente mamíferos, mas também é possível encontrá-los em aves, répteis e anfíbios (FURLONG, 2005). Podem ser responsáveis por lesões cutâneas, anemia, inoculação de toxinas e transmissão de patógenos, podendo levar o hospedeiro a morte. Tais efeitos variam conforme a espécie do carrapato (RODRIGUES et al., 2015; MORAES-FILHO, 2017).

Os carrapatos são considerados o principal grupo de vetores de importância para animais e o segundo mais importante para humanos. Esses ectoparasitos são potenciais transmissores de agentes patogênicos aos humanos, o que têm despertado o interesse na saúde pública (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

As espécies de carrapatos que infestam os animais domésticos são mais estudadas do que as que infestam a fauna silvestre. No entanto, os roedores, por exemplo, fazem parte da fauna silvestre e são fortemente incriminados por atuar como reservatórios de agentes patogênicos e dispersores de ectoparasitos, principalmente em áreas públicas próximas a vegetação, em vários países (BOULANGER et al., 2019; YOSHII, 2019; EISEN, 2021; GONÇALVES et al., 2021). São frequentemente parasitados por ixodídeos

como os do gênero *Amblyomma*, principalmente nos estágios imaturos (GUGLIELMONE; NAVA, 2011; MARTINS et al., 2016).

A importância dos carrapatos se reflete nos esforços de diferentes países ao longo de mais de um século tentando controlar ou erradicar carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos. O uso massivo de ectoparasiticidas colocou o carrapato da espécie *R. microplus* no sexto lugar no ranking mundial de artrópodes mais resistentes (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2018). Na pecuária, o impacto econômico causado pelo carrapato do boi *Rhipicephalus microplus*, em 2014, chegava a 3.247 bilhões de dólares por ano (GRISI et al., 2014).

O uso excessivo e indevido de ectoparasiticidas, além de causar resistência na população de carrapatos exposta, pode se tornar perigoso para os animais, alimentos, meio ambiente e, conseqüentemente, para o homem (LEÓN et al., 2020).

2.2 O Complexo *Amblyomma cajennense*

Um estudo realizado por Nava et al. (2014) demonstrou, que *Amblyomma cajennense*, deve ser considerado um complexo de seis espécies: *A. cajennense*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma tonelliae*, *Amblyomma interandinum* e *Amblyomma patinoi*. Cada uma das espécies relatadas tem uma distribuição geográfica distinta. A nova classificação determinou que *A. cajennense*, a fim de evitar confusões devido a possuir o mesmo nome do complexo (complexo *Amblyomma cajennense*), fosse chamado de *Amblyomma cajennense sensu stricto*.

Portanto, *A. cajennense s.s.* é encontrado na região Amazônica da América do Sul, englobando Venezuela, Guianas e parte do Brasil (Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins). A espécie *A. interandinum* é encontrada no Peru; *A. mixtum* é encontrada desde o Texas (EUA) até oeste do Equador; *A. patinoi* é encontrada somente na Colômbia; *A. tonelliae* é encontrado na Argentina, Bolívia e Paraguai; e *A. sculptum* é encontrado na Argentina, Bolívia, Paraguai e áreas peri-amazônicas no Brasil (Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Pernambuco, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás) (Figura 1).



Figura 1. Distribuição geográfica das seis espécies pertencentes ao Complexo *Amblyomma cajennense* de acordo com Nava et al., 2014. **Amblyomma cajennense* s.s.; †*Amblyomma tonelliae* n. sp.; ¥*Amblyomma interandinum* n. sp.; #*Amblyomma patinoi* n. sp.; *Amblyomma mixtum*; O*Amblyomma sculptum* (NAVA et al., 2014).

2.3 O Carrapato *Amblyomma sculptum*

Um dos carrapatos de maior importância no Brasil é *A. sculptum* (antes conhecido por *A. cajennense*), chamado popularmente como “carrapato estrela” (forma adulta) e “micuim” (forma larval), pode ser encontrado em várias espécies de animais, inclusive em humanos. Por ser a principal espécie associada aos homens, ele é o principal transmissor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB) (LABRUNA et al., 2002).

A transmissão dessa bactéria ocorre através da picada do carrapato em qualquer uma de suas fases (larva, ninfa e adulto) (DEL FIORI et al., 2010).

2.3.1 Taxonomia

O carrapato *A. sculptum* pertence ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acarina, Ordem Ixodida e família Ixodidae (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

2.3.2 Morfologia

Assim como as demais espécies do gênero *Amblyomma*, *A. sculptum* possui hipostômio e palpos longos (principalmente o segundo artigo, que é mais que o dobro do tamanho do terceiro), base do capítulo retangular e escudo ornamentado (ONOFRIO et al., 2006).

Os carrapatos do complexo *A. cajennense* compartilham diversas características morfológicas semelhantes, sendo essa a principal dificuldade de diferenciação das espécies (NAVA et al., 2014).

Todas as seis espécies, tanto machos quanto fêmeas, possuem sulco marginal completo delimitando os festões até o nível dos olhos, olhos achatados, palpos alongados com espinho ventral pequeno e rombo projetando-se posteriormente no artigo I, denteção hipostomal 3:3, ausência de espinhos no trocânter I e nos metatarsos II-IV, coxa I com dois espinhos, sendo o externo mais longo que o interno (NAVA et al., 2014).

A coxa IV dos machos possui um espinho longo e reto que não atinge o nível do ânus. As fêmeas possuem um espinho em forma de crista nas coxas II e III e um pequeno espinho visível na coxa IV (NAVA et al., 2014).

Os machos de *A. cajennense s.s.* e *A. sculptum* não são facilmente distinguíveis, diferente das fêmeas. A principal diferença entre elas pode ser observada no formato da abertura genital, na qual *A. cajennense s.s.* possui formato de “V”, enquanto as fêmeas *A. sculptum* possuem uma abertura genital em forma de “U”. Além da diferenciação das fêmeas, também é importante levar em consideração a origem geográfica, já que ela pode ajudar a corroborar na distinção entre essas 2 espécies (NAVA et al., 2014).

2.3.3 Biologia

O carrapato *A. sculptum* é mais comum na região sudeste do Brasil, como já dito anteriormente, possui ciclo de vida trioxeno, com as fases de ovo, larva, ninfa e adulto (ONOFRIO et al., 2006). Sua alimentação ocorre através da hematofagia em diversas espécies de animais (ARAGÃO, 1936), preferencialmente antas, cavalos e capivaras (LABRUNA et al., 2001; SZABÓ et al., 2013), mas também já foi relatado infestando naturalmente javalis (RAMOS et al., 2014), bovinos (RAMOS et al., 2016), porcos domésticos (OSAVA et al., 2016), emu australiano (ARAÚJO et al., 2019), javaporcos (NOGUEIRA et al., 2020) e morcegos (NOVAES et al., 2020).

As larvas eclodem dos ovos, permanecem certo tempo no ambiente onde sofrem a maturação e, então sobem nas folhas de plantas rasteiras onde ficam à espera de um

hospedeiro para se fixar. Após o repasto sanguíneo, as larvas se desprendem de seu hospedeiro e, já alimentadas, retornam ao solo em busca de ambiente seguro para que sofram a ecdise para fase de ninfa (RODRIGUES et al., 2015).

As ninfas repetem o mesmo processo das larvas, subindo nas folhas e aguardando o hospedeiro. A fase de ninfa também pode ir em busca de seu hospedeiro, percorrendo curtas distâncias. Após completar sua alimentação, as ninfas desprendem do hospedeiro e, assim como as larvas, buscam um local seguro para realização da ecdise para a fase adulta. Na fase adulta, ocorre a diferenciação entre machos e fêmeas que, assim como as larvas e ninfas, sobem nas folhas para aguardar o hospedeiro. Na fase adulta também pode ser observada a busca ativa pelo hospedeiro, visto que são a fase com maior mobilidade (RODRIGUES et al., 2015).

Em todas as fases, mas principalmente as larvas não alimentadas podem ser encontradas, principalmente, nos campos e cerrados, em grupos de milhares, formando colônias que ficam imóveis à espera do hospedeiro (ARAGÃO, 1936).

Após se fixarem no hospedeiro, machos e fêmeas realizarão o repasto sanguíneo e a cópula. Após o completo ingurgitamento da fêmea (teleógina), ela se desprende e vai para o ambiente onde irá depositar seus ovos. O macho permanece no hospedeiro por mais tempo à espera de outras fêmeas (RODRIGUES et al., 2015).

No ambiente, seu ciclo de vida dura cerca de um ano para se completar (LABRUNA et al., 2002; LABRUNA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2003), sendo regulado pela diapausa comportamental que ocorre nas larvas (OLIVEIRA et al., 2003). Ao longo do ano, é possível observar predominâncias de larvas entre os meses de abril e julho, de ninfas entre julho e outubro e de adultos entre outubro e março. Assim, os adultos predominam na primavera e no verão, as larvas no outono e inverno e as ninfas no inverno e na primavera (OLIVEIRA et al., 2000; LABRUNA et al., 2002).

Como a predominância dos adultos inicia em outubro, é possível observar a presença de larvas de *A. sculptum* durante o verão, no entanto, elas se mantêm em diapausa até que chegue o outono, comportamento desencadeado pela diminuição da duração do dia e da temperatura (LABRUNA et al., 2003; CABRERA; LABRUNA, 2009).

Em condições de temperatura, umidade e fotoperíodo controlados, o ciclo de *A. sculptum* pode durar cerca de 95 dias (SANAVRIA; PRATA, 1996; CHACÓN et al., 2015).

2.4 A Febre Maculosa Brasileira e o Papel da Cativeira

Como dito anteriormente, dentre as duas espécies desse complexo de ocorrência no Brasil, *A. sculptum* é a de maior distribuição entre os estados brasileiros e é reconhecida como sendo principal vetor da FMB, a qual acomete seres humanos. Essa doença é causada pela bactéria *R. rickettsii* e possui alta letalidade, mas é necessário que o carrapato infectado permaneça fixado por, pelo menos 6h no homem, para que possa transmitir a bactéria (FIOL et al., 2010).

Segundo dados do Ministério da Saúde (MS) atualizados em 2017, no Brasil, foram notificados dos anos 2000 até 2017, 1747 casos confirmados, sendo 139 só no estado do Rio de Janeiro. Dos casos confirmados nesse período, ocorreram 554 óbitos no Brasil e 40 no estado do Rio de Janeiro, ou seja, a doença mostra um alto grau de acometimento e óbito, entretanto acredita-se que o número de casos seja muito maior.

A FMB pode causar febre alta, enxaqueca, vômitos, diarreia, dor abdominal, dor muscular, máculas na pele, necrose nas extremidades e paralisia que inicia em membros pélvicos e evolui de forma ascendente, podendo levar ao óbito. A associação dos sintomas com as alterações laboratoriais (leucocitose e trombocitopenia), fazem com que frequentemente os casos sejam confundidos com dengue. Como os sintomas são muito inespecíficos, a demora na busca por profissionais de saúde muitas vezes associada a falha no diagnóstico, são a principal causa de óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Segundo a Portaria do MS de nº 4 de 03 de outubro de 2017, todo caso de FMB é de notificação obrigatória às autoridades locais de saúde.

A maioria dos casos de FMB ocorre durante a época de ocorrência das ninfas de *A. sculptum* (PINTER et al., 2011). Isso pode ser explicado devido à alta agressividade das ninfas, ao seu tamanho pequeno em comparação ao do adulto dificultando a percepção do hospedeiro, além de uma maior dispersão na área infestada. Apesar das larvas também serem pequenas e de ocorrer a transmissão transovariana de *R. rickettsii*, Soares et al. (2012) mostraram que as larvas de *A. sculptum* infectadas pela bactéria possuem baixa competência vetorial, ao contrário das ninfas.

Já se sabe que a taxa de infecção de *A. sculptum* por *R. rickettsii* mesmo em áreas endêmicas é muito baixa (COSTA et al., 2020) basicamente por três razões: é um carrapato pouco susceptível a essa bactéria; a taxa de transmissão transovariana de *R. rickettsii* em *A. sculptum* é baixa; e as fêmeas de *A. sculptum* infectadas por *R. rickettsii* possuem menor desempenho reprodutivo quando comparadas às não infectadas. Esses fatores impedem que *A. sculptum* seja capaz de manter a bactéria *R. rickettsii* por várias

gerações consecutivas (LABRUNA et al., 2008; SOARES et al., 2012; GERARDI et al., 2019). Sendo assim, o principal fator que permite a manutenção da bactéria e, por sua vez, da FMB, são os chamados “hospedeiros amplificadores”. Estes desenvolvem a riquetsemia por alguns dias e infectam novas populações de carrapatos (transmissão horizontal) (POLO et al., 2017).

As capivaras atuam como hospedeiros amplificadores, já que as que nunca foram infectadas pela bactéria *R. rickettsii*, quando parasitadas por carrapatos infectados desenvolvem a doença de forma assintomática, sendo responsabilizadas pela sua amplificação, uma vez que durante o período de bacteremia, transmitem a bactéria a novos carrapatos. Felizmente, após sua recuperação, as capivaras tornam-se refratárias a bactéria. Por isso, os filhotes de capivaras são os mais incriminados na transmissão de *R. rickettsii*, pois comumente adquirem a infecção no início da vida (SOUZA et al., 2009; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ et al., 2020).

No caso das capivaras, não só a questão da amplificação da bacteremia, mas diversos outros fatores, logicamente associados a este, fazem com que ela seja caracterizada como a principal espécie-problema em várias regiões do Brasil: 1- São animais com capacidade de se adaptar a habitats antrópicos; 2- Possuem grande potencial reprodutivo; 3- Vivem em grupos grandes; 4- Ausência de predadores naturais nos ambientes antrópicos. Todos esses fatores levam a um aumento considerável da densidade populacional de capivaras e, conseqüentemente, de carrapatos infectados (FERRAZ et al., 2007; AGUIRRE; TABOR, 2008; FERRAZ et al., 2010).

No sudeste do Brasil, por exemplo, a maioria dos casos de FMB relatados tem sido associado à transmissão pelo carrapato *A. sculptum* em áreas tanto naturais quanto antrópicas, onde as populações desta espécie de carrapato são mantidas principalmente por capivaras (LUZ et al., 2019).

2.5 Família Caviidae

A família Caviidae (Fischer de Waldheim, 1817) pertence ao filo Chordata, classe Mammalia, Ordem Rodentia e Subordem Hytricomorpha. Dentro dessa família estão inseridas três subfamílias: Caviinae; Dolichotinae e Hydrochoerinae (ITIS, 2022).

Dentro da subfamília Caviinae existem seis espécies, todas do gênero *Cavia*, e são conhecidos como preás e porquinhos-da-índia (PRITT, 2012; ITIS, 2022).

Dentro da subfamília Dolichotinae encontram-se apenas duas espécies, ambas pertencentes ao gênero *Dolichotis*, conhecidos como lebre-da-patagônia ou mara (ITIS, 2022).

A subfamília Hydrochoerinae possui apenas dois gêneros: *Kerodon* e *Hydrochoerus*, sendo o primeiro conhecido como moró e o segundo como capivara (ITIS, 2022). Existem duas espécies de capivara, sendo o tamanho sua principal diferença. A maior espécie (*Hydrochoerus hydrochaeris*) é a comumente encontrada no Brasil (TIMM, 2010).

A principal característica morfológica compartilhada por todos os membros da família Caviidae é o fato de terem quatro dedos nas patas dianteiras e três nas patas traseiras, com as solas dos pés sem pelos (PRITT, 2012)

2.5.1 Capivaras

As capivaras da espécie *Hydrochoerus hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) são os maiores roedores vivos, podendo pesar cerca de 80kg na idade adulta (TIMM, 2010; MOREIRA et al., 2013; HOKAMP et al., 2020).

São animais sociáveis, que vivem em grupos de até 30 adultos, sendo um macho dominante e um ou dois subordinados e todo o restante composto por fêmeas, provavelmente aparentadas (MOREIRA et al., 2013). A fêmea atinge a maturidade sexual aos 12 meses de idade, a gestação dura cerca de 150 dias e cada ninhada pode ter até sete filhotes (TIMM, 2010).

São herbívoros monogástricos que realizam a cecotrofia (ingestão de cecotrófos) pela manhã, quando as fezes são ricas em proteínas devido à presença de microrganismos usados na fermentação do capim consumido durante a tarde e noite anteriores (MOREIRA et al., 2013). São semiaquáticas e geralmente mais ativas durante a tarde e à noite em ambientes naturais (MACDONALD, 1981), já em ambientes antrópicos, elas repousam mais durante a noite (RODRIGUES et al., 2013).

Como já dito anteriormente, é considerada uma espécie-problema em áreas endêmicas de FMB. Diversos estudos com essa espécie animal vêm sendo realizados em áreas endêmicas e não endêmicas de FMB abordando controle populacional (KUNIY, et al., 2018), exposição dos animais à bactéria e ao carrapato *A. sculptum* (GRUHN et al., 2019; QUADROS et al., 2021; YANG, 2021) e mapeamento dos animais (TONETTI et al., 2018; NUNES et al., 2019) e dos casos de FMB (DONALISIO et al., 2020). Todos

esses estudos citados corroboram no entendimento da dinâmica do carrapato *A. sculptum*, das populações de capivaras, e da FMB.

2.5.2 Porquinhos-da-índia

As cobaias, também conhecidas como porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus* Linnaeus, 1758), são animais sociáveis e dóceis e seus antepassados selvagens são oriundos da América do Sul. Passaram a ser domesticados em meados de 1500, na Europa, por conquistadores e marinheiros espanhóis (CLEMONS; SEEMAN, 2018).

São versáteis, podendo ser destinados à domesticação, alimentação ou pesquisa (ANDRADE et al., 2002). Antes de serem usados na pesquisa, já eram (e ainda são) fonte de alimento em vários locais da América do Sul. Nos Estados Unidos, são animais de companhia, como os cães, por exemplo (CLEMONS; SEEMAN, 2018).

Por muito tempo foram o símbolo da experimentação animal, principalmente na década de 60. Apesar de não continuar sendo o animal mais utilizado em experimentação, segue sendo muito popular devido à sua docilidade e tamanho pequeno (PRITT, 2012)

São utilizados para fins experimentais desde o século XVIII (ANDRADE et al., 2002), mas atualmente as principais áreas de pesquisa utilizam porquinhos-da-índia para experimentação com doenças infecciosas (COSTA et al., 2020), ensaios alergênicos (JIN et al., 2020), testes toxicológicos (VASILIEV et al., 2020) e como fonte de alimentação de carrapatos (MARTINS et al., 2012) e de mosquitos para manutenção de colônias (MAHAMOOD, 1999) e em testes de repelência (GUTA et al., 2018).

Como fonte de alimentação para carrapatos são utilizados apenas uma vez, por desenvolverem imunidade (resistência adquirida) às espécies de carrapatos após repetidas infestações. Há relatos de porquinhos-da-índia com resistência adquirida a larvas de várias espécies de carrapatos, incluindo espécies de *Amblyomma* (MCTIER et al., 1981; FIELDEN et al., 1992).

Possuem um sistema imunológico semelhante ao humano, o que o tornou o modelo ideal para estudos com riquetsioses desde o início do século XX (STOKES et al., 2020). Um exemplo é o estudo realizado por Costa et al. (2020), no qual infectaram porquinhos-da-índia experimentalmente (pela via intraperitoneal) com macerado de carrapatos oriundos de capivaras soropositivas para *R. rickettsii* e um dos nove animais infectados apresentou febre e soroconversão para *R. rickettsii*. O sangue desse animal foi coletado e inoculado em outros porquinhos-da-índia, os quais apresentaram, também, febre e soroconversão.

O porquinho-da-índia é considerado um parente próximo das capivaras, pois além de pertencer a mesma família, possuem comportamento, anatomia e fisiologia muito semelhantes (HEATLEY; RUSSELL, 2020).

Apesar de todo o problema citado anteriormente sobre o impacto negativo dos carrapatos em capivaras e, apesar de porquinho-da-índia possuir toda essa semelhança com capivaras e já ter sido utilizado em diversos experimentos com carrapatos, não foi encontrada na literatura nenhum dado acerca do controle de *A. sculptum* em nenhum desses dois mamíferos. De fato, poucos estudos *in vivo* foram encontrados com controle de *A. sculptum*, no entanto, há uma gama de publicações com diversas moléculas no controle de carrapatos em mamíferos que puderam nortear este trabalho.

2.6 Principais Grupamentos Antiparasitários Usados No Controle De Carrapatos Em Animais

A maioria dos fármacos com atividade antiparasitária utilizados atualmente foram desenvolvidos há mais de 20 anos, e o mercado é impulsionado em grande parte por medicamentos com perfis semelhantes (SELZER; EPE, 2021).

2.6.1 Amidinas

O grupamento das amidinas é representado pelo amitraz, que age nos sítios receptores de octopamina, causando hiperexcitabilidade neuronal e morte nos ectoparasitos (TAYLOR, 2001). No caso dos carrapatos, especificamente, causa desprendimento do hospedeiro, seguido de mortalidade ou redução do peso das teleóginas e da produção de ovos (HAIGH; GICHANG, 1980; DAVEY et al., 1984).

O amitraz é rapidamente absorvido e excretado, principalmente, na urina. Para bovinos, é indicado para banho ou pulverização e vendido na forma de concentrado emulsionável. Para cães, o amitraz está disponível para uso tópico (banho e coleira) e é contraindicado para equinos (TAYLOR, 2010).

Em todo o mundo já existem diversos relatos de resistência ao amitraz em diferentes populações do carrapato *R. microplus* (CHEVILLON et al., 2007; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2014; MUYOBELA et al., 2015; PETERMANN et al., 2016; KLAFKE et al., 2017; VALSONI et al., 2020). Também já existe relato de populações de *A. sculptum* (FREITAS et al., 2011) e *A. mixtum* (antes da mudança de nome/clatura acreditava-se que era *A. cajennense* s.s.) (ALONSO-DÍAZ et al., 2013) resistentes ao amitraz, apesar de não haver histórico de ter tido contato com o ativo.

2.6.2 Organofosforados

Os organofosforados são ésteres neutros derivados do ácido fosfórico ou seu análogo e atuam inibindo a ação da acetilcolinesterase nas sinapses colinérgicas e nas placas terminais musculares. Agem mimetizando a estrutura da acetilcolina e, quando se liga à acetilcolinesterase, provoca transforilação da enzima. A acetilcolinesterase transforilada é incapaz de quebrar a acetilcolina acumulada na membrana pós-sináptica, levando à paralisia neuromuscular do artrópode (TAYLOR et al., 2001).

Os organofosforados são considerados os mais tóxicos de todos os praguicidas para os vertebrados (MITCHELL, 1996).

No Brasil, os principais organofosforados usados no controle de carrapatos é o clorpirifós. Em estudo *in vitro* ambos foram eficazes no controle de larvas não alimentadas de *A. sculptum* (BORGES et al., 2020).

Já existem diversos relatos de resistência de diferentes espécies de carrapatos aos organofosforados, inclusive para *A. mixtum*, membro do Complexo *A. cajennense*. (ALONSO-DÍAZ et al., 2013). Nos EUA, devido à sua toxicidade relativamente alta para os vertebrados, os organofosforados foram proibidos (AGWUNOBI et al., 2021).

2.6.3 Lactonas macrocíclicas

Esse grupamento é composto pelas avermectinas e milbemicinas, que são produtos da fermentação macrocíclica de micro-organismos do gênero *Streptomyces* e possuem atividade endectocida (TAYLOR, 2010).

As avermectinas são representadas por abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina e selamectina, enquanto as milbemicinas por milbemicina oxima e moxidectina (VERCRUYSSSE; REW, 2002).

Atuam nos canais de cloreto controlados pelo glutamato, que está presente nas membranas neuronais e musculares de muitos invertebrados, provocando ataxia e paralisia nos insetos e nematoides (SARTOR; BICUDO, 1999).

Apesar de possuir atividade *in vitro* contra larvas não alimentadas de *A. sculptum* (BORGES et al., 2020), estudos *in vivo* mostraram que o uso indiscriminado da ivermectina no controle de nematoides em bovinos possibilitou que várias populações de carrapatos adquirissem resistência a essa molécula (ALEGRÍA-LÓPEZ et al., 2015). Apesar da molécula ter começado a ser comercializada no mercado mundial na década de 80 (VERCRUYSSSE; REW, 2002), 20 anos depois (MARTINS; FURLONG, 2001) até os

dias de hoje, esse fenômeno vem sendo relatado para o carrapato do boi *R. microplus* (KLAFKE et al., 2006; PÉREZ-COGOLLO et al., 2010; FERNÁNDEZ-SALAS et al., 2012; EL-ASHRAM et al., 2019; TORRENTS et al., 2020; VALSONI et al., 2020) e, mais recentemente, também para carrapatos trioxenos como *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto* (BECKER et al., 2019), *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (SUNKARA et al., 2021) e *Hyalomma anatolicum* (SHYMA et al., 2021).

2.6.4 Piretroides

As piretrinas naturais são derivadas do piretro, uma mistura de alcaloides da planta conhecida por “crisântemo”. São moléculas lipofílicas que sofrem rápida absorção, distribuição e excreção, fornecem excelente efeito *knockdown*, mas têm pouca atividade residual devido à sua instabilidade (WALL, 2001).

As piretrinas atuam no sistema nervoso central (SNC) do inseto, excitando e despolarizando as membranas celulares (TAYLOR, 2001).

Os piretroides são produtos químicos sintetizados modelados na molécula natural de piretrina, porém são mais estáveis e possuem maior potência do que as piretrinas naturais. Alguns dos piretróides mais comuns utilizados na medicina veterinária são permetrina, cipermetrina, deltametrina e flumetrina (WALL et al., 2001).

Possuem ação acaricida e inseticida e os períodos de proteção variam entre produtos e método de aplicação, mas geralmente duram até um mês e todas as formas farmacêuticas são de uso tópico (TAYLOR, 2001).

A resistência dos carrapatos aos piretróides foi relatada pela primeira vez no final da década de 80 no Brasil (LEITE, 1988) e até hoje vem sendo reportada em diferentes populações de *R. microplus* (VALSONI et al., 2020). Para carrapatos trioxenos também existem relatos de resistência às diferentes moléculas desses grupamentos (BECKER et al., 2019; SUNKARA et al., 2021), inclusive para *A. sculptum* (FREITAS et al., 2011).

Estudos *in vitro* realizados com carrapatos *A. sculptum* mantidos em colônias laboratoriais mostraram susceptibilidade das larvas frente aos piretróides desde 1989 (BITTENCOURT et al. 1989). Um estudo *in vitro* mais atual demonstrou que as larvas de *A. sculptum* ainda são mais sensíveis aos piretróides (cipermetrina > deltametrina > flumetrina) do que a outras moléculas como clorpirifós, coumafós, fipronil e ivermectina (BORGES et al., 2020).

2.6.5 Fenilpirazóis

O único composto desse grupamento utilizado no controle de carrapatos é o fipronil, que vem sendo utilizado desde os anos 90 no controle de infestações carrapatos em animais (DAVEY et al., 1998). Inibe não competitivamente o GABA, fixando-se ao receptor no interior do canal do cloro, inibindo o fluxo celular dos íons, anulando assim o efeito neuroregulador do GABA e causando a morte do parasito por hiperexcitação (VASYLIEVA et al., 2015). É altamente lipofílico e difunde-se nas glândulas sebáceas onde ficam reservadas, dando-lhe uma longa atividade residual (BIRCKEL et al., 1998).

Em estudo *in vitro*, o fipronil apresenta níveis de mortalidade de larvas de *A. sculptum* superiores a 98% a partir da concentração de 350µg.mL⁻¹ (BORGES et al., 2020).

Em 2007, houve o primeiro relato de resistência de carrapatos ao fipronil, relatado no Uruguai, para o carrapato *R. microplus* (CUORE et al., 2007) e, posteriormente, no Brasil, por Castro-Janer et al. (2010). Também há relatos de resistência de carrapatos trioxenos como *R. sanguineus s. s.* (BECKER et al., 2017).

2.6.6 Isoxazolinias

As isoxazolinias são representadas pelo afoxolaner, fluralaner, saronaler e lotilaner, que atuam inibindo os canais de cloreto de ácido γ -aminobutírico e de cloreto de glutamato de insetos e ácaros (SELZER; EPE, 2021) e seu componente ativo é o (S)-enantiômero (OZOE et al., 2010).

As isoxazolinias demonstraram contornar a resistência cruzada, devido à ligação distinta nos canais de cloreto (SELZER; EPE, 2021). Atualmente, possuem aprovação para uso apenas em cães, gatos, galinhas e bovinos (MAPA, 2023).

Apenas dois estudos *in vivo* utilizaram isoxazolinias por via oral para demonstrar sua eficácia no controle do carrapato *A. sculptum*. Ambos os estudos foram controlados com infestações em cães da raça beagle com ninfas não alimentadas. O primeiro estudo utilizou o sarolaner (2mg/kg) (SCOTT et al., 2017) e o segundo estudo utilizou o lotilaner (20mg/kg) (LASMAR et al., 2018). Os dois apresentaram resultados semelhantes, com 100% de eficácia 48h após o tratamento e mantendo níveis superiores a 99% até o final do estudo (30 e 35 dias pós-tratamento, respectivamente).

2.6.7 Reguladores/Disruptores do Crescimento de Insetos

O termo “reguladores de crescimento de insetos” (IGRs) (do inglês “insect growth regulators”) foi introduzido na literatura no início dos anos 70 e era usado para se referir

aos hormônios análogos ou antagonistas que regulavam o crescimento e o desenvolvimento dos insetos. Como as substâncias que interferem no crescimento, muda e metamorfose dos insetos não regulam, mas “desregulam” o desenvolvimento normal, Pener e Dhadialla (2012) sugeriram uma mudança no termo para “disruptores do crescimento de insetos” (do inglês “insect growth disruptors”), já que os produtos químicos do grupamento causam disrupção, invés de uma regulação no crescimento e desenvolvimento dos insetos.

Segundo o dicionário Michaelis (2022), a palavra “disruptor” significa “romper”, “quebrar”, e “disrupção” significa “ato ou efeito de romper(-se); quebra de um curso normal de um processo”. O termo “disruptores endócrinos” (endocrine disruptors) é muito utilizado na endocrinologia humana para se referir a substâncias que agem por mecanismos fisiológicos substituindo os hormônios do corpo humano ou bloqueando a sua ação natural ou aumentando ou diminuindo a quantidade original de hormônios, alterando as funções endócrinas (WAISSMAN, 2002).

Levando tudo isso em consideração, é possível que Pener e Dhadialla (2012) tenham sugerido a modificação do nome do grupamento devido, também, a alguns de seus ativos serem análogos do hormônio juvenil.

Apesar da sugestão de mudança de nome do grupamento pelos autores, poucos trabalhos adotaram o termo proposto e continuaram usando IGRs. Independente do argumento de Pener e Dhadialla ter sentido, para seguir a maioria dos trabalhos recentemente publicados, aqui também será adotado o termo IGRs.

Os reguladores de crescimento de insetos são constituídos por compostos químicos que não matam o parasita alvo diretamente, mas interferem no crescimento e desenvolvimento de estádios imaturos, não sendo adequados para o controle rápido de populações na fase adulta. Com base no seu mecanismo de ação, podem ser divididos em: análogos dos hormônios juvenis; inibidores da deposição de quitina (derivados da triazina e da pirimidina); e inibidores de síntese de quitina (benzoilfeniluréias) (GRAF, 1993).

Quando comparados as outras classes, possuem a vantagem de atuarem sobre mecanismos fisiológicos e bioquímicos específicos de artrópodes que estão ausentes em vertebrados, o que os torna praticamente atóxicos para mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (SUN et al., 2015).

2.6.7.1 Análogos do hormônio juvenil

Os principais análogos do hormônio juvenil são metoprene, fenoxicarbe e piriproxifen. Agem impedindo a metamorfose para o estágio adulto, se ligando aos receptores de hormônio juvenil, e por serem estruturalmente diferentes, não são destruídos. Assim, a metamorfose e o desenvolvimento para o estágio adulto não ocorrem (DHADIALLA; CARLSON, 1998).

O metoprene possui baixa toxicidade para mamíferos (TAYLOR, 2001) e é amplamente usado no controle de insetos, principalmente dípteros (WIJAYARATNE et al., 2018).

O fenoxicarbe é mais indicado no controle de insetos, impedindo que as larvas consigam eclodir dos ovos (TAYLOR, 2001), mas também possui ação contra carrapatos moles do gênero *Argas* interferindo no desenvolvimento dos ovos e na muda de ninfas (AHMED et al., 2009; RADWAN et al., 2009; BAKR et al., 2018), mas parece não ter ação sobre ovos de carrapatos duros (SLUSSER; SONESHINE, 1992).

O piriproxifen é usado no controle de insetos, principalmente mosquitos, demonstrando ação ovicida e larvicida (INVEST; LUCAS, 2008; PENER; DHADIALLA, 2012). Já *in vitro*, foi capaz de impedir a eclosão dos ovos e a sobrevivência das larvas de *Amblyomma americanum* (TEEL et al., 1996) e, também, teve ação ovicida e larvicida, além de diminuir o índice reprodutivo de fêmeas de *R. (annulatus)* (ABOELHADID et al., 2018).

2.6.7.2 Inibidores da deposição de quitina

Os derivados da triazina e da pirimidina agem alterando a deposição de quitina na cutícula dos insetos (FRIEDEL et al., 1989) e seus principais representantes são a ciromazina e o diciclanil, respectivamente. Não possuem ação contra carrapatos (TAYLOR, 2001).

2.6.7.3 Inibidores de síntese de quitina

As benzoilfenilureias são inibidores da síntese de quitina comumente usados na agricultura, dos quais vários foram introduzidos para o controle de ectoparasitos em animais. A quitina é um aminopolissacarídeo complexo e um componente importante da cutícula do artrópode (COHEN, 1993). As fases imaturas dos artrópodes, quando expostas a esses compostos, não conseguem completar a muda e acabam morrendo. Os adultos expostos produzem ovos normalmente, mas as larvas recém-desenvolvidas são incapazes de eclodir dos ovos.

Os inibidores da síntese da quitina possuem amplo espectro de atividade contra insetos, mas têm uma eficácia relativamente baixa contra carrapatos e ácaros (GRAF, 1993), com exceção do fluazuron, que tem maior atividade contra carrapatos e algumas espécies de ácaros (BULL et al., 1996).

As benzoilfenilureias são moléculas altamente lipofílicas e se acumulam na gordura corporal do hospedeiro e são lentamente liberadas na corrente sanguínea e excretadas, em grande parte, inalteradas pelas fezes (GRAF, 1993).

O lufenuron é administrado por via oral e é utilizado para o controle de pulgas de cães e gatos (GRAF, 1993). A droga se acumula no tecido adiposo, permitindo uma liberação lenta. As pulgas levam a droga através do sangue durante o repasto sanguíneo e transferem para os ovos, que não se tornam viáveis a partir de 24 horas da administração (DEAN et al., 1999). A formação de estruturas de quitina da larva é bloqueada, inibindo o desenvolvimento de larvas de pulga e proporcionando controle ambiental da população de pulgas (BLAGBURN et al., 1995).

O fluazuron é comercializado para ser usado pela via tópica e não afeta diretamente os diferentes estágios de carrapatos, mas interfere nos processos de muda e eclosão dos ovos. Essa atividade é bem-sucedida no controle de carrapatos monoxenos como *R. microplus*, que permanecem durante toda a fase parasitária no mesmo animal. As larvas que se alimentarem no animal tratado com fluazuron não sofrerão muda para a fase de ninfa, assim como as ninfas não sofrerão muda para a fase adulta. As teleóginas, apesar de não terem seu repasto sanguíneo afetado, irão produzir ovos com larvas que não irão emergir (GRAF, 1993; JUNQUERA et al., 2019).

No Brasil, existem apenas dois relatos de resistência de carrapatos *R. microplus* ao fluazuron devido ao uso massivo no Rio Grande do Sul (RECK et al., 2014) e no Mato Grosso do Sul (VALSONI et al., 2020; VALSONI et al., 2021). Além disso, há relato de quatro populações de *R. microplus* com baixa susceptibilidade ao fluazuron, sendo uma em Minas Gerais, uma em São Paulo, e duas no Mato Grosso do Sul e todas com histórico de uso prolongado do fluazuron “pour-on” (MACIEL et al., 2016). Felizmente ainda não há relatos de resistência de outras espécies de carrapatos.

Cerca de 62 a 81% do fluazuron aplicado é excretado inalterado nas fezes dos animais tratados (FAO, 1998). Portanto, uma parte significativa do produto aplicado é transferida para o solo, podendo causar importantes impactos no meio ambiente. Devido a isso, o fluazuron vem sendo alvo de estudos sobre os impactos que pode causar no meio ambiente.

Alves et al. (2019) avaliaram os efeitos do fluazuron em solo artificial tropical na sobrevivência, reprodução e comportamento dos invertebrados do solo *Folsomia candida* e *Eisenia andrei*, por meio de ensaios toxicológicos. O fluazuron mesmo em concentrações baixas foi capaz de reduzir a reprodução desses invertebrados e, além disso, em concentrações ainda menores foi observado comportamento de evitação, indicando que o fluazuron pode afetar a função do habitat do solo. Ainda assim, outros ativos como o fipronil e a ivermectina, por exemplo, possuem uma toxicidade muito mais elevada do que o fluazuron (ZORTÉA et al., 2017).

Já um estudo realizado por Kryger et al. (2005) na África do sul, avaliou o efeito ecotoxicológico do fluazuron sobre a fauna de besouros “rola-bosta” (escaravelhos). Para isso, trataram alguns rebanhos de novilhas com fluazuron (3mg/kg) e monitoraram as populações do besouro daqueles locais durante um ano. Segundo os autores, a quantidade e a diversidade de espécies não foram afetadas. Como também relataram que o ano de avaliação foi mais chuvoso do que o normal, atribuíram que a noção dos impactos ecotoxicológicos dos antiparasitários depende de fatores como condições climáticas, escala espacial de tratamento e proporção de animais tratados.

O fluazuron realmente parece não ser prejudicial para o besouro “rola-bosta” (*Onthophagus gazela*) já que, Kryger et al. (2007) também trataram bovinos com a dose de 3mg/kg e avaliaram os possíveis efeitos na sobrevivência e reprodução desses besouros e, ao final do estudo também observaram que não houve diferença significativa na sobrevivência de adultos ou larvas, produção de ovos, fecundidade e fertilidade entre o grupo controle e tratamento após três gerações de besouros.

De acordo com um levantamento realizado pela World Health Organization (WHO), em doses de até 1000mg/kg de peso corporal por dia, o fluazuron não induziu toxicidade materna, embrionária ou fetal e não foi teratogênico para ratos e coelhos. Em porquinhos-da-índia expostos ao fluazuron para estudos de toxicidade dérmica, não foram observadas sensibilização da pele após desafios com fluazuron de grau técnico por via intradérmica ou epidérmica. Como o fluazuron pertence a uma classe que não atua no sistema nervoso central, o Comitê WHO concluiu que estudos de neurotoxicidade eram desnecessários (PRONK; SCHEFFERLIE, 1997).

2.7 O Uso do Fluazuron Pela Via Tópica No Controle De Carrapatos Em Animais

No Brasil existem apenas três apresentações comercializadas contendo somente fluazuron para uso tópico (pour on) em animais: Tackzuron®, Acatak® e Neox®, sendo os dois primeiros a 2,5% e o terceiro a 5% e todas indicadas para uso em animais de produção.

Martins et al. (1995) avaliaram o uso do fluazuron “pour-on” em bovinos 21 dias após a infestação artificial com uma população de *R. microplus* mantida em laboratório. Um grupo foi tratado com a dose de 1mg/kg (G1) e outro com a dose de 2mg/kg (G2). As teleóginas coletadas a partir do d+7 para o G1 e do d+ 2 para o G2, apesar de vivas, não fizeram postura e apresentaram alterações morfológicas (forma, tamanho e aspecto). Os autores relataram flacidez na cutícula, que favorecia seu rompimento quando manipuladas.

Para avaliar eficácia e a sensibilidade de ninfas de *R. sanguineus* expostas ao fluazuron, Oliveira et al. (2012a) trataram coelhos pela via tópica (“pour on”) com 13 doses diferentes (1,25; 2,5; 5; 10; 15; 20; 30; 40; 60; 80 e 100 mg/kg). O bioensaio revelou que as ninfas de *R. sanguineus* são sensíveis a todas as doses de fluazuron testadas, embora a mortalidade tenha sido significativamente diferente. A porcentagem de ninfas mortas (0,5-95%) aumentou diretamente com as doses. O aumento progressivo da mortalidade ocorreu até 100 mg/kg, obtendo dose letal de 95% (DL95) dos carrapatos expostos. Nos grupos tratados com as duas doses mais altas (125 e 150 mg/kg), o número de ninfas mortas diminuiu para 80% e 62%, respectivamente.

Ainda sobre o estudo de Oliveira et al. (2012a), as primeiras ninfas a ingurgitar e desprender do hospedeiro tratado (5º dia) foram mais afetadas pelo fluazuron do que aquelas que se desprenderam no 7º dia. No entanto, essa diferença só foi observada a partir da dose de 15 mg/kg. Em alguns tratamentos, como na dose de 100 mg/kg, a porcentagem de ninfas desprendidas mortas no primeiro dia foi de 95%, contra 81% no segundo dia. As ninfas dos tratamentos com doses de 10 a 150 mg/kg de fluazuron exibiram alterações morfológicas e comportamentais, como menor tamanho, formato elíptico, idiossoma curvo, tegumento frágil e friável, cristas dorsal e ventral não bem definidas e letargia. As ninfas que foram capazes de mudar para a fase adulta tinham uma fina camada da cutícula anterior ligada à nova cutícula. As ninfas mortas estavam murchas e escurecidas.

Oliveira et al. (2012a) também observaram que o período de ingurgitamento dos animais do grupo controle foi mais curto (5 a 6 dias) contra 7 a 8 dias nos grupos tratados, no entanto, o tamanho dos indivíduos ingurgitados nos grupos tratados foi menor em

comparação com os espécimes recuperados dos coelhos do grupo controle. O período de muda tornou-se gradualmente mais longo, quando comparado ao do grupo controle, à medida que as doses de fluazuron aumentaram.

O mesmo grupo de autores (Oliveira et al., 2012b) reproduziu um outro estudo para demonstrar os efeitos do fluazuron na formação do tegumento e nos processos digestivos de ninfas também de *R. sanguineus* alimentadas em coelhos tratados com as doses de 20, 40 ou 80 mg/kg (“pour on”). Os coelhos foram infestados 24h após o tratamento e sete dias após a infestação as ninfas ingurgitadas foram removidas e incubadas. Após sete dias, as ninfas ingurgitadas passaram por análises morfológicas, histoquímicas e histológicas. Os resultados mostraram a ocorrência de alterações citológicas, morfo-histológicas e histoquímicas no tegumento e intestino médio de ninfas de todos os diferentes grupos tratados. Essas alterações ocorreram em nível cuticular nas subdivisões da cutícula, relacionadas ao tamanho das células digestivas, quantidade de elementos sanguíneos acumulados e resíduos digestivos, bem como a presença de vacúolos no citoplasma das células digestivas. Ou seja, o fluazuron é capaz de atuar sobre as células do tegumento e do intestino médio de ninfas de *R. sanguineus*.

Calligaris et al. (2013) e Oliveira et al. (2014) seguiram a mesma metodologia realizada por Oliveira et al. (2012b), mas os primeiros realizaram uma análise ultramorfológica das ninfas ingurgitadas recuperadas de *R. sanguineus*, enquanto o segundo realizou uma análise ultraestrutural da formação da cutícula e dos processos digestivos.

Os resultados obtidos por Calligaris et al. (2013) revelaram alterações na ultramorfologia de muitas estruturas quitinosas (hipostômio e quelíceras menores, escudo menos esclerotizado, menos poros, ausência de sulcos, faixas marginais e cervicais e festões no corpo, até mesmo a placa anal danificada) que desempenham papéis essenciais para a sobrevivência dos carrapatos e que podem comprometer o desenvolvimento total ou parcial das ninfas e a emergência dos adultos após a muda periódica.

Já Oliveira et al. (2014), observaram desorganização da cutícula e ausência de subdivisões, danos nas células epiteliais do tegumento, tamanho das células digestivas, quantidade de endossomos, vacúolos autofágicos e digestivos, resíduos digestivos acumulados, gotículas lipídicas e organelas encontradas no citoplasma das células digestivas, bem como a presença de microvilosidades em suas membranas plasmáticas. Por fim, concluíram que o fluazuron pode atuar nas células do tegumento e do intestino médio de ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus*, prejudicando a síntese da nova cutícula e

os processos digestivos (absorção do sangue ingerido do hospedeiro, digestão – hemólise, formação de resíduos digestivos e liberação de nutrientes para serem convertidos em lipídios, bem como para a síntese de proteínas estruturais). Devido às alterações encontradas por Calligaris et al. (2013) e por Oliveira et al. (2014), ambos concluíram que o fluazuron interfere no desenvolvimento das ninfas de *R. sanguineus*, podendo prevenir o surgimento de adultos.

Cruz et al. (2014) avaliaram os efeitos deletérios de duas formulações contendo fluazuron sobre os parâmetros reprodutivos de teleóginas de *R. microplus* recuperadas de bovinos artificialmente infestados. Um grupo de bovinos foi tratado com a formulação contendo apenas fluazuron (2,5mg/kg) e um outro grupo foi tratado com a associação contendo fluazuron (3mg/kg) e abamectina (0,5mg/kg). No grupo em que os animais foram tratados apenas com o fluazuron, só foram observados efeitos deletérios no percentual de eclodibilidade dos ovos em que as teleóginas recuperadas entre os dias experimentais +2 e +7 ovipuseram. Já nos carrapatos do grupo de bovinos tratado com a associação de fluazuron e abamectina, foi observado peso inferior das teleóginas desprendidas, peso inferior das massas de ovos, menor eclodibilidade, quando comparado ao grupo controle.

Gomes et al. (2015) compararam a eficácia do fluazuron administrado por via tópica (“pour on”, 2,5mg/kg) e da associação contendo fluazuron (1,6mg/kg) + ivermectina (0,63mg/kg) administrado pela via subcutânea para controlar o carrapato *R. microplus* em bovinos infestados naturalmente e artificialmente. O primeiro grupo teve alta eficácia acaricida nos animais infestados artificialmente, com níveis acima de 98% do dia +15 até o +63, enquanto o grupo tratado com a associação injetável teve eficácia máxima de 76,8% ao longo de todo o estudo. Já nos animais naturalmente infestados, o fluazuron tópico teve eficácia acima de 94,4% apenas do dia +15 ao +49 e o grupo contendo a associação de fluazuron com ivermectina empregados pela via subcutânea atingiu eficácia máxima de 82,4% ao longo de todo o estudo. Os autores não relataram alterações morfológicas nos carrapatos recuperados dos animais dos grupos tratados.

Para avaliar possíveis alterações no metabolismo de carboidratos de *R. microplus* expostos ao fluazuron, Gaudêncio et al. (2016) quantificaram a concentração de glicose e avaliaram a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) na hemolinfa das teleóginas. As teleóginas foram recuperadas de bovinos tratados com fluazuron (“pour on”, 2,5mg/kg) nos dias +4, +8 e +15. Os resultados encontrados pelos autores comprovam que há perda da homeostase glicêmica na hemolinfa de teleóginas, sugerindo

que a sobrevivência do carrapato depende da ativação de mecanismos fisiológicos compensatórios. O aumento da atividade da LDH associado ao aumento dos níveis de ácido láctico na hemolinfa, indicam que o metabolismo anaeróbio fermentativo é uma estratégia metabólica empregada por este artrópode em resposta a condições de estresse fisiológico.

Comumente o fluazuron é empregado em associação a alguma molécula de ação carrapaticida com o objetivo de minimizar o problema da resistência. Um exemplo disso um estudo que avaliou a eficácia carrapaticida e preventiva da associação de abamectina (600mcg/kg) com o fluazuron (3mg/kg) em bovinos artificialmente infestados com *R. microplus*. Nesse estudo, os autores ressaltaram que enquanto a abamectina permitiu uma eficácia inicial elevada a partir do quinto dia pós-tratamento, o fluazuron determinou uma ação na prevenção contra reinfestações por larvas, com níveis superiores a 90% por até 63 dias. Isso ocorre porque o fluazuron atua principalmente sobre larvas e ninfas, impedindo sua muda e, conseqüentemente, diminuindo a recuperação de teleóginas a longo prazo, mesmo quando a eficácia da abamectina estiver reduzida (ROCHA et al., 2017).

Apesar de também não ser apenas com o uso do IGR, um estudo recente avaliou os efeitos de uma formulação comercial contendo fipronil (1,25 mg/kg) + fluazuron (2,5 mg/kg) e demonstrou que a formulação afetou a biologia reprodutiva, causou alterações morfológicas nos ovários e reduziu o número de oócitos de teleóginas de *R. microplus* (SECCHIS et al., 2022).

Lopes et al. (2017) fizeram alguns estudos para avaliar o espectro ectoparasiticida e para determinar os parâmetros farmacocinéticos de uma combinação “pour-on” de fipronil (1,25mg) + fluazuron (2,5mg/kg) em bovinos, para o controle de *R. microplus*. Para avaliação da eficácia no controle do carrapato, usaram um grupo controle e três tratados, sendo um com a associação, outro só com fipronil (1mg/kg) e outro só com o fluazuron (2,5mg/kg). A população de carrapatos foi considerada suscetível tanto ao fipronil quanto ao fluazuron. Todas as formulações demonstraram valores de eficácia $\geq 90\%$ de oito a 42 dias pós-tratamento. No entanto, foi possível observar que a combinação também apresentou maior eficácia terapêutica e residual contra *R. microplus* quando comparada com formulações comerciais independentes que foram administradas separadamente.

As análises de fluazuron foram realizadas por cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) e obtiveram concentração máxima (C_{max}) do fluazuron no plasma dos

bovinos de 26,1 µg/L, T_{max} de 6 dias, área sob a curva (AUC_{42d}) de 10472,64 µg-hr/L e meia-vida (t_{1/2}) de 24,5 (±3,5) dias após a administração (LOPES et al., 2017).

Apesar do uso corriqueiro de formulações “pour-on” para o controle de carrapatos, não há muitos estudos sobre a influência da chuva na eficácia desses produtos. Zapa et al. (2020), por exemplo, avaliaram se a eficácia terapêutica e residual do fluazuron “pour-on” (2,5 mg/kg) em bovinos infestados por *R. microplus* seria influenciada sob condição de chuva simulada quatro ou quatro e 24h após o tratamento. Observaram que a eficácia residual foi menor em animais submetidos à chuva simulada quatro e 24 h após o tratamento (Figura 2). Confirmando que as variáveis meteorológicas, como a chuva, podem afetar a eficácia do produto aplicado pela via tópica.

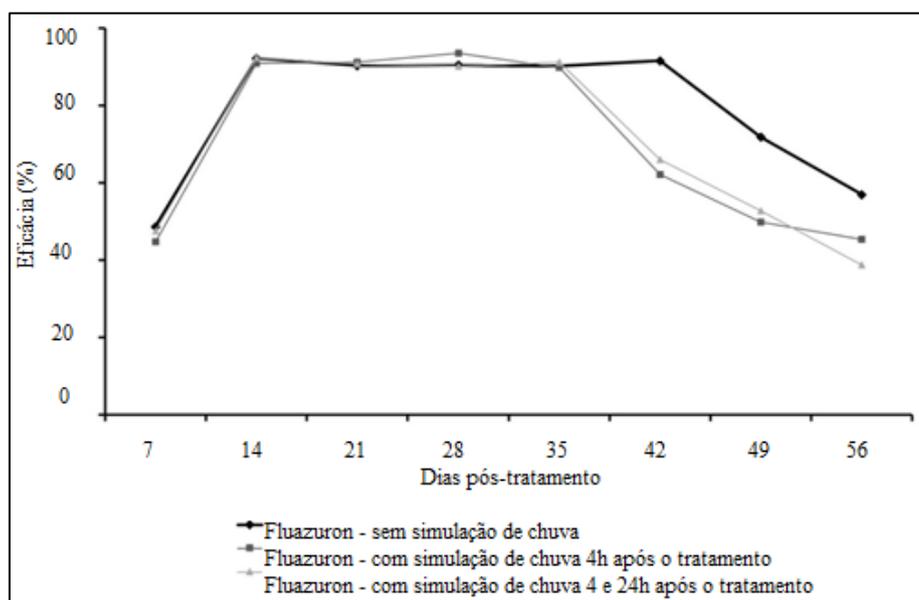


Figura 2. Eficácia do fluazuron “pour-on” após simulação de chuva no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* em bovinos (ZAPA et al., 2020).

2.8 O Uso do Fluazuron Pela Via Oral No Controle De Ectoparasitos Em Animais

Pasay et al. (2012) publicaram um trabalho com o uso do fluazuron para o controle de *Sarcoptes scabiei* em porcos artificialmente infestados. Dos cinco animais utilizados, dois eram controle e três tratados. Os animais do grupo tratado receberam a solução oral de fluazuron (formulação comercial Acatak® - 25mg/mL) oito semanas após a infestação. Os animais foram tratados uma vez ao dia, por 7 dias consecutivos, na dose de 10mg/kg/dia.

O fluazuron foi rapidamente absorvido, com um rápido aumento dos níveis plasmáticos 24 horas após a administração oral. Os picos foram atingidos no dia +7 com níveis entre 300 e 800 ng/mL. Os níveis sanguíneos de fluazuron permaneceram detectáveis por 28 dias após o início do tratamento. Houve diminuição na contagem de ácaros nos animais tratados, principalmente dos estágios imaturos. Houve interrupção da progressão clínica da sarna, no entanto, não houve melhora completa das lesões e tampouco a eliminação total nas contagens de ácaros. Os autores atribuíram o resultado devido ao fato de que os ácaros, diferente dos carrapatos, não se alimentam de sangue e, portanto, podem ter sido expostos a níveis baixos de fluazuron (PASAY et al. 2012).

O fluazuron, assim como outros reguladores de crescimento de insetos, vem sendo amplamente utilizados por via oral para o controle de ectoparasitos de roedores selvagens.

Trabalhos utilizados para o controle químico de ectoparasitos em roedores selvagens utilizam um sistema liberação de fármacos e estão citados no tópico 2.10.

2.9 Sistemas de Liberação de Fármacos para Animais Selvagens

Os sistemas de liberação de fármacos para animais selvagens (do inglês “delivery systems for wildlife”) são utilizados para administração de vacinas, antibióticos, ectoparasiticidas, anestésicos e analgésicos. Para os animais selvagens que são considerados pragas, são fornecidos agentes de controle de fertilidade em substituição aos métodos de controle letais utilizados antigamente (MCDOWELL, 2013).

Existem diferentes tipos de sistemas desenvolvidos relatados que podem ser usados remotamente, como: dardos com seringas para injetar substâncias líquidas à distância (TARMIZI; ZAINUDDIN, 2020); munição termoplástica biodegradável para aplicação de vacina viva (CHRISTIE et al., 2006); iscas orais para administração de medicação ou vacina viva, disponibilizadas em dispositivo próprio (MASSEI et al, 2010) ou diretamente no ambiente (COWLED et al., 2006; ROSATTE et al., 2011).

Apesar de alguns desses sistemas já serem amplamente empregados, a administração à campo para animais selvagens, principalmente em áreas inacessíveis, ainda é um desafio. Outra consideração importante que deve ser levada para a implementação do sistema é o custo, principalmente quando a população alvo é grande e ocorre em uma área extensa e remota (MCDOWELL, 2013).

Se tratando de um sistema de liberação oral, dependendo do que será administrado, deve-se levar em consideração a especificidade do alvo, já que várias

espécies de animais de vida livre coexistem em um ecossistema natural e podem, por exemplo, ser afetadas pelo composto ativo empregado (BENGSEN et al., 2008).

Para minimizar o consumo por espécies não-alvos, Cowled et al. (2006) desenvolveram uma formulação em iscas (PIGOUT®) para porcos selvagens, contendo cereais com sabor peixe para atraí-los, mas adicionaram uma coloração verde escura para que outras espécies, principalmente as aves, não fossem atraídas pelas iscas.

Slowik et al. (2001) e Davis et al. (2008) adicionaram um corante vermelho nas iscas que formularam para roedores selvagens para que pudessem monitorar seu consumo através da coleta das fezes no ambiente em que frequentam e, com isso, ambos puderam perceber que outras espécies não alvo também foram atraídas e consumiram as iscas.

No entanto, além de ser atrativa, uma isca deve ser palatável e conter dose suficiente do ativo para que seja capaz de atingir o efeito desejado na espécie-alvo (MCDOWELL, 2013). Morgan (2004), em seu estudo para o controle de populações de gambás usando iscas palatáveis, relata a importância do fornecimento de iscas placebo previamente para que os animais aprendam onde encontrá-las (MORGAN, 2004).

Também é importante conhecer o comportamento do animal alvo como, por exemplo, locais que frequentam e horário preferencial de alimentação, para evitar um resultado desfavorável como o relatado por Davis et al. (2008), quando os esquilos do gênero *Tamias* não consumiram a quantidade adequada de iscas fornecidas, por seus hábitos alimentares ocorrerem no amanhecer e as iscas terem sido fornecidas no entardecer.

A questão da palatabilidade deve ser levada em consideração principalmente quando algum dos ingredientes ativos utilizados for amargo (MCDOWELL, 2013), como é o caso do fluazuron, por exemplo.

Para minimizar o sabor amargo do fluazuron, Slowik et al. (2001) adicionaram manteiga de amendoim na formulação (isca) a ser oferecida para ratos do gênero *Neotoma* e, para monitorar o consumo da isca pelos roedores, também foi adicionado um corante vermelho fluorescente, para deixar as fezes pigmentadas.

Os sistemas de liberação de fármacos para animais selvagens devem ser capazes de proteger o composto ativo, sem comprometer a sua eficácia, já que a formulação estará sujeita a condições ambientais extremas (variação de temperatura e umidade, chuva, luz ultravioleta e contaminação microbiana), como é esperado em uma situação de campo, (MCDOWELL, 2006).

Para obter essa proteção das iscas que são disponibilizadas no ambiente, geralmente utilizam-se ceras, principalmente a parafina. A parafina é atóxica e possui propriedades termoplásticas e de resistência à água (FREUND et al., 1982).

2.10 Sistema de Liberação de Fármacos Ectoparasiticidas em Iscas para Animais Selvagens

Há mais de 20 anos diversos trabalhos vêm sendo publicados com sistemas de liberação de fármacos para o controle de infestações principalmente por pulgas e carrapatos para roedores selvagens, sendo a maioria com benzoilfenil ureias e todos com o mesmo objetivo final: diminuir a população de ectoparasitos vetores de micro-organismos causadores de doenças letais ao homem. Nenhum dos artigos publicados possui o objetivo de controlar o carrapato *A. sculptum*.

Slowik et al. (2001) realizaram um estudo a campo na Califórnia (EUA) no qual disponibilizaram iscas contendo fluazuron (40mg/isca) para ratos do gênero *Neotoma* (“ratos trocadores”), com o objetivo de avaliar a eficácia no controle de pulgas e carrapatos nesses animais. As iscas eram disponibilizadas nos ninhos dos animais e, para avaliação da eficácia, os ratos eram capturados e os espécimes de pulgas e carrapatos coletados e identificados. A avaliação foi feita para as seguintes espécies de carrapatos: *Dermacentor occidentalis*, *Ixodes pacificus*, *Ixodes spinipalpis* e *Ixodes woodi*. Apesar da isca ter sido eficaz no controle de pulgas, não houve eficácia no controle de carrapatos ao longo dos quatro meses de avaliação.

Um estudo semelhante ao anterior foi realizado em uma área de acampamento na Califórnia (EUA) por Davis et al. (2008), mas com o objetivo de controlar apenas pulgas em roedores selvagens dos gêneros *Neotoma*, *Peromyscus*, *Spermophilus* e *Tamias*, utilizando o fluazuron e o lufenuron. As iscas desenvolvidas tinham 40mg de fluazuron ou 60mg de lufenuron em sua composição e eram disponibilizadas próximas as tocas desses roedores. Ao longo dos anos de avaliação do estudo, os autores observaram que as contagens de pulgas diminuíram em todos os roedores avaliados, exceto nos esquilos do gênero *Tamias*. Os próprios autores ressaltaram que a não diminuição das contagens de pulgas desses esquilos pode estar relacionada ao fato deles terem fornecido as iscas nos horários que os animais não costumam se alimentar (causando um baixo consumo) e, não pela ineficácia da formulação.

Um estudo com uma outra benzoilfenil ureia (lufenuron) foi conduzido a campo na Califórnia (EUA) por Davis (1999) com o objetivo de controlar infestações por pulgas

em esquilos *Spermophilus beecheyi*. O autor desenvolveu uma isca palatável contendo lufenuron no formato de cubos de gelo – posteriormente a formulação serviu de base para o desenvolvimento de outras iscas em diversos trabalhos. Cada isca continha 15mg de lufenuron (± 30 mg/kg) e foram distribuídas em todas as tocas durante seis meses.

Para as contagens de pulgas os animais eram capturados em armadilhas e anestesiados. Posteriormente uma amostra de sangue era coletada por punção cardíaca de alguns animais e acondicionada em tubos contendo EDTA para análise dos níveis de lufenuron no sangue dos animais através de HPLC (DAVIS, 1999).

Das 29 amostras coletadas por Davis (1999), apenas 6 (21%) demonstraram um nível sanguíneo de lufenuron de 50 ng/ml. Das 5 amostras coletadas 15 dias após o tratamento, 4 (80%) demonstraram níveis de 50 ng/ml (71, 126, 132 e 482 ng/ml). No entanto, de 24 amostras coletadas 29-32 dias após o tratamento, apenas 2 (8%) apresentaram níveis de 50 ng/ml (307 e 1.200 ng/ml). Apesar disso, a eficácia no controle de pulgas nesses esquilos atingiu 96% após o quarto tratamento.

Apesar de não ser com um regulador de crescimento, um estudo realizado no estado de Colorado (EUA) avaliou a eficácia a campo de uma isca contendo fipronil no controle de pulgas em esquilos *Cynomys ludovicianus*. A isca foi desenvolvida em formato de grãos na concentração de 0,005% de fipronil (50mg/kg) e a concentração foi confirmada antes do início do estudo a campo por HPLC. A concentração média de fipronil na isca foi de $54,9 \pm 1,5$ mg/kg ((n=4, recuperação = 98%, Coeficiente de variação (CV) = 2,64%). Para avaliação da eficácia, utilizaram a mesma metodologia empregada por Davis et al. (1999). A isca foi eficaz no controle de pulgas nos esquilos, com eficácia mantida entre 95 e 100% por cerca de 30 dias após o tratamento (POCHÉ et al. 2017).

Outro estudo realizado por Poché et al. (2018) a campo no Cazaquistão, utilizou a mesma isca que Poché et al. (2017) para avaliar sua eficácia no controle de pulgas (*Xenopsylla* spp.) e de flebotomíneos (*Phlebotomus* spp.) em gerbis (esquilos *Rhombomys opimus*). A concentração média de fipronil na isca foi determinada por HPLC em 51,1 mg/kg (n = 4, recuperação = 102%). Para determinação da eficácia no controle de pulgas, os gerbis foram capturados, penteados e o número de espécimes de pulgas identificados e contados. Para a determinação da eficácia no controle dos flebotomíneos, foi utilizada uma armadilha de luz. As iscas foram disponibilizadas no dia 0 e +5. As iscas contendo fipronil foram 100% eficazes no controle de pulgas *Xenopsylla* spp. em gerbis por, pelo menos, 80 dias. O resultado no controle de fêmeas de flebotomíneos foi inconsistente,

pois cada espécie de *Phlebotomus* apresentou uma eficácia diferente, levando os autores a concluir que o método não foi adequado para seu controle.

Em um estudo controlado realizado em laboratório, Poché et al. (2020) avaliaram a eficácia de uma isca em bloco contendo parafina e fipronil (0,005%) no controle de *Ixodes scapularis* em camundongos *Peromyscus leucopus*. Antes de oferecer as iscas aos camundongos, a concentração de fipronil foi verificada por HPLC. A concentração média de fipronil foi de $47,8 \pm 4,65$ mg/kg (CV: 9,73%; Recuperação: 95,6%).

Para o estudo citado acima, 60 camundongos foram divididos em 3 grupos tratados e 3 grupos controle. Todos os animais tratados tiveram sua comida retirada e receberam apenas isca contendo 0,005% de fipronil por 48h. Os camundongos dos grupos controle não tiveram sua comida retirada. Após a retirada das iscas, os animais foram infestados com larvas não alimentadas de *I. scapularis* em um dos seguintes tempos: um grupo controle (CD1) e um grupo tratado (TD1) foram infestados no dia 1 após retirada das iscas. Outro grupo controle (CD9) e outro grupo tratado (TD9) foram infestados no dia 9. Um terceiro grupo controle (CD15) e tratado (TD15) foram infestados no dia 15 (POCHÉ et al., 2020).

Para a fixação das larvas de *I. scapularis*, os camundongos foram anestesiados. Em seguida, cada camundongo teve a região dorsal (omoplata) tricotomizada e então um aparato feito com $\frac{1}{4}$ de um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL foi fixado utilizando uma mistura de resina e cera de abelha natural (proporção de 3:1). Aproximadamente 40 larvas foram aplicadas em cada aparato usando um pincel de ponta fina e, então, uma tampa de plástico perfurada com orifícios foi fixada a cada abertura da cápsula. As larvas foram monitoradas continuamente durante os próximos 4 dias consecutivos (POCHÉ et al. 2020).

Dezesseis camundongos foram selecionados para coleta de sangue para determinação da concentração plasmática do fipronil (CP). Antes da coleta os animais foram eutanasiados. Aproximadamente 100 μ L de sangue foram coletados de cada animal por meio de punção cardíaca. As amostras de plasma foram analisadas para CP de fipronil usando um procedimento validado de cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC/MS) (POCHÉ et al., 2020).

A isca de fipronil não pareceu produzir neofobia em camundongos, pois a quantidade de isca ingerida em 24 e 48 horas de exposição não diferiu significativamente. A exposição de 48 horas à isca de fipronil impediu que 100% das larvas se alimentassem

até a repleção total nos dias +1, +9 e +15 pós-tratamento. A média de CP foi de 948,9, 101,2 e 79,4 ng/mL para os dias +1, +9 e +15, respectivamente (POCHÉ et al., 2020).

Após o estudo descrito anteriormente, Poché et al. (2021) (mesmo grupo de autores) avaliaram a eficácia da isca de fipronil a 0,005% no controle de *I. scapularis* em camundongos (*P. leucopus*) sob condições simuladas de campo. Para isso, 80 camundongos foram divididos em quatro grupos tratados e quatro grupos controles da seguinte maneira: T24-1 (isca de fipronil disponibilizada por 24h; infestado no dia +1); C24-1 (só receberam alimentação comercial; infestados no dia +1); T24-15 (isca de fipronil disponibilizada por 24h; infestado no dia +15); C24-15 (só receberam alimentação comercial; infestados no dia +15); T168-21 (isca de fipronil disponibilizada por 168h; infestado no dia +21); C168-21 (só receberam alimentação comercial; infestados no dia +21); T168-35 (isca de fipronil disponibilizada por 168h; infestado no dia +35); C168-35 (só receberam alimentação comercial; infestados no dia +35). A etapa de infestação e avaliação dos carrapatos ocorreu da mesma forma descrita por Poché et al. (2020).

Quatro dias após a infestação, amostras de sangue foram coletadas de todos camundongos como descrito por Poché et al. (2020) para verificação da concentração plasmática de fipronil (POCHÉ et al., 2021).

Nos últimos anos, as isoxazolininas tem sido escolhidas como novo método de controle de ectoparasitos em pequenos animais e, com isso, abriu precedentes para novos estudos com roedores selvagens.

Em um estudo controlado, Pelletier et al. (2020) avaliaram a ação do fluralaner (Bravecto®) sobre larvas de *Ixodes scapularis* em um estudo controlado utilizando como hospedeiro ratos *Peromyscus maniculatus*. Tal roedor foi escolhido por ser filogeneticamente próximo ao hospedeiro preferencial de *I. scapularis* o rato *Peromyscus leucopus* (principal reservatório da bactéria causadora da Doença de Lyme) e por ser um hospedeiro permissivo para o carrapato.

Vinte e nove ratos foram divididos em três grupos, sendo um controle (recebeu apenas a isca de manteiga de amendoim) e dois tratados. O tratado 1 recebeu 50mg/kg de fluralaner macerado misturado na isca de manteiga de amendoim, enquanto o tratado 2 recebeu 12,5mg/kg misturado na isca. Os animais ficaram individualizados em gaiolas com água e comida à vontade e as iscas foram disponibilizadas mimetizando o ambiente natural. Somente após 24h foi verificado se houve o consumo das iscas (PELLETIER et al., 2020).

Para avaliar a eficácia do tratamento, cada animal foi infestado com 20 larvas não alimentadas de *I. scapularis* nos dias +2, +28 e +45 utilizando uma pinça entomológica e com os animais anestesiados por uma hora. Após 12, 24 e 48h da infestação, os animais foram anestesiados por 5 minutos para inspeção e contagem dos espécimes fixados. Na avaliação 48h pós infestação as larvas que ainda estavam fixadas foram coletadas e observadas em estereomicroscópio para classificação de vivas e mortas. Amostras de sangue foram coletadas de três ratos nos três dias de infestação para determinação da concentração plasmática de fluralaner por HPLC (PELLETIER et al., 2020).

A eficácia observada foi superior a 94% para os dois grupos tratados no dia +2, no entanto, os níveis de eficácia observados do dia +28 foram inferiores a 4%. No dia +2, a média aritmética da concentração plasmática foi de 13.815 ± 11.585 ng/mL para o tratado 1 e 4594 ± 6995 ng/mL para o tratado 2. Devido ao desvio padrão significativo, não houve diferença estatística entre os dois grupos. No dia +28, as diferenças na concentração plasmática entre os grupos tratados diminuíram com 579 ± 885 ng/mL para o tratado 1 e 208 ± 277 ng/mL para o tratado 2. A concentração plasmática tornou-se praticamente a mesma no dia +45 com $46,7 \pm 0,5$ ng/mL e 52 ± 1 ng/mL, respectivamente (PELLETIER et al., 2020).

Os resultados promissores apresentados por Pelletier et al. (2020) incentivaram a continuação do trabalho para que fosse executado a campo, com roedores naturalmente infestados.

Pelletier et al. (2022) realizaram o estudo a campo no Québec (Canadá) por três anos disponibilizando, dentro de estações próprias, a isca contendo pasta de amendoim e fluralaner (50 a 100mg/kg), uma vez por semana, durante o verão, para que fosse consumido por pequenos mamíferos. Durante o período do estudo, por serem considerados principais hospedeiros para bactéria *Borrelia burgdorferi*, apenas os ratos *Peromyscus* spp. foram capturados e anestesiados para contagem de larvas e ninfas de carrapatos fixados. Para verificar se a população de carrapatos estava diminuindo, também foi realizado arrasto no local. Ao término do estudo os autores observaram que houve diminuição do número de carrapatos *I. scapularis* imaturos em ratos *Peromyscus* spp., com eficácia de até 86% contra larvas e até 72% contra ninfas.

2.11 Desenvolvimento De Blocos Parafinados E Testes De Bancada

Antes de uma formulação ser testada *in vivo*, ela passa por processos de desenvolvimento com controle de qualidade rigoroso (CANCHUMANI, 2009).

A produção de medicamentos deve obedecer às Boas Práticas de Fabricação (BPFs), que tem por objetivo padronizar os procedimentos para que sua reprodutibilidade seja possível (CALARGE et al., 2007).

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (2019), as formas farmacêuticas sólidas em dose unitária devem ser pesadas para verificar se todas as unidades de um mesmo lote possuem uniformidade de peso. Peso igual ou superior a 250mg possui limite de variação aceito de $\pm 5\%$.

Para determinação de resistência mecânica, são necessários testes de dureza e friabilidade, os quais necessitam de aparelhagem adequada para serem realizados, no entanto, o resultado do teste de dureza é apenas informativo (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019).

Cada unidade do lote de um medicamento deve ter quantidade do componente ativo próxima a declarada, para que a administração das doses seja correta. Para verificação da uniformidade de dose, é importante realizar duas avaliações: variação de peso e uniformidade de conteúdo. Para a variação de peso deve-se pesar individualmente 10 unidades. Para a uniformidade de conteúdo (doseamento) deve-se analisar individualmente 10 unidades e, com os resultados obtidos de peso individual e doseamento, calcular o valor de aceitação (VA) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019).

Não foram encontradas referências acerca de características organolépticas de iscas palatáveis, no entanto, as características organolépticas dos comprimidos (incluindo os mastigáveis/palatáveis) que devem ser avaliadas são: cor, forma, tamanho, odor, sabor, textura e aparência. É importante, principalmente por questões psicológicas no caso de humanos, que os comprimidos tenham aparência estética agradável, ou seja, superfícies lisas, sem danos, aspecto uniforme e, preferencialmente, seu exterior deve ser brilhoso (ASSIS, 2013).

Quando um ingrediente ativo é transformado em uma forma farmacêutica, antes de ser testada na espécie alvo, deve passar por testes de estabilidade. Esses testes têm o objetivo de avaliar a influência que diversos fatores ambientais como temperatura, umidade e luz irão interferir no medicamento (ANVISA, 2019).

Os ensaios de estabilidade empregados são de escolha do pesquisador e podem ser classificados em organolépticos, físico-químicos e microbiológicos. Alguns testes de estabilidade sugeridos por Isaac et al. (2008) estão relacionados abaixo:

- Estresse térmico: as amostras devem ser submetidas a temperaturas de 5 a 45°C para detecção de sinais de instabilidade. A não separação de fases é um indicativo de estabilidade do produto.
- Aspecto: a avaliação do aspecto leva em consideração características macroscópicas que sugiram instabilidade. A não ocorrência de turvação é indicativo de estabilidade. O aspecto de formas sólidas pode ser descrito como homogêneo, heterogêneo, transparente, opaco e leitoso.
- Cor: deve ser avaliada sob luz branca, natural. A comparação da cor da amostra analisada deve ser comparada com a do padrão e pode ser classificada em normal (sem alteração), levemente modificada e intensamente modificada.

Além dos fatores ambientais, outros fatores, tais como, as propriedades dos excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e composição também influenciam na estabilidade do produto (SOUZA, 2009). Os excipientes, também conhecidos como ingredientes inativos, são as substâncias que não possuem propriedades terapêuticas e são utilizadas apenas para assegurar estabilidade físico-química e organoléptica do produto farmacêutico (BALBANI, 2006).

De acordo com Balbani (2006), os excipientes que podem ser usados em formulações para uso oral são: conservantes, corantes, aromatizantes, adoçantes, espessantes, emulsificantes, estabilizantes ou antioxidantes. A escolha de excipientes poderá influenciar na aceitação do paciente ao medicamento oferecido.

O desafio associado aos medicamentos de sabor amargo é muito maior do que os medicamentos sem sabor, sendo necessário o mascaramento de sabor e odor. A adição de produtos à base de alimentos em uma formulação palatável é uma opção. Além disso, também podem ser utilizados sabores artificiais (THOMBRE, 2004).

No quadro abaixo (Quadro 1) estão relacionados os excipientes e ativos utilizados em alguns estudos com formulações em isca para o controle de ectoparasitos em animais, onde é possível observar que a maioria dos trabalhos utilizou palatilizantes e aromatizantes para facilitar a aceitação da espécie-alvo.

Quadro 1: Relação de estudos publicados contendo a descrição dos ativos e excipientes utilizados para formulação de iscas para o controle de ectoparasitos em animais

Referência	Excipientes	Ativo	Espécie-alvo
Davis (1999)	Manteiga de amendoim, ração seca para cães e aveia, parafina	Lufenuron	Esquilos <i>Spermophilus beecheyi</i>
Slowik et al. (2001)	Manteiga de amendoim, ração seca para cães, aveia, parafina e pigmento vermelho fluorescente	Fluazuron	Ratos do gênero <i>Neotoma</i>
Davis et al. (2008)	Manteiga de amendoim, ração seca para cães, aveia em flocos, sementes de pássaros silvestres, parafina e pigmento vermelho fluorescente	Fluazuron ou lufenuron	Roedores dos gêneros <i>Neotoma</i> , <i>Spermophilus</i> , <i>Tamias</i> e <i>Peromyscus</i>
Borchert et al. (2009)	Aveia	Imidacloprida	Esquilos <i>Spermophilus beecheyi</i>
Poché et al. (2017)	Aveia e parafina	Fipronil	Esquilos <i>Cynomys ludovicianus</i>
Poché et al. (2018)	Aveia e parafina	Fipronil	Esquilos <i>Rhombomys opimus</i>
Poché et al. (2020); Poché et al. (2021)	Parafina	Fipronil	Camundongos
Pelletier et al. (2020)	Manteiga de amendoim	Fluralaner	Ratos <i>Peromyscus maniculatus</i>
Pelletier et al. (2022)	Manteiga de amendoim	Fluralaner	Ratos do gênero <i>Peromyscus</i> spp.

2.12 Estudos de Palatabilidade e Aceitação para Animais

Diversos trabalhos e guias vem sendo publicados sobre palatabilidade de medicamentos e de alimentos para animais de companhia, principalmente cães e gatos. Poucos estudos acerca de palatabilidade foram publicados com porquinhos-da-índia e, nenhum com medicamentos palatáveis, todos apenas com opções de alimentação. As duas principais metodologias já validadas para avaliação da palatabilidade de alimentos para cães e gatos são: teste da tigela única e teste de duas tigelas (ALDRICH; KOPPEL, 2015).

Resumidamente, o teste da tigela única consiste em metade dos animais recebem o alimento “X” por cinco dias consecutivos, enquanto a outra metade recebe o alimento “Y” pelo mesmo período. Após os cinco dias, os alimentos “X” e “Y” são invertidos para os pares de animais por mais cinco dias. No final dos 10 dias, é feita a avaliação do consumo geral. Já o teste de duas tigelas consiste em colocar dois alimentos em suas respectivas tigelas e apresentá-los simultaneamente ao animal. Assim, ao contrário do teste da tigela única, o animal terá uma escolha (ALDRICH; KOPPEL, 2015).

De acordo com Thombre (2004), o termo “palatabilidade” refere-se à aceitação voluntária ou ingestão de uma composição farmacêutica por animais de companhia. Dados como velocidade com que o animal aceita o produto, grau de interesse/ entusiasmo demonstrado pelos animais pode ser considerado medida de palatabilidade. No entanto, o dado mais importante é o se foi ou não consumido.

A palatabilidade para os animais depende principalmente do cheiro e sabor do produto oferecido, mas outras características como forma, tamanho, textura, dureza e cor também influenciam. A palatabilidade de um medicamento veterinário não deve ser extrapolada para outra espécie animal, nem para animais da mesma espécie mas que vivam em condições diferentes (condições controladas e de campo) e tampouco para animais da mesma espécie em condições de saúde distintas (animal sadio e animal doente). Palatabilidade deve ser testada em animais representativos da população alvo (CVMP, 2014).

A aceitação quando ocorre o consumo total voluntário dentro do tempo máximo de oferta. A não aceitação é considerada quando o animal não consome todo o medicamento no tempo pré-determinado, quando o animal consome parcialmente o medicamento, quando o animal regurgita/cospe o medicamento ou quando o animal se recusa a ingerir o medicamento. O produto é considerado palatável quando as taxas gerais de aceitação voluntária atingem, pelo menos, 80% em cães e 70% em outras espécies. O limiar deve ser atingido em um grupo de pelo menos 50 animais se o produto for

administrado apenas uma vez e de, pelo menos, 25 se o produto for administrado pelo menos duas vezes (CVMP, 2014).

De acordo com o guia da CVMP (2014), quando ocorre aceitação voluntária, a seguinte frase pode ser adaptada “O produto é palatável, ou seja, geralmente é consumido voluntariamente por [espécie] (consumo voluntário em > [70]/[80]% das ocasiões em animais estudados)”.

Poché et al. (2021) avaliaram a palatabilidade de uma formulação em isca contendo fipronil e parafina para camundongos *P. leucopus*. Para isso, após o período de aclimatação, toda a dieta específica para roedores foi retirada das gaiolas e, então, para os grupos tratados, foi disponibilizada aproximadamente 100g da isca contendo fipronil dentro de uma estação para roedores de um lado da gaiola. Em um comedouro, foi disponibilizado aproximadamente 50g da alimentação comercial para roedores + 50g de aveia em flocos no lado oposto ao da estação contendo a isca. Para os grupos controle, foram disponibilizados dois comedouros contendo em cada 50g da alimentação comercial para roedores + 50g de aveia em flocos. Os grupos foram divididos em: T24 (10 machos e 10 fêmeas; receberam a isca de fipronil por 24h); C24 (10 machos e 10 fêmeas; receberam apenas a alimentação citada anteriormente por 24h); T168 (10 machos e 10 fêmeas; receberam a isca de fipronil diariamente por 168h); C168 (10 machos e 10 fêmeas, receberam apenas a alimentação citada anteriormente por 168h) (POCHÉ et al. 2021).

Os resultados encontrados por Poché et al. (2021) indicaram que a isca de fipronil foi palatável mesmo na presença de alimentação. Em média, os camundongos dentro de cada grupo tratado consumiram mais isca de fipronil do que a alimentação disponibilizada. A isca de fipronil representou 89,8% e 82,9% da dieta total consumida por camundongos machos e fêmeas, respectivamente, no grupo que teve a isca disponibilizadas por apenas 24h. No grupo em que a isca era disponibilizada por 168h, o consumo foi de 53,1% e 74% da dieta total para camundongos machos e fêmeas, respectivamente. Camundongos machos que tiveram a isca disponibilizada por 24h consumiram uma média de 8,5 mg de fipronil/kg de peso corporal, já as fêmeas consumiram uma média de 7,3 mg/kg. Os que tiveram a isca disponibilizada por 168h consumiram uma média de 4,7 mg/kg/dia (macho) e 4,8 mg/kg/dia (fêmea).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para que os objetivos deste trabalho fossem atingidos, foram necessários seis estudos, que ocorreram de forma cronológica, já que a maioria necessitava do resultado do estudo anterior para que fosse delineado e executado o seguinte.

Os estudos estão listados de acordo com a ordem em que ocorreram, com seus respectivos objetivos e número de protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IV/UFRRJ), conforme tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Estudos realizados e seus respectivos protocolos de autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais.

Estudo	Objetivo	Nº CEUA
Estudo I	Determinar a influência de três diferentes doses de fluazuron administrado por gavagem na concentração plasmática e na eficácia no controle de <i>A. sculptum</i> em porquinhos-da-índia (análises farmacocinéticas e farmacodinâmicas – PK/PD).	3260110219
Estudo II	Determinar a farmacocinética descritiva do fluazuron administrado por gavagem em porquinhos-da-índia.	6044140721
Estudo III	Desenvolver uma formulação em isca, palatável e resistente à diferentes temperaturas e umidades	Não se aplica
Estudo IV	Avaliar a aceitação e palatabilidade da formulação desenvolvida	6640210721
Estudo V	Determinar a farmacocinética descritiva do fluazuron após administração do bloco medicamentoso palatável para porquinhos-da-índia.	7690060821
Estudo VI	Avaliar a eficácia no controle de <i>A. sculptum</i> em porquinhos-da-índia após a administração do bloco medicamentoso palatável.	2786091221

Todas as etapas do trabalho foram realizadas nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), pertencente ao

Departamento de Parasitologia Animal (DPA), do IV da UFRRJ, localizada no município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

3.1 Estudo I: Farmacocinética e eficácia do fluazuron administrado por gavagem no controle de *Amblyomma sculptum*

3.1.1 Seleção dos hospedeiros

Foram utilizados 24 porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) clinicamente saudáveis, sem raça definida, de ambos os sexos, com idade entre 6 e 8 meses, pesando entre 0,5 e 0,9kg.

Para certificação de que os animais estavam dentro da faixa de peso adequado, foram pesados individualmente em balança digital previamente calibrada.

Os animais foram adquiridos de um criadouro comercial certificado e não tinham histórico de contato prévio com carrapatos e nem com antiparasitários.

Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas individuais suspensas à um metro do chão, com dimensões 0,60m (altura) X 1,2m (largura) X 0,60m (profundidade).

As gaiolas foram mantidas dentro de um recinto que não era compartilhado com outros animais, apenas o do estudo. A temperatura do recinto foi controlada com ar-condicionado, mantendo o ambiente com 21 ± 1 °C.

A limpeza do recinto, das gaiolas, comedouros e bebedouros foi realizada sempre pelas mesmas pessoas com água e detergente neutro, uma vez ao dia.

O fornecimento de água potável era *ad libitum* e oriunda de sistema de abastecimento. A ração seca era própria para porquinhos-da-índia (Alcon Club®) e oferecida duas vezes ao dia, de acordo com o peso e necessidade de cada indivíduo, conforme recomendado pelo fabricante.

A composição da ração, segundo o fabricante é de: Alfafa desidratada (35,2 %), fubá de milho, farelo de soja, fibra vegetal (5 %), óleo de soja refinado, cenoura desidratada, extrato de levedura (fonte de nucleotídeos) (0,7 %), premix vitamínico mineral, beterraba desidratada, aditivo prebiótico (0,2 %), farinha de alga (fonte de DHA - Ômega 3) (0,07 %), vitamina C, aditivo adsorvente de odor (0,03 %), antioxidantes (Etoxiquin, Propilgalato, ácido cítrico, BHA, BHT).

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

Diariamente foram disponibilizadas, dentro de cada gaiola, uma bandeja plástica limpa e seca contendo feno próprio para categorias de animais mais exigentes, onde eles podiam comer, brincar, se esconder e dormir. Além disso, foram disponibilizados blocos de cálcio e fósforo da marca Rodent Alcon® próprios para que os porquinhos-da-índia pudessem roer e desgastar seus dentes.

3.1.2 Obtenção dos carrapatos *Amblyomma sculptum*

Os carrapatos utilizados no estudo foram provenientes da colônia já estabelecida e mantida nas dependências do LQEPV (CEUA 7699190418).

Para a manutenção da colônia, coelhos da raça Nova Zelândia são infestados semanalmente com larvas, ninfas ou adultos não alimentados de *A. sculptum*. Os espécimes ingurgitados recuperados são acondicionados em seringas e mantidos em câmara climatizada com demanda bioquímica de oxigênio (tipo DBO) a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $90\pm 10\%$ de umidade relativa (UR), de acordo com o procedimento operacional padrão do LQEPV.

3.1.3 Delineamento experimental

O estudo iniciou no dia experimental -14 (antes do tratamento) com o recebimento dos animais e posterior aclimação de 24 porquinhos-da-índia (12 machos e 12 fêmeas). Todos os procedimentos realizados com os animais foram feitos sempre pelas mesmas pessoas.

Os animais foram submetidos a avaliações clínicas, para que houvesse a inclusão apenas de animais saudáveis. Em seguida, todos os animais foram microchipados, pela via subcutânea, na região entre as escápulas, utilizando uma agulha por animal. Cada animal foi contido sobre a mesa de procedimentos, sendo mantido em decúbito esternal com uma das mãos sobre a região pélvica e a outra sobre a região torácica. Foi realizada assepsia da pele com algodão embebido em álcool 70% e aplicado o microchip pela via subcutânea com dispositivo de aplicação próprio disponibilizado pelo fabricante.

No dia -7 os animais foram divididos entre os quatro grupos experimentais: Um grupo controle (GC) e três grupos tratados (G1, G2 e G3). Para a randomização, uma lista decrescente para cada sexo foi preparada contendo o peso de cada animal. Os animais foram divididos por sorteio entre os quatro grupos (seis animais/grupo – GC, G1, G2 e G3), sendo o sorteio começando pelo mais pesado até chegar ao mais leve, alocando um animal em cada grupo, até que houvesse seis em cada, três machos e três fêmeas.

No dia -1 os animais pertencentes aos grupos tratados foram submetidos a coleta de sangue. Cada animal foi contido individualmente com auxílio de uma toalha limpa, que foi enrolada ao seu redor, mantendo apenas pescoço e cabeça expostos. Sua cabeça foi posicionada pelo responsável pela contenção de forma que o focinho ficasse voltado para cima. Então foi realizada tricotomia da região cervical ventral com máquina de tosa silenciosa (indicada para uso em gatos), realizada assepsia da pele com algodão embebido em álcool 70% e, posteriormente, foi realizada a coleta de 1mL de sangue através da punção da veia jugular com agulha 25x0,7mm e seringa de 3mL. O sangue foi acondicionado em tubo contendo heparina com capacidade para 4mL.

Do dia 0 ao dia +14, o Grupo Controle, não recebeu nenhum tratamento, e os grupos G1, G2 e G3, receberam uma formulação contendo fluazuron administrada por gavagem em três doses: G1 – 1mg/Kg de peso vivo, G2 – 5mg/Kg de peso vivo e G3 – 10mg/Kg de peso vivo, a cada 24h, por 15 dias. Todos os animais dos grupos tratados foram pesados diariamente para o cálculo correto da administração da solução (volume administrado = 1mL/Kg).

Para o procedimento de gavagem, a solução contendo fluazuron foi aplicada com auxílio de seringa de 1mL, acoplada a uma sonda uretral nº8. A sonda teve a sua ponta cortada, para que a suspensão viscosa contendo o fluazuron pudesse fluir facilmente pela cânula. Antes da introdução, foi realizada a medição do quanto a sonda deveria ser introduzida, medindo-se a distância da ponta do nariz até a primeira costela do animal. Em seguida, a ponta da cânula era introduzida na lateral da boca da cobaia, deslizando sua ponta para o interior da cavidade oral, por cima da língua do animal, realizando um movimento delicado e contínuo. Ao estar devidamente posicionada, o fluazuron era administrado lentamente. Esses procedimentos eram realizados para todos os animais e nenhum material (seringa, sonda) era reutilizado (Figura 3). A sonda utilizada possuía diâmetro largo o suficiente para ser introduzido facilmente no esôfago do animal e, ao mesmo tempo, largo demais para que houvesse o risco de ser introduzido erroneamente na traquéia.

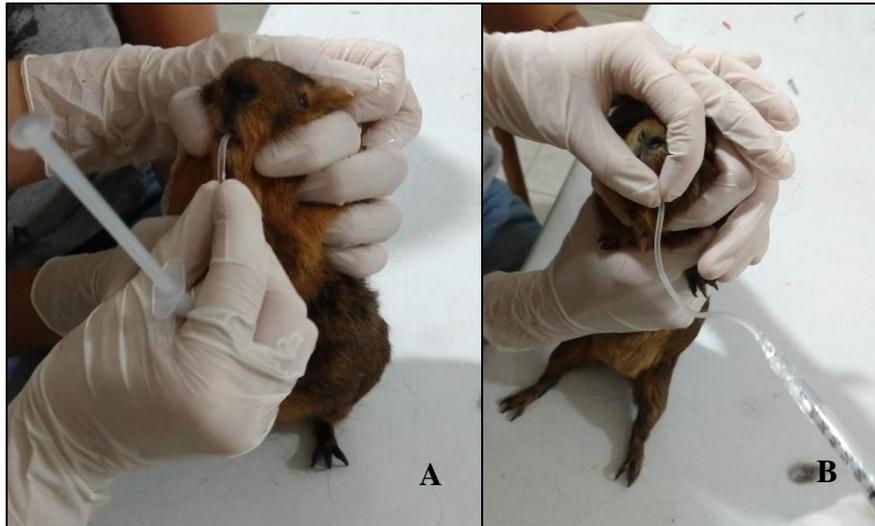


Figura 3. (A) Introdução da sonda por via oral em cobaias para administração de solução contendo fluazuron por gavagem; (B) sonda uretral nº8 acoplada a uma seringa de 1mL, contendo a solução de fluazuron, sendo introduzida por via oral em cobaias.

Nos dias +1, +4, +7 +15 e +21 (após o tratamento) os animais dos grupos tratados foram submetidos a coleta de sangue para análises farmacocinéticas (PK), conforme descrito no dia -1. Imediatamente após todas as coletas de sangue, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 756g por 10 minutos a 4°C, o plasma pipetado, acondicionado em microtubo Eppendorf (Figura 4), identificado com o nº do microchip do animal e dia experimental e congelado à -20°C até análise.



Figura 4. Tubo de heparina contendo sangue total e microtubo Eppendorf contendo 500µL de plasma em após centrifugação do sangue total.

No dia +6, foi realizada tricotomia da região dorsal de todos os animais (incluindo os do grupo tratado) (Figura 5). Na região tricotomizada, foi fixado um capuz de pano

(HEINE et al., 1987) com auxílio de cola Unna (HADANI et al., 1969) e esparadrapo impermeável (Cremer®) (Figura 6).



Figura 5. Região dorsal de porquinho-da-índia tricotomizada para fixação do capuz de pano.



Figura 6. Capuz de pano fixado com cola Unna e esparadrapo em porquinho-da-índia.

No dia seguinte (d+7), cada porquinho-da-índia foi infestado com aproximadamente 1000 larvas não alimentadas de *A. sculptum*, cerca de 35 dias após emergirem dos ovos. O tempo de espera entre a fixação do capuz de pano e da infestação foi de 24h, como garantia de que a cola havia secado totalmente.

Para a infestação, primeiramente cada capuz foi aberto e a uma seringa contendo aproximadamente 1000 larvas (Figura 7) foi depositada dentro de cada um (Figura 8). Os capuzes foram fechados com elástico e esparadrapo, para evitar a fuga dos espécimes (Figura 9A). Além disso, sobre cada capuz, foi colada uma identificação contendo o microchip do animal e o grupo experimental (Figura 9B).



Figura 7. Seringas (5mL) contendo aproximadamente 1000 larvas não alimentadas de *Amblyomma sculptum* utilizadas para a infestação dos porquinhos-da-índia.



Figura 8. Porquinho-da-índia com capuz de pano fixado ao dorso, sendo infestado com aproximadamente 1000 larvas (35 dias de idade) de *Amblyomma sculptum*.

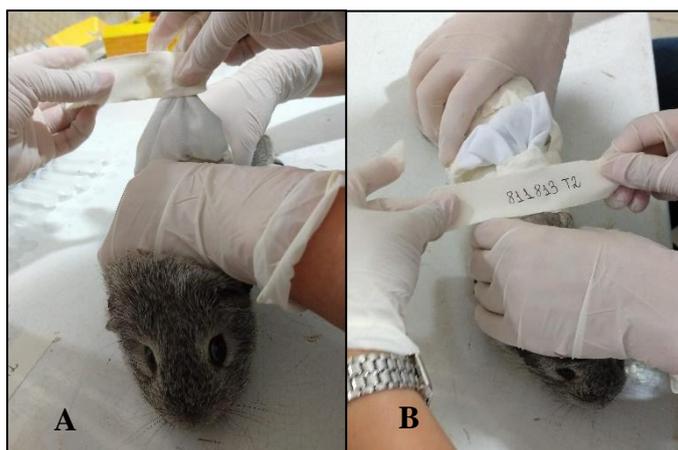


Figura 9. (A) Capuz de pano em porquinhos-da-índia sendo fechado com esparadrapo para evitar a fuga das larvas de *Amblyomma sculptum*; (B) Capuz de pano em porquinho-da-índia sendo identificado com o número do microchip do animal e grupo experimental.

A quantidade de larvas utilizada para o processo de infestação foi baseada na quantidade de massa de ovos pesada e na contagem de ovos por grama e percentual de eclosão já pré-determinados (dados oriundos dos procedimentos registrados na colônia de *A. sculptum*).

A primeira observação foi realizada 24h após a infestação, período necessário para que as larvas se fixassem. Diariamente, do dia +8 ao +14, os capuzes de pano foram inspecionados (Figura 10) e os espécimes ingurgitados foram coletados (Figura 11), contados, acondicionados em seringas cortadas de 5mL com algodão na ponta e mantidos em câmara climatizada tipo DBO a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $90\pm 10\%$ de UR.



Figura 10. Larvas de *Amblyomma sculptum* alimentadas observadas dentro de capuz de pano fixado em porquinho-da-índia.



Figura 11. Larvas de *Amblyomma sculptum* despejadas sobre bandeja branca (círculo vermelho) após completo repasto sanguíneo em porquinho-da-índia.

Após 14 dias, tempo necessário para as larvas ingurgitadas mudarem para ninfa, as seringas com os espécimes foram avaliadas quanto à muda e quanto a vivas e mortas.

A análise estatística do número de larvas ingurgitadas desprendidas foi realizada quanto à normalidade dos dados, utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk entre os grupos experimentais.

Os dados percentuais de larvas ingurgitadas que mudaram para ninfa foram utilizados para determinar se houve diferença significativa usando ANOVA (critério) entre os grupos experimentais. Em todas as análises foi considerado um percentual de significância $\geq 95\%$. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2011).

Ao final do estudo todos os animais foram eutanasiados seguindo os métodos preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2018). Os animais foram contidos com auxílio de uma toalha limpa que foi disposta ao redor do corpo do animal, mantendo apenas cabeça, pescoço e um de seus membros torácicos expostos. Foi realizada tricotomia da região onde fica localizada a veia cefálica com máquina de tosa silenciosa, seguida de assepsia com álcool 70% e canulação da veia cefálica com cateter 24G e fixação com esparadrapo impermeável. Então foi aplicado Tiopental (70mg/kg) pela via intravenosa, a fim de se obter um plano anestésico profundo. Após a confirmação da perda de consciência, foi aplicado cloreto de

potássio (100mg/kg) pela via intravenosa. A confirmação da morte se deu pela observação de apneia, assistolia, mucosas pálidas e perde do reflexo corneal.

3.1.4 Preparo das formulações contendo fluazuron

O fluazuron foi pesado em balança semianalítica (SHIMADZU; modelo BL 320H; acurácia de 0.001g) previamente calibrada, diluído em N-metil-pirrolidona e acondicionado em frascos âmbar. Para cada grupo tratado foi realizada uma diluição separada, de forma que todos os grupos recebessem o fluazuron na posologia de 1mL por Kg de peso vivo. Após a diluição, os frascos foram identificados contendo a data da diluição, o grupo com a dose referente e o nome do responsável pelo preparo da solução (Figura 12).



Figura 12. Frascos contendo solução de fluazuron utilizada para aplicação por gavagem em porquinhos-da-índia. Da esquerda para direita, o primeiro frasco corresponde ao G1 (1mg/Kg de fluazuron), o segundo frasco corresponde ao G2 (5mg/Kg de fluazuron) e o terceiro frasco corresponde ao G3 (10mg/Kg).

3.1.5 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados usando o programa PK solver (Microsoft Excel®, Redmond, WA, EUA), usando o modelo não compartimental de administração extravascular. Todos os parâmetros PK foram calculados usando a concentração plasmática individual versus dados de tempo. A concentração máxima medida para um determinado animal (C_{max}) e o tempo desde a dosagem até a concentração máxima (T_{max}) foram medidos individualmente. A área sob a curva de zero até o último tempo t (AUC_{0-t}) foi calculada pelo método trapezoidal linear e extrapolada para o infinito ($AUC_{0-\infty}$).

Os resultados são expressos como média aritmética \pm desvio padrão (DP). Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas utilizando GraphPad Prism 6.0 com 95% de significância ($p \leq 0,05$).

3.1.6 Procedimentos analíticos

As concentrações plasmáticas de fluazuron foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE-UV) e extração em fase sólida (SPE) de acordo com o procedimento descrito por Ferreira et al. (2019), adaptado e otimizado para plasma de cobaias. As amostras de plasma foram submetidas à limpeza SPE usando cartuchos de extração Discovery 18-LT (500 mg, 3 mL) (Supelco, EUA) conectados a um coletor de vácuo Visiprep SPE (Supelco, EUA), usando acetonitrila como solvente eluente.

O processo de extração foi iniciado com a centrifugação refrigerada da amostra sanguínea, a 3000 rpm por 10 minutos. Após separação, 500 microlitros do plasma foram contaminados com 25 microlitros de clorfluazuron 140 ng/mL, utilizando-se o vórtex para homogeneização da amostra.

Os cartuchos foram acondicionados sob vácuo (com auxílio de uma bomba) (Figura 13), com 2mL de metanol, as válvulas dos cartuchos foram abertas, de forma a gotejar sem que ocorresse a secura. Ao se observar o menisco de metanol acima do cartucho, desligou-se a bomba e fechou-se as válvulas dos cartuchos, adicionando 2mL de água destilada. Repetiu-se o processo anterior, até próximo a secura.



Figura 13. Cartuchos acondicionados sob vácuo (com auxílio de uma bomba).

Após o condicionamento, realizou-se a transferência do plasma contaminado para os cartuchos, realizando a eluição no cartucho sob vácuo, sem deixar o mesmo secar. Nesta etapa, o cartucho adquiriu coloração avermelhada pela eluição do plasma sanguíneo (Figura 14).



Figura 14. Transferência do plasma contaminado com clorfluazuron para os cartuchos.

Foi adicionado 1mL de água destilada para realizar a lavagem dos cartuchos. Após esta etapa, a válvula de cada cartucho sob vácuo foi aberta, deixando secar por aproximadamente 10 minutos para garantir a ausência de água. Após este tempo, as válvulas dos cartuchos foram novamente fechadas.

Foram descartados os resíduos das etapas de condicionamento, carregamento e lavagem dos cartuchos e foi utilizada uma estante com eppendorfs para coleta das amostras com o ativo em estudo. Para não haver perda das amostras, as pontas dos cartuchos ficaram localizadas no interior dos eppendorfs.

Foi adicionado de 1mL de acetonitrila em cada cartucho, ligando-se o vácuo, para ocorrer a eluição do fluazuron juntamente com a acetonitrila. Nesta etapa, a válvula ficou aberta a fim de garantir o gotejamento, permitindo a eluição do ativo. Se a separação ocorresse de maneira muito rápida, nem todo ativo seria eluído, comprometendo a análise.

Após eluição lenta, todas as válvulas foram abertas, deixando chegar à secura. Esta etapa foi realizada em uma replicata, pelo pequeno volume de sangue coletado dos animais.

O conteúdo dos eppendorfs foi evaporado até a secura em centrífuga a vácuo (SpeedVac) e reconstituído em 100 μ L de acetonitrila (Figura 15). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna C18 (Kromasil, 3,5 μ m; 4,6 \times 100 mm; Tedia, Rio de Janeiro, Brasil), precedida por uma coluna guarda C18 (Kromasil, 3,5 μ m; 4,6 \times 10 mm; Tedia, Rio de Janeiro, Brasil), ambos mantidos a 25 °C. A fase móvel consistia em acetonitrila:água (80:20, v/v) com vazão de 1,0 mL/minuto. O comprimento de onda UV foi fixado em 260 nm e o volume de injeção foi de 20 μ L.



Figura 15. Etapa de pré-evaporação até a secura em centrífuga a vácuo.

3.2 Estudo II: Farmacocinética descritiva do fluazuron administrado por gavagem

Para este estudo, a determinação dos parâmetros farmacocinéticos do fluazuron foram obtidos pela avaliação de dose única, estudo de modelo compartimental. Para a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos, apenas um grupo com oito animais recebeu

o fluazuron por gavagem em dose única de 10mg/Kg – dose escolhida por ser a maior utilizada no Estudo I.

Para esta etapa foram selecionados oito porquinhos-da-índia (quatro machos e quatro fêmeas), adquiridos do mesmo criadouro e mantido sob as mesmas condições relatadas para o Estudo I.

3.2.1 Delineamento experimental

O estudo teve início no dia experimental -14 com a aclimação dos porquinhos-da-índia. Os animais foram submetidos a avaliações clínicas, para que houvesse a inclusão apenas de animais saudáveis. Todos os animais foram microchipados conforme descrito no Estudo I.

Nos tempos experimentais -7d, +8h, +24h, +4d, +7d, +15d, +21d e +28d os animais foram submetidos a coleta de sangue (conforme descrito para o Estudo I).

No dia 0 os oito animais receberam fluazuron por gavagem na dose de 10mg/kg, em dose única (conforme descrito para o Estudo I).

Ao término das coletas, os oito animais foram devolvidos ao criador.

O preparo da formulação de fluazuron e o processamento das amostras ocorreu conforme descrito para o Estudo I.

3.3 Estudo III: Desenvolvimento de formulação em iscas

A partir dos resultados obtidos nos estudos I e II, a dose de 10mg/kg de fluazuron foi escolhida para ser incorporada a uma formulação palatável e contendo fluazuron, que pudesse ser oferecida, inicialmente, a porquinhos-da-índia para o controle de *A. sculptum*.

Baseado em trabalhos como os de Davis (1999) e Slowki et al. (2001), foi escolhido desenvolver uma formulação sob a forma de isca medicamentosa para incorporação de fármacos. Para que houvesse resistência física, uma cera teria que ser incorporada à massa, então algumas ceras foram testadas, além disso, também foram realizados testes de controle de qualidade e teor.

3.3.1 Composição e preparo da massa das iscas

A massa da isca foi preparada utilizando 15% de farinha de aveia (Quaker®), 15% de manteiga de amendoim em pó (Powdered Peanut Butter®) e 15% de alfafa peletizada para roedores (Alcon club®), como aromatizantes e palatabilizantes; 18% de glicerina

(Synth®) como aglutinante e ração para porquinhos-da-índia (Alcon club®) qsp 100% como excipiente.

A alfafa peletizada e a ração eram batidos a seco em moedor de café e liquidificador, respectivamente, e peneiradas, para que fosse utilizado apenas o pó. Todos os ingredientes em pó foram pesados em balança digital (Tecnal®, previamente calibrada), misturados em um graal de cerâmica (Figura 16) e, em seguida, passados pelo tamis nº 20 (Figuras 17 e 18).



Figura 16. Massa homogeneizada em graal de cerâmica.



Figura 17. Massa sendo tamisada.



Figura 18. Massa após ser tamisada.

3.3.2 Ceras testadas e preparo das iscas

Quatro ceras diferentes foram selecionadas para incorporação na massa, formando a isca (formulação pronta sem o ativo). Para isso, foram pesadas e derretidas individualmente em placa aquecedora e, só após estarem completamente líquidas que a massa tamisada foi adicionada vagarosamente, sendo mexida com espátula de silicone até atingir homogeneidade. Então a formulação, ainda em sua forma líquida, foi despejada sobre as formas. As formas utilizadas eram de plástico resistente ao calor, próprias para a confecção de doces.

As iscas finalizadas foram submetidas à avaliação das características organolépticas e à testes de resistência à diferentes temperaturas e à umidade 24h após o preparo.

As ceras selecionadas foram parafina alimentícia granulada (Bianquímica®) (Figura 19A), parafina para vela em barra (Reagen®) (Figura 19B), cera de abelha (Cera Alba®) (Figura 19C) e cera vegetal de coco T-02 em barra (JS RIBEIRO®) (Figura 19D). A proporção cera e massa tamisada foi mantida em 1:1 para todas as formulações.



Figura 19. Quatro diferentes tipos de ceras utilizadas: (A) Parafina alimentícia granulada; (B) Parafina para vela; (C) Cera de abelha; e (D) Cera vegetal de coco.

As formulações testadas e a proporção de cera(s):massa está relacionada abaixo:

- F1: Parafina alimentícia + Massa (1:1)
- F2: Parafina vela + Massa (1:1)
- F3: Parafina alimentícia + Cera de abelha + Massa (1:1:2)
- F4: Parafina alimentícia + Cera de abelha + Massa (2:1:3)
- F5: Cera de coco + Massa (1:1)
- F6: Cera de abelha + Massa (1:1)

3.3.3 Avaliação das características organolépticas das iscas

Para esta etapa, as iscas foram avaliadas 24h após seu preparo de forma a garantir que a formulação estivesse seca. Os parâmetros avaliados foram cor, textura, dureza e homogeneidade.

A cor foi classificada em amarela ou marrom; a textura foi classificada em lisa, oleosa ou áspera; dureza e homogeneidade foram classificadas em escores de 0 a 2, sendo a textura (0) branda, (1) firme ou (2) dura e a homogeneidade em (0) heterogênea, (1) pouco heterogênea e (2) homogênea.

O score da dureza foi realizado empiricamente com base na força manual necessária para quebrar a isca, enquanto a homogeneidade considerou a distribuição regular dos componentes por toda a isca ou sua deposição mais concentrada em algumas áreas.

3.3.4 Avaliação da resistência das iscas à água e à diferentes temperaturas

Para o teste de resistência à água, uma isca de cada formulação foi pesada e mantida submersa em uma placa de petri com 50mL de água destilada em temperatura ambiente (24°C). As placas foram mantidas fechadas e identificadas. Todos os blocos foram pesados em balança semianalítica (SHIMADZU; modelo BL 320H; acurácia de

0.001g) previamente calibrada, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos, 24 e 48h após submersão.

A avaliação da resistência em diferentes temperaturas ocorreu pela exposição de uma isca de cada grupo em temperaturas controladas de 40°C, 22°C e 6°C por 24h, sendo estas pesadas e envoltas em papel alumínio antes da exposição. As iscas expostas à 40°C, foram dispostas em uma incubadora shaker com aquecimento (Cienlab®); as iscas à 22°C ficaram sobre a bancada em temperatura controlada com ar-condicionado (monitorada com termo-higrômetro); as iscas à 6°C foram mantidos em geladeira. Após 24h de exposição, todas as iscas foram novamente pesadas.

3.3.5 Teste de uniformidade de dose e de determinação do teor de fluazuron

Após a escolha da formulação mais adequada, o fluazuron técnico em pó (CEVA®) foi incorporado as iscas, de forma a se ter 5mg/isca, já que cada porquinho-da-índia pesa cerca de 500g (equivalente a 10mg/kg).

A formulação foi preparada incorporando o fluazuron em pó na massa, antes de tamisar. Foi realizado o teste de uniformidade de dose e a determinação do teor de fluazuron nas iscas conforme recomendado pela Farmacopeia Brasileira.

3.3.5.1 Determinação do peso médio

Foram pesadas 20 iscas individualmente e calculado seu peso médio.

3.3.5.2 Doseamento

O ensaio de doseamento tem por objetivo quantificar o teor da substância ativa em formulações.

Foram pesadas 10 iscas com o ativo fluazuron e reduzidas a pó fino com auxílio do gral e pistilo para obter uma mistura homogênea. De acordo com o peso médio, foram pesadas três alíquotas desse pó, que foram transferidas para um balão volumétrico de 100mL, avolumado com acetonitrila e levado ao ultrassom por 2 horas, para garantir a homogeneização e solubilidade da solução.

Foi realizada uma diluição 1:100 transferindo após filtração 1mL deste balão para um balão de 10mL e, também, avolumada com acetonitrila. As amostras preparadas no ensaio de doseamento e a curva padrão foram analisadas por CLAE-UV, conforme as

condições cromatográficas descritas no item 3.1.6. A partir dos valores obtidos, foi calculado o teor das iscas.

3.3.5.3 Uniformidade de conteúdo

Esta análise consiste em obter o teor das iscas pelo doseamento individual de 10 iscas, trituradas separadamente. Para isso, cada alíquota da isca pulverizada foi transferida para um balão volumétrico de 100mL, avolumado com acetonitrila e colocados em ultrassom por 2 horas, para garantir a homogeneização e solubilidade da solução. Após filtração, transferiu-se 1mL deste balão para um balão de 10mL, avolumando-se com acetonitrila. Posteriormente, as alíquotas foram analisadas por CLAE-UV, conforme descrito no tópico 3.1.6 para obtenção do teor.

3.3.5.4 Uniformidade de dose por variação de peso

Esta análise consiste em obter o teor das iscas, considerando uma distribuição homogênea do princípio ativo. Para isso, foi utilizado o peso de 10 iscas do ensaio de doseamento de conteúdo e calculado o teor individual com base nos resultados obtidos na etapa de doseamento, como teor médio e peso médio.

3.4 Estudo IV: Aceitação voluntária da isca

Após o desenvolvimento da formulação em isca contendo fluazuron, foi iniciada a etapa para avaliar se os animais iriam consumir voluntariamente toda a isca disponibilizada.

Para esta etapa foram selecionados 50 porquinhos-da-índia (26 machos e 24 fêmeas), pesando entre 400 e 600g, adquiridos do mesmo criadouro e mantido sob as mesmas condições relatadas para o Estudo I.

3.4.1 Delineamento experimental

O estudo deu início no dia -14 com a recepção e aclimação dos animais trazidos pelo criadouro comercial. Os animais foram submetidos a avaliações clínicas, visando a inclusão de animais sadios ao estudo.

No dia -2 os animais foram pesados e ranqueados por peso e sexo em dois grupos: placebo e tratado. Apenas animais com faixa de peso entre 400 e 600 gramas participaram

do estudo, para que a dose de fluazuron na isca fosse próxima a 10mg/kg. O grupo placebo recebeu a formulação em isca, sem o fluazuron. O grupo tratado recebeu a mesma formulação do grupo placebo acrescido de 5mg de fluazuron por isca.

No dia -1 as formulações em iscas foram preparadas em duas etapas, sendo uma para as iscas do grupo placebo e outra para as iscas do grupo tratado.

No dia 0 as iscas foram desenformadas e pesadas individualmente em balança digital previamente calibrada. Foram selecionados apenas as iscas com peso de $2,5 \pm 0,1$ g.

As iscas foram oferecidas por cinco dias consecutivos (dos dias 0 a +4), uma vez ao dia, sendo uma isca por porquinho-da-índia, no próprio comedouro do animal, sempre no mesmo horário e sempre pela mesma pessoa. Imediatamente antes de fornecer as iscas, as mesmas foram pesadas individualmente e, então, cada uma depositada dentro do comedouro do animal.

Durante as avaliações de aceitação voluntária das iscas, foram colocadas bandejas do tipo gaveta de aço inoxidável embaixo de cada gaiola, para ter certeza de que o animal não o derrubou pelas frestas do fundo da gaiola. Caso a isca fosse derrubada, a mesma, após constatação visual, seria imediatamente recolhida e, novamente, disposta dentro do comedouro.

Uma escala sensorial, com pontuação de 20 a 100 mm, para medir a intensidade do paladar para cada cobaia foi utilizada da seguinte forma: (100) o animal consumiu toda a isca prontamente, (80) cheirou um pouco antes de consumir toda a isca, (60) mostrou relutância, mas ingeriu toda a isca em até 24h, (40) ingeriu a isca parcialmente em 24h, (20) não consumiu nada da isca em 24h. As notas 100, 80 e 60 foram consideradas como aceitação e 40 e 20 como rejeição (LIMA et al., 2021). A média e o desvio padrão foram determinados para cada grupo. Um total de 50 animais foram necessários para atingir 80% para demonstrar a não inferioridade da formulação testada em comparação com o placebo.

Os dados de palatabilidade foram submetidos ao teste de não inferioridade utilizando o software NCSS2021, versão 20.0.2 (NCSS, LLC, Kaysville, Utah, EUA, 2021). A significância estatística foi estabelecida em 5% ($P < 0,05$) e com margem de não inferioridade de 20 mm.

3.5 Estudo V: Farmacocinética descritiva do fluazuron administrado em isca

Com os resultados obtidos nos Estudos III e IV, foi possível realizar a etapa seguinte (Estudo V), que foi para verificar se o fato do fluazuron estar em outra formulação (isca) iria interferir na biodisponibilidade plasmática.

Para a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos, apenas um grupo com 12 porquinhos-da-índia (seis machos e seis fêmeas), pesando aproximadamente 500g, recebeu o fluazuron na isca em dose única de 10mg/Kg.

Os porquinhos-da-índia foram adquiridos do mesmo criadouro e mantido sob as mesmas condições relatadas para o Estudo I.

3.5.1 Delineamento experimental

No dia experimental -14 ocorreu a recepção e aclimação dos porquinhos-da-índia trazidos pelo criadouro comercial. Os animais foram submetidos a avaliações clínicas, visando a inclusão de animais sadios ao estudo e pesados, para inclusão de animais com aproximadamente 500g.

No dia -1 as formulações em iscas foram preparadas contendo cerca de 5mg de fluazuron em cada, conforme descrito no Estudo III.

No dia 0 as iscas foram desenformadas e pesadas individualmente em balança digital previamente calibrada. Foram selecionados apenas as iscas com peso de $2,5 \pm 0,1$ g. Cada animal recebeu uma isca, no próprio comedouro.

Foram colocadas bandejas do tipo gaveta de aço inoxidável embaixo de cada gaiola, para ter certeza de que o animal não derrubou a isca pelas frestas do fundo da gaiola. Caso a isca fosse derrubada, a mesma seria imediatamente recolhida e, novamente, disposta dentro do comedouro. Todas as etapas de administração e observação do consumo das iscas, foi feita pela mesma pessoa.

As coletas de sangue ocorreram nos tempos -7d, +8h, +24h, +4d, +7d, +11d, +15d, +21d e +28d, conforme descrito para o Estudo I.

O processamento das amostras de sangue para análise farmacocinética ocorreu conforme descrito para o Estudo I.

3.6 Estudo VI: Avaliação da eficácia do fluazuron administrado em isca no controle de *Amblyomma sculptum*

Após a avaliação de todos os resultados obtidos dos estudos anteriores, foi realizado um último estudo para verificação da eficácia da isca contendo 5mg de fluazuron no controle do carrapato *A. sculptum* também em porquinhos-da-índia.

Foram utilizados 32 porquinhos-da-índia (16 machos e 16 fêmeas), pesando aproximadamente 500g. Todos os animais foram adquiridos do mesmo criadouro e mantido sob as mesmas condições relatadas para o estudo I.

3.6.1 Delineamento experimental

No dia -35 ocorreu a recepção e aclimação dos porquinhos-da-índia trazidos pelo criadouro comercial. Os animais foram submetidos a avaliações clínicas, visando a inclusão de animais saudáveis ao estudo e pesados, para inclusão de animais com aproximadamente 500g.

No dia -28, os animais foram pesados e ranqueados por peso e sexo em quatro grupos:

- **Grupo controle (GC)** – não recebeu nenhum tratamento;
- **Grupo 1 (G1)** – recebeu a isca 21 dias antes da infestação com larvas de *A. sculptum*;
- **Grupo 2 (G2)** – recebeu a isca 14 dias antes da infestação;
- **Grupo 3 (G3)** – recebeu a isca 7 dias antes da infestação.

No dia -22 as iscas contendo 5mg de fluazuron foram preparadas conforme descrito para o Estudo III.

No dia -21 as iscas foram pesadas e oferecidas para os animais do G1, dentro de seus comedouros, sendo uma isca para cada animal. As avaliações de consumo foram realizadas conforme descrito para o Estudo IV.

No dia -14 e -7, as iscas foram disponibilizadas para os animais do G2 e G3, respectivamente, conforme descrito para o G1.

No dia -1 foi realizada a tricotomia da região dorsal e fixação do capuz de pano em todos os animais, conforme descrito para o Estudo I.

No dia 0 todos os animais foram infestados com aproximadamente 1000 larvas não alimentadas de *A. sculptum* cada.

Dos dias +4 a +7 as larvas ingurgitadas foram recuperadas, contadas, avaliadas e incubadas conforme descrito para o Estudo I. As larvas ingurgitadas foram incubadas por 14 dias e avaliadas em vivas, mortas e quanto a muda, conforme também descrito para o Estudo I.

Para a comparação entre os números de larvas ingurgitadas entre os quatro grupos experimentais foi empregado inicialmente o teste de Shapiro-Wilk para determinação do tipo de distribuição dos dados (paramétrico ou não). Constatou-se que a distribuição era não paramétrica e optou-se pela transformação dos dados em Log10. Após a transformação dos dados foi empregado novamente o teste de Shapiro-Wilk constatando que os dados atingiram uma distribuição normal. Então empregou-se o teste de Anova para um critério para comparação das médias.

Para a determinação da diferença significativa ou não em relação a eficácia do fluazuron em promover a interrupção da muda de larva ingurgitada para ninfa empregou-se a comparação entre os percentuais de muda. Para esta comparação utilizou-se Anova para um critério. Em todas as análises considerou-se o percentual de significância \geq a 95%. As Análise estatísticas foram realizadas através do programa Bioestat (AYRES et al., 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como a capivara é um dos principais hospedeiros de *A. sculptum* e possui um papel muito importante na disseminação da bactéria causadora da FMB (SOUZA et al., 2009; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ et al., 2020), estudos para o controle destes carrapatos são fundamentais nesses animais. Neste trabalho, optou-se pela utilização de porquinhos-da-índia (*C. porcellus*) como modelo experimental em substituição as capivaras (*H. hydrochaeris*), por serem mais dóceis, menores e mais fáceis de manejar quando comparados a capivara (CLEMONS; SEEMAN, 2018). Como as duas espécies pertencem a família Caviidae e possuem comportamento, anatomia e fisiologia similares (HEATLEY; RUSSELL, 2020), estes fatores permitiram que os estudos deste trabalho fossem conduzidos em porquinhos-da-índia.

Somados a isto, o estudo foi desenvolvido ao longo da pandemia e tornou-se inviável a aquisição de capivaras para sua condução. Assim, optou-se pela utilização de porquinhos-da-índia como modelo experimental.

4.1 Estudo I: Farmacocinética e eficácia do fluazuron administrado por gavagem no controle de *Amblyomma sculptum*

Os resultados referentes aos dados de larvas desprendidas e do processo de muda de larvas ingurgitadas recuperadas dos grupos experimentais encontram-se na Tabela 2

Os carrapatos (larvas ingurgitadas) se desprenderam entre os dias experimentais +11 e +14, tanto para o GC quanto para os grupos tratados, ou seja, de 4 a 7 dias após a infestação (Tabela 2).

As médias de espécimes ingurgitados recuperados foram 266,8 ($\pm 54,6$) para o GC, 419,2 ($\pm 276,0$) para o G1, 427,2 ($\pm 244,6$) para o G2 e 371,3 ($\pm 203,1$) para o G3 (Tabela 2). Os resultados mostraram distribuição dos dados não paramétrica. Os resultados não mostraram diferença significativa ($p=0,8123$) para comparação de médias de larvas ingurgitadas desprendidas entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação das larvas desprendidas e do processo de muda de larvas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* recuperadas de porquinhos-da-índia artificialmente infestados para os grupos controle e tratados com fluazuron por gavagem por 15 dias consecutivos.

Grupos	Nº de larvas ingurgitadas desprendidas	Eficácia larvicida (%)	Nº de ninfas que mudaram	Ninfas que mudaram (%)	Inibição do processo de muda (%)
GC	266,8 ¹ ± 54,6 ^{A*} (189-359) ²	---	247,0 ¹ ± 55,1 (176-330) ²	92,4 ¹ ± 7,0 ^A (77,5-99,2) ²	---
G1	419,2 ¹ ± 276,0 ^{A**} (132-777) ²	0	1 (0) ²	0 ^{1,B} (0) ²	100
G2	427,2 ¹ ± 244,6 ^A (227-788) ²	0	1 (0) ²	0 ^{1,B} (0) ²	100
G3	371,3 ± 203,1 ^{A**} (101-598) ²	0	1 (0) ²	0 ^{1,B} (0) ^{1,2}	100

1- Média aritmética; 2- Valores de mínimo e máximo; Letras subscritas iguais = valores não significantes (p=0,8123) para larvas ingurgitadas desprendidas (p<0,0001);

*Larvas ingurgitadas com morfologia e comportamento normal; **Larvas ingurgitadas que estavam friáveis e escuras; GC – grupo controle (sem tratamento); G1, G2 e G3 foram tratados, respectivamente, com 1 mg/kg, 5mg/kg e 10 mg/kg de fluazuron

A atividade larvicida do fluazuron sobre carrapatos heteroxenos não foi demonstrada nos artigos consultados, no entanto, já foi relatada por Oliveira et al. (2012^a) para ninfas de *R. sanguineus*, mas em doses altas (acima de 15mg/kg). Neste estudo, assim como no de Cruz et al. (2014) para teleóginas de *R. microplus*, essa atividade não foi observada, possivelmente por terem sido utilizadas doses inferiores a 15mg/kg.

Apesar de não ter sido observada atividade larvicida para nenhum dos grupos tratados, imediatamente após se desprenderem, algumas larvas apresentaram mudanças morfológicas e comportamentais. As principais alterações foram tamanho atrofiado, formato elíptico, tegumento frágil e letargia e foram mais observadas nos espécimes do G3. No entanto, não foi realizada contagem de espécimes com alterações, dado que poderia ter sido importante para comparação das alterações entre os grupos tratados. Para o GC não foram observadas alterações morfológicas ou comportamentais. Em um próximo estudo seria importante parametrizar estes achados, pois estas alterações poderiam ter impacto negativo na evolução do ciclo. A própria letargia observada poderia expor estas larvas as intempéries do clima e facilitar sua predação, por exemplo, por formigas.

Martins et al. (1995) relataram alterações morfológicas (forma, tamanho e aspecto) e flacidez na cutícula, de teleóginas de *R. microplus* recuperadas de bovinos tratados com fluazuron (1 e 2mg/kg). Essa flacidez (também observada nesta etapa do trabalho), faz com que os espécimes sejam facilmente rompidos, se não forem manipulados com cuidado.

Oliveira et al. (2012b) observaram que a endocutícula de ninfas de carrapatos *R. sanguineus* foram significativamente menores quando comparadas ao grupo controle, demonstrando que houve interferência no crescimento da procutícula durante o processo de ingurgitamento devido à inibição da síntese de quitina ocasionada pelo fluazuron.

Oliveira et al. (2012a), em estudo com coelhos tratados com diferentes doses de fluazuron (1,25 a 150mg/kg, pour on) para controle de *R. sanguineus*, observaram as mesmas alterações morfológicas e comportamentais em ninfas ingurgitadas em grupos que receberam doses acima de 10 mg/kg. Provavelmente o uso continuado e a via (oral ao invés de tópica) do fluazuron aplicado nos animais deste estudo influenciaram nas alterações observadas mesmo no grupo que recebeu a menor dose (1 mg/kg).

Para determinar se houve efeito residual do fluazuron seriam necessárias outras infestações dos mesmos animais, mas como existem vários estudos comprovando que porquinhos-da-índia adquirem resistência a carrapatos após uma primeira infestação

[ALLEN, 1973; WIKEL; ALLEN, 1976; WIKEL, 1979; BROWN; ASKENASE, 1981; SZABÓ et al., 1995), acarretando decréscimo da recuperação dos espécimes, optou-se por não infestar os animais novamente.

O percentual médio de ninfas que mudaram no grupo controle foi de 92,4% (± 7), enquanto para todos os grupos tratados foi 0 (eficácia de 100%) (Tabela 2). Houve uma diferença significativa no percentual médio de ninfas que mudaram entre o grupo controle e os três grupos tratados ($p < 0,0001$). Apesar de não ter sido observado efeito “knockdown” do fluazuron como acaricida, 14 dias pós-incubação, todas as larvas ingurgitadas dos grupos tratados estavam mortas. Além disso, também estavam murchas e mais escuras (enegrecidas) (alterações também relatadas por Oliveira et al., 2012a) e, já para os espécimes do GC que não mudaram, tais alterações não foram observadas.

As administrações de fluazuron por gavagem por 15 dias consecutivos geraram concentrações no plasma variando de 50,87 a 400,67 ng.mL^{-1} na dose mais baixa (1 mg/kg), de 164,44 a 509,99 ng.mL^{-1} na dose média (5 mg/kg) e de 293,84 a 701,43 ng.mL^{-1} na dose mais alta (10 mg/kg) (Tabela 3) (Figura 20). A menor dose apresentou valor médio mais baixo na concentração plasmática em comparação com a maior dose. As análises estatísticas mostraram diferença significativa ($p < 0,005$) no primeiro dia de avaliação (d+1). No entanto, para doses médias e altas, embora o aumento da dose tenha resultado em um aumento da concentração plasmática de fluazuron, doses múltiplas (uma vez ao dia por 15 dias) não levaram a um aumento das concentrações do fluazuron ao longo do tratamento em ambas as doses – não foram observadas diferenças significativas entre os dias de avaliação

Tabela 3. Média \pm DP da concentração plasmática do fluazuron (ng.mL^{-1}) em porquinhos-da-índia tratados por gavagem com doses múltiplas (1mg/kg, 5mg/kg e 10mg/kg).

Grupos	Dias de avaliação					
	D +1	D +2	D +4	D +7	D +15	D +21
G1	50.87 \pm 3.55 ^a	298,99 \pm 141.45 ^{a,b}	400.67 \pm 160.53 ^{a,b}	98.12 \pm 19.89 ^{a,c}	157.83 \pm 102.64 ^{a,b,c}	52.29 \pm 29.43 ^{a,c}
G2	164.44 \pm 9.78 ^b	226.96 \pm 110.04 ^b	509.99 \pm 366.23 ^b	250.20 \pm 79.95 ^b	348.37 \pm 158.47 ^{a,b}	161.40 \pm 66.62 ^b
G3	377.77 \pm 46.62 ^b	525.00 \pm 38.50 ^b	701.43 \pm 423.42 ^b	519.02 \pm 273.33 ^{b,c}	499.73 \pm 220.76 ^b	293.84 \pm 151.17 ^b

Valores seguidos pela mesma letra na linha da média não diferiram significativamente entre si, com nível de significância de 5%; valores seguidos por letras diferentes na coluna dos dias, diferiram entre si, com nível de significância de 5%.

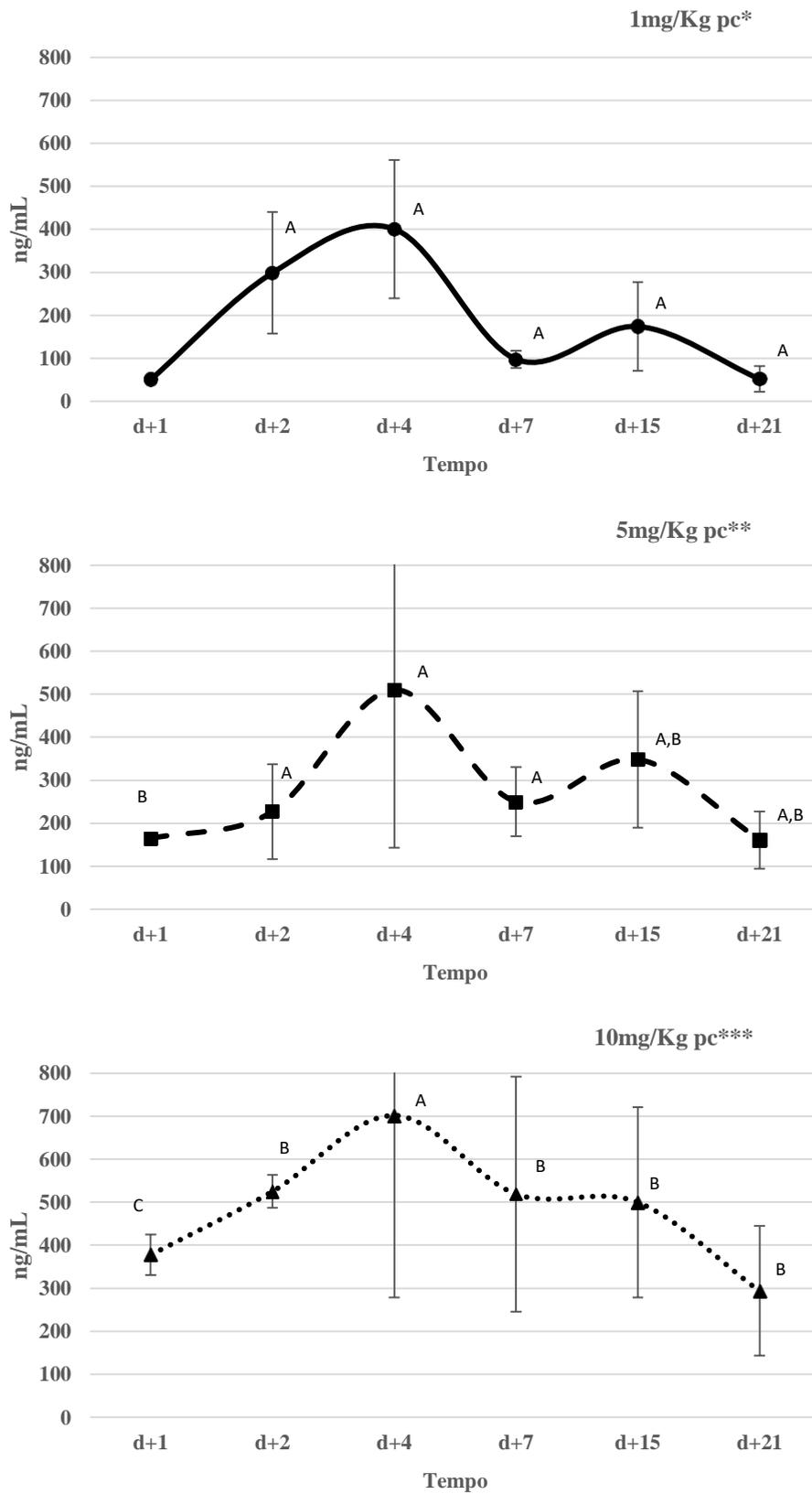


Figura 20. Média \pm desvio padrão da concentração plasmática do fluazuron após administração por gavagem por 15 dias consecutivos de fluazuron nas doses 1, 5 e 10mg/kg para porquinhos-da-índia (n=8).

Pasay et al. (2012) administrou o fluazuron por via oral por sete dias (10 mg/kg/dia) para controlar a infestação por *S. scabiei* em três porcos e atingiu picos plasmáticos de 300 - 800 ng.mL⁻¹ no dia 7, semelhante ao resultado observado nesta etapa (Estudo I), com média de 701,43 ng.mL⁻¹ no dia 4 (pico plasmático) em animais tratados com 10 mg/kg/dia. Embora esses autores não tenham calculado os parâmetros farmacocinéticos, foi observado o mesmo comportamento, com absorção rápida e eliminação lenta.

Os resultados obtidos mostraram um aumento na concentração plasmática de fluazuron com o aumento da dose no dia +1. No entanto, do dia +4 até o último dia de avaliação (+21), as concentrações plasmáticas médias não diferiram significativamente entre os grupos. Os resultados de eficácia mostraram que mesmo a dose mais baixa alcançou 100% de eficácia contra a muda das larvas ingurgitadas. Esses resultados, associados aos do Estudo II (descrito abaixo), permitiram a escolha de uma dose entre 1 e 10 mg/kg (via oral) para realização dos próximos estudos (III a VI) realizados.

Ao avaliarmos os dados de eficácia e das concentrações plasmáticas suscita-se a hipótese que seja possível diminuir a dose empregada em níveis inferiores a 1mg/Kg de peso corporal, mantendo os elevados níveis de eficácia na inibição do processo de muda de larva para ninfa. Tal possibilidade irá permitir o desenvolvimento de uma formulação menos onerosa. Estes resultados demonstram que o fluazuron tem potencial para ser empregado de forma continuada, por exemplo, incorporado ao sal mineral e fornecido para roedores de vida selvagem para o controle de *A. sculptum*.

Embora os resultados sejam promissores, é preciso destacar que estudos na espécie (hospedeiro) alvo precisam ser conduzidos, ou seja, serão necessários estudos em capivaras para que verificação da confirmação dos resultados obtidos para porquinhos-da-índia.

Além disso, serão necessários estudos específicos para verificar a segurança do uso na espécie e, também, os impactos no ambiente. É importante que os impactos ambientais sejam avaliados visto que o fluazuron é eliminado de forma inalterada nas fezes e as capivaras possuem o hábito de defecar tanto no solo quanto na água. Já se sabe que o fluazuron pode interferir no desenvolvimento de artrópodes de vida livre que possuem papel relevante na manutenção do equilíbrio ambiental no solo e na água.

4.2 Estudo II: Farmacocinética descritiva do fluazuron administrado por gavagem

As curvas de concentração plasmática de fluazuron versus tempo após tratamento em dose única por gavagem são mostradas na Figura 21. As concentrações plasmáticas de fluazuron aumentaram rapidamente, indicando rápida absorção, atingindo C_{max} de $356,55 \pm 133,75$ ng/mL em $0,77 \pm 0,35$ dias (T_{max}), com intervalos de absorção (AUC_{0-t}) de $2327,99 \pm 673,39$, ng/mL*d, e eliminação lenta com t_{1/2} de $6,94 \pm 1,47$ (Tabela 4), comportamento esperado e já descrito por Graf (1993).

No Estudo I, no d+7, o G1 apresentou concentração plasmática do fluazuron de $98,12$ ng.mL⁻¹ ($\pm 19,89$), semelhante ao resultado do Estudo II no mesmo dia experimental (d+7). Como no estudo de dose múltipla (Estudo I) foi obtido 100% de eficácia na inibição da muda em concentrações plasmáticas de fluazuron próximas a 100 ng.mL⁻¹, talvez o tratamento a cada 7 dias com dose oral de fluazuron de 10 mg/kg fosse suficiente para controlar *A. sculptum* em porquinhos-da-índia.

O uso do fluazuron como ectoparasiticida e seus parâmetros farmacocinéticos foram descritos por Lopes et al. (2017) e Ferreira et al. (2019) para formulações “pour-on” em bovinos ($2,5$ mg/kg, dose única). No entanto, de acordo com Flajs e Grabnar (2002), embora a comparação de parâmetros farmacocinéticos entre diferentes espécies e com diferentes vias de administração não seja recomendada, ainda é possível comparar o tempo médio em que os níveis da droga podem ser detectados no plasma sanguíneo.

No Estudo II, foi observado o mesmo padrão de absorção rápida e eliminação lenta do fluazuron relatado por Lopes et al. (2017) e Ferreira et al. (2019).

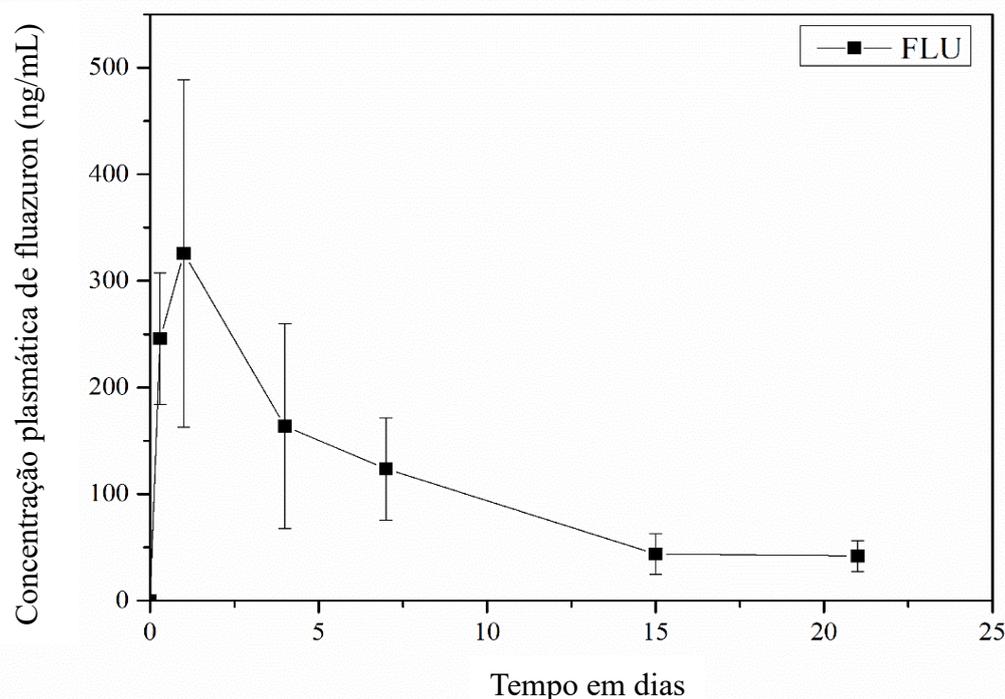


Figura 21. Média \pm desvio padrão da concentração plasmática do fluazuron após administração oral de fluazuron (10mg/Kg) para porquinhos-da-índia (n=8).

Tabela 4. Parâmetros farmacocinéticos do fluazuron em porquinhos-da-índia após administração oral de fluazuron (10mg/kg) (n=8).

Parâmetros Farmacocinéticos	Média Aritmética \pm DP
C_{max} (ng/mL)	356,55 \pm 133,75
T_{max} (d)	0,77 \pm 0,35
AUC _{0-t} (ng.d/mL)	2327,99 \pm 673,39
AUC _{0-∞} (ng.d/mL)	2768,13 \pm 708,61
$T_{1/2}$	6,94 \pm 1,47

Média \pm DP; t_{max} (tempo para atingir o pico plasmático); C_{max} (pico da concentração plasmática); AUC_{0-t} (área sob a curva do tempo zero até a última concentração detectável); $t_{1/2}$ (meia-vida terminal); AUC_{0-∞} (área sob a curva do tempo zero a infinito).

4.3 Estudo III: Desenvolvimento de formulação em iscas

Baseado nos resultados obtidos nos estudos anteriores (Estudo I e II), foi escolhida a dose de 10mg/Kg de fluazuron para ser testada e administrada em iscas medicamentosas para porquinhos-da-índia. Como a eficácia na interrupção da muda de larva para ninfa foi

elevada e os dados de biodisponibilidade mostraram persistência elevada no plasma, fato que corrobora com outros achados publicados, aventou-se a possibilidade do fluazuron ser administrado em dose única, em sistemas de liberação de fármacos para animais selvagens, para controlar o carrapato alvo deste estudo. Como não foi encontrado nenhum trabalho com formulações em forma de isca ou sistemas de liberação de fármacos para porquinhos-da-índia, a formulação teve que ser, primeiramente, desenvolvida.

Como a intenção era que os animais ingerissem as iscas voluntariamente, mimetizando uma situação de campo em que seria fornecida em sistemas de liberação de fármacos, a formulação obrigatoriamente deveria ser palatável. Como Thombre (2004) já havia explicado que o mascaramento do sabor e do odor de fármacos amargos pode ser feita com a adição de produtos à base de alimentos, foram escolhidos ingredientes sabidamente palatáveis, já utilizados em iscas para roedores por outros autores (DAVIS, 1999; SLOWIK et al., 2001; DAVIS et al., 2008; BORCHERT et al., 2009; POCHÉ et al., 2017; POCHÉ et al., 2018; PELLETIER et al., 2020; PELLETIER et al., 2022).

Todos os estudos citados neste trabalho com iscas palatáveis aplicadas em sistemas de liberação de fármacos para roedores, utilizaram a cera parafina, por possuir propriedades termoplásticas e de resistência à água (FREUND et al., 1982), característica essencial para que os ativos presentes nas iscas permaneçam estáveis por mais tempo. Nenhum dos estudos especifica se utilizaram a parafina de vela ou a alimentícia. Sendo assim, foi optado por testar as duas parafinas e mais os outros tipos de ceras consideradas também atóxicas.

Antes de preparar as formulações, foi observado que a cera de abelha pura, ao toque, era a mais dura dentre todas as ceras mas, ao mesmo tempo, tinha um odor forte, que talvez mascarasse o odor dos ingredientes da massa que atrairiam os porquinhos-da-índia. Para tentar minimizar o odor sem perder essa possível característica da dureza, foi pensado nas formulações F3 e F4, que continham também a parafina alimentícia.

As características organolépticas de cada formulação em isca (ainda sem o fluazuron) testada podem ser observadas na Tabela 5. Os parâmetros de cor e textura foram apenas observacionais, já que o resultado deles não seria utilizado como critério para inclusão ou exclusão da formulação testada. A cor e a textura poderiam ser um critério de aceitação ou não pelos animais, mas como não há nada descrito sobre qual cor ou textura os porquinhos-da-índia preferem, corroborou para que esses resultados não fossem considerados critérios.

Tabela 5. Características organolépticas de seis formulações em iscas desenvolvidas para porquinhos-da-índia.

Formulações	Parâmetros avaliados			
	Cor	Textura	Dureza	Homogeneidade
F1	Amarela	Áspero	1	2
F2	Marrom	Áspero	1	0
F3	Marrom	Liso	2	2
F4	Marrom	Áspero	2	1
F5	Amarela	Oleoso	0	0
F6	Marrom	Liso	2	2

F1- Parafina alimentícia + Massa (1:1); F2- Parafina vela + Massa (1:1); F3- Parafina alimentícia + Cera de abelha + Massa (1:1:2); F4- Parafina alimentícia + Cera de abelha + Massa (2:1:3); F5- Cera de coco + Massa (1:1); F6- Cera de abelha + Massa (1:1).

No critério “dureza”, apenas a formulação F5 não foi considerada adequada, pois era macia (branda). As formulações em iscas já descritas para roedores possuem a característica de serem duras, para que sejam mais atrativas e a espécie-alvo.

No critério de homogeneidade, apenas as formulações F1, F3 e F6 estavam adequadas. A homogeneidade é importante, pois as formulações heterogêneas sugerem instabilidade (ISAAC et al., 2018), ou seja, no caso deste trabalho especificamente, significa que a cera não ficou igualmente distribuída em toda a isca, tornando-a menos resistente as intempéries.

Apesar dos resultados das características organolépticas, se optou por realizar os testes de resistência à água e à variação de temperatura em todas as 6 formulações.

Para a avaliação de resistência à água, as formulações foram pesadas antes da exposição e em vários tempos pós início da exposição para verificar o quanto de água cada formulação absorveu (Tabela 6). As formulações F3 e F4 se dissolveram completamente na avaliação pós 24h e as formulações F5 e F6 na avaliação de pós 48h. Apesar da cera de abelha pura ser mais dura ao toque, todas as formulações que a continham, foram as menos resistentes à água, o que mostra que dureza não está necessariamente associada a resistência à água.

Tabela 6. Avaliação da resistência à água de seis diferentes formulações em iscas para porquinhos-da-índia.

Formulações	Tempos de avaliação									
	0 min	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	60 min	120 min	24h	48h
F1	2,381	2,391	2,392	2,392	2,391	2,389	2,464	2,401	2,853	3,065
F2	2,520	2,531	2,538	2,525	2,531	2,543	2,533	2,546	3,19	3,772
F3	2,497	2,516	2,523	2,529	2,531	2,547	2,53	2,588	*	*
F4	2,411	2,440	2,460	2,49	2,538	2,568	2,704	2,999	*	*
F5	2,793	2,799	2,807	2,813	2,819	2,830	2,892	2,838	3,306	*
F6	2,653	2,678	2,691	2,699	2,700	2,685	2,741	2,791	4,353	*

*o bloco dissolveu completamente; F1- Parafina alimentícia + Massa (1:1); F2- Parafina vela + Massa (1:1); F3- Parafina alimentícia + Cera de abelha + Massa (1:1:2); F4- Parafina alimentícia + Cera de abelha + Massa (2:1:3); F5- Cera de coco + Massa (1:1); F6- Cera de abelha + Massa (1:1).

Nas avaliações de resistência à diferentes temperaturas, foi realizada a pesagem das iscas antes e 24h após a exposição para observar se houve perda ou absorção de água devido à uma possível instabilidade da formulação causada pela variação de temperatura. Todas as formulações tiveram uma variação mínima de seu peso inicial e, por isso, não foi estatisticamente significativa (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação de resistência à diferentes temperaturas em seis formulações em iscas para porquinhos-da-índia.

Temperaturas	Tempos de avaliação	Formulações					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
40°C	0	2,647	2,714	2,735	2,362	2,763	2,677
	24h	2,645	2,711	2,734	2,36	2,75	2,677
22°C	0	2,605	2,397	2,562	2,185	2,741	2,634
	24h	2,609	2,406	2,563	2,189	2,744	2,637
6°C	0	2,804	1,837	3,083	2,366	2,730	2,789
	24h	2,806	1,84	3,088	2,371	2,732	2,792

F1- Parafina alimentícia + Massa (1:1); F2- Parafina vela + Massa (1:1); F3- Parafina alimentícia + Cera de abelha + Massa (1:1:2); F4- Parafina alimentícia + Cera de abelha + Massa (2:1:3); F5- Cera de coco + Massa (1:1); F6- Cera de abelha + Massa (1:1).

A única formulação que foi aprovada em todas as avaliações, ou seja, foi dura, homogênea, resistente à água e à variação de temperatura, foi F1 e, por isso, foi a selecionada para incorporação do ativo fluazuron em pó para testes de uniformidade de dose. Como os porquinhos-da-índia possuem um peso médio de 500g e a dose de fluazuron escolhida foi de 10mg/Kg, cada isca recebeu o equivalente a 5mg do ativo fluazuron.

O peso médio das iscas foi de 2,8573g. Considerando-se o limite de variação de 10% que a Farmacopéia Brasileira (2019) orienta, as iscas poderiam ter seu peso variando entre 2,572g a 3,143g, estando assim todas dentro dos parâmetros estabelecidos, conforme tabela abaixo (Tabela 8).

Tabela 8. Peso médio de 20 iscas contendo fluazuron para porquinhos-da-índia.

Amostras	Peso (g)
1	2,9929
2	2,7725
3	2,6075
4	2,8907
5	2,648
6	2,9702
7	2,9600
8	2,9498
9	2,8638
10	2,8231
11	2,9383
12	2,9983
13	2,7661
14	2,7701
15	2,8715
16	2,9158
17	2,9889
18	2,6189
19	2,9510
20	2,8481
PM	2,8570
DP	0,125
DPR	4,36%
	2,572
±10%	3,143

PM= peso médio

DP= Desvio padrão

DPR= Desvio padrão relativo

Para o doseamento, observou-se que os teores das iscas variaram entre 107,46 e 112,03%, tendo 109,01% como teor médio (Tabela 9). A concentração de princípio ativo utilizada foi calculada com base no número de iscas desejadas mais duas unidades, para evitar que esteja em uma concentração inferior a desejada. Contudo, obteve-se um teor acima de 100%, indicando uma concentração superior a desejada, mas dentro de um limite aceitável pela Farmacopéia Brasileira (2019).

Tabela 9. Doseamento de iscas contendo fluazuron para porquinhos-da-índia.

Doseamento											
Amostras	Área	Média	Conc Dil	FD (µg/mL)	Peso (g)	Massa (mg/ml)	Massa cp (mg)	Teor (%)	Média Teor (%)	DP	DPR
1	2,72	2,720	5,61	5605,57	2,8594	5,606	5,60	112,0281			
2	2,524 2,521	2,523	5,38	5376,45	2,8572	5,376	5,38	107,5318	109,0078944	2,615754	2,40%
3	2,524 2,52	2,522	5,38	5375,87	2,8587	5,376	5,37	107,4638			

DP= Desvio padrão; DPR= Desvio padrão relativo;

Na análise de uniformidade de conteúdo, o teor médio das iscas analisadas é de 107,43%, variando de 94,04 a 121,58%. Contudo, o valor de aceitação obtido foi de 27,59 e o limite máximo permitido pela Farmacopéia Brasileira (2019) é de 15 (Tabela 10). Logo, faz-se necessário homogeneizar o princípio com mais cuidado, a fim de garantir uma distribuição mais uniforme do mesmo nos blocos.

No ensaio de uniformidade por variação de peso, o teor médio dos blocos com base nos resultados do doseamento é de 109,01% variando de 99,59 a 114,01%, sendo o peso médio dos blocos de aproximadamente 2,87g (Tabela 11). Assim, pode-se perceber que os valores de teor estão dentro do desvio máximo permitido para a análise individual dos blocos, que seria entre 75-125%. Tal fato pode ser observado pelo valor de aceitação inferior a 25.

Tabela 10. Avaliação da uniformidade de conteúdo de iscas contendo fluazuron.

Amostras	Área	Média	Conc Dil	Uniformidade de Conteúdo				Teor (%)	Média Teor (%)	DP	DPR
				FD (µg/mL)	Pesada (g)	Massa (mg/ml)	Massa cp (mg)				
1	2,646	2,6455	5,519	5519,142	2,938	5,519	5,367	107,339			
	2,645										
2	2,351	2,3525	5,179	5179,234	2,998	5,179	4,936	98,713			
	2,354										
3	2,271	2,268	5,081	5081,206	2,766	5,081	5,249	104,974			
	2,265										
4	2,302	2,3015	5,120	5120,070	2,770	5,120	5,281	105,624			
	2,301										
5	1,963	1,9615	4,726	4725,638	2,872	4,726	4,702	94,045	107,43	8,40	7,82%
	1,96										
6	2,816	2,813	5,713	5713,457	2,916	5,713	5,599	111,976			
	2,81										
7	2,984	2,9855	5,914	5913,573	2,989	5,914	5,653	113,063			
	2,987										
8	2,69	2,691	5,572	5571,926	2,619	5,572	6,079	121,582			
	2,692										
9	2,382	2,38	5,211	5211,137	2,951	5,211	5,046	100,913			
	2,378										
10	2,876	2,8755	5,786	5785,963	2,848	5,786	5,805	116,092			
	2,875										
									VA	27,59	

DP= Desvio padrão; DPR= Desvio padrão relativo;

Tabela 11. Avaliação da uniformidade de doses por variação de peso de iscas contendo fluazuron.

Amostras	Peso (g)	Teor (%)
1	2,938	111,73
2	2,998	114,01
3	2,766	105,18
4	2,770	105,33
5	2,872	109,19
6	2,916	110,87
7	2,989	113,65
8	2,619	99,59
9	2,951	112,21
10	2,848	108,30
PM	2,867	
Média		109,01
DP		4,54
VA		19,90

PM= Peso médio
DP= Desvio padrão
VA= Valor de aceitação

4.4 Estudo IV: Aceitação voluntária da isca

Após o desenvolvimento e escolha da melhor formulação em isca, foi dado início ao estudo de aceitação voluntária. A quantidade de animais utilizada neste estudo atendeu ao mínimo preconizado pelo CVMP (2014), tendo 25 animais em cada grupo experimental.

Durante os cinco dias de avaliação da aceitação voluntária, apenas dois animais de cada grupo não ingeriram a isca (escore 20mm) e nenhum animal ingeriu a isca apenas parcialmente (escore 40mm).

Os escores 20mm e 40mm foram considerados como rejeição, já que, conforme Thombre (2004), o importante era que a medicação fosse totalmente consumida no período pré-determinado.

As iscas placebo e tratado foram palatáveis em, pelo menos, 92% das vezes, atendendo a taxa mínima de aceitação (70%) indicada pela CVMP (2014) para outras espécies animais que não sejam cães.

As médias de escore sensorial em mm para os grupos placebo e tratado foram de 83,67 e 84,51, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os grupos já que foi obtido valor de $p = 0,00$ (Tabela 12).

Tabela 12. Avaliação da palatabilidade de iscas placebo e com fluazuron (5mg) para porquinhos-da-índia.

Formulação	Escore (mm)	Aceitação			Rejeição		Média do escore sensorial (mm) ± DP
		100	80	60	40	20	
Placebo	nº animal/escore	52	44	19	0	10	83,67628 ± 2,019058
	N (%)	115 (92%)			10 (8%)		
Tratado	nº animal/escore	48	47	20	0	10	84,51355 ± 2,037886
	N (%)	115 (92%)			10 (8%)		
	Teste de não inferioridade*	Valor de p				0,00000	

*Teste de não inferioridade de dose foi realizado para os dados de escore sensorial (iscas contendo fluazuron e placebo) utilizando NCSS2021, versão 20.0.2 (NCSS, LLC, Kaysville, Utah, EUA, 2021). Valores demonstraram não inferioridade quando $p \leq 0.05$ com margem de tolerância de 20 mm

A metodologia empregada poderia ter sido adaptada do teste das duas tigelas, (ALDRICH; KOPPEL, 2015) mas o resultado poderia não ser fidedigno, pois seriam necessários dois comedouros para disponibilizar uma isca placebo em um e uma tratado em outro e, a escolha poderia ser apenas baseada na preferência por um comedouro específico ou até pela localização do comedouro. Foi pensado em adicionar pigmento nas iscas de um dos grupos, mas isso também poderia interferir na escolha do animal, então optou-se por dividir os animais em dois grupos e avaliar de acordo com a intensidade em que a isca seria ingerida.

Para nenhuma das avaliações a ração foi retirada, pois era fundamental que os animais tivessem interesse em consumir as iscas, mesmo sem fome, para mimetizar uma situação de campo, em que poderia haver abundante disponibilidade de comida. Além disso, Poché et al. (2021) já demonstrou que mesmo com a disponibilidade de comida, os roedores consomem as iscas quando são palatáveis para a espécie.

Para verificação do consumo em estudos a campo, em alguns estudos eram adicionados corantes, que alteravam a coloração das fezes COWLED et al., 2006; DAVIS et al., 2008;

SLOWIK et al., 2001). Como neste estudo os animais estavam individualizados, não haveria necessidade de colocar um corante para verificar se a isca foi completamente ingerida ou não.

4.5 Estudo V: Farmacocinética descritiva do fluazuron administrado em isca

As médias e a curva de concentração plasmática de fluazuron versus tempo após tratamento em dose única com a isca na dose de 10mg/kg podem ser observadas na Tabela 13 e Figura 22, respectivamente.

As concentrações plasmáticas de fluazuron aumentaram rapidamente, indicando rápida absorção, atingindo Cmax de $107,23 \pm 46,69$ ng/mL em $0,90 \pm 1,04$ dias (Tmax), com intervalos de absorção (AUC0 -t) de $862,99 \pm 182,05$, ng/mL*d, e eliminação lenta com t1/2 de $6,63 \pm 2,02$ (Tabela 14), mesmo comportamento obtido para o Estudo II, conforme esperado e já descrito por Graf (1993), Lopes et al. (2017) e Ferreira et al. (2019).

Como dito anteriormente, é possível observar que as médias de concentração plasmática do Estudo II e V apresentam o mesmo comportamento de atingir o pico plasmático nas primeiras 24h (rápida absorção) e lenta excreção que pode ser observada ao longo dos dias. No entanto, as médias de concentração plasmática observadas nos animais tratados com a isca (Estudo V) é, pelo menos três vezes menor do que nos animais tratados por gavagem (Estudo II), o que demonstra que a formulação em isca interferiu na absorção do fluazuron. Isso pode ter ocorrido pela parafina ter impedido a liberação do fármaco, já que possui propriedades de resistência à água ou por ter passado mais rápido do que o trato gastrointestinal dos animais consegue digerir, não dando tempo suficiente para absorção de todo o fármaco.

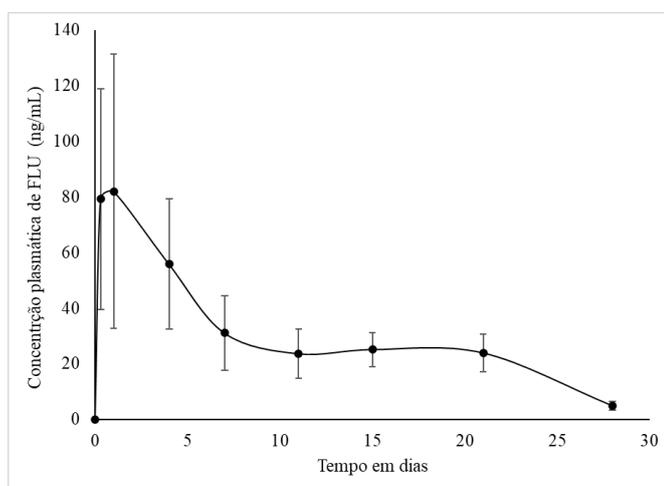


Figura 22. Média± DP da concentração plasmática do fluazuron após administração oral de fluazuron na dose única de 10 mg/kg para porquinhos-da-índia (n = 12).

Tabela 13. Média \pm DP da concentração plasmática do fluazuron (ng.mL^{-1}) em porquinhos-da-índia tratados com dose única de um bloco medicamentoso contendo fluazuron (10mg/kg).

Dia Experimental	D0+8h	D+1	D+4	D+7	D+11	D+15	D+21	D=28
Média \pm DP	79,24 \pm 39,73	81,99 \pm 49,30	55,86 \pm 23,51	31,08 \pm 13,41	23,66 \pm 8,81	25,15 \pm 6,09	23,95 \pm 6,76	4,97 \pm 1,58

Tabela 14. Parâmetros farmacocinéticos do fluazuron em porquinhos-da-índia após administração oral de bloco medicamentoso contendo fluazuron (10mg/kg) (n=12).

Parâmetros Farmacocinéticos	Média Aritmética ± DP
C _{max} (ng/mL)	107,23 ± 46,69
T _{max} (d)	0,90 ± 1,04
AUC _{0-t} (ng.d/mL)	862,99 ± 182,05
AUC _{0-∞} (ng.d/mL)	911,65 ± 181,09
T _{1/2} (d)	6,63 ± 2,02

Média ± DP; t_{max} (tempo para atingir o pico plasmático); C_{max} (pico da concentração plasmática); AUC_{0-t} (área sob a curva do tempo zero até a última concentração detectável); t_{1/2} (meia-vida terminal); AUC_{0-∞} (área sob a curva do tempo zero a infinito).

Os resultados obtidos neste estudo são importantes porque demonstram as características farmacocinéticas do fluazuron administrado nas condições experimentais presentes. Destaca-se o fato que comparado com a administração única por gavagem. No estudo II o C_{max} obtido foi de 356,55 ng/mL contra 107,23 ± 46,69 ng/mL para este estudo, ou seja, 3,32 vezes maior para o primeiro. Houve um ligeiro aumento no T_{max}, no Estudo II foi determinado 0,77±0,35 dias contra 0,90 ± 1,04 dias. No parâmetro AUC_{0-t} observou-se valores de 2327,99±673,39 ng.d/mL para o Estudo II e de 862,99 ± 182,05 ng.d/mL para o Estudo V. Para AUC_{0-∞}, obteve-se para o Estudo II valores de 2768,13±708,61 ng.d/mL contra 911,65 ± 181,09 ng.d/mL para o Estudo V. No caso T_{1/2} encontrou-se valores de 6,94±1,47 dias para o Estudo II e de 6,63 ± 2,02 dias para o Estudo V.

Tais resultados demonstram o quanto a formulação interferiu na absorção distribuição e excreção do fluazuron. Isto é relevante porque poderá indicar doses mais elevadas do que as empregadas por gavagem.

4.6 Estudo VI: Avaliação da eficácia do fluazuron administrado em isca no controle de *Amblyomma sculptum*

Como todo este trabalho visou a possibilidade futura de fornecer iscas contendo fluazuron para capivaras, nesta última etapa, baseado nos resultados do Estudo V, foi traçado um delineamento experimental com a ideia de verificar se as iscas poderiam ser fornecidas a cada 7, 14 ou 21 dias e controlar o carrapato *A. sculptum* em porquinhos-da-índia.

O delineamento deste estudo seguiu um cronograma diferente dos anteriores, visando minimizar o número de animais utilizados e, por isso, os animais não foram tratados no mesmo dia e o dia zero foi o dia da infestação.

Os resultados da eficácia da isca podem ser observados na Tabela 15.

Tabela 15. Avaliação da recuperação e do processo de muda de larvas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* recuperadas de porquinhos-da-índia artificialmente infestados para o grupo controle e tratados com isca contendo fluazuron (10mg/kg) (n=32) em diferentes tempos antes da infestação.

Grupos	Média de larvas ingurgitadas desprendidas	Eficácia larvicida (%)	Média de ninfas que mudaram (%)	Ninfas que mudaram (%)	Inibição do processo de muda (%)
GC	546,6 ± 379,6 ^a	---	380,0 ± 239,9	70,8 ± 6,6 ^a	---
G1	790, 9 ± 570, 8 ^a	0	254,5 ± 292,3	24,8 ± 13,2 ^b	64,99
G2	573,1 ± 278,7 ^a	0	192,9 ± 180,4	27,0 ± 18,7 ^b	61,88
G3	626,4 ± 297,6 ^a	0	200,3 ± 113,6	28,8 ± 12,3 ^b	59,31

Letras sobrescritas iguais valores não são significativos ($p > 0,05$); letras sobrescritas diferentes valores não significativos ($p \leq 0,05$); GC- Grupo controle (não recebeu nenhum tratamento); G1- recebeu a isca 21 dias antes da infestação; G2- recebeu a isca 14 dias antes da infestação; G3- recebeu a isca 7 dias antes da infestação.

Nos resultados observados para esta etapa, assim como para o Estudo I, pode-se observar que o fluazuron administrado na dose de 10mg/Kg, na forma de isca, não interferiu na recuperação das larvas ingurgitadas. O número médio de larvas ingurgitadas entre os quatro grupos experimentais não diferiu significativamente ($p > 0,05$) (Tabela 15).

No entanto, não foi obtido os mesmos níveis elevados de eficácia na interrupção do processo de muda de larva para ninfa. Os dados observados indicaram níveis de eficácia de 64,99% (dia +7), 61,88% (dia +14) e 59,31% (dia +21). A análise estatística demonstrou diferença estatística da média observada para o GC em comparação com as dos G1, G2 e G3. ($p \leq 0,05$) (Tabela 15)., mas não houve diferença significativa nas médias entre os grupos tratados ($p > 0,05$) (Tabela 15).

Ao se observar que não houve diferença estatística na farmacocinética descritiva da isca (Estudo V) entre os valores médios de concentração plasmática para os dias +7, +15 e +21(Tabela 13), é possível justificar o porquê de também não ter sido observada diferença estatística quanto a eficácia entre os grupos experimentais tratados com a isca (Tabela 15) , ou

seja, como não houve diferença entre os níveis médios de fluazuron para estes dias após o tratamento, também não houve diferença entre os níveis de eficácia.

Oliveira et al. (2012a) observaram diferenças entre os grupos controle e tratados em ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus* recuperadas de coelhos tratados com diferentes doses de fluazuron pela via tópica, que não foram observadas em nenhum dos dois estudos de eficácia realizados neste trabalho. As observações feitas por eles que diferiram grupos tratados e controle foram: período de muda, que foi mais longo para os grupos tratados; tamanho dos espécimes ingurgitados recuperados, que foi menor nos grupos tratados; as primeiras ninfas ingurgitadas a se desprender foram mais afetadas (mortas) pelo fluazuron nos grupos que receberam doses a partir de 15mg/kg. Possivelmente, se os porquinhos-da-índia tivessem recebido doses superiores a 15mg/kg, as larvas de *A. sculptum* também teriam sido mais afetadas e pudesse ter sido observada eficácia larvicida.

Ao se observar os dados de farmacocinética, é possível perceber que a formulação em isca afetou de forma negativa a eficácia do fluazuron. Assim, o aumento da dose poderá aumentar os valores de eficácia na interrupção da muda de larva para ninfa e no período de ação, possivelmente superando os 21 dias.

Apesar da predominância de larvas de *A. sculptum* ser na época de outono e inverno (OLIVEIRA et al., 2000; LABRUNA et al., 2002) e de em seu comportamento no ambiente apresentar a diapausa, os estudos de eficácia ocorreram no verão (Estudo I) e primavera (Estudo VI) sem intercorrências, já que as larvas utilizadas eram oriundas de uma colônia mantida em condições de temperatura, umidade e fotoperíodo controlados.

O fluazuron administrado por via oral em porquinhos-da-índia também pode ser considerado bem-sucedido no controle de carrapatos *A. sculptum* quando utilizada a dose adequada e, não só quando administrado pela via tópica em outros animais para o controle de carrapatos monoxenos (GRAF, 1993; JUNQUERA et al., 2019).

O uso do fluazuron administrado por via oral possui vantagem em relação ao uso tópico quando empregado em animais que podem ficar expostos à chuva ou que sejam semiaquáticos (exemplo: capivara (MACDONALD, 1981)), pois ZAPA et al. (2020) já comprovaram que a eficácia terapêutica e residual do fluazuron empregado pela via tópica foi consideravelmente reduzida em animais expostos à chuva.

O fluazuron, assim como outros reguladores de crescimento de insetos, vem sendo amplamente utilizados por via oral para o controle de ectoparasitos de roedores selvagens, no entanto, apenas o estudo de Pasay et al. (2012) administrou diretamente a solução de fluazuron

pela via oral. Neste trabalho, foi utilizado primeiramente o fluazuron por gavagem para que houvesse garantia de que o animal ingeriu todo o fármaco, assim os dados farmacocinéticos e de eficácia seriam mais fidedignos. Apenas após ter os resultados da administração por gavagem, que foi realizado o estudo com o uso das iscas. Isso permitiu que fosse feita uma comparação dos resultados de eficácia e farmacocinética para cada formulação e, também, pôde-se observar que a formulação em isca interferiu na absorção do ativo.

Os sistemas de liberação de fármacos vem sendo amplamente empregados para o controle de ectoparasitos em roedores com o uso de iscas, mas nem sempre os sistemas são eficazes. Enquanto neste estudo cada isca tinha 5mg de fluazuron e foi obtida eficácia entre 59 e 64,99%, no estudo realizado por Slowik et al. (2001) com ratos, cada isca tinha 40mg de fluazuron e não foi obtida nenhuma eficácia para o controle de carrapatos, mas obteve eficácia para o controle de pulgas. A explicação para esses resultados divergentes talvez possa ser justificada pela eficácia ter sido avaliada em espécies de roedores e/ou carrapatos diferentes.

Um estudo controlado realizado por Pelletier et al. (2020) com a isoxazolina fluralaner, foi obtido eficácia de 94% 2 dias após o tratamento, mas de menos de 4% 28 dias após o tratamento – os autores não realizaram avaliações entre essas duas tomadas de tempo. Neste estudo, foram feitas avaliações em três tempos diferentes, com intervalos mais curtos do que os realizados por Pelletier et al. (2020) para que fosse possível determinar o intervalo de administração entre doses que poderia ser aplicado para o controle efetivo de larvas de *A. sculptum*. Ao contrário de Pelletier et al. (2020), é possível afirmar que administrações a cada 21 dias da isca contendo 5mg de fluazuron irão promover níveis de eficácia próximos a 65%.

Apesar de grande parte do fluazuron (62 a 81%) ser excretado de forma inalterada nas fezes (GRAAF, 1993; FAO, 1998), não foi verificada a quantidade excretada nas fezes pelos porquinhos-da-índia por serem animais pequenos que não produzem a quantidade diária mínima de fezes que seria necessária para a análise.

Nenhuma reação adversa foi observada nos cinco estudos realizados com porquinhos-da-índia – todos os animais permaneceram clinicamente saudáveis durante todo o período experimental.

Os achados neste Estudo permitiram apontar o potencial que o fluazuron tem para controlar o *A. sculptum* a partir da sua administração em formulação de isca, para oferecimento na natureza para roedores selvagens. Obviamente que todas as considerações realizadas no Estudo II necessitam ser abordadas aqui: necessidade de verificar a segurança no hospedeiro alvo; aceitação voluntária da isca; impacto no ambiente; etc.

Com base em todos os resultados observados nos seis Estudos conduzidos no presente trabalho, pode-se verificar que porquinhos-da-índia poderão ser empregados como modelo experimental para explorar o potencial de moléculas com ação sistêmica para o controle de *A. sculptum* em roedores selvagens.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- 1- O fluazuron empregado por gavagem em porquinhos-da índia nas doses de 1, 5 e 10mg/Kg de peso corporal, foi eficaz na interrupção do processo de muda de larva para ninfa. O aumento da dosagem não se refletiu em uma diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de fluazuron;
- 2- A administração do fluazuron por gavagem em porquinhos-da índia, em dose única, indicaram através de dados farmacocinéticos uma rápida absorção e lenta eliminação;
- 3- Foi possível desenvolver uma formulação na forma de isca contendo fluazuron (10mg/kg) que tivesse características organolépticas desejáveis, resistência a água e a diferentes temperaturas, que apresentasse uniformidade no teor de fluazuron e que fosse palatável para porquinhos-da-índia. A formulação que se adequou foi a F1, composta por parafina alimentícia, farinha de aveia, manteiga de amendoim em pó, alfafa peletizada para roedores, glicerina e ração para porquinhos-da-índia.
- 4- Os dados de farmacocinética demonstraram uma rápida absorção e lenta excreção do fluazuron administrado na forma de isca na dose de 10m/Kg de peso corporal. A formulação em isca promoveu menor absorção e distribuição do fluazuron em relação a administração por gavagem.
- 5- O fluazuron administrado na dose de 10mg/kg de peso corporal em uma formulação em isca, administrado em dose única, mostrou potencial para o emprego no controle de *A. sculptum* em roedores selvagens, entretanto será necessário avaliar doses superiores a 10mg/kg.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nada como contemplar o entardecer vendo o sol se pôr no Lago do Instituto de Agronomia da UFRRJ, na companhia daquelas que são as mascotes de nossa amada instituição: as capivaras!

Símbolo não só da UFRRJ, mas também das cidades de Curitiba (PR), São José do Rio Preto (SP), Belo Horizonte (BH), Campo Grande (MT) e de tantos outros lugares pelo Brasil, a capivara é “protegida” por todos os frequentadores e moradores dessas regiões.

Infelizmente, estes animais vêm sendo alvo daqueles que, por medo da FMB, querem eliminá-las de áreas antropizadas.

De fato, as capivaras têm uma parcela de “culpa” na disseminação da bactéria, mas o verdadeiro “culpado” é o vetor: o carrapato *A. sculptum*. No entanto, a “solução” que as autoridades encontraram em vários lugares foi de realizar o abate dos animais nas áreas endêmicas de FMB. No entanto, já se passou uma década de casos sendo confirmados nos mesmos locais e as autoridades ainda parecem não ter entendido que o abate das capivaras não funciona, pois novos grupos de capivaras sempre vão migrar para esse tipo de ambiente e não há como promover a extinção da espécie.

São os maiores roedores do mundo, vivem em bandos com até 30 adultos e sempre próximas a lagoas, rios, savanas alagadas e pântanos, podendo ser encontradas também no interior de florestas tropicais úmidas, isso porque passam grande parte do dia dentro da água. Quando o ambiente em que vivem seca ou se torna desfavorável, elas migram para outro local que tenha lagos, açudes, etc e, assim, chegam aos centros urbanos.

Como já dito neste trabalho, as capivaras também adoecem quando infectadas pela bactéria, mas de forma assintomática. A grande questão é que elas só adoecem uma vez e quinze dias após a infecção não são mais capazes de infectar novos carrapatos. O que acontece na prática é: as capivaras adultas, que provavelmente já tinham entrado em contato com a bactéria e que não iriam mais infectar novos carrapatos, são abatidas. Isso abre espaço para um novo grupo de capivaras, que possivelmente não entrou em contato com a bactéria e tudo começa de novo.

Claro que só deixar os animais nos locais e não tomar nenhuma providência, também não soluciona o problema, já que vários filhotes vão nascer todos os anos e passar por todo o processo de infecção, perpetuando a presença da bactéria naquele local. A esterilização dos

animais adultos já se mostrou ineficaz e vem sendo muito criticada, já que promove desarmonia no bando, por haver a necessidade um macho alfa.

Ora, se o problema é o carrapato, devem ser implementadas medidas para seu controle, interferindo o mínimo possível nos animais, mas, ao mesmo tempo, mantendo-os livres deste ectoparasito tão problemático.

Como são animais de vida livre, os sistemas de liberação de fármacos são os mais indicados e a estratégia de oferecimento de iscas palatáveis contendo o acaricida fluazuron pode ser a opção mais adequada para minimizar o problema das infestações por *A. sculptum* em capivaras.

Este trabalho, embora ainda inicial, pôde demonstrar que o fluazuron tem potencial para ser incorporado em iscas, de ser aceito por roedores e de controlar seus ectoparasitos.

Como já dito inúmeras vezes ao longo deste trabalho, o porquinho-da-índia foi escolhido como modelo experimental por possuir anatomia e fisiologia muito semelhantes às capivaras e, ao mesmo tempo, ser muito menor, o que facilita seu manejo, manutenção em laboratório e reduz os custos de forma considerável.

Felizmente a escolha do modelo experimental pôde atender aos objetivos iniciais deste trabalho, mas, por ser um animal de tamanho pequeno, outras etapas não puderam ser propostas. Não foi possível realizar infestações com outras fases do carrapato *A. sculptum* (ninfas e adultos) e tampouco foi possível realizar coletas de sangue em todos os tempos ideais, já que os danos que seriam causados aos animais extrapolariam as boas práticas clínicas e o bem-estar animal. Mesmo com essas duas desvantagens, o trabalho pode ser executado e foram obtidos resultados satisfatórios e promissores.

Apesar do porquinho-da-índia ter se mostrado um modelo experimental adequado para esse tipo de estudo controlado, obviamente, para que as iscas sejam administradas para outros roedores há, sem dúvidas, a necessidade de que sejam realizados testes na espécie-alvo.

Vale lembrar que, antes mesmo de se testar na espécie alvo, é fundamental que seja estudado suas preferências e seu comportamento alimentar, visto que a isca deve ser manipulada com ingredientes palatáveis e aromatizantes para aquele animal. Além disso, se tornaria inviável do ponto de vista financeiro utilizar os mesmos ingredientes para as iscas de capivaras, por exemplo, visto que a ração para porquinhos-da-índia tem um custo elevado, o que acaba sendo um impeditivo para produção de iscas em tamanhos grandes e em larga escala.

A formulação proposta pode ser extrapolada para outras espécies, ou seja, pode ser utilizada como base. Já foi demonstrado aqui que a parafina alimentícia é a mais adequada para

formular iscas e que a glicerina possui papel aglutinante fundamental, ou seja, será necessário apenas a escolha dos ingredientes palatilizantes e aromatizantes e, então desenvolver a isca.

Além disso, agora também já se sabe que, as doses a serem testadas devem ser a partir de 10mg/kg e que o regime de administração das iscas, possivelmente, irá depender da dose escolhida, mas acredita-se que doses maiores poderão proporcionar regimes de administração mensal das iscas com níveis favoráveis de eficácia no controle de carrapatos.

Quando as iscas forem desenvolvidas para capivaras, o ideal é que se tente realizar estudos controlados, preferencialmente com filhotes, pela facilidade de manejo. Com os animais individualizados, será mais fácil de se obter resultados mais fidedignos, pois será possível avaliar o consumo da isca por cada animal, será possível fazer avaliações clínicas, infestar os animais com uma quantidade pré-determinada de carrapatos e realizar as coletas de sangue para determinação da biodisponibilidade plasmática em todos os tempos desejados. É importante lembrar que outros autores relataram muitas dificuldades em suas avaliações por terem realizado estudos a campo com roedores selvagens, enquanto os que realizaram estudos controlados obtiveram resultados mais confiáveis.

Apesar de ainda existir um caminho longo para alcançar o tão sonhado método eficaz de controle de *A. sculptum* em capivaras de vida livre, pode-se dizer que, talvez, este trabalho tenha dado aquele tão importante primeiro passo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOELHADID, S. M.; ARAFA, W. M.; WAHBA, A. A.; MAHROUS, L. N.; IBRAHIUM, S. M.; HOLMAN, P. J. Effect of high concentrations of lufenuron, pyriproxyfen and hydroxypropranolol on *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. **Veterinary Parasitology**, v. 256, p. 35-42, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.05.005>

AGWUNOBI, D. O.; YU, Z.; LIU, J. A retrospective review on ixodid tick resistance against synthetic acaricides: implications and perspectives for future resistance prevention and mitigation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 173, 104776, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104776>

AHMED, N. H.; RADWAN, W. A.; GUNEIDY, N. A.; MOHAMMED, S. S. Effect of juvenile hormone analogue (Admiral) on embryogenesis of the soft tick *Argas persicus* (Oken). **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences (A, Entomology)**, v. 2, n. 1, p. 165-176, 2009. <https://doi.org/10.21608/EAJBSA.2009.15716>

ALDRICH, G. C.; KOPPEL, K. Pet food palatability evaluation: a review of standard assay techniques and interpretation of results with a primary focus on limitations. **Animals**, v. 5, n. 1, p. 43-55, 2015. <https://doi.org/10.3390/ani5010043>

ALEGRÍA-LÓPEZ, M. A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; OJEDA-CHI, M. M.; ROSADO-AGUILAR, J. A. Use of ivermectin as endoparasiticide in tropical cattle herds generates resistance in gastrointestinal nematodes and the tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 2, p. 214-221, 2015. <https://doi.org/10.1093/jme/tju025>

ALONSO-DÍAZ, M. A.; FERNÁNDEZ-SALAS, A.; MARTÍNEZ-IBÁÑEZ, F.; OSORIO-MIRANDA, J. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) tick populations susceptible or resistant to acaricides in the Mexican Tropics. **Veterinary parasitology**, v. 197, n.1-2, p.326-331, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.004>

ALVES, P. R. L.; BANDEIRA, F. O.; GIRALDI, M.; PRESOTTO, R.; SEGAT, J. C.; CARDOSO, E. J. B. N.; BARETTA, D. Ecotoxicological assessment of Fluazuron: effects on *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 5842-5850, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-4022-7>

ANDRADE, A.; PINTO, SC.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.

ARAGÃO, H. B. **Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 31, p. 759-841, 1936. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761936000400004>

ARAÚJO, I. M.; MAGALHÃES-MATOS, P. C.; CORDEIRO, M. D.; PACHECO, A.; ROCHA, B. S.; FEITOZA, L. F. B. B.; SANAVRIA, A.; FONSECA, A. H. Ticks in wild animals at a resort and the first documentation of *Amblyomma sculptum* infesting Emu (*Dromaius novaehollandiae*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 177-179, 2019. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180082>

ASSIS, R. E. D. (2013). Avaliação da qualidade de comprimidos de hidroclorotiazida 25 mg disponíveis no município de Cuité-PB. Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2013.

AYRES, M.; AYRES, J.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 5.3: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; 2011.

BAKR, R. F.; SALEM, D. A.; RADWAN, W. A.; HELMY, N.; SHANBAKY, N. M.; ABD EL HAMID, A. E. Effect of the Insect Growth Regulator “Lufox” on Some Biological Aspects of the Soft Tick *Argas persicus* (Oken). **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences (A, Entomology)**, v 11, n. 1, p. 1-17, 2018. <https://doi.org/10.21608/EAJB.2018.11908>

BALBANI, A.P.S; STELZER, L.B; MONTOVANI, J.C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 6, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0034-72992006000300018>

BARBIERI, A.R.M.; SZABÓ M. P. J.; COSTA, F. B.; MARTINS, T. F.; SOARES, H. S.; PASCOALI, G.; TORGA, K.; SARAIVA, D. G.; RAMOS, V. N.; OSAVA, C.; GERARDI, M.; DIAS, R. A.; MORAERS, E. A.; FERREIRA, F.; CASTRO, M. B.; LABRUNA, M. B. Species richness and seasonal dynamics of ticks with notes on rickettsial infection in a Natural Park of the Cerrado biome in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 10, p. 442-453, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.12.010>

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**, Instituto Butantan, São Paulo, p. 223, 2006.

BECKER, S.; WEBSTER, A.; DOYLE, R. L.; MARTINS, J. R.; RECK, J.; KLAFKE, G. M. Resistance to deltamethrin, fipronil and ivermectin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto*, Latreille (Acari: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n.5, p. 1046-1050, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.05.015>

BENGSSEN, A.; LEUNG, L. K. P.; LAPIDGE, S. J.; GORDON, I. J. The development of target-specific vertebrate pest management tools for complex faunal communities. **Ecological Management & Restoration**, v. 9, n. 3, p. 209-216, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1442-8903.2008.00420.x>

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L., GRISI, L. Atividade *in vitro* de alguns piretróides sintéticos no carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, n. 10, p. 1193-1199, 1989.

BORCHERT, J. N.; DAVIS, R. M.; POCHÉ, R. M. Field efficacy of rodent bait containing the systemic insecticide imidacloprid against the fleas of California ground squirrels. **Journal of Vector Ecology**, v. 34, n. 1, p. 92-98, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2009.00011.x>

BORGES, D. A.; CID, Y. P.; AVELAR, B. R.; FERREIRA, T. P.; CAMPOS, D. R.; SANTOS, G. C. M. D.; ALVES, M. C. C.; SCOTT, F. B. *In vitro* acaricidal activity of different

ectoparasiticide classes against *Amblyomma sculptum* larvae. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 3, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020052>

BRITES-NETO, J.; DUARTE, K. M. R.; MARTINS, T. F. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. **Veterinary world**, v. 8, n. 3, 301, 2015. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.301-315>

CABRERA, R. R.; LABRUNA, M. B. Influence of photoperiod and temperature on the larval behavioral diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.46, p. 1303-1309, 2009. <https://doi.org/10.1603/033.046.0608>

CALARGE, F. A.; SATOLO, E. G.; SATOLO, L. F. Aplicação do sistema de gestão da qualidade BPF (boas práticas de fabricação) na indústria de produtos farmacêuticos veterinários. **Gestão & Produção**, v.14, p. 379-392, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0104-530X2007000200014>

CALLIGARIS, I. B.; DE OLIVEIRA, P. R.; ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Action of the insect growth regulator fluazuron, the active ingredient of the acaricide Acatak®, in *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 11, p. 1177-1185, 2013. <https://doi.org/10.1002/jemt.22282>

CANCHUMANI, R. M. L. A produção de fármacos e medicamentos no Brasil e na Índia: uma análise comparativa (1995-2001), **PUC-SP**, p. 1-13, 2009.

CHACÓN, S. C.; BARBIERI, F. S.; CORREIRA, P. G.; FACCINI, J. L. H.; DAEMON, E. Influência da temperatura de manutenção da fase não-parasitária sobre a fase parasitária de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 9, n. 3, 2002. <http://doi.org/10.4322/rbcv.2015.252>

CHEVILLON, C.; DUCORNEZ S.; DE MEEUS, T.; KOFFI, B. B.; GAIA, H.; DELATHIERE, J. M.; BARRE, N. Accumulation of acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus*

(Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) populations from New Caledonia Island. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3-4, p. 276-288, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.05.003>

CHRISTIE, R. J.; FINDLEY, D. J.; DUNFEE, M.; HANSEN, R. D.; OLSEN, S. C.; GRAINGER, D. W.; Photopolymerized hydrogel carriers for live vaccine ballistic delivery. **Vaccine**, v.24, n. 9, p. 1462-1469, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.05.048>

CLEMONS, D. J.; SEEMAN, J. L. **The laboratory guinea pig**, 2ed. Taylor & Francis, 2018, 177p.

CONCEA, Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – **Resolução Normativa nº 37 de 27/01/2018**, 49p. 2018.

COSTA, F. B.; GERARDI, M.; BINDER, L. D. C.; BENATTI, H. R.; SERPA, M. C. D. A.; LOPES, B.; LUZ, H. R.; FERRAZ, K. M.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infecting *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) ticks and capybaras in a Brazilian spotted fever-endemic area of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.57 n.1, p. 308-311, 2020. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz141>

Cowled, B. D., Lapidge, S. J., Smith, M., & Staples, L. Attractiveness of a novel omnivore bait, PIGOUT®, to feral pigs (*Sus scrofa*) and assessment of risks of bait uptake by non-target species. **Wildlife Research**, v.33, n.8, p.651-660, 2006. <https://doi.org/10.1071/WR06054>

CRUZ, B. C.; TEIXEIRA, W. F. P.; MACIEL, W. G.; FELIPPELLI, G.; FÁVERO, F. C.; CRUZ, A. C.; BUZZULINI, C.; SOARES, V. E.; GOMES, L. V. C.; LOPES, W. D. Z.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Effects of fluazuron (2.5 mg/kg) and a combination of fluazuron (3.0 mg/kg)+ abamectin (0.5 mg/kg) on the reproductive parameters of a field population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* on experimentally infested cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 1, p. 80-84, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.04.012>

CVMP (COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR VETERINARY USE).

Guideline on the demonstration of palatability of veterinary medicinal products. **European Medicines Agency**. 2012.

DAVEY, R. B.; AHRENS, E. H.; GEORGE, J. E.; HUNTER III, J. S.; JRSNNIN, P. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2-4, p.261-276, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00152-0)

DAVEY, R. B.; AHRENS, E. H.; GEORGE, J. E: Efficacy of sprays of amitraz against *Boophilus* ticks on cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 2, n. 5, p. 691-698, 1984. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(84\)90014-X](https://doi.org/10.1016/0167-5877(84)90014-X)

Davis, R. M. Use of orally administered chitin inhibitor (lufenuron) to control flea vectors of plague on ground squirrels in California. **Journal of Medical Entomology**, v.36, n.5, p.562-567, 1999. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.5.562>

DAVIS, R. M.; CLEUGH, E.; SMITH, R. T.; FRITZ, C. L. Use of a chitin synthesis inhibitor to control fleas on wild rodents important in the maintenance of plague, *Yersinia pestis*, in California. **Journal of Vector Ecology**, v.33, n.2, p.278-284, 2008. <https://doi.org/10.3376/1081-1710-33.2.278>

DONALISIO, M. R.; SOUZA, C. E.; ANGERAMI, R. N.; SAMY, A. M. Mapping Brazilian spotted fever: Linking etiological agent, vectors, and hosts. **Acta Tropica**, v. 207, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105496>

EISEN, L. Control of ixodid ticks and prevention of tick-borne diseases in the United States: The prospect of a new Lyme disease vaccine and the continuing problem with tick exposure on residential properties. **Ticks and tick-borne diseases**, v.12, n.3, e101649, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101649>

EL-ASHRAM, S.; ABOELHADID, S. M.; KAMEL, A. A.; MAHROUS, L. N.; FAHMY, M. M. First report of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* in Egypt resistant to Ivermectin. **Insects**, v. 10, n.11, p. 404, 2019. <https://doi.org/10.3390/insects10110404>

FERNÁNDEZ-SALAS A.; RODRÍGUEZ-VIVAS R. I.; ALONSO-DÍAZ, M. A.; BASURTO-CAMBEROS, H. Ivermectin resistance status and factors associated in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) populations from Veracruz, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v.190, p. 210–215, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.003>

FERRAZ, K. M. P.; FERRAZ, S. F. B.; MOREIRA, J. R.; COUTO, H. T. Z.; VERDADE, L. M. Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) distribution in agroecosystems: a cross-scale habitat analysis. **Journal of Biogeography**, v. 34, p. 223–230, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01568.x>

FERREIRA, T. P.; LIMA, I. P.; MAGALHÃES, V. S.; AVELAR, B. R.; OLIVEIRA, G. F.; SCOTT, F. B.; CID, Y. P. Bioanalytical Method to Measure Fluazuron in Bovine Plasma and its Application in Pharmacokinetic Studies. **Revista Virtual Química**, v. 11, n. 3, p.1067-79, 2019. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190072>

FIELDEN, L. J.; RECHAV, Y.; BRYSON, N. R. Acquired immunity to larvae of *Amblyomma marmoreum* and *Ahebraeum* by tortoises, guinea-pigs and guinea-fowl. **Medical and veterinary entomology**, v.6, n.3, p. 251-254, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1992.tb00614.x>

FIOL, F. D. S. D.; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P. D.; TOLEDO, M. I. D.; BARBERATO FILHO, S. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, p. 461-466, 2010.

FREITAS, E. P. S.; ZAPATA, M. T. A. G.; FERNANDES, F. D. F. Monitoring of resistance or susceptibility of adults and larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) to synthetic acaricides in Goiás, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, n. 2 p. 189-202, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10493-010-9389-1>

FREUND, M.; CSIKÓS, R.; KESZTHELYI, S.; MÓZES, G. Y.; **Paraffin Products: Properties, Technologies, Applications**. Elsevier, Budapest, 331p., 1982.

GAUDÊNCIO, F. N.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; LIMA, M. G.; GÔLO, P. S.; ANGELO, I. D. C.; CASTRO, R. N.; FONSECA, A. H.; SCOTT, F. B.; PINHEIRO, J. Alterations in the oxidative metabolism of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in response to exposure to the insect growth regulator fluazuron. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 54-60, 2016. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016006>

GERARDI, M.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; BINDER, L. C.; F. KRAWCZAK, F. S.; GREGORI, F.; LABRUNA, M. B. Comparative susceptibility of different populations of *Amblyomma sculptum* to *Rickettsia rickettsii*. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 653, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00653>

GOMES, L. V. C.; LOPES, W. D. Z.; CRUZ, B. C.; TEIXEIRA, W. F.; FELIPPELLI, G.; MACIEL, W. G.; BICHUETTE, M. A.; RUIVO, M. A.; COLLI, M. H. A.; CARVALHO, R. S.; MARTINEZ, A. C.; SOARES, V. E.; COSTA, A. J. Acaricidal effects of fluazuron (2.5 mg/kg) and a combination of fluazuron (1.6 mg/kg) + ivermectin (0.63 mg/kg), administered at different routes, against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitizing cattle. **Experimental Parasitology**, v. 153, p. 22-28, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.02.004>

GONÇALVES, L. R.; PALUDO, G.; BISOL, T. B.; PERLES, L.; OLIVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. M.; ANDRÉ, M. R. Molecular detection of piroplasmids in synanthropic rodents, marsupials, and associated ticks from Brazil, with phylogenetic inference of a putative novel *Babesia* sp. from white-eared opossum (*Didelphis albiventris*). **Parasitology Research**, v. 120, n. 10, p. 3537-3546, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07284-8>

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. D. S.; BARROS, A. T. M. D.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LÉON, 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, p. 150-156, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>

GRUHN, K. D.; OGRZEWALSKA, M.; ROZENTAL, T.; FARIKOSKI, I. O.; BLANCO, C.; FREITAS, L. S.; LEMOS, E. R. S.; RIBEIRO, V. M. F. Evaluation of rickettsial infection in free-range capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) (Rodentia: Caviidae) and

ticks (Acari: Ixodidae) in the Western Amazon, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 5, p. 981-986, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.007>

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Rodents of the subfamily Sigmodontinae (Myomorpha: Cricetidae) as hosts for South American hard ticks (Acari: Ixodidae) with hypotheses on life history. **Zootaxa**, v. 2904, p. 45-65, 2011. <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.2904.1.2>

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G. Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) Parasitizing Humans. **Cham: Springer**, 230, 2018.

GUTA, M.; TEKA, F. F.; BISLAT, D.; LINDEMANN, P.; ASRES, K. Repellent activity of essential oil of the stem of *Kleinia squarrosa* against mosquitoes. **Ethiopian Pharmaceutical Journal**, v. 33, n. 2, p. 75-82, 2018. <http://doi.org/10.4314/epj.v33i2.1>

HADANI, A.; CWILICH, R.; REHAV, Y.; DINUR, Y. Some methods for the breeding of ticks in the laboratory. **Refuah Veterinarith**, v.26, n. 3, p. 87-100, 1969.

HAIGH, A. J. B.; GICHANG, M. M. The activity of amitraz against infestations of *Rhipicephalus appendiculatus*. **Journal of Pesticide Science**, v. 11, n.6, p.674-678, 1980. <https://doi.org/10.1002/ps.2780110616>

HEYNE, H.; ELLIOTT, E. G. R.; BEZUIDENHOUT, J. D. Rearing and infection techniques for *Amblyomma* species to be used in heartwater transmission experiments. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 461-471, 1987.

HOKAMP, J.; CHIACCHIOR, R. G.; MATUSHIMA, E. R. Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) In: HEATLEY, J. J.; RUSSEL, K. E. **Exotic Animal Laboratory Diagnosis**. Pondicherry, India, p. 145-154, 2020.

INVEST, J. F.; LUCAS, J. R. Pyriproxyfen as a mosquito larvicide. In: **Proceedings of the sixth international conference on urban pests**. 2008, pp. 239-245.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G.; SALGADO, H. R. N.; CORREA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 29, n. 1, 2008.

ITIS, Integrated Taxonomic Information System. Disponível em: <<https://www.itis.gov/>>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2022.

JIN, C.; YE, K.; LUAN, H.; LIU, L.; ZHANG, R.; YANG, S.; WANG, Y. Tussilagone inhibits allergic responses in OVA-induced allergic rhinitis guinea pigs and IgE-stimulated RBL-2H3 cells. **Fitoterapia**, v. 144, e104496, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104496>

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n.1, p.3-14, 2004. <https://doi.org/10.1017/s0031182004005967>

JUNQUERA, P.; HOSKING, B.; GAMEIRO, M.; MACDONAL, A. Benzoylphenyl ureas as veterinary antiparasitics. An overview and outlook with emphasis on efficacy, usage and resistance. **Parasite**, v. 26, 2019. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019026>

KLAFKE, G. M.; SABATINI, G.; DE ALBUQUERQUE, T.; MARTINS, J. R.; KEMP, D.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. Larval immersion tests with ivermectin populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 386–390, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.001>

KLAFKE, G.; DALL, AGNOL, B.; PRADEL, E.; SILVA, J.; DE LA CANAL, L. H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M. F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; DOS SANTOS, J.; RECK, J.; MARTINS, J. R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.019>

KRYGER, U.; DESCHODT, C.; DAVIS, A. L. V.; SCHOLTZ, C. H. Effects of cattle treatment with a fluazuron pour-on on survival and reproduction of the dung beetle species *Onthophagus*

gazella (Fabricius). **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3-4, p. 380-384, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.021>

KRYGER, U.; DESCHODT, C.; SCHOLTZ, C. H. Effects of fluazuron and ivermectin treatment of cattle on the structure of dung beetle communities. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 105, n. 4, p. 649-656, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.08.003>

KUNIY, A. A.; DIAS, C. A.; DE SOUZA, C.; DE MENDONÇA UCHOA, F. C.; LUIZ, T. G.; PEREIRA, M. S.; VASQUEZ; NARDI, M. S.; LEONIS, P. M.; ARRUDA, V.; PELEGRINI, S.; DA SILVA, H. S.; GODOY, L. P.; ZAHN, T. M. G. Removal of Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) population as measure to control *Amblyomma* tick population and reduce Brazilian Spotted Fever transmission risk in a gated community in Bragança Paulista (SP, Brazil) – case study. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 4, p.143-159, 2018. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.143159>

LABRUNA, M. B.; AMAKU, M.; METZNER, J. A.; PINTER, A.; FERREIRA, F. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, p. 170–178, 2003. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.170>

LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00649-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00649-5)

LABRUNA, M. B.; KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; DE WAAL, D. T.; GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1-14, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00387-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00387-9)

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T. F.; PINTER, A.; HORTA, M. C. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma*

cajennense, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, p. 1156–1159, 2008. <https://doi.org/10.1093/jmedent/45.6.1156>

LASMAR, P. V. F.; MURPHY, M.; NANCHEN, S.; DRAKE, J.; COUMENDOUROS, K.; BORGES, D. A.; SCOTT, F. B. Laboratory evaluation of the efficacy of lotilaner (Credelio™) against *Amblyomma cajennense* (*sensu lato*) infestations of dogs. **Parasites & Vectors**, v.11, 537, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3116-x>

LEITE, R. C. **Boophilus microplus: susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiogeográficas da baixada do Grande-Rio e Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica.** 1998. PhD diss., Tese (Doutorado) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - Brasil, 1998.

LEÓN, A. A. P.; MITCHELL III, R. D.; WATSON, D. W. Ectoparasites of cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 173-185, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.004>

LIMA, I. P.; MAGALHÃES, V. S.; OLIVEIRA, R. M.; FERREIRA, T. P.; SANTOS, G. C. M.; ALVES, M. C. C.; PEREIRA, G. A.; SILVA, F. C. S.; RODRIGUES, L. F.; BORGES, D. A.; OLIVEIRA, P. C.; SCOTT, F. B.; CID, Y. P. Development and pharmacokinetic evaluation of chewable doxycycline tablets in Beagle dogs: comparison with a commercial formulation and evaluation of co-administration with vitamin supplement on the bioavailability. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm002921>

LOPES, W. D. Z.; CHIUMMO, R. M.; VETTORATO, L. F.; DE CASTRO RODRIGUES, D.; SONADA, R. B. The effectiveness of a fixed-dose combination pour-on formulation of 1.25% fipronil and 2.5% fluazuron against economically important ectoparasites and associated pharmacokinetics in cattle. **Parasitology International**, v. 66, n. 5, p. 627-634, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.05.005>

LUZ, H. R.; COSTA, F. B.; BENATTI, H. R.; RAMOS, V.N., DE A. SERPA, M. C.; MARTINS, T. F.; AACOSTA, I. C.; RAMIREZ, D. G.; MUÑOZ-LEAL, S.; RAMIREZ-

HERNANDEZ, A.; BINDER, L. C. Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 9, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007734>

MACDONALD, D. W. Dwindling resources and the social behaviour of capybaras, (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Mammalia). **Journal of Zoology**, v. 194, p. 371–391, 1981. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1981.tb04588.x>

MACIEL, W. G.; LOPES, W. D. Z.; GOMES, L. V. C.; CRUZ, B. C.; FELIPPELLI, G.; SANTOS, I. B.; BORGES, F. A.; GONÇALVES JUNIOR, W. A.; SCARPA, A. B.; NICARETTA, J. E.; BASTOS, T. S. A.; COSTA, A. J. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to fluazuron (2.5 mg/kg) and a combination of novaluron (2.0 mg/kg)+ eprinomectin (0.36 mg/kg) in field studies in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 135, p. 74-86, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.10.019>

MAHMOOD, F. Laboratory maintenance of mosquitoes. **Rearing Animal and Plant Pathogen Vectors**. 1ed. Boca Raton, CRC Press, p. 1-41, 2014.

MARTINS, J. R.; CORRÊA, B. L.; CERESÉR, V. H. Ação carrapaticida do fluazuron, formulação “pour-on” sobre o carrapato bovino *Boophilus microplus*. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 1, n. 2, p. 257-261, 1995.

MARTINS, J.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **Veterinary Record**, v. 149, n. 2, p. 64, 2001.

MARTINS, T. F.; PERES, M. G.; COSTA, F. B.; BACCHIEGA, T. S.; APPOLINARIO, C. M.; ANTUNES, J. M. A. D. P.; LABRUNA, M. B. Ticks infesting wild small rodents in three areas of the state of São Paulo, Brazil. *Ciência Rural*, v. 46, p. 871-875, 2016. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150671>

MARTINS, T. F.; MOURA, M. M.; LABRUNA, M. B. Life-cycle and host preference of *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 56, n. 2, p. 151-158, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10493-011-9506-9>

MASSEI, G.; COATS, J.; QUY, R.; STORER, K.; COWAN, D. P. The Boar-Operated-System: a Novel Method to Deliver Baits to Wild Pigs. **Journal of Wildlife Management**, v. 74, n. 2, p.333-336, 2010. <https://doi.org/10.2193/2008-489>

MCDOWELL, A. Delivery Systems for Wildlife. In **Long Acting Animal Health Drug Products**. Springer, New York, NY. p. 345-357, 2013

MCDOWELL, A.; MCLEOD, B. J.; RADES, T.; TUCKER, I. G. Application of pharmaceutical drug delivery for biological control of the common brushtail possum in New Zealand: a review. **Wildlife Research**, v. 33, n. 8, p. 679–689, 2006. <https://doi.org/10.1071/WR06028>

MCTIER, T. L.; JOHN E. G.; SARA N. B. Resistance and cross-resistance of guinea pigs to *Dermacentor andersoni* Stiles, *D. variabilis* (Say), *Amblyomma americanum* (Linnaeus), and *Ixodes scapularis* Say. **The Journal of Parasitology**, p. 813-822, 1981.

MESQUITA, G. B.; SILVA, W. L.; FECCHIO, A.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; DIAS, R. I. *Amblyomma* ticks consumed by a giant cowbird, *Molothrus oryzivorus*. **Ticks and tick-borne diseases**, v.11, n.4, e101424, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101424>

MICHAELIS (2022). Acesso em 20fev2022; disponível em:

<https://michaelis.uol.com.br/busca?r=0&f=0&t=0&palavra=disrup%C3%A7%C3%A3o>

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), 2017. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/693-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/febre-maculosa/11269-situacao-epidemiologica-dados>>.

Acesso em: 19 fevereiro de 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Conheça os sinais e sintomas da Febre maculosa e saiba como prevenir, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2021-1/setembro/conheca-os-sinais-e-sintomas-da-febre-maculosa-e-saiba-como-prevenir>>. Acesso em 19 de fevereiro de 2022.

MITCHELL, M. Acaricide resistance--back to basics. **Tropical Animal Health and Production**, v. 28, n. 2, p. 53-58, 1996. <https://doi.org/10.1007/bf02310700>

MORGAN, D. R. Enhancing maintenance control of possum populations using long-life baits. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 31, n. 4, p. 271-282, 2004. <https://doi.org/10.1080/03014223.2004.9518380>

MUYOBELA, J.; NKUNIKA, P. O. Y.; MWASE, E. T. Resistance status of ticks (Acari; Ixodidae) to amitraz and cypermethrin acaricides in Isoka District, Zambia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 8, p. 1599-1605, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0906-4>

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of 15 *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 252–276, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>

NOGUEIRA, B. C. F.; BEZERRA-SANTOS, M. A.; YAMATOOGI, R. S.; CAMPOS, A. K. *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing feral pigs in the state of Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Acarology**, v.46, n. 3, p. 171-173, 2020. <https://doi.org/10.1080/01647954.2020.1729858>

NOVAES, R. L. M.; ALVES, F. M.; SOUZA, R. F.; LAURINDO, R. S.; MORATELLI, R. Bats used as hosts by *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) in Northeastern Brazil and its implications on tick-borne diseases. **Zoologia (Curitiba)**, v. 37, 2020. <https://doi.org/10.3897/zoologia.37.e56795>

NUNES, F. B. P.; SILVA, S. C.; CIETO, A. D.; LABRUNA, M. B. The dynamics of ticks and capybaras in a residential park area in southeastern Brazil: implications for the risk of *Rickettsia*

rickettsii infection. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 19, n. 10, p. 711-716, 2019. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2479>

OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LEITE, R. C.; FREITAS, C. M. V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 4, p. 412-416, 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2003.00459.x>

OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LOPES, C. M. L.; LEITE, R. C. Population dynamics of the free living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.92, p. 295-301, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00322-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00322-8)

OLIVEIRA, P. R.; CALLIGARIS, I. B.; NUNES, P. H.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Fluazuron-induced morphological changes in *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs: An ultra-structural evaluation of the cuticle formation and digestive processes. **Acta Tropica**, v. 133, p. 45-55, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.01.008>

OLIVEIRA, P. R.; CALLIGARIS, I. B.; ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; PIZANO, M. A.; MATHIAS, M. I. C. Potential of the insect growth regulator, fluazuron, in the control of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): Determination of the LD95 and LD50. **Experimental Parasitology**, v. 131, n.1, p. 35-39, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.023>

OLIVEIRA, P. R.; CALLIGARIS, I. B.; ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Fluazuron-induced morphophysiological changes in the cuticle formation and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) nymphs. **Parasitology Research**, v. 112, n. 1, p. 45-58, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3103-7>

ONOFRIO, V. C.; VENZAL, J. M.; PINTER, A.; SZABÓ, M. P. J. Família Ixodidae: características gerais, comentários e chaves para gêneros. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região**

neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. 3ed. São Paulo: Instituto Butantan, 2006, p. 29-39.

OSAVA, C. F.; NASCIMENTO RAMOS, V.; RODRIGUES, A. C.; REIS NETO, H. V.; MARTINS, M. M.; PASCOAL, J. O.; SZABÓ, M. P. J. *Amblyomma sculptum* (*Amblyomma cajennense* complex) tick population maintained solely by domestic pigs. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.6, p.9-13, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.11.002>

OZOE, Y., ASAH, M.; OZOE, F.; NAKAHIRA, K.; MITA, T. The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n.1, p. 744-749, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.131>

PELLETIER, J.; ROCHELEAU, J. P.; AENISHAENSLIN, C.; BEAUDRY, F.; DIMITRI MASSON, G.; LINDSAY, L. R.; LEIGHTON, P. A. Evaluation of fluralaner as an oral acaricide to reduce tick infestation in a wild rodent reservoir of Lyme disease. **Parasites & vectors**, v.13, n. 1, p. 1-9, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3932-7>

PELLETIER, J.; ROCHELEAU, J. P.; AENISHAENSLIN, C.; DIMITRI MASSON, G.; LINDSAY, L. R.; OGDEN, N. H.; LEIGHTON, P. A. Fluralaner Baits Reduce the Infestation of *Peromyscus* spp. Mice (Rodentia: Cricetidae) by *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) Larvae and Nymphs in a Natural Environment. **Journal of Medical Entomology**, v. 59, n.6, p. 2080-2089, 2022. <https://doi.org/10.1093/jme/tjac106>

PÉREZ-CPGPLLO, L. C.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; RAMÍREZ-CRUZ, G. T.; MILLER, R. J. First report on the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 165–169, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.021>

PETERMANN, J.; CAUQUIL, L.; HURLIN, J. C.; GAIA, H.; HUE, T. Survey of cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, resistance to amitraz and deltamethrin in New Caledonia. **Veterinary Parasitology**, v. 217, p. 64-70, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.010>

PINTER, A.; FRANÇA, A. C.; SOUZA, C. E.; SABBO, C.; NASCIMENTO, E. M. M.; SANTOS, F. C. P.; KATZ, G.; LABRUNA, M. B.; HOLCMAN, M. M.; ALVES, M. J. C. P.; HORTA, M. C.; MASCHERETTI, M.; MAYO, R. C.; ANGERAMI, R. N.; BRASIL, R. A.; LEITE, R. M.; DE SOUZA, S. S. A. L.; COLOMBO, S.; OLIVEIRA, V. L. M. Febre Maculosa Brasileira. **Bepa - Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 8, n.1, 2011.

POCHÉ, D. M.; DAWSON, K.; TSEVEENJAV, B.; POCHÉ, R. M. Efficacy of low-dose fipronil bait against blacklegged tick (*Ixodes scapularis*) larvae feeding on white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) under simulated field conditions. **Parasites & Vectors**, v.14, n.1, p. 1-18, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04930-z>

POCHÉ, D. M., FRANCKOWIAK, G., CLARKE, T., TSEVEENJAV, B., POLYAKOVA, L., & POCHÉ, R. M. Efficacy of a low dose fipronil bait against blacklegged tick (*Ixodes scapularis*) larvae feeding on white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) under laboratory conditions. **Parasites & Vectors**, v.13, p. 1-15, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04258-0>

POCHÉ, D. M.; HARTMAN, D.; POLYAKOVA, L.; POCHÉ, R. M. Efficacy of a fipronil bait in reducing the number of fleas (*Oropsylla* spp.) infesting wild black-tailed prairie dogs. **Journal of Vector Ecology**, v.42, n. 1, p. 171-177, 2017. <https://doi.org/10.1111/jvec.12252>

Poche, D. M., Torres-Poche, Z., Yeszhanov, A., Poche, R. M., Belyaev, A., Dvořák, V., ... & Aimakhanov, B. (2018). Field evaluation of a 0.005% fipronil bait, orally administered to *Rhombomys opimus*, for control of fleas (Siphonaptera: Pulicidae) and phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Central Asian Republic of Kazakhstan. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(7), e0006630.

POLO, G.; MERA-COSTA, C.; LABRUNA, M. B.; FERREIRA, F. Transmission dynamics and control of *Rickettsia rickettsii* in populations of *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Amblyomma sculptum*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. 1–12, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005613>

PRITT, S. Taxonomy and history. In: SUCKOW, M. A.; STEVENS, K.; WILSON, R. P. **The Laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents**. 3 ed. Elsevier Academic Press: Amsterdam, 2012, p. 563-574.

PRONK, M. E. J.; SCHEFFERLIE, G. J. WHO Food Additives Series 39: Fluazuron. **International Programme on Chemical Safety**, 1997.

QUADROS, A. P. N. D.; RÊGO, G. M. S. D.; SILVA, T. F. D.; CARVALHO, A. D. M.; MARTINS, T. F.; BINDER, L. D. C.; CASTRO, M. B.; MATTOS, P. S. R.; LABRUNA, M. B.; PALUDO, G. R. (2021). Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) exposure to *Rickettsia* in the Federal District of Brazil, a non-endemic area for Brazilian spotted fever. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, 2021. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021035>

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; UCHOA, F.; DE AZEVEDO SERPA, M. C.; BINDER, L. C.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B. Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) as amplifying hosts of *Rickettsia rickettsii* to *Amblyomma sculptum* ticks: evaluation during primary and subsequent exposures to *R. rickettsii* infection. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.11, n.1, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101463>

RAMOS, V. N.; PIOVEZAN, U.; FRANCO, A. H. A.; RODRIGUES, V. S.; NAVA, S.; SZABÓ, M. P. J. Nellore cattle (*Bos indicus*) and ticks within the Brazilian Pantanal: ecological relationships. **Experimental and Applied Acarology**, v. 68, n. 2, p. 227–240, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9991-3>

RAMOS, V. D. N.; PIOVEZAN, U.; FRANCO, A. H. A.; OSAVA, C. F.; HERRERA, H. M.; SZABÓ, M. P. J. Feral pigs as hosts for *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) populations in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 64, n. 3, p. 393-406, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9832-9>

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. S. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes

of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 128-136, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.012>

ROCHA, C. N. C.; CAMPOS, D. R.; AVELAR, B. R.; DE OLIVEIRA, G. F.; OLIVEIRA, P. C.; MELO, R. C.; CORREIA, T. R.; SCOTT, F. B. Preventive and acaricide efficacy against *Rhipicephalus microplus* of abamectin association with fluazuron in artificially infested cattle. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n.4, p. 239-245, 2017. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm022117>

RODRIGUES, M. V.; PAULA, T. A. R.; FERREIRA, L. B. C.; ÁVILA, E. C.; SILVA, L. C.; SOUZA, V. B. Comportamento de um grupo de capivaras em uma área urbanizada. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 3, p. 212-217, 2013. <https://doi.org/10.21708/avb.2013.7.3.3142>

RODRIGUES, V.; PINA, F. T. B.; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, R. Carrapato-estrela (*Amblyomma sculptum*): ecologia, biologia, controle e importância. Gado de Corte (Comunicado Técnico n.132): **Base de Dados da Pesquisa Agropecuária** da Embrapa, 2015.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology research**, v. 117, n.1, p. 3-29, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; PEREZ-COGOLLO, L. C.; ROSADO-AGUILAR, J. A.; OJEDA-CHI, M. M.; TRINIDAD-MARTINEZ, I.; MILLER, R. J.; LI, A. Y.; DE LEON, A. P.; GUERRERO, F.; KLAFKE, G. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 113-122, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014044>

ROSATTE, R. C.; DONOVAN, D.; DAVIES, J. C.; BROWN, L.; ALLAN, M.; VON ZUBEN, V.; FEHLNER-GARDINER, C. High-density baiting with ONRAB® rabies vaccine baits to control Arctic-variant rabies in striped skunks in Ontario, Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, v.47, n. 2, p. 459-465, 2011. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.2.459>

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada a Experimentação Animal**. 4thed. Belo Horizonte: FEPMVZ; 2015.

SANAVRIA, A.; PRATA, M. C. A. Metodologia para colonização do *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 87-90, 1996.

SARTOR, I. F.; BICUDO, P. L. Agentes empregados no controle de ectoparasitas. *In*: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 480-492.

SAZIMA, I.; SAZIMA, C. Brazilian cleaner birds: update and brief reappraisal. **Biota Neotropica**, v. 10, p.327-331, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000100028>

SCOTT, F.; FRANZ, L.; CAMPOS, D. R.; AZEVEDO, T. R. C.; CUNHA, D.; SIX, R. H.; CREE, T. Efficacy of sarolaner (Simparic™) against induced infestations of *Amblyomma cajennense* on dogs. **Parasites & vectors**, v.10, n. 1, p. 1-5, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2324-0>

SECCHIS, M. V.; VALE, L.; DE CASTRO RODRIGUES, D.; DE SOUZA PERINOTTO, W. M.; DA SILVA MATOS, R.; LOPES, T. R.; BRITO, P. V. DE A.; LOPES, W. D. Z.; ARRUDA, W.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M. Effect of the formulation with fipronil and fluazuron on the reproductive biology and ovaries histopathology of *Rhipicephalus microplus* engorged females. **Parasitology Research**, v. 121, n. 3, p. 839-849, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07454-2>

SELZER, P. M.; EPE, C. Antiparasitics in animal health: Quo Vadis?. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 1, p. 77-89, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.09.004>

SHYMA, K. P.; GUPTA, J. P.; PARSANI, H. R.; ANKUYA, K. J.; SINGH, V. Ivermectin resistance in the multi-host tick *Hyalomma anatolicum* (Acari: Ixodidae) in India. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n.6, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101791>

SLOWIK, T. J.; LANE, R. S.; DAVIS, R. M. Field trial of systemically delivered arthropod development-inhibitor (fluazuron) used to control woodrat fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae) and ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v.38, n.1, p.75-84, 2001. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.1.75>

SLUSSER, J. H.; SONENSHINE, D. E. Absence of ovicidal effects of fenoxycarb in the tick *Ixodes dammini* as observed by light, scanning, and transmission electron microscopy. **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 1, p. 115-117, 1992. <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.1.115>

SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, p. 139-151, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00982.x>

SOUZA, K.J.; ALÉSSIO, P.V.; GOMES, A.J.P.S. Desenvolvimento de excipiente específico para cápsulas de nifedipina preparadas magistralmente: parte I. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Araraquara**, v.30, nº 3, 2009, p.257- 261.

STROKES, J. V.; WALKER, D. H.; VARELA-STOKES, A. S. The guinea pig model for tick-borne spotted fever rickettsioses: a second look. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 1. 11, n. 6, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101538>

SUN, R.; LIU, C.; ZHANG, H.; WANG, Q. Benzoylurea chitin synthesis inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 31, p. 6847-6865, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02460>

SUNKARA, P.; CHENNURU, S.; KROVVIDI, S.; CHITICHOTI, J. Cypermethrin and ivermectin resistance in field populations of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Latrielle, 1806) collected from dogs in south India. **Veterinary Research Communications**, v. 46, n. 1, p. 67-78, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09830-2>

SZABÓ, M. P. J.; OLEGÁRIO, M. M. M.; SANTOS, A. L. Q. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, p. 73–84, 2007. <http://doi.org/10.1007/s10493-007-9096-8>

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. 27, 2013. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>

TARMIZI, M. R.; ZAINUDDIN, Z. Z. Low-cost remote drug delivery blow-dart for veterinary use. **Journal of Wildlife and Parks**, v. 35, p.39-48, 2020.

TEEL, P. D.; DONAHUE, W. A.; STREY, O. F.; MEOLA, R. W. Effects of pyriproxyfen on engorged females and newly oviposited eggs of the lone star tick (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 5, p. 721-725, 2014. <https://doi.org/10.1093/jmedent/33.5.721>

THOMBRE, A. G. Oral delivery of medications to companion animals: palatability considerations. **Advanced drug delivery reviews**, v.56, n. 10, p. 1399-1413, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.02.012>

TIMM, R. M. Capybaras: Behavior, Ecology, and Management. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 17, n. 3, p. 217–219, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10914-009-9124-z>

TONETTI, A. M.; BIONDI, D.; LEITE, J. C. de M.; SILVA, P. W. Mapeamento e distribuição de *Hydrochoerus hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) nos parques públicos de Curitiba-PR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, Umuarama**, v. 21, n. 1, p. 29-32, 2018.

TORRENTS, J.; SARLI, M.; ROSSNER, M. V.; TOFFALETTI, J. R.; MOREL, N.; MARTÍNEZ, N. C.; WEBSTER, A.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Resistance of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin in Argentina. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 332-337, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.012>

VALSONI, L. M.; FREITAS, M. G. D.; BORGES, D. G. L.; BORGES, F. D. A. Status of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin, fipronil and fluazuron in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120201091>

VALSONI, L. M.; FREITAS, M. G. D.; ECHEVARRIA, J. T.; BORGES, D. G. L.; TUTIJA, J.; BORGES, F. D. A. Resistance to all chemical groups of acaricides in a single isolate of *Rhipicephalus microplus* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **International Journal of Acarology**, v. 46, n. 4, p. 276-280, 2020. <https://doi.org/10.1080/01647954.2020.1765867>

VALSONI, L. M.; FREITAS, M. G. D.; ECHEVERRIA, J. T.; BORGES, D. G. L.; TUTIJA, J.; BORGES, F. D. A. Resistance to all chemical groups of acaricides in a single isolate of *Rhipicephalus microplus* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **International Journal of Acarology**, v. 46, n. 4), p. 276-280, 2020. <https://doi.org/10.1080/01647954.2020.1765867>

VASILIEV, R. O.; TROSHIN, E. I.; BREVNOVA, S. A.; YUGATOVA, N. Y.; SHISHKIN, A. V.; VASILYEVA, I. L.; KULIKOV, A. N. Evaluation of toxicological parameter of DAPS-25k after a single intragastric administration to mice and guinea pigs. **International Transaction Journal of Engineering, Management and Applied Sciences and Technologies**, v. 11, n. 10, p. 1110-1110, 2020.

VERCRUYSSSE, J.; REW, R. S. **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**. CABI Publishing: London, 2002.

VERONEZ, V. A.; FREITAS, B. Z.; OLEGÁRIO, M. M. M.; CARVALHO, W. M.; PASCOLI, G. V. T.; THORGA, K.; GARCIA, M. V.; SZABÓ, M. P. J. Ticks (acari: ixodidae) within various phytophysionomies of a cerrado reserve in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, p. 169–179, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10493-009-9294-7>

WAISSMANN, W. Health surveillance and endocrine disruptors. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 511-517, 2002.

WIJAYARATNE, L. K. W.; ARTHUR, F. H.; WHYARD, S. Methoprene and control of stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 76, p.161-169, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.09.001>

YANG, S. G. N. S.; SOUZA, D. D. S.; SANTIAGO, A. C. S.; SILVA, R. B. S.; MELO, M. A.; SOUZA, E. A. R.; LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; OLIVEIRA, J. B. Rickettsial infection in free-ranging capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) and their ticks (Acari, Ixodidae) in the Caatinga and Atlantic Forest biomes, Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 26, 100649, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100649>

YOSHII, K. Epidemiology and pathological mechanisms of tick-borne encephalitis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 18, e0373, 2019. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0373>

ZAPA, D. M. B.; COUTO, L. F. M.; HELLER, L. M.; DE ASSIS CAVALCANTE, A. S.; NICARETTA, J. E.; CRUVINEL, L. B.; MELO JÚNIOR, R. D.; FERREIRA, L. L.; BASTOS, T. S. A.; SOARES, V. E.; MELLO, A. S.; Lopes, W. D. Z. Do rainfall and tick burden affect the efficacy of pour-on formulations against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*?. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 177, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104950>

ZORTÉA, T.; SEGAT, J. C.; MACCARI, A. P.; SOUSA, J. P.; DA SILVA, A. S.; BARETTA, D. Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* in tropical soils. **Chemosphere**, v. 173, p. 460-465, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.069>