

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

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO DA CURVA DE CONCENTRAÇÃO
PLASMÁTICA E EFICÁCIA DA IVERMECTINA ORAL EM CÃES
CONTRA *Ctenocephalides felis felis* E *Rhipicephalus sanguineus***

Viviane de Souza Magalhães

2012



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

**AVALIAÇÃO DA CURVA DE CONCENTRAÇÃO
PLASMÁTICA E EFICÁCIA DA IVERMECTINA ORAL EM CÃES
CONTRA *Ctenocephalides felis felis* E *Rhipicephalus sanguineus***

VIVIANE DE SOUZA MAGALHÃES

Sob Orientação do Professor
Fabio Barbour Scott

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2012

636.089696

M188a

T

Magalhães, Viviane de Souza, 1982-

Avaliação do perfil plasmático e eficácia contra *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus* de ivermectina oral em cães / Viviane de Souza Magalhães – 2012.

73 f. : il.

Orientador: Fabio Barbour Scott.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 65-73.

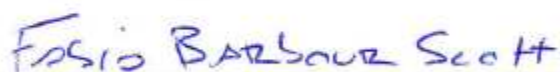
1. Parasitologia veterinária - Teses. 2. Pulga do gato – Teses. 3. *Rhipicephalus sanguineus* - Teses. 4. Ivermectina – Uso terapêutico – Teses. I. Scott, Fabio Barbour, 1966-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

VIVIANE DE SOUZA MAGALHÃES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2012



Fabio Barbour Scott, Ph.D., UFRRJ
(Orientador)



Julio Israel Fernandes, Dr., UFPA



José Carlos Saraiva Gonçalves, Ph.D., UFRJ

As espécies que sobrevivem não são as mais fortes, nem as mais inteligentes, e sim aquelas que se adaptam melhor às mudanças

Charles Darwin

Mesmo que já tenha feito uma longa caminhada, sempre haverá mais um caminho a percorrer.
Santo Agostinho

*Aos meus pais e minha filha, meus maiores tesouros, por toda
dedicação, apoio e paciência durante esta longa caminhada.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, obrigada pelo apoio em mais um dos meus projetos e por compreender todos os momentos de ausência sempre me incentivando a continuar no meu caminho.

A Renata Oliveira obrigada por indiretamente me dar coragem para reiniciar minha carreira acadêmica. Obrigada também por ser um exemplo e por todo apoio e carinho dedicados a mim.

A amiga e companheira Yara Cid um especial muito obrigado, por ser responsável pelo início de minha mudança de caminho profissional e por todo apoio, paciência e cumplicidade durante esses anos. Sua companhia foi essencial.

As amigas Martha Machado, Roberta Vitalino, Mirza Nalesco e tantos outros não integrantes da UFRRJ, mas extremamente importante em minha vida profissional. Obrigado pelo apoio e incentivo, mesmo distantes estiveram sempre muito presentes.

A amiga Luciana Bezzerá obrigada por todos os momentos de apoio e por aguentar todos os meus lamentos, e oscilações de humor. Você foi um presente da UFRRJ.

Aos colegas e amigos do LQEPV, Ary Aboud, Alexsandro dos Santos, Cássio Nascimento, Diego Dias, Fabrício Gaudêncio, Francisco Ribeiro, Julio Fernandes, Lilian Batista, Maria Clara Botelho, Monique Lambert, Pedro Ivan Fazio Jr., Raquel Melo e Vanessa Vieira obrigada pela troca de conhecimentos e experiências divididas comigo, pelos momentos de trabalho e descontração que compartilhamos, e por todo apoio prestado.

A família farmacometria, não menos integrantes do LQEPV, mas com um local diferenciado em meus agradecimentos. Rodrigo, Nathália, Deborah, nossa iniciante Thais, e novamente a Professora Yara, obrigada por acreditar que este novo projeto era possível e tornar todos os momentos de trabalho mais divertidos. Obrigada também por todo apoio e comprometimento.

Aos Professores do LQEPV Katherina Coumendouros, Thais Correia e Laerte Grisi obrigada pela oportunidade e apoio.

Ao pesquisador André Mazzei obrigada pelo apoio e orientação.

Ao Professor FABIO BARBOUR SCOTT, obrigada pela oportunidade e orientação nessa etapa de minha vida e por ter contribuído para o meu crescimento e amadurecimento, profissional e pessoal.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), obrigada pelo apoio financeiro na modalidade de bolsista de mestrado.

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

A todos os professores, funcionários e amigos do curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias, que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho obrigada.

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

BIOGRAFIA

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

Cursou seu segundo grau na Escola Técnica Federal de Química do Rio de Janeiro, formando-se em como técnica em química, especialista em biotecnologia em julho de 2003.

Foi técnica de laboratório do grupo de pesquisa responsável pelo sequenciamento automático da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicos*, utilizando ferramentas de biologia molecular, bioinformática e processos básicos de microbiologia, no departamento de bioquímica médica da UFRJ no período de agosto de 2001 a agosto de 2003.

No ano de 2004 ingressou no curso de Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal do Rio de Janeiro, diplomando-se em setembro de 2008 como Farmacêutica, e posteriormente, em junho de 2010, como Farmacêutica Industrial.

Durante a graduação foi estagiária do Laboratório de Controle de Qualidade da UFRJ no período de novembro de 2005 a fevereiro de 2007 e analista de controle de qualidade microbiológico da Indústria Ranbaxy Farmacêutica no período de março de 2007 a agosto de 2009.

Em dezembro de 2009, foi aprovada no processo de seleção para o Mestrado do Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), área de concentração Sanidade Animal, do Instituto de Veterinária desta instituição, sob a orientação do professor Fabio Barbour Scott. Foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de março de 2010 a fevereiro de 2012.

RESUMO

MAGALHÃES, Viviane de Souza. **Avaliação da curva de concentração plasmática e eficácia da ivermectina oral em cães contra *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus***. Seropédica UFRRJ 2012. 59p (Dissertação, Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinárias)

Com o aumento crescente de animais de companhia nos lares familiares o relacionamento humano-animal está cada vez mais estreito e a preocupação com o controle de doenças cada vez maior. Este controle muitas vezes é realizado com a utilização de produtos químicos, chamados de inseticidas. Entre os estes, a ivermectina tem seu uso extremamente difundido devido sua segurança comprovada. Seu uso em cães é aconselhado para o tratamento da sarna demodécica e na prevenção da dirofilariose, porém informalmente é extremamente utilizado para o controle de pulgas e carrapatos. Entre os ectoparasitas mais comum nos cães estão o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e a pulga *Ctenocephalides felis felis*. Com o objetivo de avaliar a eficácia da ivermectina contra esses parasitas e juntamente ao tratamento acompanhar o perfil plasmático da formulação de ivermectina testada, foi desenvolvido um método de quantificação de ivermectina em plasma canino, utilizando cromatografia líquida com detecção por fluorescência. Este método foi validado tendo como base as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para validação de métodos analíticos e bionalíticos, a Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003. As amostras coletas durante o teste de eficácia foram analisadas através deste método e demonstraram boa biodisponibilidade com C_{max} de 350 ng.mL^{-1} em quatro (4) horas e AUC de 8411. Apesar de a formulação ter apresentado boa absorção os valores de eficácia encontrados para *Rhipicephalus sanguineus* e *Ctenocephalides felis felis* foram muito baixos demonstrando este não ser o tratamento mais adequado para o controle destes parasitas.

Palavras-chave: macrolactonas, farmacocinética, cromatografia líquida.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Viviane de Souza. **Evaluation of plasma concentration curve and efficacy of ivermectin following oral administration in dogs against *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus sanguineus***. Seropédica UFRRJ 2012. 59p (Dissertation Master Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology)

With the increasing number of pets in family homes the human-animal relationship is getting closer and concern for the control of diseases increasing. This control is often performed with the use of chemicals known as insecticides. Among them, ivermectin is extremely widespread use because of its proven safety. Its use in dogs is suitable for the treatment of mite dermatosis and heartworm prevention, but is extremely informally used for the control of fleas and ticks. Among the most common ectoparasites in dogs are the *Rhipicephalus sanguineus* tick and *Ctenocephalides felis felis* flea. In order to evaluate the efficacy of ivermectin against these parasites, along with treatment follow the profile of plasma tested formulation of ivermectin, a method was developed for quantification of ivermectin in canine plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. This method was validated based on the recommendations of the National Agency of Sanitary Surveillance for validation of analytical methods and bioanalytical, Resolution RE n ° 899/2003. The samples collected during the test effectiveness using this method were analyzed and showed good bioavailability with C_{max} 350 ng.mL⁻¹ in four (4) hour and at AUC of 8411. Although the formulation have shown good absorption efficacy values found for *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* were very low showing this is not the most appropriate treatment for the control of these parasites.

Key words: macrolactones, pharmacokinetics, liquid chromatography

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema de diluições das soluções combinadas	14
Tabela 2: Número de amostras preparadas para avaliação de cada método de extração	15
Tabela 3: Níveis de recuperação estabelecidos pela Associação Internacional de Comunidades Analíticas	17
Tabela 4: Número total de amostras necessárias para realizar a estabilidade	17
Tabela 5: Esquema dos animais utilizados no estudo.....	19
Tabela 6: Cronograma do teste de eficácia.....	19
Tabela 7: Volumes de reagentes empregados no processo de derivatização da ivermectina e da abamectina	21
Tabela 8: Termos da curva de linearidade das reações de derivatização	22
Tabela 9: Resultados cromatográficos obtidos com volumes finais de reação diferentes.....	23
Tabela 10: Parâmetros cromatográficos para padrão de ivermectina à 0,5ng/mL e abamectina.	23
Tabela 11: Variação da relação de área (ivermectina/abamectina) em solvente armazenadas a temperatura ambiente por 14 dias.....	24
Tabela 12: Equação das retas de linearidade da estabilidade dos padrões em solvente.....	24
Tabela 13: Variação da relação de área (ivermectina/abamectina) do derivatizado armazenado no amostrador do cromatôgrafo líquido por 48h.	25
Tabela 14: Precisão dos métodos de extração expressos em coeficiente de variação relativo	26
Tabela 15: Equações de linearidade das curvas de extrações.....	26
Tabela 16: Resultado do teste F para a variância dos resíduos da curva de calibração por regressão linear simples.....	29
Tabela 17: Parâmetros da curva de calibração para os tratamentos testados de regressão linear ponderada.....	30
Tabela 18: Equação das curvas de calibração.....	32
Tabela 19: Recuperação e Exatidão da Linearidade.....	32
Tabela 20: Precisão da Linearidade.....	33
Tabela 21: Ponto de controle de qualidade baixo.....	34
Tabela 22: Ponto do controle de qualidade medio.....	34
Tabela 23: Ponto do controle de qualidade alto.....	35

Tabela 24: Resultados de Precisão e Exatidão	36
Tabela 25: Resultados de relação sinal-ruído, exatidão e precisão do limite inferior de quantificação.....	37
Tabela 26: Estabilidade de curta duração	38
Tabela 27: Estabilidade Pós-Processamento	38
Tabela 28: Estabilidade de Ciclo de congelamento.....	38
Tabela 29: Estabilidade de Longa	39
Tabela 30: Parâmetros da curva de concentração plasmática da ivermectina oral e peso dos animais utilizados	41
Tabela 31: Resultado da contagem de pulgas.....	43
Tabela 32: Correlação de Pearson entre o número de pulgas vivas pós-tratamento e concentração plasmática de ivermectina	43
Tabela 33: Resultado da contagem de carrapatos.....	44
Tabela 34: Correlação de Pearson entre o número de pulgas vivas pós-tratamento e concentração plasmática de ivermectina	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da IVM. a- anel macrolídeo condensado, b- espirocetal, c- anel benzofurano, d- dissacarídeo.....	7
Figura 2: Processo de derivatização de avermectinas	11
Figura 3: Cromatograma comparativo do volume final de reação.....	22
Figura 4: Curva da linearidade das reações com volumes finais diferentes.....	22
Figura 5: Curvas de linearidade das soluções padrão de 0h a 14 dias armazenadas a temperatura ambiente.	24
Figura 6: Linearidade da estabilidade do derivatizado.....	25
Figura 7: Linearidade das extrações	26
Figura 8: Recuperação relativa das extrações	26
Figura 9: Relação entre o sinal analítico e o ruído em uma regressão linear	27
Figura 10: Diferentes dispersões de resíduos	28
Figura 11: Dispersão de resíduo da curva de calibração empregando a regressão linear simples.....	29
Figura 12: Gráficos de resíduo das regressões ponderadas. a- $w=1$; b- $w=1/x$; c- $w=1/x^{0,5}$; d- $w=1/x^2$; e- $w=1/y$; f- $w=1/y^{0,5}$; g- $w=1/y^2$	31
Figura 13: Curvas de calibração individuais. a-padrão; b- matriz dia 1; c- matriz dia 1; d- matriz dia 2.....	32
Figura 14: Cromatogramas de seletividade. 1-Padrão 25ng mL^{-1} , 2-branco do reagente, 3- amostra jejum, 4-amostra lipêmica, 5-amostra hemolisada	36
Figura 15: Cromatograma de LQ com S/R de IVM >5	37
Figura 16: Gráfico da concentração exponencial versus tempo de ivermectina	39
Figura 17: Gráfico da curva de concentração plasmática de ivermectina oral em cães	42

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

- A – rea
AAC – anidrido acético
ABA – abamectina
AOAC – Association of Analytical Communities
AUC – rea sob a curva
CL – cromatografia líquida
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
C_{max} – concentração plasmática máxima
Conc. – concentração
CQA – controle de qualidade alto
CQB – controle de qualidade baixo
CQM – controle de qualidade alto
CV – coeficiente de variação
CV% - coeficiente de variação relativo
DMF – N N dimetilformamida
EC – eficácia carrapaticida
ELL – extração líquido-líquido
EM – espectometria de massa
EP – Eficácia pulicida
FA – fortificação antes de extração
FD – fortificação depois da extração
FL – fluorescência
IM – via intramuscular
IMD – 1 metil imidazol
IV – via intravenosa
IVM – ivermectina
Liof – extração com liofilização
LQ – limite de quantificação
LQEPV – laboratório de quimioterapia experimental em parasitologia veterinária
MMQQ – método dos mínimos quadrados
N – número de pratos teóricos
PI – padrão interno

R – resolução cromatográfica
RA – relação de área
Rec abs – recuperação absoluta
Rec rel – recuperação relativa
RLP – regressão linear ponderada
S – simetria cromatográfica
S/R – relação sinal-ruído
[SC] – solução combinada
SC – via subcutânea
SM – solução mãe
SPE – extração em fase sólida
ST – solução de trabalho
 $T_{1/2}$ – Tempo de meia-vida
 T_{\max} – tempo onde ocorre o C_{\max}
UV – ultravioleta
Vd – volume de distribuição
VO – via oral
VT – via tópica
 λ – comprimento de onda

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	1
2.0	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	IMPORTÂNCIA DOS ANIMAIS DE COMPANHIA	2
2.2	<i>CTENOCEPHALIDES FELIS FELIS</i>	3
2.3	<i>RHIPICEPHALUS SANGUINEUS</i>	3
2.4	CONTROLE DE ECTOPARASITAS	4
2.5	CONTROLE QUÍMICO DE ECTOPARASITAS	5
2.6	IVERMECTINA	6
2.6.1	PROPRIEDADES QUÍMICAS	6
2.6.2	FARMACOLOGIA	7
2.6.3	INDICAÇÕES	9
2.6.4	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	9
2.7	CURVA DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA	11
3.0	MATERIAL E MÉTODO	13
3.1	ETAPA DE BIODISPONIBILIDADE	13
3.1.1	PADRÕES E REAGENTES	13
3.1.2	MATRIZ BIOLÓGICA	13
3.1.3	PRODUTO FARMACÊUTICO	13
3.1.4	EQUIPAMENTO	14
3.1.5	PREPARO DOS PADRÕES ANALÍTICOS	14
3.1.6	PREPARO DE AMOSTRAS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO	14
3.1.7	AJUSTE DA METODOLOGIA ANALÍTICA	15
3.1.8	PREPARO DA AMOSTRA	15
3.1.9	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	16

3.1.10.	CONSTRUÇÃO DO PERFIL PLASMÁTICO.....	18
3.2.	ETAPA DE AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA <i>IN VIVO</i> DE IVERMECTINA ORAL CONTRA <i>C. F. FELIS</i> E <i>R. SANGUINEUS</i>	18
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	AJUSTE DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	21
4.2	PREPARO DA AMOSTRA	25
4.3	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	27
4.3.1	LINEARIDADE.....	27
4.3.2	RECUPERAÇÃO	33
4.3.3	SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE.....	35
4.3.4	PRECISÃO E EXATIDÃO.....	36
4.3.5	LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO	37
4.3.6	ESTABILIDADE	37
4.4	CURVA DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA	39
4.5	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE IVERMECTINA ORAL CONTRA <i>C.F.FELIS</i> E <i>R. SANGUINEUS</i>	42
5.0	CONCLUSÕES	46
6.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
7.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1.0 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os animais de companhia têm se tornado cada vez mais importantes nas vidas das pessoas sendo considerados como familiares. Entre os animais de companhia os cães são os mais comuns nos lares. Devido a esta proximidade não é raro a transmissão cruzada de parasitoses.

Entre os ectoparasitos mais comuns dos cães estão o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e a pulga *Ctenocephalides felis felis*. Estes parasitas são hematófagos e merecem destaque, pois podem transmitir patógenos tanto para o homem quanto para outros animais, tornando necessário seu controle.

O controle de pragas pode ser realizado de formas mecânica e/ou química. Inseticidas de vários grupos químicos podem ser utilizados neste sentido. Entre eles encontram-se as lactonas macrocíclicas que incluem as avermectinas (abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina e selamectina) e as milbemicinas (moxidectina e milbemicina oxima). Estes compostos são ativos contra uma variedade de nematóides e artrópodes sendo denominados de endectocidas.

A ivermectina tem eficácia contra a maioria dos nematóides, incluindo as formas de larva e adulto, e a maioria dos artrópodos que parasitam animais domésticos. Em cães é eficaz contra microfilárias de *Dirofilaria immitis*, sendo utilizada na profilaxia da dirofilariose. Seu uso também é indicado para o tratamento de *Toxocara canis*, *Toxocara leonine*, *Ancylostoma caninum*, *Uncinaria stenocephala*, *Tricuris vulpis*, *Sarcoptes scabiei*, *Demodex canis* e *Otodectes cynotis* (CANGA et al., 2009). Tem sido uma constante o emprego de ivermectina a 1% injetável (formulação de uso injetável em ruminantes e suínos) no controle principalmente do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, embora não haja a indicação em bula para tal fim. Atualmente já existe no mercado brasileiro uma formulação de emprego oral para cães.

Apesar de a ivermectina ser um dos antiparasitários mais utilizados no mundo com eficácia bem estabelecida, seus parâmetros farmacocinéticos sofrem muita variação entre indivíduos e entre formas farmacêuticas. Isto torna difícil a extrapolação dos resultados obtidos em diferentes espécies e diferentes condições experimentais.

Estudos clínicos veterinários relacionando efeito terapêutico e as concentrações plasmáticas do ativo são pouco realizados. Esta relação é documentada para muitos outros fármacos e traz vantagens para o uso adequado do medicamento. Este trabalho teve por objetivo estabelecer a relação entre a eficácia pulgicida e carrapaticida de ivermectina oral administrada a cães da raça Beagle com sua concentração plasmática e desta forma promover o uso correto deste medicamento.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância dos Animais de Companhia

O relacionamento entre humanos e animais é documentado em diferentes períodos da história. Além da evolução dos laços entre estas duas espécies, os estudos investigam os benefícios que os animais proporcionam para a saúde mental dos seus proprietários e analisa o significado desse tipo de relacionamento na vida (WALSH, 2009). Nas últimas décadas, os animais de companhia têm se tornado cada vez mais importante nas vidas das pessoas (GRIER, 2006).

A grande maioria dos proprietários consideram seus animais como membros da familiares. Os cães são os animais de companhia mais comuns, seguidos por gatos, cavalos e pássaros (WELLS; PERRINE, 2001). Na internet, blogs e redes sociais, conectam proprietários de animais de companhia e fornecem informações úteis, tais como recursos de saúde, comunidades e eventos. A quantia em dinheiro gasto com animais de companhia dobrou na última década, superando o produto nacional bruto de muitos países em desenvolvimento. Os apaixonados por animais de estimação estão cuidando cada vez mais dos seus animais, incluindo consultas ao veterinário e despesas onerosas com tratamentos para doenças graves (WALSH, 2009).

Dados do radarpet (2009) indicam que a população de cães era de 32 milhões enquanto a de gatos era apenas 16 milhões. Existem, atualmente cerca de 30 mil pontos de pet shops no Brasil e o mercado continua em crescimento. O gasto médio com produtos e serviços per capita por ano é de R\$ 390,00 entre insumos farmacêuticos, vacinas, embelezamento e acessórios, que no total representam R\$ 16 bilhões de faturamento para o setor. Esses números levam o Brasil ao segundo lugar em população de cães e gatos no mercado mundial, ao quarto lugar em população de animais de companhia, o segundo em volume de produção e o sétimo em faturamento (ANFALPET, 2012).

Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Sanidade Animal, no ano de 2009 os animais de companhia ocupavam 10,4% do mercado veterinário, movimentando cerca de 292 milhões de reais em nosso país (SINDAN, 2012).

Dentre as espécies consideradas de “companhia”, a espécie canina *Canis familiaris* representa aproximadamente 10% da população humana, resultando em um elevado número de animais em convivência domiciliar (TRHUSFIELD, 1999). Estes carnívoros domésticos são hospedeiros de uma gama de endo e ectoparasitos. Muitos estão comumente relacionados à transmissão de patógenos para o homem e constituem grande parte das chamadas zoonoses. Assim, o estreito relacionamento entre o homem e animais necessita de cuidados constantes, levando-se em consideração que estes frequentam sua moradia ou habitam locais próximos a ela, aumentando os riscos da ocorrência de zoonoses (DRYDEN; PRESTWOOD, 1993). Além disso, os endo e ectoparasitos podem gerar prejuízos e causar danos graves para a saúde do animal. Dentre os ectoparasitos mais comuns dos cães estão, *S. scabiei*, *D. canis*, o carrapato *R. sanguineus* e a pulga *C. f. felis* (TAYLOR, 2001).

Os artrópodes que parasitam animais domésticos têm suma relevância em Medicina Veterinária e em Saúde Pública (BRUM et al., 1987). Destes, aqueles com hábitos alimentares hematófagos merecem destaque, pois podem transmitir agentes patogênicos tanto para o homem quanto para outros animais (RIBEIRO et al., 1997).

2.2 *Ctenocephalides felis felis*

As pulgas são insetos ápteros, holometabólicos, de coloração castanha, de corpo comprimido lateralmente e que medem de 1 a 8 milímetros. Com quase 3000 espécies descritas, a subespécie vulgarmente conhecida como pulga do gato, *C. f. felis*, é a de maior prevalência em cães e gatos. Os adultos de ambos os sexos exercem a hematofagia, podendo ser realizada durante o dia ou à noite, com duração de 10 minutos, ingerindo aproximadamente 14µl de sangue, o que corresponde a 15 vezes o seu peso, levando a danos decorrentes da injúria provocada pela picada e espoliação sanguínea durante a alimentação, dermatites alérgicas em virtude da inoculação de antígenos presentes na saliva da pulga (FOIL et al., 1998; LINARDI; GUIMARÃES, 2000; MEHLHORN; HANSEN; MENCKE, 2001) representando 50% das causas de alergias em cães e gatos (LINARDI, 2004). *C. felis* também tem sido implicada na transmissão de *Rickettsia typhi*, *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, *Mycoplasma haemofelis*, e em casos raros, até mesmo *Yersinia pestis* (BREITSCHWERDT, 2004).

Seu ciclo biológico está dividido em duas fases: uma fase de vida parasitária, sobre o hospedeiro, e outra de vida livre, no ambiente. Nos hospedeiros são encontradas as formas adultas, machos e fêmeas, que são estritamente hematófagas, e no ambiente são encontradas as formas imaturas, ou seja, os ovos, as larvas, as pré-pupas e as pupas, além de adultos recém emergidos dos pupários (SILVA et al., 2008). O ciclo tem duração média de 25 a 30 dias (LINARDI, 2004) e está diretamente relacionado às condições ambientais, sendo influenciado principalmente pela temperatura e umidade, podendo diminuir para até 15 dias (SANTOS, 2000). No ambiente encontramos 95% dos indivíduos da população de pulgas, enquanto apenas 5% estão no hospedeiro (LINARDI; GUIMARÃES, 2000). De acordo com Genchi (1992) os pulicídeos adultos constituem apenas cinco por cento (5%) da população em parasitismo, ficando os 95% restantes distribuídos entre as outras fases de vida. Portanto, a maior parte do ciclo biológico se passa fora do hospedeiro, com período de incubação dos ovos oscilando entre um e 12 dias, dependendo da temperatura e umidade relativa do ar (SILVERMAN; RUST; REIERSON, 1981).

2.3 *Rhipicephalus sanguineus*

Carrapatos são artrópodes de grande importância médica e médico veterinária. O carrapato da espécie *R. sanguineus* é um dos principais problemas parasitários enfrentados por proprietários de cães e donos de canis, e vem se destacando cada vez mais no ambiente domiciliar e peridomiciliar do homem que convive com o principal hospedeiro deste ectoparasita, o cão doméstico (PAZ; LABRUNA; LEITE, 2008).

R. sanguineus é conhecido como carrapato dos canis ou carrapato marrom. É um ectoparasito comum a cães domésticos e que pode ser encontrado em quase todo mundo (MORAES-FILHO et al., 2011). Trata-se de uma espécie heteroxena, que apresenta mais de um hospedeiro, onde larvas, ninfas e adultos são encontrados em hospedeiros distintos, e que obrigatoriamente devem se alimentar de sangue para dar continuidade ao ciclo (LABUDA; NUTTALL, 2004).

Esta espécie tem sido encontrada em alta prevalência em cães urbanos, sendo descrita na literatura como uma das principais espécies de parasitos destes animais domésticos (LABRUNA; PEREIRA, 2001; SZABÓ et al., 2001). Entretanto, há relatos de parasitar outros mamíferos, tais como capivaras, coelhos domésticos, búfalos, camelos, gatos, bovinos, cervos, caprinos, ovinos, leões, zebras, canídeos silvestres e lebres. Pode ainda parasitar aves que se alimentam no solo, bem como o próprio homem, no qual as formas imaturas

alimentam-se mais frequentemente do que previamente se supunha (BELLATO; DAEMON, 1997; FERNANDES, 2000).

Uma vez no hospedeiro, os carrapatos tendem a se fixar na cabeça, pescoço, dorso, orelhas e espaços interdigitais (ROMANO et al., 1998; LABRUNA; PEREIRA, 2001), porém, as larvas, ninfas e os adultos podem ser encontrados em qualquer região do corpo (FLECHTMANN, 1985)

Como praticam hematofagia, os carrapatos podem causar danos diretos devido ao comportamento alimentar, atuando também como um dos principais vetores de patógenos que afetam os animais domésticos e seres humanos (MORAES-FILHO et al., 2011).

Além dos danos causados pela espoliação sanguínea e lesões cutâneas, assim como o desconforto causado pelo parasitismo, *R. sanguineus*, quando em infestações maciças, pode causar anemia e anorexia (MARRA et al., 1999); maior predisposição a outras doenças, devido a toxinas imunossupressoras presentes na sua saliva (ROMANO et al., 1998) (LABRUNA, 2004); irritação, gerando alterações metabólicas e comportamentais, predisposição a miíases e abscessos (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2004).

No homem, como também em alguns animais, pode ocorrer dermatite pruriginosa, devido às reações alérgicas desencadeadas pela saliva do ácaro (LABRUNA, 2004). Assim, por se desenvolver em ambientes sinantrópicos onde ocorre em alta densidade e prevalência, este carrapato poderá vir a causar aumento na incidência de erliquiose, babesiose e febre maculosa, como antropozoonoses emergentes (FERNANDES et al., 2001).

Suspeita-se também que o carrapato do cão esteja envolvido na transmissão de outros patógenos como o agente etiológico da leishmaniose visceral (COUTINHO et al., 2005). O papel de *R. sanguineus* na transmissão de patógenos para humanos é bem documentada, apesar de sua antropofilia relativamente baixa (PALMAS et al., 2001).

Infestações por *R. sanguineus* são de difícil controle, pois esta espécie necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo biológico, apresentando para cada fase de desenvolvimento, uma fase parasitária e outra fase de vida livre, nesta última, ocorrendo a muda em locais seguros e protegidos (MILLER et al., 1999).

Apenas cinco por cento (5%) da população total de carrapatos estão parasitando o animal, ou seja, sobre o hospedeiro. O restante encontra-se no ambiente, nas fases de vida livre, o que dificulta seu controle principalmente em lugares onde o manejo do animal e do ambiente não são considerados satisfatórios (ROMANO et al., 1998; LABRUNA; PEREIRA, 2001).

2.4 Controle de Ectoparasitas

De modo geral, o controle de pragas pode ser realizado de duas formas: o controle mecânico e o controle químico. A limpeza do ambiente, a catação manual de parasitos e a higienização do animal são alternativas eficazes no controle de ectoparasitos. O emprego de medidas de controle mecânico, juntamente com o controle químico, favorece um controle estratégico do ectoparasito (DRYDEN; PRESTWOOD, 1998).

Atualmente, a principal forma de controle é através do emprego de substâncias químicas (FERNANDES, 2000). O uso indiscriminado de acaricidas ao longo dos anos levou ao aparecimento de cepas de carrapatos resistentes e seu aparecimento vem progredindo rapidamente, o que dificulta o controle (FERNANDES, 2000; MILLER et al., 2001).

O desenvolvimento e aplicação de medidas alternativas de controle visam reduzir o uso intenso e indiscriminado de produtos químicos, que atualmente predomina como prática, acarretando prejuízos dentre os quais: poluição do meio ambiente, desenvolvimento de cepas

resistentes, além de custos elevados aliados a resultados ineficazes tornando desfavorável a relação custo benefício.

2.5 Controle Químico de Ectoparasitas

Inseticidas de vários grupamentos químicos podem ser empregados no controle dos principais ectoparasitos de cães e gatos. Dentre eles, destacam-se: amidinas, carbamatos, nitroguanidinas, organoclorados, organofosforados, fenilpirazoles, piretróides e lactonas macrocíclicas em diversas formas farmacêuticas e vias de administração como sabonetes, xampus, pós molháveis, concentrados emulsionáveis, talcos, spray, colares impregnados, “spot-on”, “pour-on”, injetáveis e outros (SCOTT et al., 2002).

As amidinas têm como seu principal membro o amitraz, que age em receptores de octopamina dos artrópodes, resultando em hiperexcitabilidade neuronal e morte (NATHANSON, 1985). Ele está disponível para pulverização, imersão e em coleiras eficaz contra ácaros, piolhos e carrapatos em animais domésticos (TAYLOR, 2001).

Os carbamatos são inseticidas intimamente relacionados aos organofosforados, são anticolinesterásicos, mas ao contrário de compostos organofosforados, eles aparecem para causar espontaneamente um bloqueio reversível na enzima acetilcolinesterase, sem alterá-la. Os dois principais compostos carbamatos mais usados na medicina veterinária são o carbaril e o propoxur (TAYLOR, 2001).

Atualmente os neonicotinóides compõem a classe química mais importante de inseticidas introduzido no mercado global desde dos piretróides sintéticos. Estes inseticidas não são apenas empregados no controle de insetos na agricultura, mas também são usados em medicina veterinária, como no controle da pulga do gato e de moscas, no meio urbano. (NAUEN; JESCHKE, 2008). Problemas de fotoestabilidade impediram o uso comercial das primeiras moléculas descobertas desta classe. A fotoestabilidade foi alcançada quando o nitrometileno foi substituído pela nitroguanidina ou cianoamidina, resultando em um composto altamente eficaz em condições de campo, o imidacloprid (KAGABU; MEDEJ, 1995, KAGABU; AKAGI, 1997). Devido às suas excelentes propriedades físico-químicas, tais como sistemicidade, os inseticidas neonicotinóides também permitiram o desenvolvimento de técnicas de aplicação totalmente novas e métodos de aplicação específicos, tornando-se o inseticida mais comum e eficiente. Outro fator que explica o seu sucesso é a dificuldade do estabelecimento de resistência em populações de algumas pragas bem conhecidas, tais como *Bemisia tabaci* e *Myzus persicae* (NAUEN; JESCHKE, 2008). Como o que ocorre naturalmente com a nicotina, os neonicotinóides agem sobre o sistema nervoso central dos insetos como agonistas dos receptores nicotínicos pós-sinápticos de acetilcolina (LIU; CASIDA, 1993), com seletividade notável, eficácia contra insetos e seguro para mamíferos (JESCHKEI; NAUEN, 2005). Como resultado deste modo de ação, não há nenhuma resistência cruzada com as classes de inseticidas convencionais, e portanto, os neonicotinóides já começaram substituindo os piretróides, hidrocarbonetos clorados, organofosforados, carbamatos e várias outras classes de compostos inseticidas no controle de insetos (DENHOLM et al., 2002).

Os organoclorados se dividem em três grupos principais: derivados do cloroetano, ciclodienos e o hexaclorociclo-hexano. O desenvolvimento de resistência, bem como preocupações com o ambiente, têm ambos grande importância na retirada desses produtos do mercado (KIRKWOOD, 1979).

Os organofosforados são ésteres neutros de ácido fosfórico que agem inibindo a ação da acetilcolinesterase em sinapses colinérgicas e nos músculos. O organofosforado mimetiza a estrutura da acetilcolina e quando se liga a acetilcolinesterase e causa sua transfosforilação. A Esta enzima transfosforilada é incapaz de evitar o acúmulo da acetilcolina na membrana pós-

sináptica levando a paralisia neuromuscular. O grau de transfosforilação da enzima ajuda a determinar a atividade do organofosforado (SAUNDERS; HARPER, 1994). Os compostos organofosforados podem ser extremamente tóxicos para os animais e seres humanos, causando a inibição da acetilcolinesterase, e outras colinesterases. O citioato, um organofosforado, é administrado por via oral para cães e gatos para o controle de pulgas. O composto é absorvido pelo trato gastro-intestinal duas à três horas após a administração. As pulgas adultas são mortas quando ingerem sangue contendo a droga ativa (TAYLOR, 2001).

Os fenilpirazóis foram desenvolvidos na década de 1980 e introduzidos no mercado nos meados dos anos 90 com diversas indicações tanto para uso agrícola como em medicina veterinária (TANNER et al., 1997). A molécula desta classe que é mais empregada no controle ectoparasitário em animais domésticos é o fipronil.

Os piretróides são sintetizados à partir das piretrinas naturais, são classificados segundo o mecanismo de ação nas categorias de tipo I (piretrina e permetrina) e do Tipo II (cipermetrina e deltametrina). Ao iniciarem a ação inseticida, os piretróides alteram a cinética junto aos canais de Na^+ e K^+ dos insetos, acarretando estímulo neuronal através da produção repetitiva de descargas elétricas (Tipo I) ou por meio da despolarização das membranas nervosas e atuando também como agonistas nos receptores do GABA (Tipo II). Em vista da presença destes receptores no tecido muscular dos insetos, os piretróides Tipo II apresentam maior toxicidade para os invertebrados (PEREIRA; SANTOS, 1998). Estes compostos podem ser empregados no controle de pulgas adultas e carrapatos sob várias formas de apresentação, como sabonetes, talcos, xampus, loções, sprays, coleiras e formulações “spot-on” (SCOTT et al., 2002).

Os reguladores de crescimento de insetos representam uma nova categoria de agentes no controle de artrópodes. Eles constituem um grupo de compostos químicos que não matam o parasito diretamente, mas interferem no crescimento e no desenvolvimento (TAYLOR, 2001). Com base em seu modo de ação podem ser divididos em inibidores da síntese de quitina (benzoilfenil uréias), inibidores da deposição de quitina (triazina / derivados de pirimidina) e análogos do hormônio juvenil (GRAF, 1993).

As lactonas macrocíclicas estão disponíveis para o uso em medicina veterinária e, atualmente, incluem as avermectinas (abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina e selamectina) e as milbemicinas (moxidectina e milbemicina oxima). Estes compostos são ativos contra uma variedade de nematóides e artrópodes sendo denominados de endectocidas. A atividade dos endectocidas, particularmente contra ectoparasitos, é variável entre os produtos e é dependente tanto da molécula ativa, quanto da formulação do produto e da via de administração. As lactonas macrocíclicas estão disponíveis no mercado em formulações via oral, parenteral ou tópica. A via de administração varia de acordo com o animal a ser tratado e com o parasito alvo (JOHNES; DI PIERRO, 1996).

A preocupação com o controle de parasitas, tanto em animais de produção como de companhia, tem impulsionado o mercado farmacêutico veterinário para o desenvolvimento principalmente de novas formas de administração, formulações com períodos de ação mais longos e espectros de atividade mais amplos (TAYLOR, 2001).

2.6 Ivermectina

2.6.1 Propriedades Químicas

As macrolactonas são um conjunto de moléculas compostas de um dissacarídeo funcional ligado ao C-13 de um anel macrocíclico de 16 membros condensado a uma unidade espirocetal e um anel benzofurano (DANAHER et al., 2006; AQUINO et al., 2007). Neste grupo encontram-se as avermectinas, e as milbemicinas. As avermectinas diferem uma das

outras quimicamente devido as substituições das cadeias laterais ao anel de lactona, enquanto as milbemicinas diferem das avermectinas pela ausência do dissacarídeo na estrutura da lactona (SHOOP; SOLL, 2002). Este grupo inclui compostos naturais produzidos pela fermentação do microorganismo *Streptomyces avermitilis*. A ivermectina (IVM) é um derivado semi-sintético da avermectina B₁, contendo cerca de 80% de 22,23-dihidroivermectina B_{1a} e aproximadamente 20% de 22,23-dihidroivermectina B_{1b} (KOJIMA; YAMAMOTO; NAKANISHI, 1987).

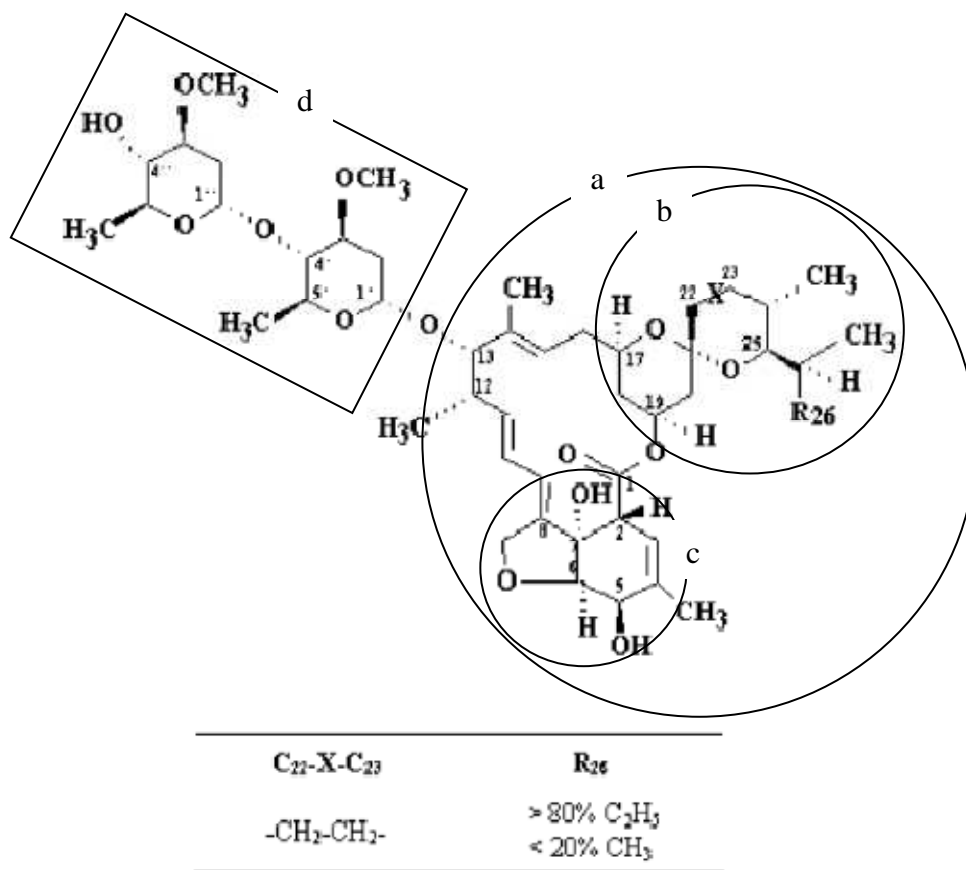


Figura 1: Estrutura da IVM. a- anel macrolídeo condensado, b- espirocetal, c- anel benzofurano, d- dissacarídeo. (CANGA, et al., 2009).

IVM é solúvel em solventes orgânicos e praticamente insolúvel em água devido sua alta lipofilicidade. Foi comercializado pela primeira vez em 1981 por Merck Sharp and Dohme como um agente antiparasitário. Seu amplo espectro de eficácia contra endo e ectoparasitas em doses extremamente baixas a torna um medicamento seguro com uma ampla faixa terapêutica (CANGA et al., 2009).

2.6.2 Farmacologia

Seu mecanismo de ação envolve especialmente os canais de cloro controlados pelo ácido glutâmico e secundariamente canais de cloro controlados pelo GABA (ácido gama-aminobutírico), ocasionando um aumento no fluxo do íon cloreto nas sinapses nervosas em vermes redondos e na placa ou no botão neuromuscular em artrópodes. Conseqüentemente há bloqueio da estimulação inter-neuronal dos neurônios motores excitatórios e hiperpolarização

das membranas nervosas, ocasionando paralisia flácida, morte e eliminação dos parasitos (TAYLOR, 2001).

Desde sua introdução no mercado, em 1981, diversos estudos farmacocinéticos envolvendo a IVM foram publicados. Esta droga pode ser administrada via oral (VO), intramuscular (IM), subcutânea (SC) ou tópica (VT) dependendo das espécies animal. Sua via de administração irá afetar diretamente seu perfil farmacocinético (CANGA et al., 2009) e biodisponibilidade maiores podem ser observadas com IVM SC, seguida da VO e por último da VT (DANAHER et al., 2006; ÔMURA 2008).

Estudos demonstram que a IVM tem grande afinidades por proteínas plasmáticas como albumina e lipoproteínas, sofre pouco metabolismo, sendo a maior parte de dose eliminada inalterada. Entre 80-90%, de forma inalterada pelas fezes e menos de 2% via urina (ALVINERIE et al., 1999; DANAHER et al., 2006). Esta droga também é excretada pelas glândulas mamárias e por este motivo seu uso é contraindicado em animais produtores de leite (DANAHER et al., 2006).

O tempo de meia-vida da IVM é influenciado pela composição da formulação, sendo mais lenta em formulações oleosas quando comparado às formulações aquosas (DANAHER et al., 2006).

Após a administração, as lactonas macrocíclicas são armazenadas no tecido adiposo de onde são liberadas lentamente, metabolizadas e excretadas (DANAHER et al., 2006; TAYLOR, 2001). Este fato é uma consequência de sua estrutura molecular apresentar características lipofílicas com Log P em torno de 3,22 (LÖFFLER; TERNES, 2003).

Devido a sua baixa solubilidade aquosa a IVM tende a formar cristais no local de aplicação em formulações SC. Como consequência positiva ocorre um aumento do tempo de permanência da droga na corrente sanguínea. Por outro lado, esta acumulação nos tecidos subcutâneos aumentam ainda mais a variabilidade dos seus parâmetros farmacocinéticos.

A IVM demonstrou ser absorvida sistemicamente após a administração oral, subcutânea ou por via tópica, mas é absorvida em maior grau, e tem uma meia-vida maior, quando administrada por via subcutânea ou dérmica. Em cães a biodisponibilidade oral é melhor quando os comprimidos são palatáveis (DANAHER et al., 2006).

Um depósito temporário parece ocorrer na gordura e no fígado, de onde ocorre uma liberação lenta (FINK; PORRAS, 1989). A afinidade destes compostos por gordura, explica a sua persistência no organismo e os longos períodos de proteção contra algumas espécies de parasitos internos e externos, com variações individuais nestes períodos de proteção refletindo em diferenças na distribuição das substâncias, metabolismo e excreção (CAMPBELL; BENZ, 1984).

Sua biodisponibilidade é linear a dose, ou seja, sua concentração plasmática máxima (C_{max}) e a área sob a curva (AUC) aumentam linearmente com o aumento da dose. Sua excreção é mais rápida em animais monogástricos, assim como sua absorção. A IVM é bem distribuída pelo organismo, possuem um alto volume de distribuição (Vd) em todas as espécies. Em cães, formulações IV apresentam Vd de aproximadamente 2,4L e seu C_{max} é alcançado com 3 a 5 horas (CANGA et al., 2009).

IVM é provavelmente um dos antiparasitários mais utilizados no mundo com eficácia bem estabelecida, entretanto seus parâmetros farmacocinéticos sofrem muita variação com determinados fatores como: espécie, via de administração, forma farmacêutica, veículos utilizados na formulação, massa corporal, estado nutricional e estado fisiológico. Isto torna difícil a extrapolação dos resultados obtidos em diferentes espécies e diferentes condições experimentais (CANGA et al., 2009).

2.6.3 Indicações

A IVM tem eficácia contra a maioria dos nematóides, incluindo as formas de larva e adulto, e a maioria dos artrópodos que parasitam animais domésticos (CANGA et al., 2009). Por esta razão é classificada como um endectocida (LIFSCHITZ et al., 1999). Em cães, a IVM é efetiva contra as microfilárias de *D. immitis*, sendo utilizada na profilaxia da dirofilariose na dose oral de 6µg/kg. Seu uso também é aconselhado para o tratamento de *T. canis*, *T. leonine*, *A. caninum*, *U. stenocephala*, *T. vulpis*, *S. scabiei* e *O. cynotis* (CANGA et al., 2009). Informalmente, em clínicas e lojas especializadas, a IVM tem seu uso aconselhado para o tratamento de infestações de *R. sanguineus* através de formulação injetáveis bovinas em doses elevadas (MARTINS, 2012). Sua eficácia para o combate deste parasita não é bem estabelecida, pois a maioria dos estudos disponíveis é realizada com uso de cães naturalmente infestados (MORSY; HARIDY, 2000; NOGARI; SOTO; SOUZA, 2004; DIAS et al., 2005; ROY; ROY, 2010). Estes estudos, demonstram que a IVM, na dose de 0,3mg/kg, apesar de ser capaz de eliminar os carrapatos com um intervalo de 7 a 14 dias, não foi capaz de prevenir novas infestações, sendo necessário novo tratamento após este período. Em um estudo realizado por Morsy (2000) a eficácia alcançada no ensaio *in vivo* não foi confirmada pelo ensaio *in vitro*.

Já foi demonstrado que as avermectinas, de uma forma geral, não apresentam boa eficácia para o combate a *C.f. felis*, sendo a IVM uma das avermectinas de menor eficácia *in vitro* e *in vivo* (ZAKSON-AIKEN et al., 2001). A baixa capacidade de permeabilidade da IVM aos tecidos cerebrais do parasita pode ser uma boa explicação para sua falta de eficácia (PHIPPS et al., 2005).

A IVM possui segurança comprovada para utilização em animais de companhia e de produção para o tratamento de diversas doenças parasitárias com larga janela terapêutica. A margem de segurança dos compostos dessa classe é atribuída a três fatos: os mamíferos não possuem receptores de glutamato; as lactonas macrocíclicas possuem baixa afinidade por outros receptores de canais de cloreto e devido ao seu alto peso molecular, não são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica (DANAHER et al., 2006).

Efeitos colaterais associados ao uso de IVM são raros, mas podem ser identificados por midríase e depressão seguida de ataxia, prostração e morte. Apesar de a IVM ser relativamente segura, alguns cães de pastoreio, em especial da raça Collie, são mais sensíveis a doses mais altas. Por este motivo em alguns casos esta droga é trocada por selamectina, que demonstra sinais de intoxicações apenas em doses mais altas, no tratamento destes cães (BOY et al., 2000). A alta sensibilidade destes animais está associada à baixa quantidade de glicoproteína-P em suas membranas. Esta proteína é responsável pela excreção de IVM nas membranas plasmáticas, principalmente na barreira hemato-encefálica, protegendo o sistema nervoso central e diminuindo sua neurotoxicidade (CANGA et al., 2009).

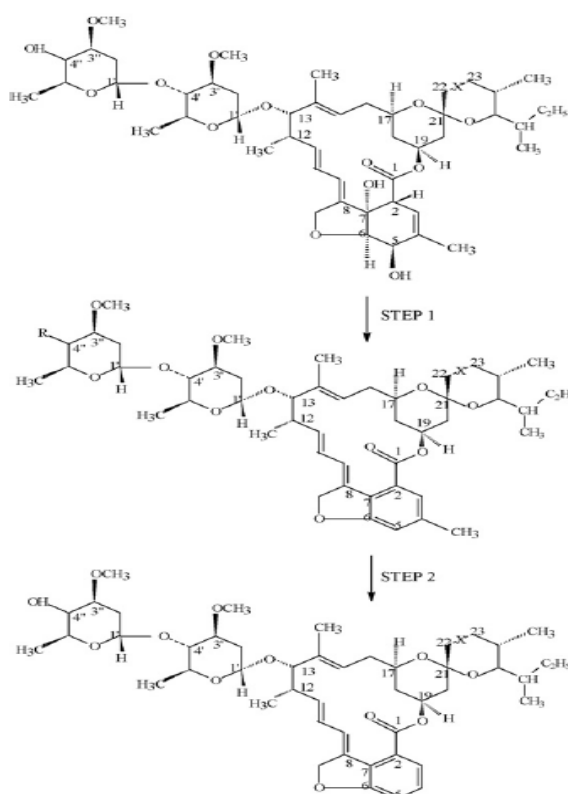
2.6.4 Análise Cromatográfica

Para a construção do seu perfil plasmático e determinação de seus parâmetros farmacocinéticos em cada uma dessas condições é necessário a análise química do medicamento na matriz biológica. A IVM consegue promover eficácia com doses muito baixas, por consequência as concentrações plasmáticas observadas são também muito baixas. Desta forma estudos de farmacocinética envolvendo a IVM necessitam de um método sensível e específico para sua detecção (KOJIMA; YAMAMOTO; NAKANISHI, 1987).

Métodos para determinação de avermectinas em matrizes biológicas incluem extração baseados em partição líquido-líquido e purificação por extração em fase sólida (KOJIMA; YAMAMOTO; NAKANISHI, 1987; PRIETO et al., 2003). A etapa de extração da amostra tem a finalidade de aumentar a especificidade do método analítico, remover matriz e interferentes e concentrar o analito. Matrizes de origem biológica são ricas em proteínas, carboidratos e lipídeos, componentes que podem interferir nas análises, além de diminuir a vida útil das colunas cromatográficas. Diversos métodos para a extração de lactonas macrocíclicas em matrizes biológicas já foram descritos anteriormente. Dentre eles podem ser encontradas: extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (SPE), cromatografia por imunoafinidade e a extração em fluido super-crítico (DANAHER et al., 2006). O interesse pela SPE vem crescendo nos últimos anos, dadas as boas recuperações obtidas para analitos de diferentes polaridades, porém uma desvantagem deste método é o alto custo do cartucho, principalmente para estudos com um grande número de amostras. O procedimento mais comumente utilizado consiste em passar a matriz através de um leito do adsorvente, empacotado em um pequeno cartucho ou coluna que contém entre 100 e 500mg de fase. O fluxo da amostra através da fase proporciona a área de superfície necessária para garantir separação e purificação da amostra. Em seguida, o analito de interesse é eluído com um solvente orgânico, geralmente metanol (DANAHER et al., 2006).

Métodos fundamentados na técnica de cromatografia líquida (CL) com detecção de ultravioleta (UV), fluorescência (FL) e espectrometria de massas (EM) têm sido reportados (FINK; MONTIGNY; SHIM, 1996; FISCHER et al., 1993; DANAHER et al., 2006). Entretanto, as detecções por FL e EM oferecem maiores sensibilidade e seletividade que os métodos baseados em detecção UV. CL-FL possui um alto grau de especificidade devido à combinação da seletividade cromatográfica e de grupos cromogênicos, além de adequada sensibilidade devido à forte fluorescência dos derivados. CL-FL tem sido preferida também devido à vantagem de ser econômica para uso em atividades de rotina, em detrimento dos altos custos dos métodos que empregam EM (SOUZA et al., 2007). Entretanto para a detecção de avermectinas por fluorescência é necessário fazer sua derivatização com a presença de um catalisador nucleofílico e um agente acetilante para que ocorra a aromatização do ciclo hexano do anel benzofurano. Diversos métodos de derivatização já foram descritos nos últimos 20 anos com variações nos reagentes, do tempo e da temperatura de reação (KOJIMA; YAMAMOTO; NAKANISHI, 1987; MONTIGNY; SHIM; PIVNICHNY, 1990; FINK; MONTIGNY; SHIM, 1996; DANAHER et al., 2006) conforme descrito na figura 2.

Uma vez derivatizada, as amostras biológicas contendo IVM podem ser quantificadas através de CL-FL possibilitando o estudo de sua biodisponibilidade.



Primeira etapa da derivatização

Reação	Acetilação	Catalise	Tempo	Temperatura	R
A	anidrido acético	Piridina	4h	100°C	CH ₃ CO
B	anidrido acético	Metilimidazol	1h	95°C	CH ₃ CO
C	anidrido trifluoacético	Metilimidazol	30s	Ambiente	CF ₃ CO
C	anidrido trifluoacético	Trietilamina	30s	Ambiente	CF ₃ CO

Segunda etapa da derivatização

Reação	Estabilização	Tempo	Temperatura
A	amônia 2M em metanol	1h	30°C
B	metanol: água: trietilamina	10 min	Ambiente
C	acetato de amônia em metanol	15 min	50-51°C

Figura 2: Processo de derivatização de avermectinas (DANAHER et al., 2006)

2.7 Curva de Concentração Plasmática

A biodisponibilidade é um termo farmacocinético que descreve a velocidade e o grau com que uma substância ativa ou a sua forma molecular terapeuticamente ativa é absorvida a partir de um medicamento e se torna disponível na circulação sistêmica (EMA, 2000). A avaliação da biodisponibilidade é realizada com base em parâmetros farmacocinéticos calculados a partir dos perfis de concentração plasmática do fármaco ao longo do tempo (GOODMAN, GILMAN, 2006).

O uso racional do medicamento exige conhecimento básico de sua farmacocinética na espécie alvo. Este conhecimento ajuda a otimizar a sua eficácia clínica (CANGA et al., 2009). O estudo de biodisponibilidade é muito útil para determinar a relação da ação terapêutica de um fármaco com sua dose. Sua eficácia irá depender da existência de uma concentração

efetiva do ativo no seu local de ação, durante um período de tempo desejável. Desta forma este tipo de investigação, assume um papel crítico para uma correta avaliação da eficácia clínica de um medicamento. O princípio fundamental da farmacocinética clínica é a relação existente entre os efeitos farmacológicos e a concentração disponível do fármaco. Esta é documentada para muitos fármacos e traz vantagens para o tratamento dos pacientes (GOODMAN, GILMAN, 2006).

Os quatro parâmetros mais importantes que governam a disposição dos fármacos são depuração, que é uma medida da eficácia do organismo na sua eliminação; volume de distribuição, que é uma medida do espaço aparentemente disponível no organismo para conteúdo; meia-vida de eliminação, que é uma medida da taxa de remoção deste do organismo; e biodisponibilidade, ou fração do fármaco absorvido sem alterar a circulação sistêmica (GOODMAN, GILMAN, 2006). O cálculo destes parâmetros é realizado com base nos resultados encontrados de área sob a curva de concentração plasmática do fármaco versus tempo (AUC_{0-t}) e concentração plasmática máxima atingida após a administração da dose (C_{max}), que está relacionada ao tempo denominado T_{max} (STORPIRTIS et al., 2009).

Para realizar este estudo são coletadas amostras dos animais em diferentes tempos após a administração do fármaco. Estas são analisadas e quantificadas através de métodos bioanalíticos previamente desenvolvidos.

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

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

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

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

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

3.0 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização do presente estudo foi realizado os testes de eficácia carrapaticida e pulguicida concomitantemente ao estudo de biodisponibilidade em cães da raça Beagle.

O trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), pertencente ao Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

As experimentações do teste de eficácia e coleta de sangue para a construção do perfil plasmático foram realizadas em condições não controladas nos meses de outubro e novembro de 2011.

Os animais empregados no estudo foram selecionados do plantel do canil do LQEPV constituído por cães da raça Beagle identificados com *transponder* implantados no tecido subcutâneo. Os animais foram mantidos individualmente em baias totalmente cobertas com e telhas transparentes em parte dela permitindo a entrada de raios solares. As baias possuíam as seguintes dimensões: altura 2,0m; largura 1,5; comprimento 1,50 m. Os canis foram limpos todos os dias efetuando-se a retirada das fezes, e limpeza com jato de água da superfície do chão. Uma vez por semana foi passada em todas as baias vassoura de fogo para manutenção do ambiente isento de formas evolutivas de parasitos. A alimentação destes animais foi realizada através de comedouros abastecidos com 300g de ração comercial para cães adultos duas vezes por dia e oferta de água “*ad libitum*”.

3.1 Etapa de Biodisponibilidade

3.1.1. Padrões e reagentes

Os padrões analíticos utilizados de IVM¹ e ABA², são padrões de referência fornecidos por Jofadel Industria Farmacêutica S/A. Foram utilizados também acetonitrila grau CLAE, metanol grau CLAE (TEDIA), N-N dimetilformamida ACS (MERCK), anidrido acético ACS (SPECTRUM) e 1-metil imidazol (SIGMA). A água utilizada para preparar todas as amostras e soluções foi purificada em um sistema GEHAKA MASTER P&D.

3.1.2. Matriz biológica

As amostras de plasma branco foram retiradas de animais sem tratamento provenientes do plantel do LQEPV e estocadas congeladas em freezer -20°C.

3.1.3. Produto farmacêutico

Para o tratamento dos cães foram utilizados comprimidos palatáveis de IVM³ de 12mg.

¹ Lote: 2010071401; teor:97% p/p;

² Lote: 20090512; teor: 97,1% p/p;

³ MECTIMAX®, AGENER UNIÃO, lote:1140870, validade: 03/2013.

3.1.4. Equipamento

Os equipamentos, vidrarias e materiais volumétricos empregados neste estudo foram calibrados por laboratórios da Rede Brasileira de Calibração (RBC). Os padrões e reagentes utilizados foram pesados em balança analítica com precisão de 0,0001 g (BTEC210A, TECNAL). Volumes inferiores a 1 mL foram pipetados com pipetas automáticas calibradas (LABMATE +, HTL). Foram ainda utilizados no desenvolvimento do método e preparo das amostras os seguintes equipamentos: agitador de tubos PHOENIX AP-56, TECNAL; centrífuga refrigerada CT6000R, CIENTEC; capela de exaustão TECNAL; concentrador de amostras TE-019, TECNAL e TE-0197, TECNAL; bomba à vácuo PRIMAR; banho de ultrassom USC2800, UNIQUE; cromatógrafo líquido ULTIMATE 3000 DIONEX, equipado com uma bomba quaternária ULTIMATE 3000 DIONEX, forno para coluna ULTIMATE 3000 DIONEX, detector de fluorescência RF2000 DIONEX e software CHROMELEON 6.80 DIONEX.

Para pesagem dos animais foi utilizada a balança METAL VET MIC200, MICHETTI.

3.1.5. Preparo dos padrões analíticos

Foram preparadas soluções estoques de IVM e ABA, usada como padrão interno (PI), nas concentrações de 1 mg.mL^{-1} chamadas de solução mãe de IVM (SMI) e ABA (SMA) respectivamente. A partir da SMI foi preparada a solução de trabalho (ST1) de IVM a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Estas foram utilizadas no preparo das soluções combinadas [SC] conforme descrito na Tabela 1. Em todas as soluções foram utilizadas acetoneitrila como diluente e armazenadas em frascos âmbar a temperatura ambiente, sendo realizada nova diluição a cada quinze dias.

Tabela 1: Esquema de diluições das soluções combinadas

Código da solução	Concentração de IVM (ng.mL^{-1})	Volume Pipetado de IVM (μL)	Solução utilizada de IVM	Volume pipetado de SMA (μL)	Volume final (mL)
[SC] 0,1	10	10	ST1	100	10
[SC] 0,5	50	25	ST1	50	5
[SC] 10	1000	10	SMI	100	10
[SC] 25	2500	25	SMI	10	10
[SC] 50	5000	25	SMI	50	5
[SC] 100	10.000	50	SMI	50	5
[SC] 150	15.000	75	SMI	50	5
[SC] PI	0	0	---	50	5

--- solução não utilizada

3.1.6. Preparo de amostras para validação do método

Para desenvolvimento e validação do método, foi utilizado plasma de animais sem nenhum tratamento medicamentoso. As amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados e centrifugadas a $756 \times g$ por 15 minutos para coleta de plasma. Para cada 0,5mL de plasma foram adicionados $10 \mu\text{L}$ de [SC] a fim de obter amostras contendo 200 ng.mL^{-1} de ABA (PI) e 0,2; 20; 50; 100; 200 e 300 ng.mL^{-1} de IVM. As amostras contendo 0,2; 50 e 200 ng.mL^{-1} de IVM foram utilizadas na validação como controle de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) respectivamente.

3.1.7. Ajuste da metodologia analítica

A metodologia utilizada para análise de IVM foi ajustada com base em métodos descritos na literatura (KOJIMA;YAMAMOTO; NAKANISHI, 1987; MONTIGNY; SHIM; PIVNICHNY, 1990; FINK; MONTIGNY; SHIM, 1996; BORGES et al., 2007). Utilizando padrão analítico de IVM e ABA em solvente e em matriz biológica foram avaliados parâmetros cromatográficos como número de pratos teóricos (N) superior a 2000, resolução (R) superior a 1,5, simetria (S) entre 0,8 e 1,2 e sinal ruído (S/R) superior a 5 para CQB. Para isso foi utilizado uma coluna cromatográfica NUCLEOSIL C18, 100Å, 5µm, 125 X 4,6mm (MACHEREY-NAGUEL), pré-coluna 100-5-C18 10 X 4,6mm (KROMASIL) e fase móvel metanol: água filtrada em membrana filtrante HV DURAPORE de 47mm de diâmetro e 0,45µm MILLIPORE.

Foram avaliados também os volumes finais de reagentes para derivatização e a estabilidade dos padrões em solvente e também do derivatizado de IVM e ABA. Os resultados foram comparados em termos de coeficiente de variação percentual (CV%), linearidade e relação sinal/ruído.

3.1.8. Preparo da amostra

Com base nos protocolos descritos anteriormente (KOJIMA;YAMAMOTO; NAKANISHI, 1987; LIFSCHITZ et al., 1999; ASBAKK; BENDIKSEN; OKSANEN, 1999; DANAHER et al., 2006; CHITTRAKARN et al., 2008) foram testados três métodos de extração para o preparo das amostras. A extração líquido-líquido (ELL), a extração em fase sólida (SPE) e a extração do plasma liofilizado (LIOF). Para avaliar as três extrações foram preparadas um lote de amostras para cada metodologia conforme descrito na Tabela 2. As amostras foram preparadas seguindo o mesmo esquema proposto para o preparo das amostras para validação.

Tabela 2: Número de amostras preparadas para avaliação de cada método de extração

Concentração (ng.mL ⁻¹)	Testes	
	Precisão	Linearidade
0,5	5	1
10	0	1
25	5	1
50	0	1
100	0	1
150	5	1

Estas foram avaliadas em função da recuperação, precisão, linearidade e custo benefício. A extração com os melhores resultados foi escolhida para prosseguir a validação do método e a análise das amostras do perfil plasmático.

Para ELL a 0,5 mL de plasma previamente contaminado com [SC] e congelado a -20°C foi adicionado 0,5 mL de acetonitrila. Esta mistura foi vigorosamente agitada e posteriormente centrifugada a 756 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi reservado, ao pellet foi adicionada nova alíquota de 0,5 mL de acetonitrila com posterior agitação vigorosa e centrifugação nas mesmas condições anteriores. O novo sobrenadante foi adicionado ao anterior e levado à centrifugação a 756 x g por 10 minutos. Esta amostra foi filtrada em

unidade filtrante descartável (HV em PE de 13mm de diâmetro e 0,45µm - MILLIPORE) e levadas para o concentrador de amostras a 70°C até secura completa.

Para SPE 0,5 mL de plasma previamente contaminado com [SC] e congelados a -20°C após ser descongelado foi adicionado ao cartucho de SPE (OASIS HLB 100mg- Waters) acondicionado com 2 mL de metanol e 2 mL de água ultrapura. Após a eluição da amostra a limpeza foi realizada com 1 mL de água ultrapura e 1 mL de solução metanol:água 20:80 (v:v). Para eluição do analito foi utilizado 1 mL de metanol. Todo o processo foi realizado em baixa pressão de vácuo. Após isto as amostras foram levadas para o concentrador a 70°C até secura completa.

Para a LIOF 0,5 mL de plasma previamente contaminado com [SC] e congelado a -20°C foi liofilizado por 24^h (Liotop L101 - Liobras). Após isto foi seguido o mesmo procedimento da ELL.

Após seca, todas as amostras foram derivatizadas com a adição de 100µL de N-N dimetilformamida, 40µL de 1 metilimidazol e 60 µL de anidrido acético e posterior incubação à 70°C por 1 hora. Após derivatização as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta resolução com detecção por fluorescência.

3.1.9. Validação da metodologia

A validação do método descrito foi realizada com base na resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003 (guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos), da ANVISA exceto para recuperação que foi tomado como base a AOAC/2002 (Guideline for single laboratory validation) uma vez que a ANVISA não tem valores de aceitação para este teste. Os parâmetros de validação exigidos pelas normas e o número de amostras preparadas para a avaliação são descritos a seguir.

A seletividade/especificidade do método foi avaliada por meio de análise de seis amostras diferentes de plasma branco, sendo quatro plasmas normais, um lipêmico e um hemolisado. Foram avaliadas a presença de interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos e do PI, não sendo permitidos picos interferentes no tempo de retenção da IVM e da ABA superiores a 20% e 5% respectivamente.

A linearidade foi verificada analisando-se amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 0,2; 20; 50; 100, 200 e 300 ng.mL⁻¹, com triplicatas de cada ponto e utilizando ABA na concentração de 200 ng.mL⁻¹ como PI. Foi calculado o coeficiente de correlação (r^2) da equação da reta utilizando-se como variável dependente a razão entre as áreas do padrão analítico (IVM) e do padrão interno (ABA). O r^2 deve ser superior a 0,98, 66% das amostras da linearidade devem possuir exatidão da concentração nominal de 80 a 120% incluindo o limite de quantificação (LQ) e possuírem coeficiente de variação relativa (CV%) menores que 15% para concentrações superiores ao LQ e 20% para CQB (LQ). Todas as curvas de calibração feitas durante a validação foram construídas com a razão entre as áreas da IVM e ABA no eixo Y (variável dependente) e as concentrações nominais de IVM no eixo X (variável independente).

As precisões intra-dia e inter-dia foram avaliada nas concentrações de 0,2; 50 e 200ng.mL⁻¹ (CQB, CQM e CQA respectivamente) em quintuplicata de amostras. O resultado foi expresso em função CV%. As amostras foram consideradas precisas quando os desvios foram inferiores a 15% para as concentrações maiores do que o LQ e 20% para as concentrações do LQ (CQB).

A exatidão foi avaliada utilizando-se as mesmas amostras da precisão comparando-se a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica

correspondente. Esta é utilizada como 100%. Foram desejáveis valores de exatidão entre 80 e 120%.

O LQ foi determinado como a menor concentração onde o pico do analito fosse cinco vezes maior do que o ruído da linha base. Para sua confirmação foram analisadas cinco amostras onde o CV% entre as respostas foi inferiores a 20%.

Para avaliar a recuperação relativa do método, foram preparadas cinco amostras fortificadas antes (FA) do procedimento de extração e cinco depois (FD), nas concentrações CQB, CQM e CQA. Para avaliar a recuperação foram utilizados os parâmetros descritos na AOAC/2002 para a faixa de 10ppb a 1ppm. Sendo eles:

Tabela 3: Níveis de recuperação estabelecidos pela Associação Internacional de Comunidades Analíticas

Concentração	Limite de Recuperação
100%	98-101%
$\geq 10 < 100\%$	95-102%
$\geq 1 < 10\%$	92-105%
$\geq 0,1 < 1\%$	90-108%
$\geq 0,01 < 0,1\%$	85-110%
$\geq 10 \text{ ppm} < 0,01\%$	80-115%
$\geq 1 \text{ ppm} < 10 \text{ ppm}$	75-120%
$\geq 10 \text{ ppb} < 1 \text{ ppm}$	70-125%

ppm: parte por milhão

Para avaliar a estabilidade do analito na matriz a RE n°899/2003 preconiza realizar estudos comparativos em períodos de curta, pós-processamento, ciclo de congelamento e longa duração, sendo que este último compreende o tempo entre a coleta da primeira amostra até a análise das amostras. Para avaliação da estabilidade foram preparadas 42 amostras nas concentrações CQB, CQM e CQA conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Número total de amostras necessárias para realizar a estabilidade

Estudo de Estabilidade	Nível de Concentração		
	CQA	CQM	CQB
análise inicial	3	3	3
estabilidade pós-processamento	3	0	3
estabilidade de curta duração	3	0	3
estabilidade de longa duração	6	0	6
estabilidade ciclo de congelamento	3	3	3

CQ: controle de qualidade (A- alto; M-medio; B-baixo)

As amostras para análises iniciais foram fortificadas extraídas e analisadas em seguida. Para estabilidade de curta duração as amostras fortificadas foram deixadas à temperatura ambiente por 12h para depois serem extraídas e analisadas. Para estabilidade pós-processamento as amostras fortificadas foram extraídas a temperatura ambiente por 12h para depois serem analisadas. Para a estabilidade de ciclo de congelamento e descongelamento as amostras fortificadas foram congeladas a -20°C por 24h, totalmente descongeladas e novamente congeladas até completar três ciclos. Após isso foram extraídas e analisadas. Para o estudo de longa duração as amostras foram analisadas após períodos de armazenamento a -

20°C de 1 mês. Foram considerados como amostras estáveis com desvios inferiores a 15% para as concentrações maiores do que o LQ e 20% para as concentrações do LQ (CQB).

3.1.10. Construção do perfil plasmático

Para construção do perfil plasmático foram utilizados os animais do grupo tratado do estudo de eficácia. Desta forma os dois estudos foram realizados em paralelo. Durante a coleta do sangue foram utilizados tubos heparinizados vacutainer de 6mL (BD) e agulha múltipla descartável vacutainer 25X8 (BD). Antes do início do tratamento foi coletada uma amostra de sangue de cada animal, estas foram chamadas de tempo zero e foram utilizadas como amostra branca. Após o tratamento foram coletas novas amostras nos tempos uma (1), quatro (4), seis (6), oito (8), 10, 24, 32 horas, dois (2), três (3), quatro (4), sete (7), nove (9), 11, 15 e 18 dias. Estas foram processadas conforme o método descrito e validado anteriormente para obtenção das concentrações plasmáticas.

Os valores de concentração plasmática encontrados foram analisados individualmente para cada animal. A construção da curva de concentração plasmática versus tempo foi realizada através do programa PK Solutions 2.0 (Ashland, 1999). Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados utilizando o modelo dos métodos independente para a determinação dos parâmetros farmacocinético de concentração máxima absorvida (C_{max}), tempo onde ocorre o C_{max} (T_{max}), tempo de meia-vida ($T_{1/2}$), área sobre a curva de zero até a última concentração possível de ser quantificada (AUC_{0-t}) e área sobre a curva de zero a infinito ($AUC_{0-\infty}$). Os resultados foram expressos em relação a média \pm CV.

3.2. Etapa de Avaliação da Eficácia *in vivo* de Ivermectina Oral Contra *C. f. felis* e *R. sanguineus*

Foram utilizados 17 cães machos, adultos com idade entre 1,5 e 6 anos, pesando entre 9 e 17kg, divididos em dois grupos, um tratado, contendo 10 animais, e um controle, sem tratamento, contendo sete animais. Antes dos estudos os animais ficaram sem contato prévio com agentes ectoparasitocidas e animais tratados, sendo ainda desparasitados mecanicamente, através de catação, antes do início dos desafios. Todos os animais foram alojados individualmente em baias no dia -3. No dia -2, os animais foram infestados com 100 pulgas, adultas, não alimentadas, da espécie *C. felis felis* e 25 casais de adultos do carrapato, não alimentados, da espécie *R. sanguineus*. Após 48 horas da infestação (dia 0) todos os animais foram tratados na dose de $600\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ peso vivo (Tabela 5).

Após 48 horas de tratamento (dia +2) os animais foram penteados (“comb test”), catados manualmente, todas as pulgas e carrapatos foram retirados dos animais e foi realizada a avaliação da carga parasitária. No dia +4 os animais foram desparasitados mecanicamente até que nenhum parasito fosse encontrado. Anteriormente a retirada das pulgas os animais foram examinados através da inspeção manual e visual para remoção dos carrapatos conforme descrito por Marchiondo (2007). Os ciclos de infestação e desinfestação dos animais foram repetidos sucessivamente até que fosse encontrada uma eficácia inferior a 50% conforme descrito da Tabela 6. Durante o estudo os animais foram acompanhados em diversas etapas do ensaio no que diz respeito a parâmetros clínicos para detecção de possíveis reações adversas.

Tabela 5: Esquema dos animais utilizados no estudo

Grupo	n° de animais	Peso (kg)	Dose
Controle	1	14,0	--
	2	12,6	--
	3	10,9	--
	4	11,5	--
	5	17,0	--
	6	13,8	--
	7	10,7	--
Tratado	1	12,8	¾ comp
	2	11,0	¾ comp
	3	16,0	1 comp
	4	12,1	¾ comp
	5	9,7	½ comp
	6	12,5	¾ comp
	7	12,1	¾ comp
	8	17,3	1 comp
	9	11,6	¾ comp
	10	10,8	¾ comp

-- animais não tratados, comp: comprimido

Tabela 6: Cronograma do teste de eficácia

Dia experimental	Atividades
-3	Desinfestação dos animais
-2	Infestação com 100 pulgas e 100 carrapatos adultos. Exame clínico e pesagem dos animais
0	Tratamento
+2	Avaliação das cargas parasitárias dos animais através da retirada mecânica. Exame clínico.
+4	Desinfestação dos animais
+5	Infestação com 100 pulgas e 50 carrapatos adultos. Exame clínico
+7	Avaliação das cargas parasitárias dos animais através da retirada mecânica. Exame clínico.

A eficácia pulgicida (EP) foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$EP \% = \frac{(PVC - PVT)}{PVC} \times 100$$

Onde: PVC = média aritmética de pulgas vivas recuperadas no grupo controle

PVT = média aritmética de pulgas vivas recuperadas no grupo medicado

A eficácia carrapaticida (EC) foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$EC \% = \frac{(CVC - CVT)}{CVC} \times 100$$

Onde: CVC = média aritmética de carrapatos vivos e fixados recuperados no grupo controle.

CVT = média aritmética de carrapatos vivos e fixados recuperados no grupo medicado.

Para análise estatística do ensaio, os números médios de pulgas adultas vivas e carrapatos vivos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os dados normais foram submetidos ao teste-t e os dados anormais foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 95%. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico computacional livre Bioestat 5.0.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ajuste da Metodologia Analítica

Diversos métodos utilizando cromatografias em fase reversa com colunas C-8 e C-18 para análise de ivermectina já foram descritos (MONTIGNY; SHIM; PIVNICHNY, 1990; FISCHER et al., 1993; LIFSCHITZ et al., 1999; LIFSCHITZ et al., 2004; CHITTRAKARN et al., 2008).

Foi utilizada uma coluna C18 acoplada a uma pré-coluna, com composição igual à da coluna, uma vez que os componentes da matriz, como proteínas e lipídeos, tendem a diminuir a vida útil da coluna.

Para determinar as condições cromatográficas foram utilizadas amostras de padrão analítico, sendo selecionados os seguintes parâmetros:

- Fase móvel metanol:água, 97:3 (v:v), com fluxo de 1,2 mL.min⁻¹;
- Detector de fluorescência ajustado em λ emissão: 360nm, λ excitação: 480nm; ganho: 4 e sensibilidade: media.

Conforme protocolos descritos anteriormente as avermectinas foram derivatizadas com adição, em amostra seca, de N-N dimetil formamida (DMF), 1-metil imidazol (IMD) e anidrido acético (AAC) com volumes finais de 200 e 500 μ L conforme descrito na Tabela 7. Após a adição dos reagentes as amostras foram incubadas a 70°C por uma hora.

Tabela 7: Volumes de reagentes empregados no processo de derivatização da ivermectina e da abamectina

Reagentes	Volume final de reação	
	200 μ L	500 μ L
DMF	100 μ L	250 μ L
IMD	40 μ L	100 μ L
AAC	60 μ L	150 μ L

DMF: N-N dimetilformamida; IMD: 1 metil imidazol; AAC: anidrido acético

Pode-se concluir que a diminuição do volume final da reação de derivatização não afetou a linearidade do método, aumentou a relação sinal-ruído em quatro vezes e duplicou as áreas de IVM e ABA. Estes dados estão descritos na Figuras 3 e 4 e Tabelas 8 e 9. Visando diminuir o limite de quantificação foi selecionada a reação com volume final de 200 μ L.

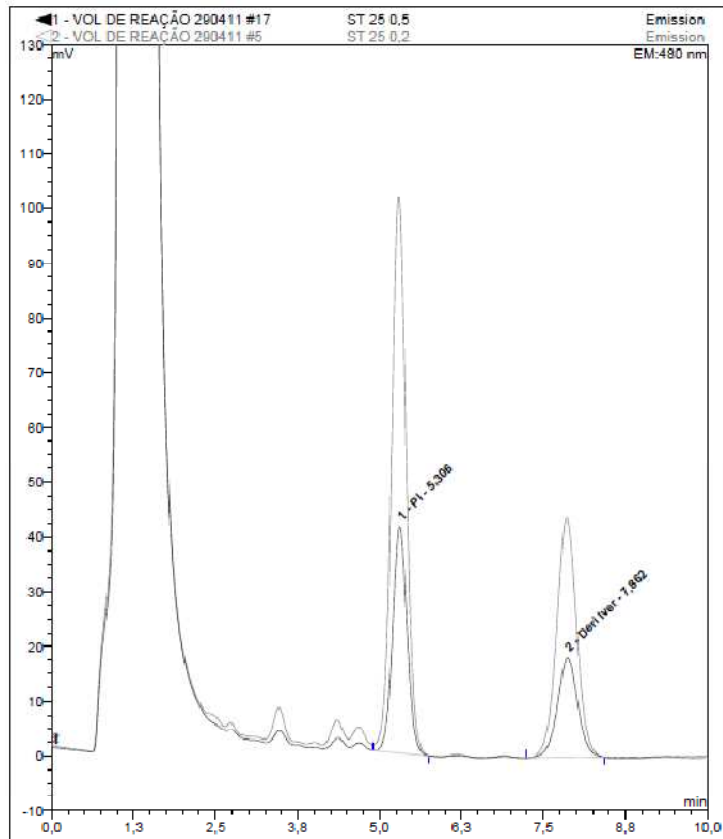


Figura 3: Cromatograma comparativo do volume final de reação.

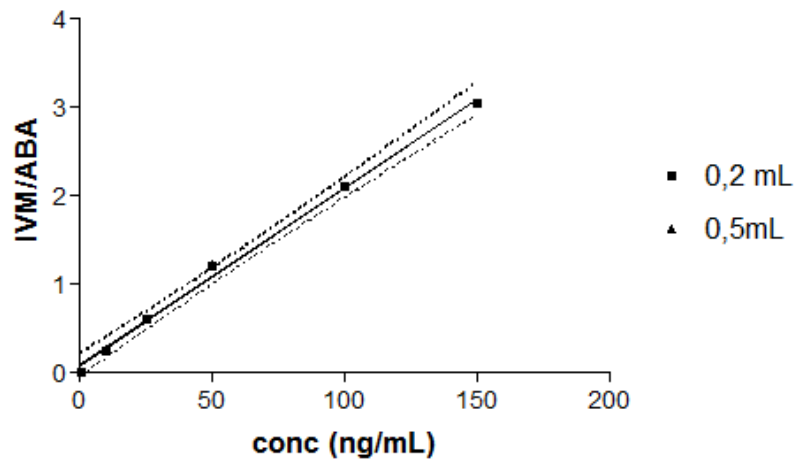


Figura 4: Curva da linearidade das reações com volumes finais diferentes

Tabela 8: Termos da curva de linearidade das reações de derivatização

Parâmetros	Volume final de reação	
	0,2mL	0,5mL
a	0,0201	0,0201
b	0,0855	0,0938
r^2	0,9983	0,9980

a-coeficiente angular; b-coeficiente linear; r^2 -coeficiente de correlação

Tabela 9: Resultados cromatográficos obtidos com volumes finais de reação diferentes

Volume de Reação (μL)	Concentração (ng.mL^{-1})	Área	Assimetria	Sinal/Ruído
200	0,5	0,4305	1,0	22,4
		0,4302	1,0	22,4
0,2401		1,0	5,5	
0,2236		0,9	5,1	

Para alcançar o menor LQ possível com relação de sinal/ruído superior a 5 foram testados volumes de injeção de amostras CQB em matriz biológica de 10, 20, 30, 50 e 100 μL observando os valores de N e S/R. O aumento do volume de injeção tem por objetivo adicionar uma maior quantidade de analito ao sistema cromatográfico e com isso diminuir o limite mínimo de quantificação do método. Este recurso aliado ao baixo volume de reação para derivatização foram necessários para conseguir um método com limites de quantificação de 0,2 ng.mL^{-1} . Conforme dados da Tabela 10, pode-se observar que a injeção de 100 μL apresentou o maior valor de S/R, porém o número de pratos teóricos foi inferior a 2000, devido ao excesso de volume injetado na coluna. A injeção de 40 μL apresentou N superior a 2000 para IVM, porém o mesmo não foi observado para ABA. As injeções de 20 e 30 μL apresentaram N superior a 2000 para IVM e ABA e S/R superior ao volume de 10 μL . Como o aumento no volume de injeção favorece o LQ foi selecionado um volume de injeção de 30 μL para a validação do método.

Tabela 10: Parâmetros cromatográficos para padrão de ivermectina à 0,5ng/mL e abamectina.

Volume de injeção (μL)	IVM			ABA		
	Area	N	S/R	Area	N	S/R
10	0,4392	2637	3,6	27,9555	3012	306,4
20	0,9244	2611	4,4	55,8448	2653	346,5
30*	1,3317	2531	4,1	85,5873	2178	316,1
40	1,6850	2322	4,2	107,8466	1882	312,8
50	2,1791	1881	4,2	145,7607	1347	307,2
100	3,7675	1102	6,1	289,1368	511	425,5

* Volume de injeção selecionado; IVM-ivermectina; ABA-abamectina; N-número de pratos teóricos; S/R-relação sinal ruído

Para se determinar o tempo de estabilidade da IVM e ABA em solvente foram avaliadas a variação da relação de área (RA) de IVM/ABA de soluções de 0,5 a 150 ng.mL^{-1} armazenadas em frasco âmbar por 14 dias. Foram consideradas estáveis amostras com CV% inferiores a 15%.

Todas as concentrações testadas demonstraram estabilidade nestas condições sem nenhuma influência na linearidade. Desta forma pôde-se determinar que as soluções de trabalho pudessem ser armazenadas por até 14 dias (Tabela 11 e 12; Figura 5).

Como o objetivo de determinar o tempo que uma amostra derivatizada poderia permanecer no amostrador antes de ser analisadas foram avaliadas amostras de 0,5 a 150 ng.mL^{-1} nos tempos de zero, 12, 24 e 48 horas de derivatização. As amostras apresentaram CV% inferiores a 15% de zero a 24 horas. Após 48 horas as amostras aumentaram consideravelmente o CV% em todas as concentrações demonstrando sua falta de estabilidade conforme demonstrado na Tabela 13 e Figura 6. Desta forma, as amostras devem ser analisadas em até 24 horas após a derivatização.

Tabela 11: Variação da relação de área (ivermectina/abamectina) em solvente armazenadas a temperatura ambiente por 14 dias

Conc. (ng.mL ⁻¹)	RA						Media	CV%
	0h	24h	48h	72h	7d	14d		
0,5	0,0103	0,0087	0,0094	0,0083	0,0066	0,0066	0,0086	14,6
10	0,1477	0,1477	0,1435	0,1437	0,1429	0,1429	0,1439	1,3
25	0,3874	0,3280	0,3274	0,3270	0,3230	0,3230	0,3367	7,4
50	0,5734	0,6432	0,6429	0,6424	0,6408	0,6408	0,6309	4,5
100	1,2689	1,3294	1,3319	1,3225	1,3218	1,3218	1,3158	1,8
150	1,9039	1,9118	1,9094	1,9064	1,8939	1,8939	1,9062	0,4

h - hora; d - dia; cv% - coeficiente de variação relativa

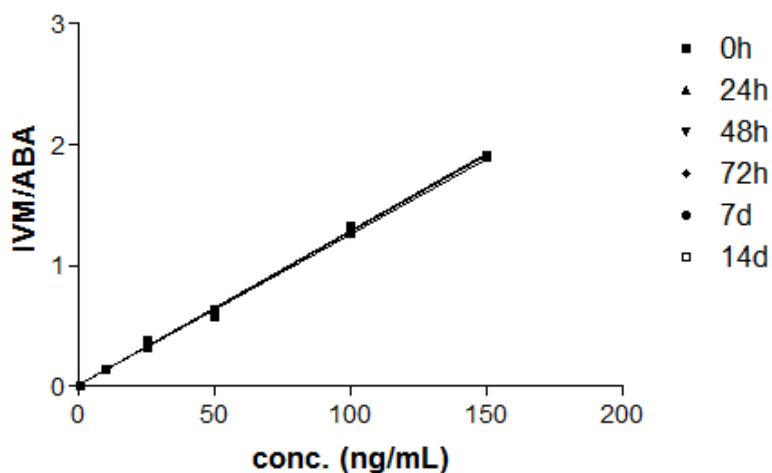


Figura 5: Curvas de linearidade das soluções padrão de 0h a 14 dias armazenadas a temperatura ambiente.

Tabela 12: Equação das retas de linearidade da estabilidade dos padrões em solvente

Parâmetro	0h	24h	48h	72h	7d	14d
A	0,0125	0,0128	0,0128	0,0128	0,0127	0,0127
B	0,0129	0,0084	0,0090	0,0085	0,0078	0,0079
r²	0,9986	0,9997	0,9997	0,9997	0,9996	0,9996

a-coeficiente angular; b-coeficiente linear; r²-coeficiente de correlação; h - hora; d - dia

Problemas com a estabilidade do derivatizado de avermectinas já foram descritos anteriormente. DANAHER (2006) sugere análise em até 24 horas após a derivatização conforme os dados encontrados nesta metodologia.

Tabela 13: Variação da relação de área (ivermectina/abamectina) do derivatizado armazenado no amostrador do cromatôgrafo líquido por 48h.

	Tempos de análises e CV%					
	0h	12h	24h	CV%	48h	CV%
Concentração (ng.mL⁻¹)						
0,5	0,2841	0,2825	0,2445	8,3	1,1745	91,1
10	0,3747	0,3738	0,4114	5,6	1,3494	76,8
25	0,6850	0,6833	0,7558	5,8	1,7519	54,0
50	1,1343	1,1296	1,2121	4,0	2,1249	34,6
100	1,9424	1,9339	2,1099	5,0	2,6901	16,4
150	2,7339	2,7272	2,8804	3,1	3,4851	12,2
Parâmetros						
a	0,0162	0,0162	0,0174		0,0156	
b	0,2761	0,2722	0,2698		1,2454	
r ²	0,9990	0,9990	0,9968		0,9965	

a-coeficiente angular; b-coeficiente linear; r²-coeficiente de correlação; h - hora

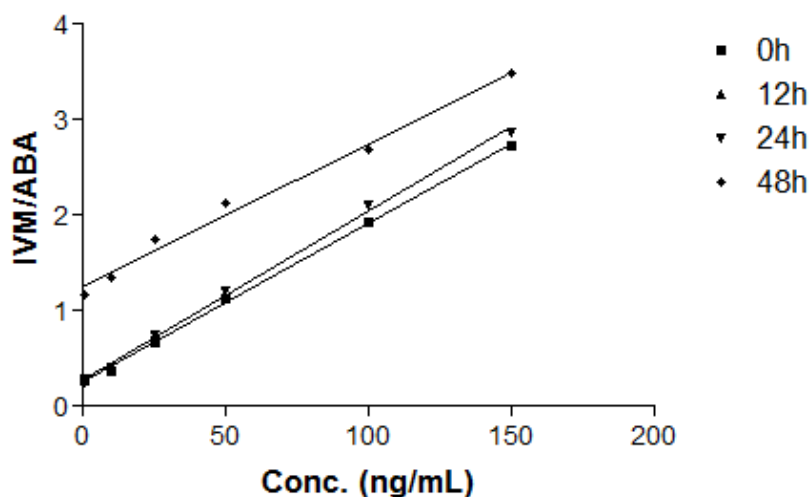


Figura 6: Linearidade da estabilidade do derivatizado

4.2 Preparo da Amostra

Na escolha do preparo da amostra fatores como disponibilidades da técnica pelo laboratório analítico e custo total da análise devem ser levadas em conta. As técnicas de ELL, liofilização e SPE encontravam-se disponíveis para sua utilização, sendo a terceira com o maior custo tendo em vista que um ensaio de biodisponibilidade utiliza um número muito grande de amostras e cada cartucho de SPE tem um valor muito elevado.

As extrações utilizando SPE apresentaram baixa precisão para concentrações menores enquanto as extrações ELL e liofilização apresentam CV% inferiores a 15%, ou seja, valores de precisão aceitáveis, conforme descrito na Tabela 14. Porém a liofilização apresentou valores de recuperação muito superiores a 100% para todas as concentrações evidenciando um efeito de matriz elevado. Na Figura 8 o mesmo resultado pode ser observado para extração com SPE. Valores de recuperação próximos a 100% puderam ser alcançados na

ELL. Todas as extrações foram lineares (Figura 7 e Tabela 15). Desta forma a ELL pode apresentar os melhores resultados além de ser a técnica de menor custo de análise.

Tabela 14: Precisão dos métodos de extração expressos em coeficiente de variação relativo

Conc (ng.mL ⁻¹)	Métodos de extração		
	Liof	ELL	SPE
1	14,8	13,8	37,6
50	9,7	1,6	6,8
300	5,4	7,4	2,3

Liof-extração do plasma liofilizado; ELL-extração líquido-líquido; SPE-extração em fase sólida

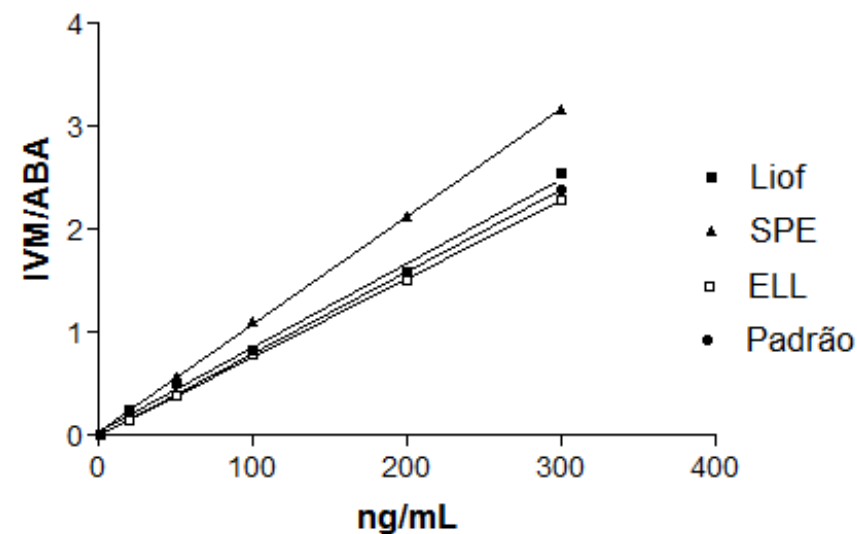


Figura 7: Linearidade das extrações

Tabela 15: Equações de linearidade das curvas de extrações

Parâmetros	Padrão	Métodos de extração		
		Liof	ELL	SPE
a	0,0079	0,0082	0,0076	0,0105
b	0,0032	0,0453	0,0097	0,0311
r ²	0,9998	0,9979	0,9999	0,9999

Liof – liofilização; ELL – extração líqui-líquido; SPE – extração em fase sólida; a-coeficiente angular; b-coeficiente linear; r²-coeficiente de correlação

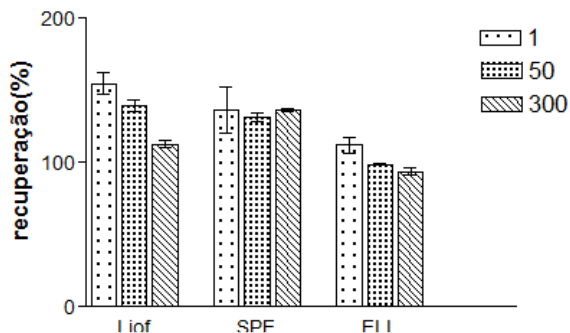


Figura 8: Recuperação relativa das extrações

O método escolhido para extração das amostras foi ELL, em razão do menor custo, melhores valores de recuperação, menor efeito de matriz e melhores resultados de precisão quando comparada aos outros métodos.

4.3 Validação da Metodologia Analítica

4.3.1 Linearidade

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

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

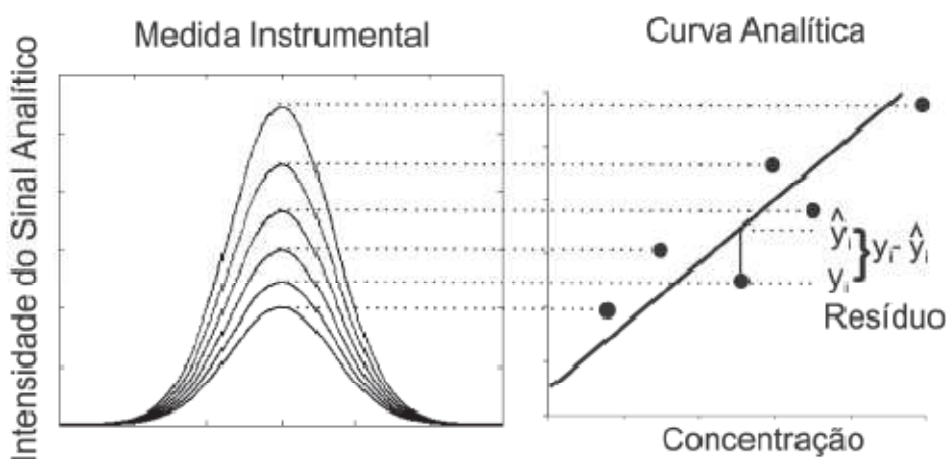


Figura 9: Relação entre o sinal analítico e o ruído em uma regressão linear (RIBEIRO et al., 2008)

O ajuste da curva pelo método dos quadrados mínimos fornecerá os coeficientes de regressão (coeficiente angular e linear) de acordo com o modelo abaixo, determinando a curva de calibração.

$$y = ax + b$$

Onde: y é a variável dependente
x é a variável independente
a é o coeficiente linear da reta
b é o coeficiente angular da reta

Uma vez determinada a curva de calibração a concentração de uma amostra desconhecida poderá ser calculada através de seu resultado analítico. A adequação do ajuste

da curva é determinada pelo coeficiente de correlação r , que é a razão da covariância entre a concentração, x , e o sinal analítico, y , com o produto dos desvios padrões de x . Este coeficiente pode variar de -1 a 1. Valores próximos de 1 indicam alta correlação positiva, valores próximos a -1 indicam alta correlação negativa enquanto valores próximos a zero indicam total falta de correlação. Modelos de calibração com alto resíduo no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependente e independente (RIBEIRO et al., 2008; SOUZA et al., 2005).

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

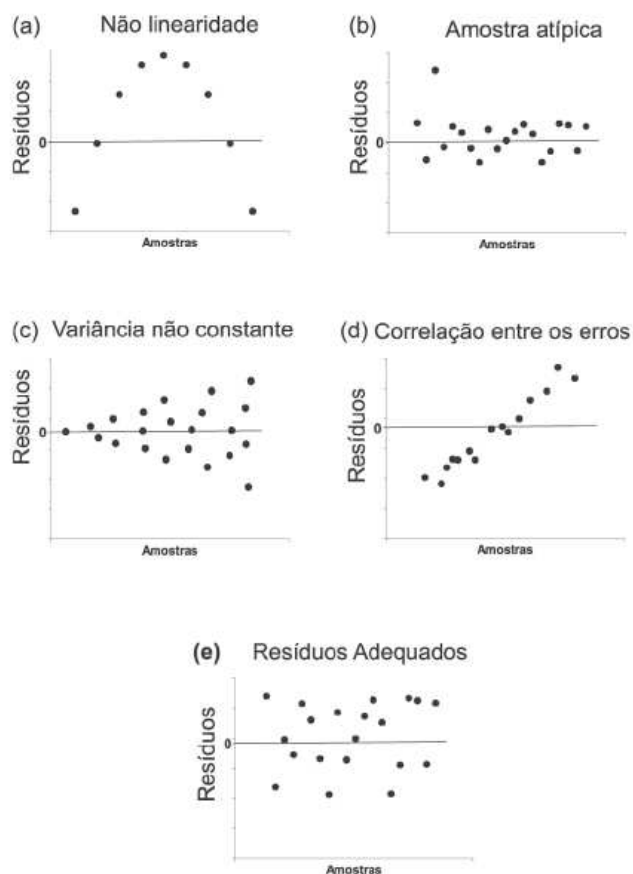


Figura 10: Diferentes dispersões de resíduos (RIBEIRO et al., 2008)

Devido à ampla faixa de linearidade estudada, em geral mais de duas ordens de grandeza é de se esperar que a variância em cada ponto da reta seja diferente e a condição de homogeneidade de variância, designada por homoscedasticidade, não seja cumprida. Assim as concentrações mais elevadas tendem a influenciar (ou “pesar”) a reta de calibração, resultando na perda da exatidão, especialmente nos seus pontos mais baixos, próximos ao LQ.

De fato, devido à ampla faixa de trabalho empregada neste estudo (0,2 a 300 ng.mL⁻¹; 4 ordens) valores discrepantes da variância dos resíduos foram encontrados durante a construção da curva de calibração. Estes resultados podem ser observados na Figura 11.

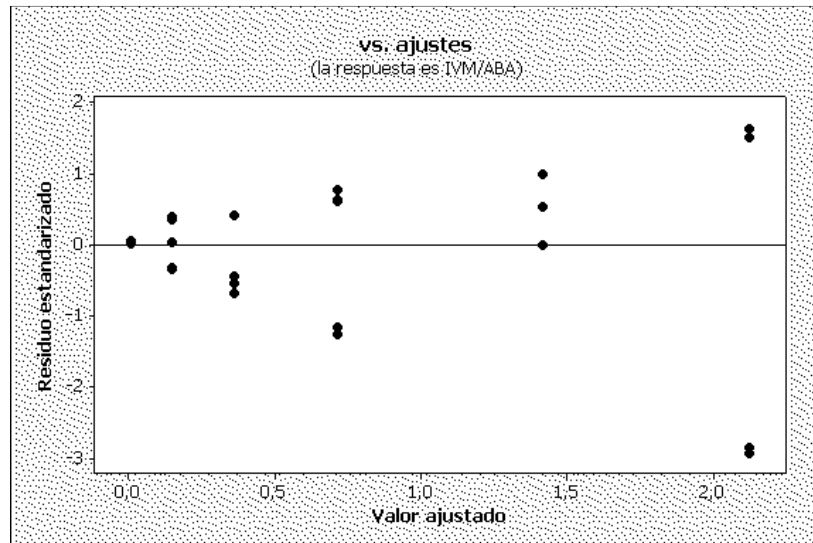


Figura 11: Dispersão de resíduo da curva de calibração empregando a regressão linear simples

Para confirmar a heterocedasticidade do método foi utilizado o teste F de variância entre as concentrações extremas do método (0,2 e 300 ng.mL⁻¹). Os resultados estão descritos na tabela 19 e determinam um p igual a 0,0000 indicando que a hipótese nula do teste deve ser rejeitada, ou seja, as variâncias são desiguais e o método é heterocedástico. Para a construção do gráfico de resíduo e teste F foram utilizados os dados das três curvas de calibração feitas em matriz biológicas. Para a construção dos gráficos de resíduo foi utilizado o programa estatístico MINITAB 15 enquanto para o teste F foi utilizado o programa EXCEL 2007.

Tabela 16: Resultado do teste F para a variância dos resíduos da curva de calibração por regressão linear simples

Estatística	IVM/ABA		F _{calculado}	F _{critico}	p-valor
	0,2 ng.mL ⁻¹	300 ng.mL ⁻¹			
Media	0,0124	2,1238			
Variância	0,0000	0,0063	0,0000	0,1980	0,0000
N	6	6			
GL	5	5			

N- número de amostras; GL- grau de liberdade

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

Seis fatores de ponderação foram testados. São eles: 1/x; 1/x^{0,5}; 1/x²; 1/y; 1/y^{0,5} e 1/y². Cada uma das ponderações foram inseridas nas curvas de calibração anterior e os gráficos de resíduo gerados foram analisados juntamente com suas regressões (Tabela 17 e Figura 12). A

ponderação $1/x^2$ e $1/x$ apresentaram as melhores dispersões de resíduos e os menores valores de erro relativo, porém a ponderação $1/x^2$ possui coeficiente de correlação inferior a 0,98 preconizado pelo guia da ANVISA. Desta forma a ponderação $1/x$ apresentou os melhores resultados sendo então utilizada para a construção das curvas de linearidade do método validado.

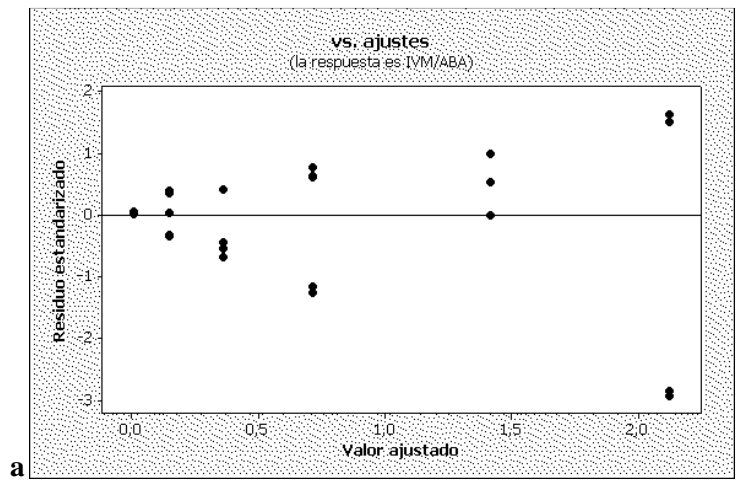
Tabela 17: Parâmetros da curva de calibração para os tratamentos testados de regressão linear ponderada

Ponderação	Coef. Linear (a)	Coef. Angular (b)	r^2	Erro Relativo
1	0,0070	0,0096	0,9971	16,89
$1/x^*$	0,0070	0,0107	0,9999	0,16
$1/x^{0,5}$	0,0070	0,0105	0,9999	2,10
$1/x^2$	0,0070	0,0108	0,9750	0,00
$1/y$	0,0070	0,0105	0,9981	21,97
$1/y^{0,5}$	0,0703	0,0100	0,9980	21,73
$1/y^2$	0,0070	0,0107	0,9969	23,50

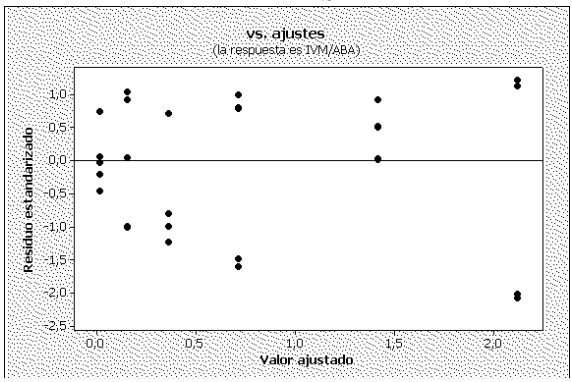
* ponderação selecionada

Foi realizada a linearidade intra-dia e inter-dia do método através da construção da curva de calibração em matriz biológica. Nas Tabelas 18, 19 e Figuras 20 abaixo serem demonstrados os resultados obtidos para a comprovação da linearidade do método através da regressão linear ponderada ao fator de $1/x$.

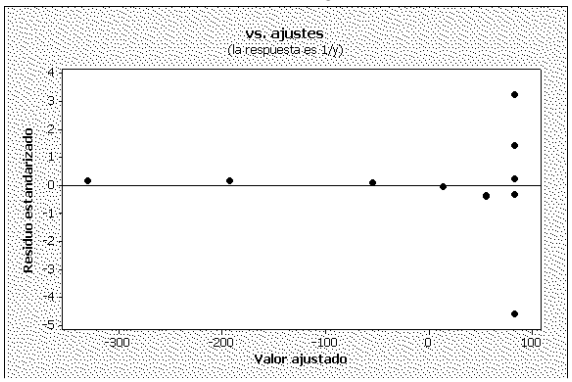
Todas as curvas de calibração construídas cumpriram com os critérios de linearidade estabelecidos pela ANVISA e recuperação pela AOAC. O método foi considerado linear e a equação da reta utilizada para a quantificação das amostras será $y = 0,0070x + 0,0107$, onde “y” é representado pela relação de área IVM/ABA e “x” será representada pela concentração (ng.mL^{-1}) de IVM.



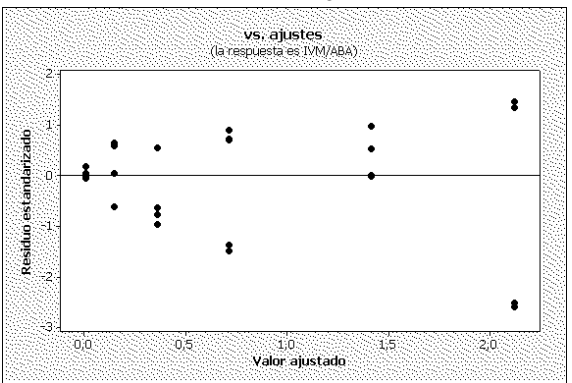
a



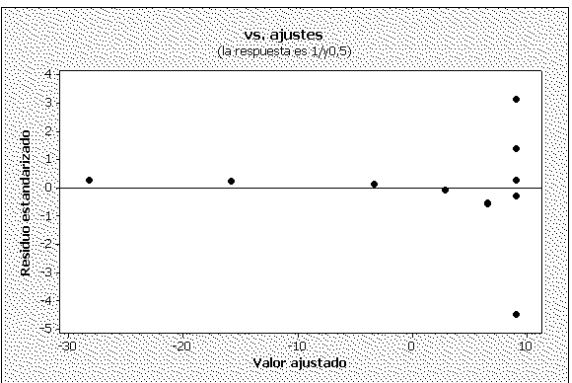
b



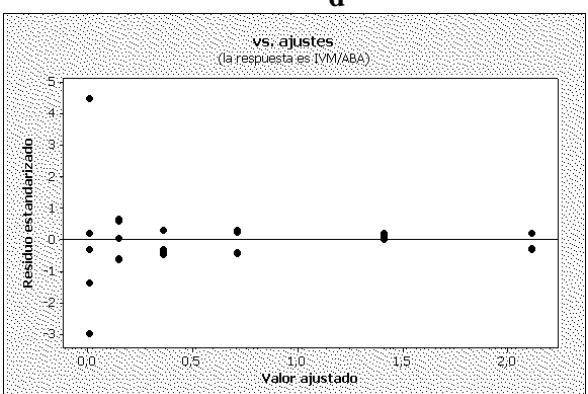
c



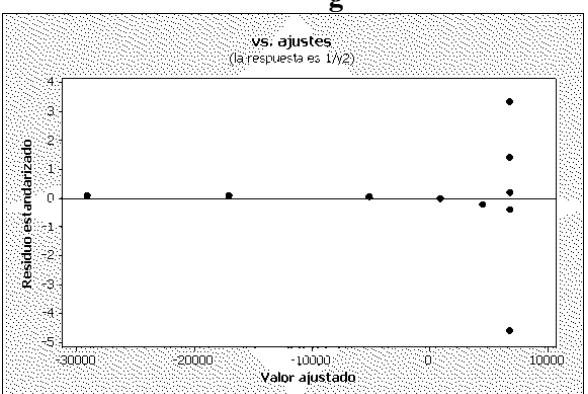
d



e



f



g

Figura 12: Gráficos de residuo das regressões ponderadas. a- $w=1$; b- $w=1/x$; c- $w=1/x^{0.5}$; d- $w=1/x^2$; e- $w=1/y$; f- $w=1/y^{0.5}$; g- $w=1/y^2$.

Tabela 18: Equação das curvas de calibração

Dia	Amostra	A	b	r ²
1	Padrão	0,0075	0,0050	1
	Matriz 1	0,0069	0,0107	0,9990
2	Matriz 2	0,0071	0,0105	0,9980
	Matriz 3	0,0072	0,0118	0,9990

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

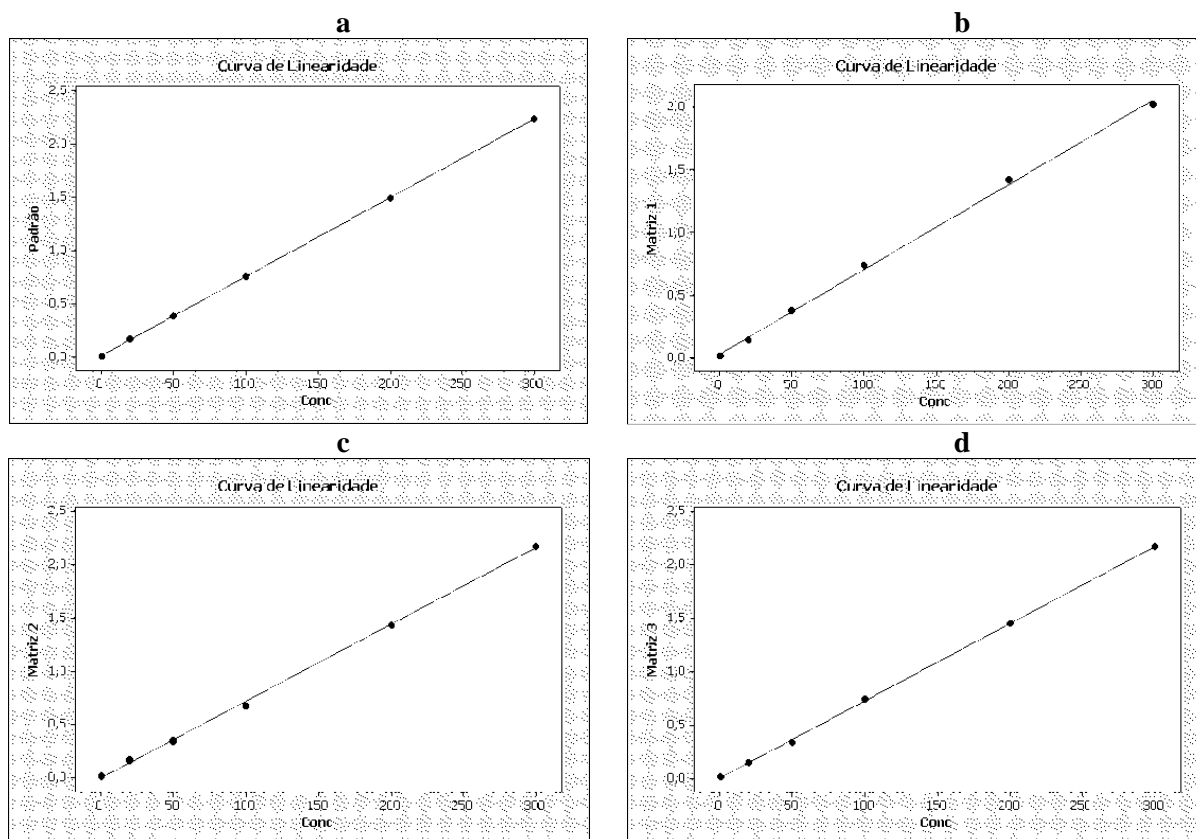


Figura 13: Curvas de calibração individuais. a-padrão; b- matriz dia 1; c- matriz dia 1; d- matriz dia 2

Tabela 19: Recuperação e Exatidão da Linearidade

Conc (ng.mL ⁻¹)	Matriz 1		Matriz 2		Matriz 3	
	Recuperação	Exatidão	Recuperação	Exatidão	Recuperação	Exatidão
0,2	103	95	102	86	115	95
20	86	91	101	110	94	101
50	100	105	92	95	90	93
100	100	104	100	94	100	104
200	98	101	99	102	100	103
300	93	96	100	103	100	103

Tabela 20: Precisão da Linearidade

Conc (ng.mL ⁻¹)	CV%	
	Intra-dia	Inter-dia
0,2	2,3	6,3
20	9,8	7,6
50	5,3	5,4
100	5,5	5,0
200	0,8	1,1
300	4,3	3,8

CV% - coeficiente de variação relativo

4.3.2 Recuperação

A quantidade de analito recuperado em uma amostra deve ser precisa, exata e reprodutível. São desejáveis recuperações próximas a 100%, entretanto, quando se trabalha com matrizes complexas como plasma e outras matrizes de origem biológica, é comum a obtenção de valores mais baixos. A recuperação absoluta é calculada tomando a média das áreas das amostras FD como 100%.

$$RA\% = \frac{A_{FA}}{A_{FD}} \times 100$$

Onde: A_{FA} = área de IVM fortificada antes do processo de extração

A_{FD} = área de IVM fortificada depois do processo de extração

O uso do PI compensa as perdas que podem ocorrer durante o processo de extração. O ideal é que a substância usada como PI apresente estrutura semelhante a do analito. Para compensar as perdas de extração foi utilizada a recuperação relativa, onde a relação de área de IVM/ABA fortificada depois da extração é utilizada como 100%. Assim a recuperação relativa é calculada conforme a seguinte fórmula.

$$RR\% = \frac{RA_{FA}}{RA_{FD}} \times 100$$

Onde: RA_{FA} = área de IVM/ABA fortificada antes do processo de extração

RA_{FD} = área de IVM/ABA fortificada depois do processo de extração

Com esta correção valores de recuperação relativa são maiores e mais precisos.

As Tabelas 21, 22 e 23 reportam os valores de recuperação absoluto e relativo para as amostras de validação nos pontos CQB, CQM e CQA. O valor médio de recuperação relativa foi de 89,9%.

Tabela 21: Ponto de controle de qualidade baixo

Dia	Rec abs	Media	CV	CV%	Rec rel	Media	CV	CV%
1	62,4	66,0	9,3	14,2	68,8	76,7	15,0	19,6
	65,1				73,1			
	62,1				66,6			
	59,3				70,9			
	81,0				102,6			
1	49,3	64,3	8,3	12,9	76,8	76,9	3,5	4,6
	67,3				75,7			
	70,6				78,4			
	67,4				80,2			
	66,7				73,5			
2	75,0	67,7	8,7	12,8	79,6	71,0	9,2	13,0
	75,0				79,1			
	57,8				59,7			
	73,1				75,3			
	57,6				61,4			
Media		66			74,9			

Rec abs: recuperação absoluta; Rec rel: recuperação relativa; CV: coeficiente de variação; CV%: coeficiente de variação relativa

Tabela 22: Ponto do controle de qualidade medio

Dia	Rec abs	Media	CV	CV%	Rec rel	Media	CV	CV%
1	89,6	120,5	31,4	26,0	96,1	96,1	2,1	2,1
	81,8				97,0			
	145,8				98,3			
	154,1				92,4			
	131,4				96,6			
1	98,6	125,8	29,0	23,0	95,1	94,9	3,1	3,1
	85,7				94,1			
	118,7				89,8			
	155,6				97,6			
	160,3				97,8			
2	120,5	91,8	17,0	18,5	98,1	97,4	1,3	1,4
	94,0				96,4			
	71,9				96,2			
	84,6				99,2			
	87,8				97,3			
Media		112,7			96,1			

Rec abs: recuperação absoluta; Rec rel: recuperação relativa; CV: coeficiente de variação; CV%: coeficiente de variação relativa

Tabela 23: Ponto do controle de qualidade alto

Dia	Rec abs	Media	CV	CV%	Rec rel	Media	CV	CV%
1	60,7	96,8	32,6	33,6	96,7	98,8	2,7	2,8
	74,6				94,9			
	124,9				100,0			
	90,4				100,6			
	133,3				101,8			
1	63,4	67,6	3,8	5,7	95,9	97,3	1,7	1,8
	71,2				97,1			
	65,9				98,0			
	64,8				95,5			
	72,6				100,1			
2	71,5	67,0	29,0	43,3	101,2	99,6	5,0	5,0
	74,4				105,3			
	99,5				100,6			
	73,9				99,8			
	15,9				91,0			
Media		77,1			98,6			

Rec abs: recuperação absoluta; Rec rel: recuperação relativa; CV: coeficiente de variação; CV%: coeficiente de variação relativa

4.3.3 Seletividade/Especificidade

A seletividade estabelece o quanto um método analítico é indiferente às espécies que estão presentes na amostra e que poderiam interferir na determinação do analito de interesse, neste caso a IVM.

De acordo com a RE n°899/2003, a avaliação da seletividade é feita com base na observação do aparecimento de picos interferentes nas amostras de plasma normal, lipêmico e hemolisado analisados. Qualquer amostra branca que apresente interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, metabólito ou padrão interno, deve ser rejeitada. O método foi considerado validado para este parâmetro uma vez que atendeu às especificações descritas na RE n°899/2003 e não apresentou interferente no mesmo tempo de retenção do analito e do padrão interno, como pode ser observado na Figura 14.

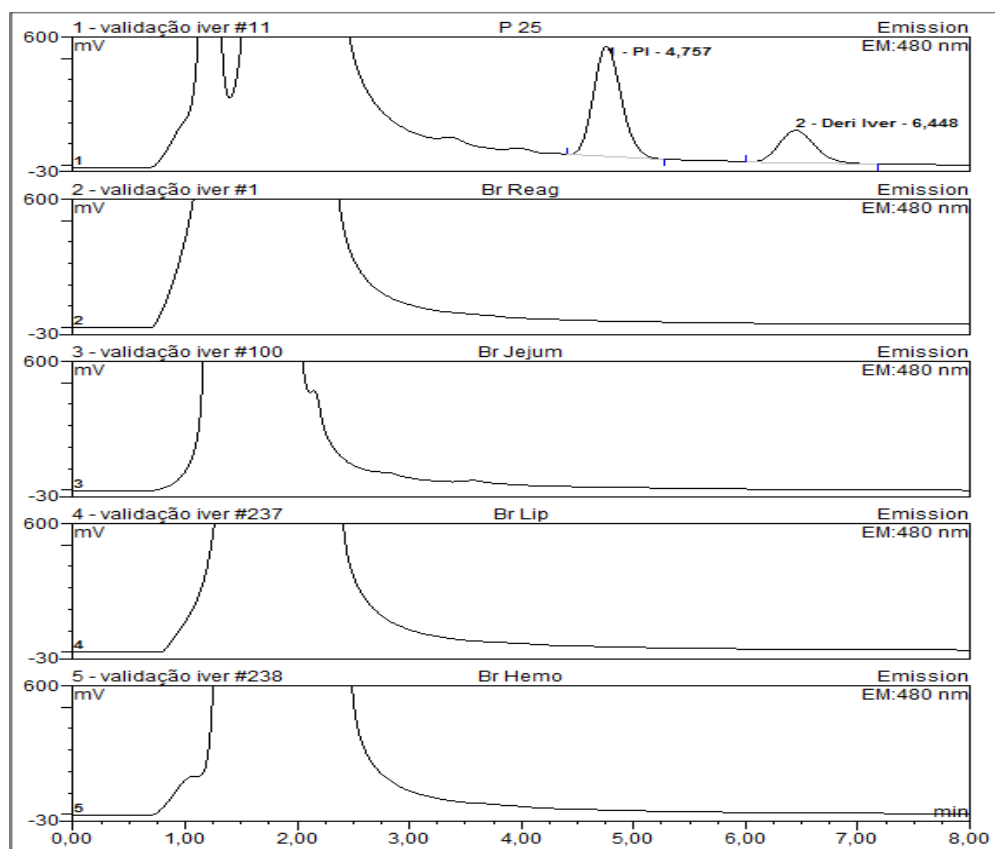


Figura 14: Cromatogramas de seletividade. 1-Padrão 25ng mL⁻¹, 2-branco do reagente, 3-amostra jejum, 4-amostra lipêmica, 5-amostra hemolisada

4.3.4 Precisão e Exatidão

Precisão é parâmetro relacionado à concordância entre os valores obtidos experimentalmente. Quanto menor a amplitude do conjunto de valores, mais precisa é a medida do método. A precisão fornece uma medida do erro aleatório da análise. Deve ser avaliada dentro de um mesmo dia de análise (precisão intra-dia, repetitividade) e entre dias diferentes (precisão inter-dias, reprodutibilidade). A precisão é avaliada através do cálculo do CV% das concentrações calculadas para as amostras preparadas. Os limites estabelecidos pela RE 899/2003 são de 20% no LQ e 15% nos demais níveis de concentração. Os resultados apresentados na Tabela 24 atendem os critérios estabelecidos na RE899/2003.

A exatidão é uma medida da concordância entre um valor aceito como verdadeiro ou um valor de referência e o valor encontrado em termos de concentração nominal. É avaliada pelo cálculo da variação encontrada nas amostras quantificadas em relação ao valor nominal das mesmas. Os limites estabelecidos pela RE nº 899/2003 são de 80 a 120% no LIQ e 85 a 115% nos demais níveis de concentração.

Tabela 24: Resultados de Precisão e Exatidão

Conc (ng.mL ⁻¹)	Precisão		Exatidão	
	Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia
CQB	13,8	13,9	93	88
CQM	2,8	2,6	100	100
CQA	2,4	3,5	101	101

CQ- controle de qualidade (B-baixo; M-medio; A-alto)

O método demonstrou-se preciso e exato pois nenhum dos resultados calculados se mostraram fora dos limites estabelecidos na RE n°899/2003.

4.3.5 Limite inferior de quantificação

É a menor quantidade de analito presente numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas. Segundo a RE n°899/2003, a relação sinal/ruído neste nível de concentração deve ser maior que 5. As cinco amostras independentes do LQ encontram-se dentro dos parâmetros exigidos pelo guia, confirmando o limite de quantificação do método de $0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$ conforme demonstrados na figura 15 e tabela 25.

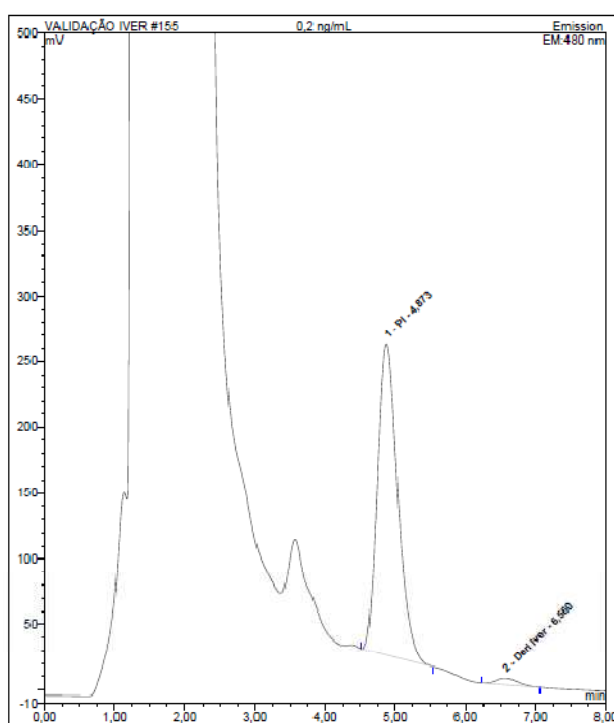


Figura 15: Cromatograma de LQ com S/R de IVM >5

Tabela 25: Resultados de relação sinal-ruído, exatidão e precisão do limite inferior de quantificação

Amostra	Relação S/R	Exatidão	Precisão
1	6,6	101	
2	5,3	97	
3	8,7	115	6,6
4	6,3	102	
5	6,3	103	

S/R- sinal-ruído

4.3.6 Estabilidade

Os testes de estabilidade são avaliados através do cálculo da precisão e exatidão das concentrações calculadas para os níveis testados (CQB, CQM e CQA). A ANVISA estabelece os mesmos critérios adotados para os testes de precisão.

Durante este estudo o método se mostrou estável para todos os testes (Tabela 25, 27, 27 e 28) exceto o de curta duração, onde a amostra é extraída e analisada apenas após 24

horas. Isso indica que este procedimento não é possível de ser utilizado durante a análise das amostras desconhecidas (Tabela 26).

A estabilidade de longa duração revelou que as amostras devem permanecer no máximo por 1 mês armazenadas à -20°C antes de serem analisadas. Períodos superiores a este podem comprometer a integridade da amostra e por consequência levar a resultados discrepantes na análise (Tabela 29).

Tabela 26: Estabilidade de curta duração

CQ	IVM/ABA		CV %
	Inicial	24h	
CQB	0,0320	0,0174	35,8
	0,0320	0,0192	
	0,0231	0,0108	
CQA	1,4723	1,3906	2,4
	1,4441	1,3949	
	1,3827	1,4113	

CQ: controle de qualidade (B – baixo; A – alto); cv% - coeficiente de variação relativa

Tabela 27: Estabilidade Pós-Processamento

CQ	IVM/ABA		CV %
	Inicial	12h	
CQB	0,0320	0,0336	8,3
	0,0320	0,0300	
	0,0231	0,0281	
CQA	1,4723	1,4428	1,0
	1,4441	1,4362	
	1,3827	1,4130	

CQ: controle de qualidade (B – baixo; A – alto); cv% - coeficiente de variação relativa

Tabela 28: Estabilidade de Ciclo de congelamento

CQ	IVM/ABA		CV %
	Inicial	Ciclo de congelamento	
CQB	0,0320	0,0248	17,0
	0,0320	0,0225	
	0,0231	0,0236	
CQM	0,3944	0,3360	7,4
	0,4097	0,3427	
	0,3857	0,3739	
CQA	1,4723	1,4273	2,0
	1,4441	1,4212	
	1,3827	1,4332	

CQ: controle de qualidade (B – baixo; M – médio; A – alto); cv% - coeficiente de variação relativa

Tabela 29: Estabilidade de Longa

CQ	IVM/ABA				
	Inicial	1 mês	CV %	2 meses	CV%
CQB	0,0120	0,0141	7,2	0,0077	41,0*
	0,0119	0,0162		0,0076	
	0,0134	0,0137		0,0032	
CQA	1,4723	1,4908	2,4	1,6065	4,9
	1,4441	1,4823		1,6294	
	1,3827	1,4439		1,6591	

CQ: controle de qualidade (B – baixo; A – alto); cv%- coeficiente de variação relativa ; * amostra não estável

4.4 Curva de Concentração Plasmática

Para correlacionar os dados de concentração plasmática com o tempo de coleta, cada animal foi analisado individualmente.

Para determinar o modelo de distribuição da IVM foi observado o coeficiente de correlação obtido da regressão linear do perfil plasmático da curva exponencial de concentração versus tempo. Foram encontrados valores indicativos de dois compartimentos, com a visualização de duas retas distintas. A reta α foi atribuída a fase de distribuição enquanto a reta β corresponde a fase de eliminação. Este resultado pode ser observado na Figura 16. Este fato se deve a característica lipofílica da IVM que tende a se depositar em tecidos subcutâneos e com isso ter constantes de distribuição de valores diferentes dos tecidos e do compartimento sanguíneo (BORGES et al., 2008; CHITTRAKARN et al., 2008; CANGA et al., 2009; ERASLAN et al., 2010).

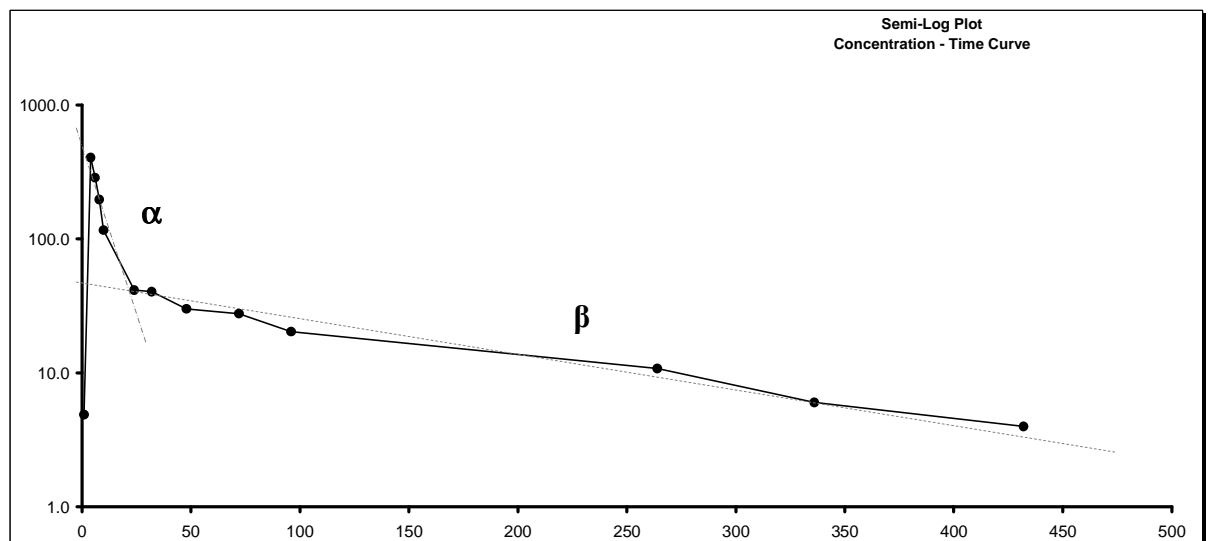


Figura 16: Gráfico da concentração exponencial versus tempo de ivermectina

Para o cálculo do $T_{1/2\alpha}$ será utilizado a equação $\ln 2/K_{\text{distribuição}} (K_{\text{dist}})$, onde K_{dist} representa a constante de distribuição do medicamento, enquanto o $T_{1/2\beta}$ será calculado com a equação $\ln 2/ K_{\text{eliminação}} (K_{\text{el}})$ onde, K_{el} representa a constante de eliminação do fármaco. A AUC será calculada através regra trapezoidal conforme descrito por LIFSCHITZ (2004).

Durante o estudo a IVM foi detectada no plasma nos tempos entre uma (1) hora e 18 dias. A $AUC_{0-\infty}$ foi de 8490,7 enquanto a AUC_{0-t} foi de 8411,2, correspondendo a 99% da $AUC_{0-\infty}$. A formulação obteve um C_{max} de 350,7 $ng.mL^{-1}$ alcançado em quatro (4) horas. Estes dados demonstram que a IVM possui uma taxa de absorção muito rápida. Estes dados estão disponíveis na Tabela 30.

Diversos estudos já foram publicados relatando o perfil plasmático de IVM em cães para dose de $0,2mg.kg^{-1}$ (KOJIMA K., YAMAMOTO K., NAKANISHI Y., 1987; GOKBULUT et al., 2006; ERASLAN et al., 2010). Estes estudos também demonstram seus dados com modelos de dois compartimentos. A C_{max} média na via SC foi de 40 $ng.mL^{-1}$, enquanto a VO apresenta dados bem discrepantes variando de 117 $ng.mL^{-1}$ no estudo realizado por Gokbulut (2006) e 19 $ng.mL^{-1}$ no estudo realizado por Kojima (1987). O valor encontrado de C_{max} para presente estudo foi bem superior ao reportado nos estudos anteriores ($350,7ng.mL^{-1}$). Esta diferença pode ser atribuída ao aumento da dose para $0,6mg.kg^{-1}$.

O $t_{1/2}$ de eliminação apresentado pelos estudos anteriores para formulações SC foi bem superior ao encontrado na VO, aproximadamente 112 e 59 horas respectivamente. Isto pode ser explicado pela lipofilicidade de IVM que tende a se depositar no local de aplicação gerando uma liberação mais prolongada em formulações SC. O mesmo não ocorre em formulações orais diminuindo seu tempo de meia-vida. O presente estudo apresentou um valor de $t_{1/2}$ de eliminação um pouco menor do que os estudos anteriores, porém pode ser observado que os animais do estudo com pesos menores apresentaram valores de $t_{1/2}$ de eliminação menores se comparados aos animais com maiores pesos. Este fato pode ocorrer pois animais mais pesados, em geral, possuem maior massa de tecido adiposo. Devido ao seu caráter lipofílico, a IVM tende a ser liberada mais lentamente destes tecidos aumentando o $t_{1/2}$ de eliminação.

Eraslan (2010) encontrou uma AUC média de 4054 $ng.h.mL^{-1}$ para dose de $0,2mg.kg^{-1}$ de formulações contendo IVM aplicados via SC. O perfil plasmático apresentado neste estudo possui uma AUC de 8491 $ng.h.mL^{-1}$, valor pouco superior ao dobro do encontrado por Eraslan (2010). Este dados corroboram com o valor médio da AUC descrito neste estudo, pois em doses maiores a AUC da IVM é aumentada devido a sua biodisponibilidade ser linear a dose, conforme descrito anteriormente.

O gráfico da concentração plasmática de IVM versus tempo de coleta com o desvio padrão encontrados entre os indivíduos pode ser observado a Figura 17.

Tabela 30: Parâmetros da curva de concentração plasmática da ivermectina oral e peso dos animais utilizados

Parâmetro	Animal										Media ± CV
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
C_{max} (ng.mL ⁻¹)	340,5	390,0	404,8	304,4	506,7	177,2	318,0	333,8	384,0	347,2	350,7 ± 84,1
Tmax (h)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4,0 ± 0
AUC _{0-α} (ng h/mL)	13201	10095	9315	6654	9186	4742	5580	6780	10957	8392	8490,7 ± 2599,9
AUC _{0-t} (ng h/mL)	13107	10086	8717	6643	9183	4726	5580	6741	10942	8382	8411,2 ± 2570,4
T _{1/2} α (h) – distribuição	2,3	1,4	3,3	4,7	4,2	2,5	2,9	8,1	9,3	6,2	4,5 ± 2,6
T _{1/2} β (h) – eliminação	56,5	31,0	104,1	46,9	44,8	28,0	24,9	50,2	51,2	33,5	47,1 ± 22,8
Vd (L/kg)	4,4	3,6	12,1	7,5	4,3	6,2	5,3	8,7	5,5	4,8	6,3 ± 2,6
Peso (kg)	12,7	11,0	16,0	12,1	9,7	12,5	11,0	11,0	11,0	10,8	

C_{max} : concentração plasmática máxima; T_{max} : tempo onde ocorre a C_{max} ; AUC: área sob a curva da concentração plasmática versus tempo; $T_{1/2\alpha}$: tempo de meia-vida de distribuição; $T_{1/2\beta}$: tempo de meia-vida de eliminação; Vd: volume de distribuição

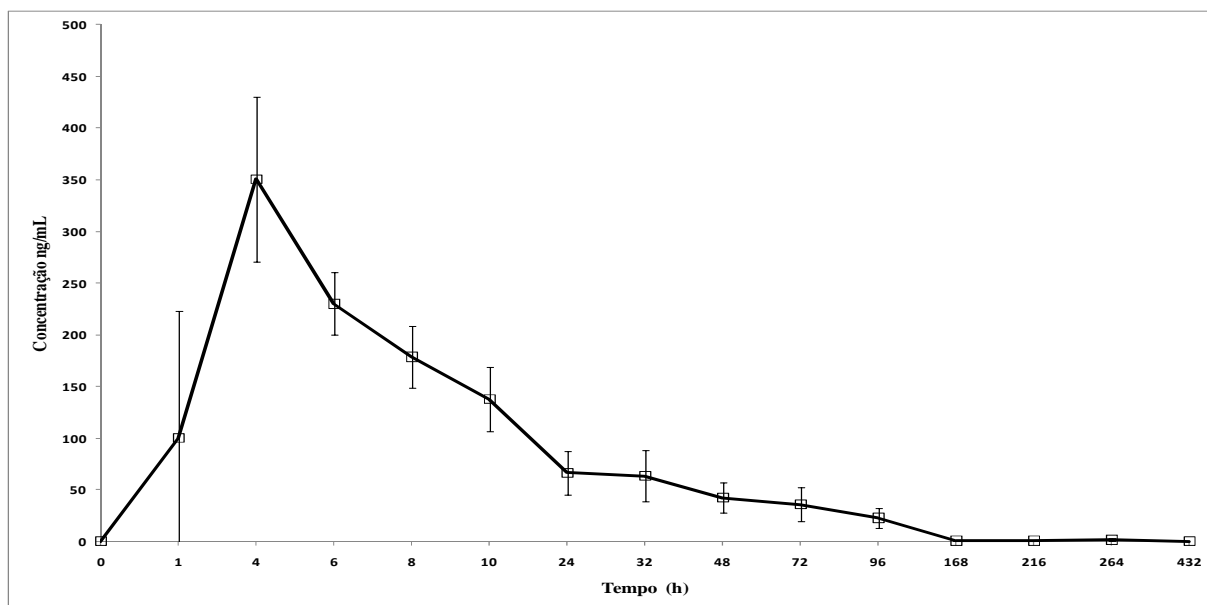


Figura 17: Gráfico da curva de concentração plasmática de ivermectina oral em cães

Os valores encontrados de T_{max} baixo e C_{max} alto indicam uma absorção rápida da IVM na formulação oral utilizada. Canga (2009) descreve uma rápida absorção de IVM em cães quando comparada a animais não monogástricos com T_{max} entre três (3) e cinco (5) horas e um aumento de sua absorção em formulações orais de comprimidos palatáveis exatamente como observado.

Maiores desvios podem ser observados na faixa de absorção se comparado as outras etapas (distribuição de 4 a 24h e eliminação de 32 a 432h). Este fato pode ser associado ao baixo número de pontos de coleta durante o estudo. Um número maior de pontos de coleta na fase de absorção e próximos ao valor de $C_{máx}$ é desejado.

4.5 Avaliação da Eficácia de Ivermectina Oral Contra *C.f.felis* e *R. sanguineus*

As médias das contagens de pulgas, antes e depois do tratamento, assim como a sua eficácia estão apresentadas na Tabela 31. As médias de pulgas vivas do grupo controle para os dias +2 e +7 foram de 31,3 e 60,4 respectivamente.

As médias de *C. f. felis* do grupo tratado foram de 35,1 e 49,6 para os dias +2 e +7, respectivamente. Não houve diferença estatística entre as médias dos grupos tratado e controle nos dias +4 e +7. Para o dia +4 a eficácia foi de 35% e no dia +7 foi de 18% sendo assim o estudo foi encerrado neste dia por apresentar eficácia reduzida e sem diferença estatística (Tabela 31).

Foi realizado o teste de Pearson, na tentativa de correlacionar as contagens de pulga do grupo tratado com a concentração plasmática encontrada nos tempos +2 (48 horas) e +7 dias. Foram observados valores de r muito próximos a zero e valores de p maiores ou iguais a 0,05. Este resultado indica total falta de correlação entre as contagens de pulgas do grupo tratado e a concentração plasmática de IVM nos dias +2 e +4 (Tabela 32).

Tabela 31: Resultado da contagem de pulgas

N° animal	N° de pulgas vivas após o tratamento	
	Dia +2	Dia +7
Controle		
1	11	73
2	40	62
3	29	62
4	29	57
5	44	82
6	45	69
7	21	18
Media	31,3^a	60,4^a
Ivermectina 600µg.kg⁻¹		
1	7	32
2	57	73
3	9	66
4	39	43
5	21	31
6	21	63
7	31	29
8	0	41
9	7	59
10	11	59
Media	20,3^a	49,6^a
Eficácia	35,1	17,9

^{ab} Colunas com médias de mesma letra não diferem significativamente (p>0,05).

Tabela 32: Correlação de Pearson entre o número de pulgas vivas pós-tratamento e concentração plasmática de ivermectina

Dia	Conc. (ng.mL ⁻¹)	Faixa	Media do n° pulgas	Faixa	r	P
+4	22,8	41-11	20,3	0-57	-0,19	0,61
+7	0,7	0-1,8	49,6	29-73	-0,64	0,05

p >= 0,05, não há significância estatística para o teste de Person.

Zakson-Aiken (2001) demonstrou em estudo *in vitro* e *in vivo* que as avermectinas, de uma forma geral, não apresentam alta eficácia no combate a *C.f. felis*, sendo a IVM uma das avermectinas de menor eficácia *in vitro*. Bezerros infestados com *C.f. felis* também não foram desparasitados com o uso de ivermectina subcutânea (ARAÚJO et al., 1998). Phipps (2005) demonstrou maior permeabilidade da selamectina no cérebro de pulgas em comparação a ivermectina e sugeriu que esta diferença de permeabilidade pode ser responsável pela sua baixa eficácia no combate a *C.f. felis*. Estes dados corroboram com os encontrados durante o estudo de eficácia e biodisponibilidade, pois independente da concentração plasmática de IVM não foi encontrada eficácia significativa.

As médias das contagens de carrapatos, antes e depois do tratamento, assim como sua eficácia estão apresentadas na Tabela 33. As médias de *R.sanguineus* vivos do grupo controle para os dias +2 e +7 foram de 19,1 e 24,6 respectivamente.

As médias da contagem de carrapatos do grupo tratado foram de 6,3 e 18,5 para os dias +2 e +7 respectivamente. Só houve diferença estatística entre as médias dos grupos tratado e controle para o dia +4. Para o dia +4 a eficácia foi de 67% e no dia +7 foi de 24% sendo assim o estudo foi encerrado neste dia por apresentar eficácia reduzida e ausência de diferença estatística entre as médias dos grupos tratado e controle do dia +7 (Tabela 33).

Todos os grupos de parasitas apresentaram distribuição normal para o teste de Shapiro-Wilk.

Tabela 33: Resultado da contagem de carrapatos

N° animal	N° de carrapatos vivos após o tratamento	
	Dia +2	Dia +7
Controle		
1	10	19
2	25	33
3	13	16
4	16	34
5	19	30
6	22	24
7	29	16
Media	19,1^a	24,6^a
Ivermectina 600µg.kg⁻¹		
1	9	5
2	8	20
3	5	31
4	2	40
5	4	6
6	6	20
7	3	3
8	2	7
9	11	5
10	13	48
Media	6,3^b	18,5^a
Eficácia	67,1	24,7

^{ab}Colunas com médias de mesma letra não diferem significativamente (p>0,05).

Foi realizado o teste de Pearson, na tentativa de correlacionar as contagens de carrapatos do grupo tratado com a concentração plasmática encontrada nos tempos +2 (48 horas) e +7 dias. Foram observados valores de r muito próximos a zero e valores de p maiores que 0,05. Este resultado indica total falta de correlação entre as contagens de carrapatos do grupo tratado e concentração plasmática de IVM nos dias +2 e +4 (Tabela 34).

Tabela 34: Correlação de Pearson entre o número de pulgas vivas pós-tratamento e concentração plasmática de ivermectina

Dia	Conc. (ng.mL ⁻¹)	Faixa	Media do n° carrapatos	Faixa	r	P
+4	22,8	41-11	6,3	2-13	0,12	0,73
+7	0,7	0-1,8	18,5	48-3	0,05	0,89

p >= 0,05, não há significância estatística para o teste de Person

Poucos estudos utilizando protocolos baseados no guia da WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) (MARCHIONDO et al., 2007) para o teste da eficácia contra *R. sanguineus* são encontrados.

MORSY (2000) demonstrou que IVM via SC na dose de $0,3\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ foi suficiente para eliminar 100% dos carrapatos em quatro dias no ensaio *in vivo*. O mesmo estudo expõe o parasita a papel de filtro impregnado com soluções de IVM em diferentes concentrações para um teste *in vitro*. Este só consegue eliminar totalmente o carrapato com concentrações iguais ou superiores a $75\mu\text{g}/\text{mL}$. Apesar de relatar eficácia, Morsy utiliza um número de animais muito pequeno (apenas 2 por grupo) e não deixa claro a carga parasitária de cada animal uma vez que são infestados naturalmente. Os resultados encontrados no presente estudo não corroboram com os demonstrados por Morsy provavelmente pela falta de padronização da carga parasitária de seu estudo e pelo baixo número de animais.

Outro ensaio (ROY et al., 2010) demonstrou a eficácia de 100% após 14 dias para uma formulação pour on na dose de $1\text{mL}/10\text{kg}$ de peso vivo aplicados com intervalos de sete dias no combate do carrapato. Esta eficácia pode estar associada ao fato do produto ser tópico e também exercer efeito carrapaticida ao contato direto com a IVM. Este efeito não pode ser observado no presente estudo, pois a via de administração escolhida foi oral. Este fato explicaria a diferença de eficácia encontrada entre os estudos.

Em um estudo na região de Ibiúna, São Paulo, cães infestados naturalmente foram tratados com duas doses de ivermectina via SC de $300\mu\text{g}/\text{kg}$, com intervalo entre doses de 15 dias e apresentou total ausência de carrapatos após uma semana de tratamento. Este estudo tinha apenas um caráter educacional. Visando orientar proprietários de cães aos cuidados básicos veterinários. O controle de parasita foi realizado apenas visualmente durante a visita da equipe de veterinários a casa dos proprietários. Nenhum controle foi realizado no sentido de monitorar a eficácia do carrapaticida, nem mesmo o período em que a pesquisa foi realizada é documentado. Desta forma não é possível garantir que nenhum outro método inseticida foi utilizado e que a IVM foi a única responsável pela desinfestação dos animais (NOGARI et al., 2004).

O tratamento de cães com IVM via SC na dose de $20\text{mg}/\text{kg}$ demonstrou-se eficaz para o combate ao carrapato no estudo realizado por Dias (2005). Este estudo tinha por objetivo avaliar a possibilidade do *R. sanguineus* ser vetor do *Trypanosoma cruzi*. Desta forma foi investigado o controle do carrapato com altas doses de IVM e posterior análise do mesmo para verificar a presença ou ausência do *T. cruzi*. É importante ressaltar que a dose utilizada neste estudo é 100 vezes superior a preconizada para o uso da IVM e mesmo em altas doses não foi possível impedir nova reinfestação do carrapato nos animais tratados.

Os valores de eficácia encontrados no presente estudo são inferiores ao relatado e não sugere um efeito residual do produto, porém nenhum dos estudos acima determinou protocolos apropriados para a avaliação da eficácia e por este motivo valores discrepantes aos relatados anteriormente podem ter sido encontrados.

Segundo o guia da WAAVP (MARCHIONDO et al., 2007) o produto com eficácia pulicida e carrapaticida devem promover a redução de 90% da população, ou seja, possuir eficácia de 90%. Estes resultados não foram encontrados para a formulação oral de IVM em dose única de $0,6\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

5.0 CONCLUSÕES

Foi possível ajustar o método com extração líquido-líquido para análise de ivermectina em plasma canino por CL-FL com um limite de quantificação baixo o suficiente para possibilitar a construção de uma curva de concentração plasmática.

A curva da concentração plasmática de ivermectina oral na dose de $0,6\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ administrada a em dose única a cães Beagle demonstrou boa absorção, boa distribuição e alta taxa de eliminação, porém não foi eficaz para o tratamento de *C.f.felis* nem do *R. sanguineus*.

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de IVM em animais de companhia é extremamente difundido, devido sua segurança e eficácia. Porém a banalização do uso do medicamento, processo já muito comum entre humanos, também é observada na rotina veterinária. Hoje a IVM tem seu uso clínico em cães aconselhado para a prevenção da dirofilariose na dose de $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso vivo e para o tratamento da sarna dermodécica na dose diária de $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$. Porém informalmente vem sendo administrada para o combate a pulga e carrapato.

Com o estudo em paralelo da eficácia e do perfil plasmático foi possível observar que a formulação oral foi absorvida e distribuída pelo organismo. Este fato não foi suficiente para garantir a eficácia da droga no combate a *C. f. felis* e do *R. sanguineus*. Porém apresentou pequena eficácia ao combate do *R. sanguineus*, sugerindo que seu uso associado a outro ectoparasiticida pode ser interessante.

Resultados discrepantes de eficácia para o combate de *R.sanguineus* podem estar associados a presença de diferentes estéreos isômeros. Não há informação na literatura sobre a eficácia dos diferentes estéreos isômeros, nem mesmo de sua presença em cada formulação.

Outro dado importante se refere ao fato da ivermectina ter alta afinidade por proteínas plasmáticas. Os métodos de extração utilizados não diferem moléculas ligadas a proteínas ou isoladas. Esta informação pode modificar os níveis de concentração plasmática encontrados. Apesar dos ectoparasitas promoverem a hematofagia não é descrito se a molécula mesmo ligada a proteína possui atividade farmacológica.

É importante ressaltar que a prática de determinar o perfil plasmático de fármacos veterinários não é tão utilizada como em humanos, mas pode ser uma ferramenta muito útil para um uso consciente de medicamento.

Em geral estudos de biodisponibilidade são realizados com o indivíduo completamente saudável, neste caso foi opção realizar a eficácia é o perfil plasmático em paralelo para mimetizar a realidade do tratamento e conseguir correlacionar exatamente a dose plasmática obtida com a contagem de parasitos encontrados o que não foi possível devido a baixa eficácia encontrada.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVINERIE, M.; DUPUY, J.; EECKHOUTTE, C.; SUTRA, J. F. Enhanced absorption of pour-on ivermectin formulation in rats by co-administration of the multidrug-resistant-reversing agent verapamil. **Parasitology research**, *11*, 920-922, 1999.
- ANALFAPET. **Associação Nacional de Fabricantes de Produtos para Animais de Estimação – 2009** Disponível em: <https://www.s2publication.com.br/imprensa/ReleaseTextoS2Publicom.aspx?press_release_id=22913>. Acesso em 25 de 02 de 2011.
- ANOVÁ, C. M.; HUTTA, M. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography. **Journal of chromatography B**, *797*, 91-109, 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº13, de 29 de maio de 2003. Aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 02 de junho de 2003.
- AQUINO, G.; OLIVEIRA, B.; SILVA, A.; BRAGA, L.; ALVES, R. Processos biocatalíticos como fonte de fármacos. **Revista Processos Químicos**, *1*, 46-51, 2007.
- ARAÚJO, F. R., SILVA, M. P., LOPES, A. A., RIBEIRO, O. C., PIRES, P. P., CARVALHO, C. M., BALBUENA, C. B., VILLAS, A.A., RAMOS, J.K.M. Severe cat flea infestation of dairy calves in Brazil. **Veterinary Parasitology**, *80*, 83-86, 1998.
- ASBAKK, K.; BENDIKSEN, H. R.; OKSANEN, A. Ivermectin in reindeer feces: determination by HPLC. **Journal of agriculture food and chemistry**, *47*, 999-1003, 1999.
- BANKS, B. J., BISHOP, B. F., EVANS, N. A., GIBSON, S. P., GOUDIE, A. C., GRATION, K. A.; PACEY, M. S.; PERRY D. A.; WITTY M.J. Avermectins and fleas control: Structure-activity relationships and the selection of selamectin for development as an endectocide for companion animals. **Bioorganic & medicinal chemistry**, *8*, 2017-2025, 2000.
- BELLATO, V.; DAEMON, E. Influência da temperatura de manutenção da fase não parasitária sobre a fase parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (acarí: Ixodidae). **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, *6*, 15-19, 1997.
- BORGES, F. A.; SILVA, H. C.; BUZZULINI, C.; SOARES, V. E.; SANTOS, E., OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Endectocide activity of a new long-action formulation containing 2.25% ivermectin + 1.25% abamectin in cattle. **Veterinary parasitology**, *155*, 299-307, 2008.
- BORGES, J. H.; RAVELO-PÉREZ, L. M.; HERMÁNDEZ-SUÁREZ, E. M.; CARNERO, A.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Analysis of abamectin residues in avocados by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of chromatography A**, *1165*, 52-57, 2007.
- BOY, M. G.; SIX, R. H.; THOMAS, C. A.; NOVOTNY, M. J.; SMOTHERS, C. D.; ROWAN, T. G.; JERNIGAN, A.G.. Efficacy and safety of selamectin against fleas and heartworms in dog and cats presented as veterinary patients in North America. **Veterinary parasitology**, *91*, 233-250, 2000.

BREITSCHWERDT, E. B. Feline bartonellosis and cat scratch disease. **Veterinary Immunology**, 15, 107, 2004.

BRUM, J. G.; RIBEIRO, P. R.; COSTA, P. R.; OLIVEIRA, C. M. Artrópodos parasitos dos animais domésticos da zona sul do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 39, 533-537, 1987.

CAMPBELL, W. C.; BENZ, G. W. Ivermectin: a review of efficacy and safety. **Journal of veterinary pharmacology**, 7, 1-16, 1984.

CANGA, G. A.; PRIETO, A. M.; LIÉBANA, M. J.; MARTÍNÉZ, N. F.; VEGA, M. S.; VIEITEZ, J. J. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. **The veterinary journal**, 179, 25-37, 2009.

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

CHITTRAKARN, S.; JANCHAWEE, B.; RUANGRUT, P.; KANSENALAK, S.; CHETHANOND, U.; KOBASA, T.; THAMMAPALOS, S. Pharmacokinetics of ivermectin in cats receiving a single subcutaneous dose. **Research in veterinary science**, 86, 503-507, 2008.

CIONE, A. P.; SILVA, P. M. Validação de metodologia para análise de ivermectina e indicadores da estabilidade da molécula sob diferentes condições de degradação forçada. **Revista Analytica**, 32, 84-92, 2007.

COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R., DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, 128, 149-155, 2005.

DANAHER, M.; HOWELLS, L. C.; CROOKS, S. R.; CERKVENIK-FLAJS, V.; O'KEEFFE, M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of chromatography B**, 844, 175-203, 2006.

DAVEY, R. B.; POUND, J. M.; MILLER, J. A.; KLAVONS, J. A. Therapeutic and persistent efficacy of a long-acting (LA) formulation of ivermectin against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and sera concentration through time in treated cattle. **Veterinary parasitology**, 169, 149-156, 2010.

DELAYTE, E. H.; OTSUKA, M.; LARSSON, C. E.; CASTRO, R. C. Eficácia das lactonas macrocíclicas sistêmicas (ivermectina e moxidectina) na terapia da demodicose canina generalizada. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, 58, 31-38, 2006.

DENHOLM, I., DEVINE, G., FOSTER, S., GORMAN, K., NAUEN, R. Incidence and management of insecticide resistance to neocotinoids. In: **Pests and diseases**. Farnham, Surrey, UK: Proc Brighton Crop Prot Conf., 2002, pp. 161-168.

DIAS, J. C.; SCHOFIELD, C. J.; MACHADO, E. M.; FERNANDES, A. J. Ticks, ivermectin and experimental Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100, 829-832, 2005.

- DOURMISHEV, A. L.; DOURMISHEV, L. A.; SCHWATZ, R. A. Ivermectin: pharmacology and application in dermatology. **The international society of dermatology** , 44, 981-988, 2005.
- DRYDEN, M. V.; PRESTWOOD, A. K. Successful fleas control. **Compendium of continuing education for practicing veterinarian** , 93, 821-831, 1993.
- DRYDEN, M. W.; BROWN, H.; BUCK, S.; SCHWAHN, R.; SLOAN, T.; SUMMERS, S. Giving pets effective long-term protection against flea infestation. **Veterinary Medicine**, 16-18, 1998.
- ERASLAN, G.; KANBUR, M.; LIMAN, B. C.; ÇAM, Y.; KARABACAK, M.; ALTINORDULU, S. Comparative pharmacokinetics of some injectable preparations containing ivermectin in dog. **Food and chemical toxicology** , 48, 2181-2185, 2010.
- FERNANDES, F. F. Atividade in vitro de permetrina, cipermetrina e deltametrina sobre larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia** , 52, 621-626, 2000.
- FERNANDES, F. F.; FREITAS, E. P.; SILVA, J. R.; SILVA, O. R.; SILVA, I. G. Efeitos toxicológicos e ineficiência in vitro de deltametrina sobre larvas de *Rhipicephalus sanguineus*, de Goiânia, Goiás, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 34, 159-165, 2001.
- FINK, D. W.; PORRAS, A. G. Pharmacokinetics of ivermectin in animal and humans. In: **Ivermectin and abamectin**. 1989, pp. 113-130.
- FINK, D. W.; MONTIGNY, P.; SHIM, J. S. Evolution of a specific fluorogenic derivatization of ivermectin for bioanalytical applications. **The analyst**, 121, 1533-1537, 1996.
- FISCHER, J.; KELLY, M. T.; SMYTH, M. R.; JANDERA, P. Determination of ivermectin in bovine plasma by column-switching LC using on-line solid-phase extraction and enrichment. **Journal of pharmaceutical & biomedical Analysis**, 11, 217-223, 1993.
- FLECHTMANN, C. H. **Ácaros de importância médico veterinária**. 3 ed., Nobel S/A, 1985.
- FOIL L.; ANDRESS E.; FREELAND R. L.; ROY A.; RUTLEDGE R.; THICHE, P. C.; O'REILLY, K. L. Experimental infection of domestic cats with *Bartonella Henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. **Journal of medical entomology**, 35, 625-628, 1998.
- FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A hora veterinária**, 23, 53-56, 2004.
- GARRIS, G. I. Control of ticks. **Veterinary clinical north american small animal practice**, 1, 173-183, 1991.
- GEARY, T. G.; THOMPSON, D. P. Development of antiparasitic drugs in the 21st century. **Veterinary Parasitology**, 115, 167-184, 2003.
- GOKBULUT, C.; BOYACIOGLU, M.; KARADEMIR, U. Plasma pharmacokinetics and faecal excretion of ivermectin (Eqvalan paste) and doramectin (dectomax, 1%) following oral administration in donkeys. **Research in veterinary parasitology**, 79, 233-238, 2005.

- GOKBULUT, C.; CIRAK, V. Y.; SENLIK, B.; AKSIT, D.; DURMAZ, M.; MCKELLAR, Q. A. Comparative plasma disposition, bioavailability and efficacy of ivermectin following oral and pour-on administrations in horses. **Veterinary parasitology**, 170, 120-125, 2010.
- GOKBULUT, C.; KARADEMIR, U.; BOYACIAGLU, M.; MCKELLAR, Q. A. Comparative plasma dispositions of ivermectin and doramectin following subcutaneous and oral administration in dogs. **Veterinary parasitology**, 135, 346-354, 2006.
- GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 11 ed. McGraw-Hill Interamericana do Brasil, RJ, 2006.
- GRAF, J. F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitol today**, 9, 471-474, 1993.
- GRIER, J. S. **Pets in America: A history**. Harvest Book, Harcourt, New York, 2006.
- BRAISL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: 2003.
- JERNIGAN, A. D.; MCTIER, T. L.; CHIEFFO, C.; THOMAS, C. A.; KRAUTMANN, M. J.; HAIR, J. A.; YOUNG, D.R.; WANG C.; ROWAN T.G. Efficacy of selamectin against experimentally induced tick (*Rhipicephalus sanguineus* and *Demacantor variabilis*) infestations on dogs. **Veterinary pararitology**, 91, 359-375, 2000.
- JESCHKEI, P.; NAUEN, R. Neonicotinoid insecticides. **Comprehensive Molecular Insect Science**, 6, 53-105, 2005.
- JOHNES, C. J.; DI PIERRO, J. A. Biology and control of arthropod parasites of horses. **Compendium of continuing veterinary education**, 18, 551-558, 1996.
- KAGABU, S.; AKAGI, T. Quantum chemical consideration of photostability of imidacloprid and related compound. **Journal of pesticide science**, 22, 84-89, 1997.
- KAGABU, S.; MEDEJ, S. Stability comparison of imidacloprid and related compounds under simulated sunlight, hydrolysis conditions, and to oxygen. **Bioscience biotecnology and biochemistry**, 59, 980-985, 1995.
- KIRKWOOD, A. C. Dipping for the control of sheep scab. **State Veterinary Journal**, 34, 134-141, 1979.
- KITZMAN, D., WEI, S. Y., & FLECKENSTEIN, L. Liquid chromatographic assay of ivermectin in human plasma for application to clinical pharmacokinetic studies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 40, 1013-1020, 2006.
- KOJIMA, K.; YAMAMOTO, K.; NAKANISHI, Y. Determination of 22-23 dihydroivermectin B1a in dog plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 413, 326-331, 1987.
- LABRUNA, M. B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI:IXODIDAE). **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, 13, 123-124, 2004.
- LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Revista clínica veterinária** , 6, 24-32, 2001.

- LABUDA, M.; NUTTALL, P. A. Tick-borne viruses. **Parasitology**, 129 (suppl.), 221-245, 2004.
- LIFSCHITZ, A.; PIS, A.; ALVAREZ, L.; VIRKEL, G.; SANCHES, S.; SALLOVITZ, J.; KUJANEK, R.; LANUSSE, C. Bioequivalence of ivermectin formulations in pigs and cattle. **Journal of veterinary pharmacology and therapy**, 22, 27-34, 1999.
- LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.; IMPERIALE, F.; PIS, A.; LORDA, J. J.; LANUSSE, C. Pharmacokinetic evaluation of four ivermectin generic formulations in calves. **Veterinary parasitology**, 119, 247-257, 2004.
- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; PIS, A.; SANCHEZ, S.; ALVAREZ, L.; KUJANEK, R.; LANUSSE, C. Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. **Veterinary parasitology**, 86, 203-215, 1999.
- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; BALLENT, M.; SALLOVITZ, J.; IMPERIALE, F.; PIS, A.; LANUSSE, C. Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. **Veterinary Parasitology**, 147, 303-310, 2007.
- LINARDI, P. M. Biologia e epidemiologia das pulgas. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, 13, 103-106, 2004.
- LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. **Sifonápteros do Brasil**, 1ed., São Paulo: MZUSP/FAPESP, 2000.
- LIU, M. Y.; CASIDA, J. E. High-affinity binding of [3H] imidacloprid in the insect acetylcholine receptor. **Pesticide and biochemistry physiology**, 46, 40-46, 1993.
- LÖFFLER, D.; TERNES, T. A. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 22, 133-144, 2003.
- MARCHIONDO, A. A.; HOLDSWORTH, P.A.; GREEN P.; BLAGBURN, B. L.; JACOBS, D. E. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestation on dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, 145, 332-344, 2007.
- MARRA, A. O.; SILVA, C. R.; MOURA, E. S.; ALVES, C. Determinação da eficácia carrapaticida da cipermetrina + triclorfon no tratamento de bovinos naturalmente infestados pelo carrapato *Boophilus microplus*. **A hora veterinária**, 19, 32-34, 1999.
- MARTINS, F. **Blog Dog Dicas - 2012.**, Disponível em:< <http://dogdicas.com.br/176/carrapatos-vs-ivermectina>> , Acesso em: 29 jan. 2012.
- MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. **A hora veterinária**, 23, 15-23, 2004.
- MEHLHORN, H.; HANSEN, O.; MENCKE, N. Comparative study on the effects of three inseticides (fipronil, imidacloprid, selamectin) on development stage of the cat flea *Ctenocephalides felis*, BOUCHE: 1835, a light and electron microscopic analysis of in vivo and in vitro experiments. **Parasitology Research**, 87, 198-207, 2001.

MILLER, R. J.; BROCE, A. B.; DRYDEN, M. W.; THRONE, J. Emergence, survival, and fecundity of adult cat fleas (Siphonaptera:Pulicidae) exposed as pupae to juvenile hormone mimics. **Journal of medical entomology**, 36, 776-779, 1999.

MILLER, R. J.; GEORGE, J. E.; GUERRERO, F.; CARPENTER, L.; WELCH, J. B. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal army veterinary quarantine center Panama. **Journal of medical entomology**, 38, 298-301, 2001.

MONTIGNY, P.; SHIM, J. K.; PIVNICHNY, J. V. Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent. **Journal of pharmaceutical & biomedical analysis**, 8, 507-511, 1990.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, 117, 51-55, 2011.

MORSY, T. A.; HARIDY, F. M. Effect of ivermectin on the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, 30, 117-124, 2000.

MULLETT, W. M. Determination of drug in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. **Journal biochemical and biophysical methods**, 70, 263-273, 2007.

NATHANSON, J. A. Characterization of octopaminesensitive adenylate cyclase: Elucidation of a class of potent and selective octopamine-2 receptor agonists with toxic effects in insects. **Proceedings of national academy of science USA**, 82, 599-603, 1985.

NAUEN, R.; JESCHKE, P. In focus: Neonicotinoid insecticides. **Pest Management Science**, 64, 1081, 2008.

NDONG, T. B.; KANE, Y.; BA, M. A.; SANE, I.; SUTRA, J. F.; ALVINERIE, M. Pharmacokinetics of ivermectin in zebu Gobra (*Bos indicus*). **Veterinary parasitology**, 128, 169-173, 2005.

NOGARI, F.; SOTO, F. R.; SOUZA, O. Programa de tratamento e controle de doenças parasitárias em cães e gatos de proprietários de baixa renda no município de Ibiúna. **Ciência em extensão**, 1, 37-148, 2004.

ÕMURA, S. Ivermectin: 25 years and still going strong. **International journal of antimicrobial agents**, 31, 91-98, 2008.

PALMAS, C.; BORTLETTI, G.; CONCHEDDA, M.; CONTINI, C.; GABRIELE, F.; ECCA, A. R. Study on immunobiology in ectoparasites of public health interest: *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitologia**, 43, 29-35, 2001.

PAZ, G. F.; LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI:IXODIDAE) de cães artificialmente infestados. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, 17, 139-144, 2008.

PEREIRA, J. R. The efficiency of avermectins (abamectin, doramectin and ivermectin) in the control of *Boophilus microplus*, in artificially infested bovines kept in field conditions. **Veterinary parasitology**, 162, 116-119, 2009.

PEREIRA, M. C.; SANTOS, A. P. **Ctenocephalides felis felis: biologia, ecologia e controle integrado - parte I**. 16, 34-38, 1998

PHIPPS, A. N.; MARTIN-SHORT, M. R.; LITTLEWOOD, L.; BLANCHFLOWER, S. E.; GRATION, K. A. Disposition of H-selamectina and H-ivermectina in the brain of the cat flea *Ctenocephalides felis felis* using micro-image analysis. **Veterinary Parasitology**, 131, 89-94, 2005.

PHIPPS, A. N.; MARTIN-SHORT, M. R.; LITTLEWOOD, L.; BLANCHFLOWER, S. E.; GRATION, K. A. Disposition of H-selamectin and H-ivermectin in the brain of the cat flea *Ctenocephalides felis felis* using micro-image analysis. **Veterinary parasitology**, 131, 89-94, 2005.

PRIETO, J. G.; MERINO, G.; PULIDO, M. M.; ESTEVEZ, E.; MOLINA, A. J.; VILA, L.; ALVAREZ, A. I. Improved LC method to determine ivermectin in plasma. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 31, 639-645, 2003.

Reino Unido. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. CPMP/EWP/QWP/1401/98. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. Londres, 14 de dezembro de 2000.

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

RIBEIRO, V. L.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O.; VARGAS, C. R. Espécies e prevalências das infestações por carrapato em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, 27, 285-289, 1997.

ROMANO, A.; MARTINEZ, S. B.; ROMANO, P. L.; MORENO-REY, M. C.; SBORDI, L. C. Evaluation de la acción ixodicida de una formulación spot-on de flumetrina al 1% para el control del *Rhipicephalus sanguineus*. **Revista de medicina veterinária**, 79, 285-292, 1998.

ROY, S.; ROY, M. Therapeutic evaluation of ivermectin pour on against tick infestation in dogs. **Veterinary world**, 3, 113-114, 2010.

SANTOS, H. D. *Período de desenvolvimento dos estágios imaturos de Ctenocephalis felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera:Pulicidae) mantidos em condições controladas e no ambiente. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado, Medicina Veterinária, Parasitologia Veterinária), 2000.

SAUNDERS, D. S.; HARPER, C. Pesticides. In: **Principles and methods of toxicology** , 3 ed., A.W.Hayes, pp. 389-415, 1994.

SCOTT, F. B.; MARTINS, I. V.; SOUZA, C. P.; CORREIA, T. R. Aspectos gerais do controle da pulga *Ctenocephalides felis felis* em cães. **A hora veterinária** , 21, 13-18, 2002.

SEIXAS, J. N.; PEIXOTO, P. V.; ARMIÉN, A. G.; JABOUR, F. F.; BRITO, M. F. Aspectos clínicos e patogênicos da intoxicação por abamectina em bazerros. **Pesquisa veterinária brasileira**, 26, 161-166, 2006.

SHOOP, W.; SOLL, M. In: J. VERCRUYSSSE, & R. S. REW, **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**, USA, CAB International, pp. 1-13, 2002.

- SILVA, H. C.; VERONEZ, V. A.; CASTAGNOLLI, K. C.; PRETT, N.; BORGES, F. A.; MIYASAKA, D. S.; OLIVEIRA, G. P. Implantação de colônia de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché: 1835) e determinação do período de desenvolvimento dos estágios imaturos sob condições controladas. **Ambiência**, 4, 473-481, 2008.
- SILVERMAN, J.; RUST, M. K.; REIERSON, D. A. (1981). Influence of temperature and humidity on survival and development of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, 18, 78-83, 1981.
- SINDAN. **Mercado Veterinário 2004 por Espécie Animal e Classe Terapêuticas - 2009**, Disponível em: < <http://www.sindan.org.br/sindan> > Acesso em: fev 2012.
- SOUZA, S. V.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squared method. **Analytica chimica acta**, 552, 25-35, 2005.
- SOUZA, S. V.; LIMA, J. A.; TEODORO, J. C.; JUNQUEIRA, R. G. Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. **Ciências e tecnologia de alimentos**, 27, 823-836, 2007.
- STOEV, G.; MIHAILOVA, A. Increasing the reliability of the identification by high-performance liquid chromatography by means of selective and/or sensitive detection. **Journal of chromatography A**, 869, 275-284, 2000.
- STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**. 1 ed., RJ, BR, Guanabara Koogan, 2009.
- SZABÓ, M. P.; CUNHA, T. M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental and applied acarology**, 25, 909-916, 2001.
- TANNER, P. A.; MEO, N. J.; SPARER, D.; BUTLER, S.; ROMANO, M. N.; KEISTER, D. M. Advances in the treatment of heartworm, fleas and ticks. **Canine Practice**, 22, 40-47, 1997.
- TAYLOR, M. Recent developments in ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, 161, 253-268, 2001.
- TORRES, D. F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary parasitology**, 152, 173-185, 2008.
- TRHUSFIELD, M. V. **Epidemiologia veterinária**. 1 ed., Acribia, Zaragoza, 1999.
- WALSH, F. Human animal bonds I: The relational significance of companion animals. **Family Process**, 48, 462-480, 2009.
- WELLS, M.; PERRINE, R. Critters in the cube farm: Perceived psychological and organizational effects of pets in the workplace. **Journal of occupational health psychology**, 6, 81-87, 2001.
- ZAKSON-AIKEN, M.; GREGORY, L. M.; MEINKE, P. T.; SHOOP, W. L. Systemic activity of the avermectins against the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, 38, 576-580, 2001.

ZENNER, L.; DREVON-GAILLOT, E.; MARCY-L'ÉTOILE. Combate químico e controle dos carrapatos em cães e gatos. **A hora veterinária**, 23, 63-65, 2004.