

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Perfil farmacocinético e eficácia contra *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus* do fipronil administrado pela via oral na forma de comprimidos em cães

Gabriela Carmelinda Martins dos Santos

2021



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

PERFIL FARMACOCINÉTICO E EFICÁCIA CONTRA *Ctenocephalides felis felis* E *Rhipicephalus sanguineus* DO FIPRONIL ADMINISTRADO PELA VIA ORAL NA FORMA DE COMPRIMIDOS EM CÃES

GABRIELA CARMELINDA MARTINS DOS SANTOS

Sob Orientação da Professora
Yara Peluso Cid

e Co-orientação do Professor
Fabio Barbour Scott

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

Seropédica, RJ
Agosto de 2021

S237p

Santos , Gabriela Carmelinda Martins , 1986-
Perfil farmacocinético e eficácia contra
Ctenocephalides felis felis e Rhipicephalus
sanguineus do fipronil administrado pela via oral na
forma de comprimidos em cães / Gabriela Carmelinda
Martins Santos . - Seropédica, 2021.
75 f.

Orientadora: Yara Peluso Cid .
Coorientador: Fabio Barbour Scott.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2021.

1. Fenilpirazóis. 2. Farmacocinética. 3. Eficácia.
4. Oral . 5. Ectoparasitos. I. Cid , Yara Peluso ,
1982-, orient. II. Scott, Fabio Barbour , 1966-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Título.



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



ATA N° 3775/2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.061476/2021-82

Seropédica-RJ, 27 de agosto de 2021.

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

GABRIELA CARMELINDA MARTINS DOS SANTOS

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

TESE APROVADA EM 27/08/2021

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

(Assinado digitalmente em 27/08/2021 17:50)

THAIS RIBEIRO CORREIA AZEVEDO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)

Matrícula: 2929889

(Assinado digitalmente em 27/08/2021 17:56)

WELLINGTON DA SILVA CORTES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)

Matrícula: 386960

(Assinado digitalmente em 27/08/2021 17:51)

YARA PELUSO CID
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptºCF (12.28.01.00.00.47)
Matricula: 1700427

(Assinado digitalmente em 27/08/2021 18:55)

GUILHERME MARCONDES KLAFKE
ASSINANTE EXTERNO CPF: 280.235.508-29

(Assinado digitalmente em 30/08/2021 08:53)

MICHELLE ALVARES SARCINELLI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 126.363.177-08

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **3775**, ano: **2021**, tipo: **ATA**, data de emissão: **27/08/2021** e o código de verificação: **4b7283f89f**

A aqueles que acreditaram e acreditam que a educação e a ciência são instrumentos transformadores da sociedade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e proteção.

Aos animais que participaram desse estudo. Respeito e agradecimento.

À toda equipe do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), professores, pós-graduandos, residentes, alunos de iniciação científica, estagiários, técnicos administrativos e à toda equipe de bem-estar animal. Em especial, a Dr^a. Priscila Cardim, Dr^a. Viviane Magalhães, Melina Alves, Debora Azevedo, Dr. Diefrey Campos, Fernando Miranda, Isabelle Vilela, Juliana Freitas e Ivan Pedrosa, pelas instruções e ensinamentos. O trabalho em equipe foi fundamental.

À minha orientadora, professora Dr^a. Yara Peluso Cid, pela paciência na orientação, apoio e disponibilidade. Pela confiança e oportunidade na participação desse trabalho.

Ao professor Dr. Fábio Barbour Scott, pelo apoio, sugestões e orientações durante o estudo.

Ao professor Dr. Luiz Henrique Guerreiro Rosado que deu início a esse trabalho.

Aos amigos e colegas da pós-graduação por toda ajuda, pela convivência diária e amizade, em especial ao Augusto Pereira e Leandra Oliveira.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela oportunidade.

À minha família e amigos pela rede de apoio e todo incentivo.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram por esse trabalho. Obrigada!

À Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica da UFRRJ (FAPUR) pelo apoio financeiro.

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

BIOGRAFIA

Gabriela Carmelinda Martins dos Santos, nasceu no dia 20 de maio de 1986 na cidade de Ubá em Minas Gerais, filha de Marlei de Fátima Marques dos Santos e Francisco Martins dos Santos. cursou os ensinos primário, fundamental e o primeiro ano do ensino médio na Escola Estadual Professor Biolkino de Andrade em Divinésia, Minas Gerais. O segundo e terceiro anos foram cursados no Colégio Objetivo no município de Ubá-MG.

Em 2006 ingressou no curso de Tecnologia de Laticínios no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais (IF SUDESTE-MG) em Rio Pomba, Minas Gerais. Durante a graduação foi monitora da disciplina Processamento de Leite e Derivados pelo período de um ano, diplomando-se em fevereiro de 2009.

No ano de 2011 ingressou no curso de Farmácia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Durante a graduação foi bolsista do Programa de Iniciação Científica (PROIC) no período de 2012 a 2014 e bolsista no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) no período 2014-2015, ambos orientada pelo professor Dr. Bruno Guimarães Marinho. Em 2015, foi também bolsista PIBIC orientada pelo professor Dr. Luiz Henrique Guerreiro Rosado, diplomando-se em julho de 2016.

Também em 2016, foi aprovada no processo de seleção de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Química, da UFRRJ, orientada pela professora Dra. Yara Peluso Cid e coorientada pelo professor Dr. Luiz Henrique Guerreiro Rosado. Foi bolsista de Pós-graduação do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de agosto de 2016 a fevereiro de 2018, obtendo o grau de Mestre em Química em fevereiro de 2018.

Em 2018 foi aprovada na seleção de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UFRRJ, sob orientação da professora Dra. Yara Peluso Cid e coorientação do professor Dr. Fabio Barbour Scott, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Em agosto de 2018 iniciou a Especialização *lato sensu* em Tecnologias Industriais Farmacêuticas em Farmanguinhos na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sendo orientada pelo professor Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha, concluindo em maio de 2021.

RESUMO

DOS SANTOS, Gabriela Carmelinda Martins. **Perfil farmacocinético e eficácia contra *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus* do fipronil administrado pela via oral em cães.** 2020. 77p Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Biotecnologia e Inovação Tecnológica em Medicina Veterinária) Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O fipronil (FIP) é um ectoparasiticida da classe dos fenilpirazóis, usado na medicina veterinária sob a forma tópica. Apoiado pelas evidências da exposição humana não controlada ao FIP e aos danos ambientais causados a partir das formulações disponíveis no mercado, o seu uso como um fármaco para administração oral tem-se tornado promissor. Nesse estudo, a eficácia do FIP contra a pulga *Ctenocephalides felis felis* e o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e a sua farmacocinética e a do seu principal metabólito ativo, a fipronil-sulfona (SULF), foram avaliadas após a administração oral de comprimidos em três diferentes doses (2, 4 e 6 mg/kg) em cães da raça Beagle, em um único tratamento. Nas doses de 4 mg/kg ($AUC_{0-t} = 442,39 \pm 137,35 \mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$) e 6 mg/kg ($AUC_{0-t} = 421,32 \pm 102,84 \mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$), foi possível observar percentuais de eficácia médios de 100 e 99% para a pulga e de 95 e 98% para o carrapato, respectivamente, 48h após o tratamento. Nas três doses testadas nesse estudo, o FIP apresentou perfil de rápida absorção e metabolização e lenta eliminação. Os valores de C_{max} ($\beta = 0,7653$) e AUC_{0-t} ($\beta = 0,3209$) não aumentaram proporcionalmente com o aumento da dose. As CE_{90} estimadas para FIP + SULF foram de 1,30 $\mu\text{g/mL}$ para *C. felis felis* e 2,16 $\mu\text{g/mL}$ para *R. sanguineus*. A correlação dos dados farmacocinéticos e de eficácia do FIP deste estudo demonstrou o seu potencial para ser administrado via oral na forma de comprimidos para o controle de ectoparasitas em cães, encorajando o desenvolvimento de uma nova formulação, como uma alternativa mais segura para os animais, seres humanos e o meio ambiente, alinhado ao conceito de Saúde Única.

Palavras-chaves: Fenilpirazóis, Oral, Farmacocinética, Dose, Eficácia, Ectoparasitos.

ABSTRACT

DOS SANTOS, Gabriela Carmelinda Martins. **Pharmacokinetic profile and efficacy against *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus sanguineus* of fipronil administered orally in dogs.** 2020. 77p Thesis (Doctor in Veterinary Science, Biotechnology and Technological Innovation in Veterinary Medicine). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Fipronil (FIP) is an ectoparasiticide of the phenylpyrazole class, used in veterinary medicine in topical form. Supported by evidence of uncontrolled human exposure to FIP and environmental damage caused by commercially available formulations, its use as a medicine for oral administration has become promising. In this study, the effectiveness of FIP against the flea *Ctenocephalides felis felis* and the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its pharmacokinetics and its main active metabolite, fipronil sulfone (SULF), were evaluated after oral administration of tablets in three different doses (2, 4 and 6 mg/kg) in Beagle dogs, in a single treatment. At doses of 4 mg/kg ($AUC_{0-t} = 442.39 \pm 137.35 \mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$) and 6 mg/kg ($AUC_{0-t} = 421.32 \pm 102.84 \mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$), it was possible to observe mean efficacy percentages of 100 and 99% for the flea and 95 and 98% for the tick, respectively, 48h after treatment. In the three doses tested in this study, FIP showed a profile of rapid absorption and metabolism and slow elimination. The values of C_{max} ($\beta = 0.7653$) and AUC_{0-t} ($\beta = 0.3209$) did not increase proportionally with increasing dose. The estimated EC_{90} for FIP + SULF was 1.30 $\mu\text{g/mL}$ for *C. felis felis* and 2.16 $\mu\text{g/mL}$ for *R. sanguineus*. The correlation of the FIP pharmacokinetic and efficacy data demonstrated its potential to be administered orally in the form of tablets for the control of ectoparasites in dogs, as a safer alternative for animals, humans and environment, aligned with the One Health concept.

Key words: Phenylpyrazoles, Oral, Pharmacokinetics, Dose, Efficacy, Ectoparasites.

LISTA DE ABREVIACOES

- ABINPET** - Associação Brasileira de Produtos para Animais de Estimação
- ACN** - Acetonitrila
- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASC0-inf** - área sob a curva do tempo zero até extrapolada para o tempo infinito.
- ASC0-t** - área sob a curva do tempo zero até o tempo X.
- CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CE50** - Concentração Plasmática do fármaco a 50% do Emax
- CE90** - Concentração Plasmática do fármaco a 90% do Emax
- CEUA** - Comissão de tica no Uso de Animais
- Cl** - Clearance
- CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- Cmax** - Concentração plasmática máxima
- CNPq** - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- COMAC** - Comissão de Animais de Companhia
- dp** - desvio padrão
- DPA** - Departamento de Parasitologia Animal
- Emax** - Efeito máximo
- ESCCAP** - European Scientific Counsel Companion Animal Parasites
- F** - Biodisponibilidade
- FAPUR** - Fundação de Apoio  Pesquisa Científica e Tecnologia da UFRRJ
- FIOCRUZ** - Fundação Oswaldo Cruz
- FIP** - Fipronil
- GABA** - γ -aminobutricos
- IF-SUDESTE - MG** - Instituto de Ciências e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais
- IV** - Instituto de Veterinária
- LOG** - Logaritmo
- LQEPV** - Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária
- PD** - Pharmacodynamic
- PIBIC** - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
- PK** - Pharmacokinetic
- PPGCV** - Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias
- PROIC** - Programa de Iniciação Científica
- SINDAN** - Sindicato Nacional de Produtos de Saúde Animal
- SM** - Solução mãe
- SULF** - Fipronil-sulfona

T_{1/2} – Tempo de meia-vida

T_{max} - Tempo máximo - necessário para atingir a maior concentração plasmática.

TMR – Tempo médio de residência do fármaco no organismo.

UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

US EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

UV - Ultravioleta

V_z – Volume de distribuição

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Adaptado de ESCCAP, 2018).	3
Figura 2 - Ciclo de vida da pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i> (Adaptado de ESCCAP, 2018)..	4
Figura 3 - Estrutura química da molécula de fipronil (GUPTA; ANADÓN, 2018).....	6
Figura 4 - Principais metabólitos e produtos de degradação do fipronil (Fonte: BHARDWAJ <i>et al.</i> , 2012).....	8
Figura 5 - Comprimidos de fipronil desenvolvidos por dos Santos e colaboradores (2020) - Arquivo pessoal).....	16
Figura 6 - Momento do tratamento por via oral dos cães (Canil experimental LQEPV/UFRRJ - Arquivo pessoal).	17
Figura 7 – Esquema cronológico avaliação da eficácia in vivo do FIP administrado pela via oral.....	17
Figura 8 - Momento das coletas de sangue dos cães para estudo de farmacocinética (Canil experimental LQEPV/UFRRJ - Arquivo pessoal).....	20
Figura 9 – Curvas bioanalíticas dos padrões analíticos (A) fipronil e (B) fipronil-sulfona) e padrão interno (Etiprol) em plasma canino.	24
Figura 10 - Curvas de concentração plasmática média (n = 6) do fipronil em plasma canino a partir de administração oral nas doses 2, 4, e 6 mg/kg.....	25
Figura 11 - Curvas de concentração plasmática média (n = 6) da fipronil-sulfona em plasma canino a partir de administração oral de fipronil nas doses 2, 4, e 6 mg/kg.....	27
Figura 12 - Log do Cmax (A) e ASC0-t (B) do Fipronil versus log da dose após administração oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg em cães Beagles. Linhas tracejadas representam o intervalo de confiança de 95%. Linhas azuis representam o ajuste utilizando regressão linear. (x) representam os valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos em de cada animal.	30
Figura 13 - % Média de eficácia contra <i>Ctenocephalides felis felis</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> versus concentração plasmática-tempo (FIP, SULF e FIP + SULF) após administração oral de FIP a cães Beagles nas doses de (A) 2 mg/kg - Grupo 1, (B) 4 mg/kg - Grupo 2 e (C) 6 mg/kg - Grupo 3.....	32
Figura 14 – Percentual médio de eficácia contra <i>Ctenocephalides felis felis</i> (A) e <i>Rhipicephalus</i> <i>sanguineus</i> (B) versus a dose após administração oral de FIP a cães Beagle. A linha vermelha representa o ajuste ao modelo sigmóide e o símbolo são os valores experimentais 48 horas após o tratamento.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sexo, peso e dose administrada de fipronil aos animais em cada grupo.	22
Tabela 2 - Média geométrica da contagem de carrapatos (<i>Rhipicephalus sanguineus</i>) vivos e fixados nos cães do grupo controle e tratados e eficácia do fipronil administrado pela via oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg.	22
Tabela 3 - Média geométrica da contagem de pulgas (<i>Ctenocephalides felis felis</i>) vivas nos cães dos grupos controle e tratados e eficácia do fipronil administrado pela via oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg.	23
Tabela 4 - Média e desvio padrão (n = 6) das concentrações plasmáticas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de fipronil em cada tempo (horas) após a administração oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg de peso corporal.	25
Tabela 5 - Média e desvio padrão (n=6) das concentrações plasmáticas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de fipronil - sulfona em cada tempo (horas) após a administração oral de fipronil nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg de peso corporal.	26
Tabela 6 - Parâmetros farmacocinéticos do fipronil e da fipronil-sulfona após a administração oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg de peso corporal.	28
Tabela 7 - Avaliação da proporcionalidade de dose do fipronil (2, 4 e 6 mg/kg) ajustados para o modelo de potência com limite de confiança de 95% (n = 6).	30
Tabela 8 - Parâmetros farmacodinâmicos do fipronil utilizando modelo de Emax após administração oral nas doses 2, 4 e 6 mg/kg (n = 18).	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Ectoparasitos de Cães e sua Importância	2
2.1.1 O Carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	2
2.1.2 A Pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i>	4
2.2 Controle de Ectoparasitos em Animais de Companhia	5
2.3 Fipronil	6
2.3.1 Biotransformação do fipronil	8
2.3.2 Toxicidade	9
2.3.2.1 Exposição não-ocupacional ao fipronil	9
2.3.2.2 Contaminação ambiental por fipronil	10
2.3.3 Farmacocinética	11
2.4 Estudos de Farmacocinética e Farmacodinâmica	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Material	14
3.1.1 Reagentes	14
3.1.2 Equipamentos e acessórios	14
3.2 Localização do Estudo	14
3.3 Aprovação pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais	15
3.4 Seleção dos Animais e Identificação	15
3.5 Origem e Manutenção das Pulgas e Carrapatos	15
3.6 Randomização	16
3.7 Tratamento	16
3.8 Avaliação da Eficácia <i>in vivo</i> dos Comprimidos de Fipronil no Controle de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	17
3.9 Estudo de Farmacocinética	18
3.9.1 Preparo das curvas bioanalíticas de fipronil e fipronil-sulfona	18
3.9.2 Preparo de amostras e análises cromatográficas	19
3.9.3 Construção da curva de concentração plasmática e determinação dos parâmetros farmacocinéticos	19
3.9.4 Análise de proporcionalidade de dose	20
3.10 Análise da Relação Farmacocinética-Eficácia	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Ranqueamento	22
4.2 Eficácia do Fipronil no Controle de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em cães após administração pela via oral	22
4.3 Curvas Bioanalíticas de Fipronil e Fipronil-sulfona	24
4.4 Curvas de Concentração Plasmática <i>versus</i> Tempo	24
4.5 Análise de Proporcionalidade de Dose	29
4.6 Análise da Relação Farmacocinética-Eficácia	31
5 CONCLUSÃO	36

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
7 ANEXOS	47
Anexo A – Certificado de aprovação na CEUA-IV/UFRRJ do estudo intitulado “Estudo da relação dose efeito de comprimidos de fipronil no controle de ectoparasitos em cães.”	47
Anexo B - Valores das contagens individuais de carrapatos da espécie <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e de pulgas da subespécie <i>Ctenocephalides felis felis</i> para o ranqueamento dos cães e divisão dos grupos.....	49
Anexo C – Valores das contagens individuais de carrapatos da espécie <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , adultos, vivos e fixados recuperados sobre os cães da raça Beagle do grupo e controle e tratado com fipronil em comprimidos nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg.....	40
Anexo D - Valores das contagens individuais de pulgas vivas da subespécie <i>Ctenocephalides felis felis</i> recuperadas de cães da raça Beagle do grupo e controle e tratado com fipronil comprimidos nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg	50

1 INTRODUÇÃO

Os ectoparasitos de maior importância que acometem os cães são a pulga da subespécie *Ctenocephalides felis felis* e o carrapato do complexo de espécies *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Estes são vetores de uma série de patógenos que acometem os animais. Além da importância veterinária, esses patógenos também podem afetar a população humana devido ao seu potencial zoonótico. Sendo assim, a prevenção e o tratamento de infestações por esses ectoparasitos é uma das grandes preocupações dos veterinários e dos tutores e requer o uso regular ou ocasional de medicamentos com capacidade de repeli-los e/ou eliminá-los sem causar danos ao animal.

Nos anos 90, as formulações tópicas (“spot-on”) representaram um grande avanço para controle de pulgas e carrapatos. No entanto, mais recentemente, o desenvolvimento de formulações orais vem se tornando uma grande tendência devido à conveniência e à conformidade na administração e consequentemente aumento na adesão ao tratamento.

O fipronil (FIP) é um praguicida fenilpirazol de amplo espectro amplamente utilizado na medicina veterinária para controle de pulgas e carrapatos em animais domésticos através de formulações de aplicação tópica (“spray” e “spot-on”). A via predominante de metabolização do FIP em mamíferos é a oxidação, que resulta em seu principal metabólito ativo, a fipronil-sulfona (SULF).

Embora as formulações de uso tópico disponíveis no mercado sejam eficazes por pelo menos 30 dias, existe uma preocupação crescente com os possíveis danos que o FIP pode trazer aos seres humanos devido à exposição não ocupacional a partir dessas formulações. A exposição ocorre durante a aplicação das formulações, através do contato do animal com seus tutores e na permanência do fármaco no ambiente domiciliar após o tratamento. Outros fatores importantes em relação a essas formulações são os prejuízos causados ao ecossistema, uma vez que o FIP e seus metabólitos são removidos durante a rotina de banho dos cães e introduzidos nos sistemas de águas superficiais e residuais.

Apoiado pelas evidências da exposição humana e aos danos ambientais, o uso do FIP como um fármaco para administração oral tem-se tornado promissor no controle de diferentes ectoparasitos em diferentes animais, como por exemplo no controle de pulgas em cães e em algumas espécies de roedores, além de moscas e mosquitos em bovinos e carrapatos em ratos.

A biodisponibilidade sistêmica do FIP em cães já foi relatada, por meio da administração oral de comprimidos, onde o FIP demonstrou perfil farmacocinético de rápida absorção e biotransformação e lenta eliminação. No entanto, dados em relação a sua eficácia pela via oral ainda não foram amplamente explorados. Com base nesses relatos, o objetivo deste estudo foi investigar a influência da dose de FIP administrado por via oral na extensão da absorção e a sua eficácia no controle de *C. felis felis* e *R. sanguineus* em cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ectoparasitos de Cães e sua Importância

Os ectoparasitos podem parasitar uma gama de organismos oferecendo danos ao hospedeiro em diferentes graus, em muitos casos podem causar doenças graves, seja diretamente pelos danos físicos (lesões cutâneas) ou indiretamente, através da transmissão de patógenos, gerando infecções secundárias bacterianas ou fúngicas (MCNAIR, 2015; ESCCAP, 2018).

Os ectoparasitos também podem levar à manifestação de vários tipos de dermatite e induzir respostas imunopatológicas. Podem também causar anemia no caso de artrópodes sugadores de sangue e ainda interferirem no vínculo humano-animal (ESCCAP, 2018).

Os agentes etiológicos transmitidos por esses ectoparasitos compreendem um grupo de patógenos globalmente distribuídos que causam várias doenças zoonóticas, ocasionadas pela picada de artrópodes hematófagos, principalmente carrapatos, pulgas e mosquitos (SKOTARCZAK, 2018; ESCCAP, 2018).

Nas últimas décadas, as doenças transmitidas por vetores têm se destacado na medicina humana e veterinária e, com isso, ressaltando a importância no controle dos ectoparasitas (BEUGNET; MARIÉ, 2009; SKOTARCZAK, 2018).

Os carrapatos e as pulgas são os ectoparasitos mais prevalentes em todo mundo (CVEJÍC *et al.*, 2017). No Brasil, destacam-se os carrapatos do complexo de espécies *R. sanguineus* e a subespécie da pulga *C. felis felis* (ZARDO *et al.*, 2019).

Os cães e os gatos são espécies de animais que geralmente são acometidos por esses ectoparasitos (MCNAIR, 2015). Considerando que os animais de estimação são um fator constante na sociedade e que as suas funções e convívio com seres humanos estão se modificando com o passar dos anos, existe uma preocupação dos proprietários com a saúde desses animais, o que inclui a prevenção e o tratamento de infestações por parasitas como pulgas e carrapatos bem como a redução do potencial de intoxicações acidentais por praguicidas de uso doméstico (TATIBANA; COSTA-VAL, 2009; BAUER *et al.*, 2015).

2.1.1. O carrapato *Rhipicephalus sanguineus*

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos de grande importância médica e veterinária, causando perdas incalculáveis para a indústria pecuária e danos para animais de companhia e populações humanas em todo o mundo (DANTAS-TORRES, 2018).

Os carrapatos do grupo *R. sanguineus* abrangem pelo menos 12 espécies (*R. camicasi*, *R. guilhoni*, *R. leporis*, *R. moucheti*, *R. pumilio*, *R. pusillus*, *R. rossicus*, *R. schulzei*, *R. sulcatus*, *R. turanicus*, *R. sanguineus* s. s e *R. afranicus*, amplamente distribuídos em todo mundo (NAVA *et al.*, 2018; SÁNCHEZ-MONTES *et al.*, 2021).

Este carrapato pertence à Família Ixodidae, tem a distribuição geográfica mais ampla entre todas as espécies de carrapatos, sendo mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais. Sua larga distribuição pode ser explicada pelo seu hospedeiro preferencial, os cães, e também por possuir hábitos nidícolas (GRAY *et al.*, 2013; POLITI *et al.*, 2013).

O carrapato *R. sanguineus* stricto sensu é também conhecido como carrapato marrom do cão e foi descrito pela primeira vez por Latreille (1806) (SÁNCHEZ-MONTES *et al.*, 2021).

Estudos envolvendo carrapatos que infestam cães têm demonstrado diferenças morfológicas entre as populações desse carrapato (SÁNCHEZ-MONTES *et al.*, 2021). Por meio de biologia molecular foi possível identificar a existência de múltiplas linhagens, entre as

quais se destacam as linhagens de regiões tropicais (*R. sanguineus* sensu lato) e temperadas (*R. sanguineus* sensu stricto) ((NAVA *et al.*, 2018; SÁNCHEZ-MONTES *et al.*, 2021).

O carrapato marrom do cão é encontrado predominantemente em áreas urbanas e suburbanas (ABREU *et al.*, 2020; MENDES *et al.* 2019).

Em seu ciclo estão presentes estágios larvais, ninfas e adultos, todos geralmente alimentando-se do cão. Entretanto, larvas e ninfas podem ser encontradas em animais de pequeno porte, como roedores (DANTAS-TORRES, 2008; GRAY *et al.*, 2013). O ciclo de vida do carrapato *R. sanguineus* está representado na Figura 1.

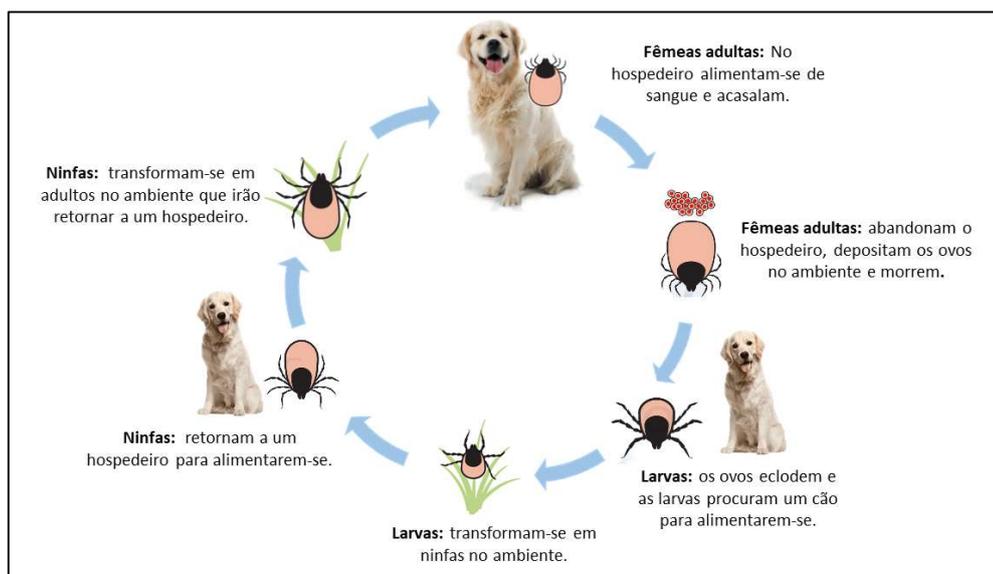


Figura 1 - Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Adaptado de ESCCAP, 2018).

O ciclo do carrapato dura em média 21 dias. No hospedeiro as fêmeas adultas aumentam seu peso em até 120 vezes, à medida que se alimentam de sangue antes da postura dos ovos (5-14 dias) e, quando totalmente ingurgitadas, uma fêmea pode medir cerca de um centímetro de comprimento. Após a postura dos ovos no ambiente as fêmeas morrem. Ainda no ambiente, os ovos eclodem e as larvas vão em busca de um hospedeiro para se alimentarem (2-3 dias). Para transformarem-se em ninfas as larvas retornam ao ambiente. As ninfas também vão em busca de um hospedeiro para se alimentarem (4-6 dias) e também retornam ao ambiente para se tornarem adultas (Figura 1) (ESCCAP, 2018).

O carrapato *R. sanguineus* também pode parasitar outros animais domésticos e humanos, sendo vetor de vários patógenos, apresentando graves riscos ao bem-estar animal e à saúde pública (ABREU *et al.*, 2020).

Dentre as doenças caninas mais importantes transmitidas por esse carrapato estão a babesiose, causada por *Babesia vogeli*, e a erliquiose, causada por *Ehrlichia canis*. Os patógenos humanos mais importantes são *Rickettsia conorii*, a causa da febre maculosa do Mediterrâneo, e *Rickettsia rickettsii*, que causa a febre maculosa das Montanhas Rochosas (ABREU *et al.*, 2020; GRAY *et al.*, 2013).

Tanto a babesiose como a erliquiose podem apresentar quadros subclínicos ou seguirem um para um curso agudo ou crônico. Essas doenças podem provocar sintomas graves podendo levar o animal a óbito (ESCCAP, 2019).

Além dessas doenças, essa espécie pode levar a outras manifestações clínicas como abscessos na pele, anemia e a paralisia do carrapato. (OTRANTO *et al.*, 2012; GRAY *et al.*, 2013).

A paralisia do carrapato em cães é causada por uma neurotoxina presente na saliva secretada de carrapatos fêmeas ingurgitados (OTRANTO *et al.*, 2012). Essas neurotoxinas afetam os sistemas nervosos periférico e central inibindo a ação da acetilcolina e levando a bloqueio neuromuscular (REMONDEGUI, 2012).

2.1.2 A pulga *Ctenocephalides felis felis*

As pulgas são um dos grupos de insetos mais comuns que podem servir como vetor e hospedeiro intermediário de agentes patogênicos entre hospedeiros vertebrados, incluindo os humanos (RUST, 2017). São pequenos ectoparasitas hematófagos que podem transmitir esses patógenos através de vários mecanismos, incluindo: fezes contaminadas, regurgitação do conteúdo intestinal e da saliva (MALEKI-RAVASAN *et al.*, 2017).

O gênero *Ctenocephalides* (Família Pulicidae), inclui 13 espécies e subespécies, mas apenas duas, respectivamente a *Ctenocephalides canis* (Curtis, 1826) e *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835), são espécies cosmopolitas. A subespécie *C. felis felis* é mais adaptável do que *C. canis*, pois infesta mais espécies hospedeiras e, portanto, se estabeleceu em áreas mais extensas. A distribuição dessas espécies está relacionada a fatores ambientais que influenciam na sua sobrevivência, desenvolvimento e reprodução (LINARDI *et al.*, 2012).

A subespécie *C. felis felis* é a principal pulga que parasita cães e gatos sendo a mais importante na transmissão de patógenos (LINARDI *et al.*, 2012). Seu ciclo inclui os estágios ovo, larva (três instares larvais), pupa e a fase adulta (DE ALMEIDA *et al.*, 2019). O ciclo de vida da pulga *C. felis felis* está representado na Figura 2.

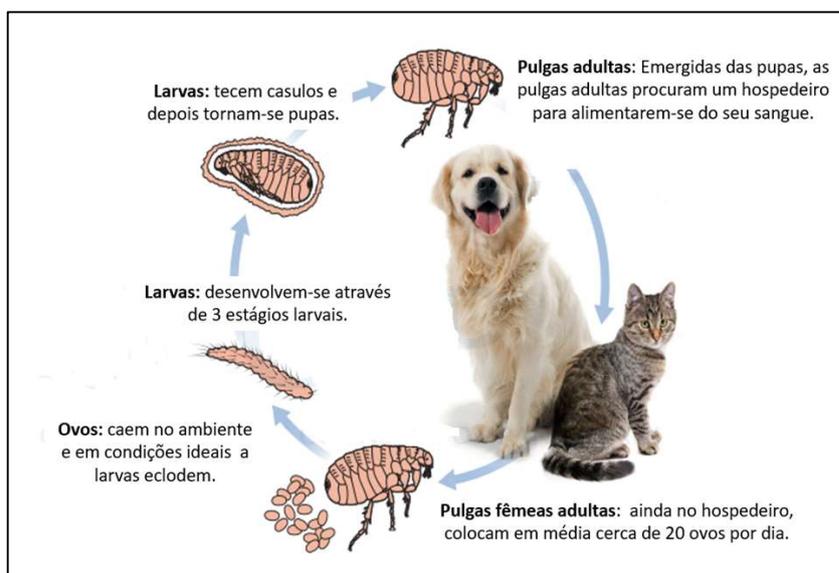


Figura 2 - Ciclo de vida da pulga *Ctenocephalides felis felis* (Adaptado de ESCCAP, 2018).

O ciclo de vida da pulga *C. felis felis* é concluído em aproximadamente 21 dias. As pulgas possuem peças bucais adaptadas para perfurarem a pele e se alimentarem de sangue. Uma vez emergidas da pupa, as pulgas adultas começam a procurar ativamente um hospedeiro, onde ocorrem a reprodução e a deposição de ovos (dentro de 48 horas após a infestação). Após

a deposição, os ovos caem no ambiente e, em condições ideais, as larvas eclodem e alimentam-se de detritos como caspas e fezes de pulgas e desenvolvem em três estágios larvais. Totalmente desenvolvidas, as larvas tecem um casulo e formam uma pupa. Após o desenvolvimento, o adulto emerge do pupário imediatamente e inicia-se um novo ciclo (ESCCAP, 2018).

Mais de 20 tipos diferentes de patógenos estão associados a espécies de *Ctenocephalides* como vetores biológicos ou hospedeiros intermediários, incluindo bactérias, protozoários e helmintos (LINARDI *et al.*, 2012).

Dentre os patógenos que podem ser transmitidos pela *C. felis felis* podemos destacar *Yersinia pestis*, *Rickettsia typhi*, responsável pelo tifo, *Rickettsia felis*, responsável pela febre maculosa transmitida por pulga, *Bartonella henselae*, responsável pela doença da arranhadura de gato. Dentre os helmintos podemos destacar o *Dipylidium caninum* e o *Achantocheiilonema reconditum* (BITMAM *et al.*, 2010; PAROLA, 2011; BOUHSIRA *et al.*, 2011; NAPOLI, *et al.*, 2014). Além da transmissão de patógenos, em casos de alta carga parasitaria, *C. felis felis* pode ocasionar no seu hospedeiro reações de hipersensibilidade tipo I e IV por meio de sua picada e anemia grave devido à hematofagia (DE ALMEIDA *et al.*, 2019).

Além de prevenir doenças, o controle das pulgas visa preservar o conforto e o bem-estar geral do hospedeiro devido ao forte estresse causado por suas picadas. Portanto, os animais infestados devem, sempre que possível, ser tratados antes que as pulgas comecem a se reproduzir (TAVARES *et al.*, 2020).

2.2 O Controle de Ectoparasitos em Animais de Companhia

Estima-se que o Brasil apresente 144,30 milhões de animais de estimação, sendo a maior população composta pelos cães (55,90 milhões) seguida dos gatos (25,60 milhões) (ABINPET, 2019). De acordo com o a Comissão de Animais de Companhia (COMAC), na Pesquisa Radar Pet de 2020, mais de 37,60 milhões de domicílios brasileiros possuem cães ou gatos e, independente da renda familiar e classificação econômica, cada domicílio possui aproximadamente em média dois cães ou gatos. A pesquisa ainda demonstra que a adoção de pets tem se tornado uma tendência e que 95% dos tutores consideram que a saúde do cão é tão importante quanto a saúde de um membro da família (COMAC, 2020).

O tratamento e a prevenção de infestações de ectoparasitas em cães geralmente requerem o uso de medicamentos com a capacidade de repelir e/ou eliminar os parasitas específicos sem causar preocupação com a segurança do animal (CVEJIĆ *et al.*, 2017). As mudanças da relação entre o proprietário e seus pets provocam impactos mercadológicos que geram demanda para novos produtos, tecnologias e serviços (COMAC, 2020). Ainda de acordo com a Pesquisa Radar Pet de 2020 da COMAC, 78% dos tutores acreditam que um medicamento para tratamento em dose única facilitaria o tratamento ainda que o custo fosse maior (COMAC, 2020).

Existe uma série de princípios ativos com ação ectoparasiticida que apresentam níveis de eficácia e segurança satisfatórios em diversas apresentações (ZARDO *et al.*, 2019). Esses compostos agem de forma sistêmica, após a absorção nos tecidos dos hospedeiros, ou por contato direto com os parasitas-alvo após aplicação externa (TAYLOR, 2001). Os principais grupos químicos usados no controle de ectoparasitos são: formamidinas, piretrinas e piretróides, fenilpirazóis, lactonas macrocíclicas, oxadiazinas, spinosinas, reguladores de crescimento de insetos, neonicotinóides, e isoxazolininas (TAYLOR, 2001; ARMSTRONG *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017; ZARDO *et al.* 2019).

Os ectoparasiticidas estão disponíveis no mercado em formulações como xampu, sabonete, talco, “spray”, coleira, pipeta (“spot-on”) e comprimidos (MARCHIONDO *et al.*, 2013).

Nos anos 90 as formulações tópicas (“spot-on”) representaram um grande avanço para controle de pulgas e carrapatos (MEADOWS *et al.*, 2014). No entanto, esses avanços apresentaram algumas limitações, incluindo a necessidade de uma aplicação cuidadosa, pelos proprietários, redução da eficácia como resultado da dissolução pelo enxágue do banho ou contato com a água e a apreensão dos proprietários com relação à exposição ao produto no ambiente doméstico (MEADOWS *et al.*, 2014). Alguns estudos também demonstram outro fator preocupante dessas formulações como a contaminação ambiental de águas superficiais e residuais (MCMAHEN *et al.*, 2016; SADARIA *et al.*, 2017; TEERLINK *et al.*, 2017).

Os comprimidos são os mais novos produtos no mercado, e vêm se tornando uma grande tendência, pois em sua maioria são palatáveis e/ou mastigáveis, facilitam a administração e adesão ao tratamento, principalmente em cães (BEUGNET *et al.*, 2015; HALOS *et al.*, 2015; ZARDO *et al.*, 2019).

Entre os comprimidos disponíveis no mercado para o controle de pulgas em cães e gatos podemos destacar para o nitempiram e spinosad (ZARDO *et al.*, 2019). Nos últimos anos, uma nova família de compostos, as isoxazolininas foram introduzidas no mercado (PFISTER; ARMSTRONG, 2016). Essa nova classe oferece eficácia prolongada e altamente específica contra múltiplos gêneros e espécies de artrópodes parasitos e propicia controle altamente bem sucedido em comparação com os compostos anteriores (PFISTER; ARMSTRONG, 2016; CAVALLERI *et al.*, 2017).

As estratégias escolhidas pelo médico veterinário e pelo tutor para o controle dos ectoparasitos vão depender de alguns fatores como: adesão ao protocolo de tratamento recomendado, o rápido início de atividade do princípio ativo após a administração, manutenção da eficácia, necessidade de retratamento e facilidade na administração (COLES; DRYDEN, 2014; PFISTER; ARMSTRONG, 2016).

2.3 Fipronil

O FIP foi descoberto, em 1987, pela Rhone-Poulenc Agro, representando a segunda geração de inseticidas que atuam por um mecanismo diferente em comparação com outros inseticidas convencionais (GUPTA; ANADÓN, 2018). É um inseticida da classe dos fenilpirazóis denominado quimicamente como (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluormetil) fenil]-4-[(trifluormetil) sulfinil]-1H pirazol-3-carbonitrila, é usado mundialmente no controle de pragas agrícolas e domésticas, incluindo espécies de gafanhotos, formigas, baratas, pulgas e carrapatos (ROMERO *et al.*, 2016). A estrutura química do FIP está demonstrada na Figura 3.

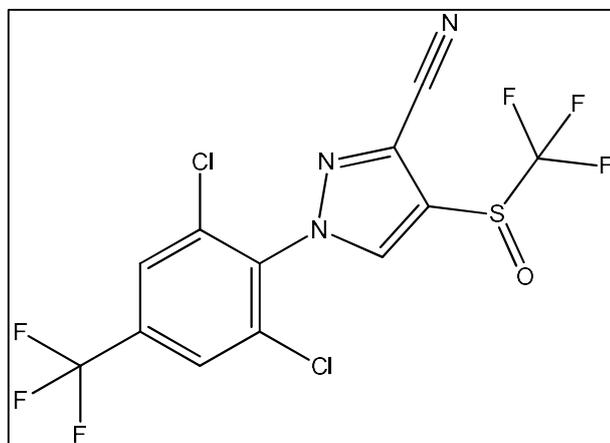


Figura 3 - Estrutura química da molécula de fipronil (GUPTA; ANADÓN, 2018).

Em relação às propriedades físico-químicas, o FIP é um pó branco de solubilidade aquosa de baixa a moderada, coeficiente de partição (logP) de 3,60, tem preferência por matrizes lipofílicas, como lipídeos, óleos, proteínas e solventes orgânicos. Devido a sua lipossolubilidade possui fácil deposição no tecido adiposo. É estável a temperatura ambiente, porém suscetível à fotólise (GUNASEKARA *et al.*, 2007; USEPA, 2011; MAGALHÃES *et al.*, 2018).

Para o controle de insetos residenciais como baratas, formigas e cupins, o FIP é formulado como iscas. O FIP é também amplamente utilizado na agricultura para tratamento de solo e revestimento de sementes, para proteger a colheita contra insetos (GUPTA; ANADÓN, 2018).

Na medicina veterinária, o FIP está presente em produtos ectoparasiticidas disponíveis comercialmente nas formas de preparação tópicas em “spray” e “spot-on” para cães e gatos, e em “pour-on” e “spray” para animais de produção. Pode ser encontrado também em associação com metoprene e também em associações com amitraz, permetrina e piriproxifen, também sob a forma de “spot-on” (TAYLOR, 2001; BOUSHIRA *et al.*, 2011; HALOS *et al.*, 2016; ARISOV *et al.*, 2019; GUPTA; ANADÓN, 2018; DOS SANTOS *et al.*, 2020).

O mecanismo de ação do FIP envolve o bloqueio dos canais de cloreto dos receptores regulados por GABA_A (ácido γ -aminobutírico) (subunidade β 3), interferindo na neuromodulação, levando à paralisia e morte do inseto por hiperexcitação neural (ISLAM; LINCH, 2012; SOUZA *et al.*, 2014).

O FIP atua em insetos e mamíferos pelo mesmo mecanismo, entretanto, tem uma maior especificidade pelo receptor GABA_A (subunidade β 3) dos insetos quando comparado a esses receptores nos mamíferos (GUPTA; ANADÓN, 2018). Bloqueando assim, os canais de cloreto dos receptores GABA_A dos insetos em concentrações muito mais baixas do que nos receptores GABA_A de vertebrados (ISLAM *et al.*, 2012).

Devido à essa especificidade, a toxicidade do FIP é muito mais severa nos insetos quando comparada aos mamíferos (GUPTA; ANADÓN, 2018). Esse mecanismo de toxicidade seletiva é devido das ações diferenciais nos receptores GABA_A dos insetos, tanto moleculares quanto nos perfis farmacológicos (NARAHASHI *et al.*, 2007). Outro fator que também explica o alto grau de toxicidade seletiva do FIP, é a presença de canais de cloro controlados por glutamato nos insetos, os quais não estão presentes nos mamíferos. A ativação do glutamato nesses canais leva a ação uma inibitória, tornando-os um alvo específico ao FIP (NARAHASHI *et al.*, 2007).

Embora a maioria das formulações tópicas contendo FIP usadas na medicina veterinária para o controle de pulas e carrapatos em cães e gatos sejam eficazes por pelo menos 30 dias (BONNEAU *et al.*, 2010; KHALID *et al.*, 2017; KUZNER *et al.*, 2013; POSTAL *et al.*, 1995), estudos envolvendo a administração do FIP pela via oral para controle de diferentes ectoparasitas em diferentes animais têm se demonstrado promissores. (WANG *et al.*, 2019).

O FIP já foi avaliado pela via oral para controle de moscas em roedores (INGENLOFF *et al.*, 2013), moscas em bovinos (POCHÉ *et al.*, 2013), mosquitos em bovinos (POCHÉ *et al.*, 2017), pulgas em roedores (POCHÉ *et al.*, 2018; EADS *et al.*, 2019) e em larvas de carrapato em ratos (POCHÉ *et al.*, 2020).

Melo e colaboradores (2012), avaliaram a eficácia do FIP pela via oral contra a pulga da subespécie *C. felis felis* e o carrapato da espécie *R. sanguineus*, em cães infestados artificialmente. O FIP foi administrado em cápsulas gelatinosas nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg, onde foi possível observar na dose de 6 mg/kg percentual de eficácia contra pulga superior a 80% e 40% contra o carrapato, e esses resultados encorajaram a realização deste estudo.

2.3.1 Biotransformação do fipronil

Nos mamíferos, o FIP é metabolizado por meio de três vias principais: em FIP sulfona (SULF) por oxidação na porção sulfinil, em sulfeto de FIP por redução na porção sulfinil e em FIP amida por hidrólise da porção ciano (WANG *et al.*, 2016). O FIP também pode sofrer fotólise sendo degradado em FIP desulfínil (BHARDWAJ *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2016).

No ambiente, o FIP não é estável e forma vários produtos de degradação, sendo os principais o FIP desulfínil e a SULF (MICHEL *et al.*, 2016). Os principais metabólitos e produtos de degradação do FIP estão demonstrados na Figura 4.

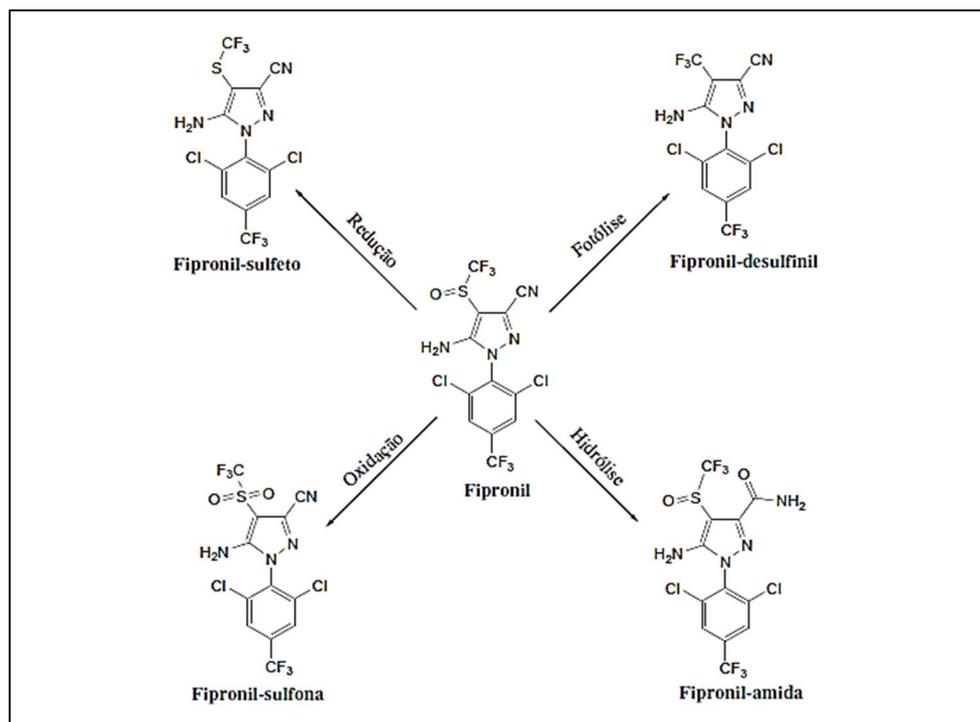


Figura 4 - Principais metabólitos e produtos de degradação do fipronil (Fonte: BHARDWAJ *et al.*, 2012).

A via predominante de metabolização do FIP em mamíferos é a oxidação e resulta em seu principal metabólito ativo, a SULF (DAS *et al.*, 2006; CRAVEDI *et al.*, 2013).

Várias enzimas P450 estão envolvidas na biotransformação do FIP (WANG *et al.*, 2016). No entanto, a isoforma CYP3A4 é predominantemente responsável pela S-oxidação (TANG *et al.*, 2004).

O FIP é metabolizado em SULF em várias espécies de mamíferos, como ratos, humanos, bovinos e cães. A SULF também atua no receptor GABA e se acredita que ela seja mais tóxica do que o FIP, e também que ela persista no sangue por mais tempo que o FIP, o que se faz necessário caracterizar as vias metabólicas do FIP em diferentes espécies (WANG *et al.*, 2016.; WANG *et al.*, 2019).

O desulfínil fotodegradado é extremamente estável e, cerca de 10 vezes mais tóxico para mamíferos do que o FIP e a SULF e o sulfeto de FIP são mais tóxicos para os invertebrados de água doce do que o próprio FIP (BHARDWAJ *et al.*, 2012).

2.3.2 Toxicidade

O FIP pode impactar organismos alvo, como insetos, e outros não-alvo, como organismos aquáticos, pássaros e mamíferos (MAGALHÃES *et al.*, 2018). Existe uma preocupação crescente sobre os possíveis danos fora do alvo aos ecossistemas e à saúde humana associados ao uso indiscriminado de FIP (WANG *et al.*, 2019).

Os metabólitos SULF e o FIP desulfínil, foram relatados como sendo mais tóxicos para os insetos, mamíferos, peixes e aves do que o composto de origem, o FIP (DAS *et al.*, 2006).

A toxicidade aguda do FIP foi caracterizada em ratos, em doses superiores a 50 mg/kg de peso corporal, onde foram observados tremores, locomoção alterada, postura encurvada, agitação, convulsões, mortalidade e alterações no sistema nervoso central após sete horas de administração (MOHAMED *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2016). Em relação a toxicidade crônica, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA) classificou o FIP como um possível carcinógeno humano com base em dados que mostraram um aumento de tumores de células foliculares tireoidianas em ratos (USEPA, 2011; MCMAHEN *et al.*, 2015).

Diferentes estudos mostraram que o FIP possui propriedades de desregulação da tireoide em ratos, sendo a SULF mais crítica nesse aspecto, pois persiste muito mais tempo no organismo do que o próprio FIP (LEGHAIT *et al.*, 2009; ROQUES *et al.*, 2012).

2.3.2.1 Exposição não-ocupacional ao fipronil

As formas farmacêuticas para uso tópico contendo FIP disponíveis no mercado, embora sejam eficazes, são seguras somente quando usadas de acordo com as instruções do fabricante, caso contrário podem ocorrer exposições excessivas ou não intencionais ao produto (BAUER *et al.*, 2015).

O potencial de exposição humana aos tratamentos tópicos ocorre quando as pessoas lidam com o animal durante a aplicação ou logo após o tratamento. As crianças são especialmente vulneráveis porque muitas vezes interagem com o animal de estimação e são menos propensas a lavar as mãos depois de acariciar o animal e antes de comer, usar o banheiro ou sugar o polegar (DYK *et al.*, 2015; BAUER *et al.*, 2015).

Um estudo realizado nos Estados Unidos da América (EUA), no período de 2001 a 2007, demonstrou um total de 103 casos de doenças agudas associadas à exposição ao FIP, sendo 38% desses casos associados ao uso de produtos para cuidados com animais de estimação (LEE *et al.*, 2010).

Dyk e colaboradores (2012) demonstraram que após a aplicação de FIP na forma de “spot-on”, o produto se espalha rapidamente pelo corpo do animal, podendo ser transferido para o tutor durante a aplicação ou quando este entra em contato com animal após o tratamento. Além disso, seus resíduos e de seus metabólitos ficam disponíveis no pelo do animal e no ambiente frequentado por ele, persistindo por até quatro semanas.

Cochran e colaboradores (2015) também relataram sobre a exposição humana ao resíduo de FIP, onde a exposição primária ocorre no momento da aplicação do produto ou ao acariciar o animal após o tratamento, além das exposições secundárias através dos resíduos presentes nos ambientes domésticos.

A poeira doméstica é também considerada uma via importante de exposição ao FIP (STARR *et al.*, 2016). Testa e colaboradores (2019) ao avaliarem poeiras residenciais, em domicílios com ou sem animais de estimação, observaram que a presença dos animais resultou em uma contaminação total de FIP significativamente maior na poeira. A contaminação por FIP existe na poeira doméstica residencial como consequência da aplicação interna e/ou uso veterinário de FIP em animais de estimação. Os animais de estimação tratados, em domicílios

sem jardim, podem levar a uma contaminação de poeira doméstica mais elevada do que a registrada em domicílios com jardim, pois permanecem por maior tempo dentro do domicílio (TESTA *et al.*, 2019). A preocupação com contaminação da poeira residencial por FIP e outros compostos químicos ocorre devido à ingestão de poeira por crianças podendo causar risco à saúde (STARR *et al.*, 2016; TESTA *et al.*, 2019).

2.3.2.2 Contaminação ambiental por fipronil

A contaminação ambiental pelo FIP ocorre principalmente através dos produtos utilizados na agricultura (BONMATIN *et al.*, 2015), no controle de pragas em ambientes residenciais (WU *et al.*, 2015) e nos medicamentos utilizados em animais de estimação (TEERLINK *et al.*, 2017). A partir desses produtos, o FIP pode ser introduzido no sistema de tratamento de águas residuais e superficiais através de escoamento (TEERLINK *et al.*, 2017; BONMATIN *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015). Concentrações elevadas de FIP nas águas superficiais podem ser originadas de efluentes de águas residuais (MCMAHEN *et al.*, 2016).

O FIP é prejudicial ao ecossistema aquático, sendo altamente tóxico para peixes e para uma variedade de invertebrados, mesmo em baixas concentrações (GUNASEKARA *et al.*, 2007; WESTON; LYDY, 2013). Os produtos de degradação do FIP, SULF e sulfeto de FIP são mais tóxicos para os organismos aquáticos do que o composto de origem (MIZE; PORTER; DEMCHECK, 2008).

Estima-se que 1/3 dos produtos agrícolas sejam produzidos usando pesticidas (ZHANG, 2018). Esses pesticidas, além de serem absorvidos pelas plantas também são absorvidos pelo solo, pelas águas subterrâneas e também ficam disponíveis no ar, levando a impactos ambientais e prejuízos para saúde humana (ZHANG, 2018; SLUIJS *et al.*, 2014).

Concentrações de FIP foram encontradas com frequência em águas superficiais ao redor de plantações de arroz, em 35 localidades no Japão (em pelo menos 50 % das amostras). E os produtos de degradação do FIP, SULF, sulfeto de FIP, FIP desulfenil também foram detectados com frequência em amostras de sedimentos dessas localidades, sendo a SULF encontrada em altas concentrações (467 mg/kg) (FURIHATA *et al.*, 2019).

Em áreas urbanas o FIP é usado no controle de pragas (cupins, formigas, baratas) em domicílios e jardins (WU *et al.*, 2015). Em um estudo realizado em amostras de águas de áreas urbanas em Orange, na Califórnia, o FIP e a SULF excederam concentrações referentes a toxicidade aquática em mais de 70 % das amostras (ENSMINGE *et al.*, 2013).

Wu e colaboradores (2015) ao investigarem a ocorrência de FIP, SULF e sulfeto de FIP em lagoas e canais localizados em áreas com alta densidade residencial, nos EUA, encontraram concentrações desses compostos nas faixas de 0,50 - 203,70, 0,46 - 57,75 e 0,40 - 26,92 ng/L, respectivamente. Acredita-se que o FIP foi utilizado nesse ambiente para controle de formigas e cupins nos gramados residenciais, apoiando que o uso residencial de FIP pode ser uma fonte significativa de exposição para o ambiente aquático, levando a riscos ecológicos.

Michel e colaboradores (2016) investigaram a ocorrência de FIP, SULF, FIP desulfenil em amostras de água, em amostras de tecidos musculares e tecidos de fígado de enguias provenientes do Rio Elba, em Hamburgo na Alemanha. Eles observaram que o FIP (0,92 ng/L) foi o principal componente em todas as amostras de água. No entanto, para os tecidos musculares (11,24 ng/g) e hepáticos (44,29 ng/g) foram observadas maiores concentrações de SULF. Os resultados desse estudo demonstraram que a presença do FIP e seus metabólitos pode ser preocupante para o ambiente aquático, principalmente devido ao seu potencial de bioacumulação dos seus produtos de degradação nos tecidos musculares e hepáticos das enguias, que supostamente são mais tóxicos.

Budd e colaboradores (2015) detectaram a presença de FIP, SULF e FIP desulfenil em 49, 43 e 33% das amostras de águas superficiais da Califórnia nos EUA, em concentrações que podem provocar efeitos ecológicos a longo prazo.

O banho de animais de estimação tratados com produtos para controle de pulgas e carrapatos, a lavagem das mãos, as roupas de cama dos animais de estimação e/ou outras superfícies que entrem em contato com esses animais, foram identificadas como potenciais vias de entrada desses produtos em esgotos (PERKINS *et al.*, 2021).

Sadaria e colaboradores (2017) sugeriram que o tratamento convencional das águas residuais de esgoto tem pouco efeito sobre a liberação de FIP no meio ambiente. Nesse mesmo estudo eles também identificaram que os produtos utilizados no tratamento de pulgas e carrapatos em animais de estimação foram os principais responsáveis pelos resíduos de FIP e imidacloprida encontrados em uma determinada bacia hidrográfica na Carolina do Norte (EUA).

Teerlink e colaboradores (2017), ao analisarem águas do enxague de banho de cães de proprietários voluntários nos dias 2, 7 e 28 dias após a aplicação de “spot-on” observaram que 100% das amostras continham FIP mesmo após 28 dias do tratamento, sugerindo que tratamento contra pulgas e carrapatos utilizando “spot-on” é uma fonte potencialmente importante para a contaminação de águas residuais municipais tanto através do ambiente doméstico quanto em estabelecimentos profissionais.

Um estudo realizado no Reino Unido, revelou que concentrações de FIP foram encontradas nos 20 locais analisados, sendo que 16 desses locais obtiveram concentrações médias que excederam o limite de toxicidade crônica para o FIP. A SULF foi detectada em 18 locais em concentrações que também excederam limite de toxicidade crônica (PERKINS *et al.*, 2021).

2.3.3 Farmacocinética do fipronil

Nos mamíferos, após ser absorvido, o FIP é rapidamente metabolizado, possui meia-vida longa e conseqüentemente lenta eliminação. A excreção do FIP ocorre principalmente nas fezes (45% - 75%) e em pequenas quantidades na urina (5% - 25%) (GUPTA; ANADÓN, 2018).

A maioria dos estudos disponíveis na literatura em relação à farmacocinética do FIP foram realizados em ratos pela via intragástrica ou pela via oral (LEGHAIT *et al.*, 2009; LEGHAIT *et al.*, 2010; LACROIX *et al.*, 2010).

Em coelhos, o FIP foi administrado pela via intravenosa em uma única administração, na dose de 3 mg/kg, apresentando concentrações plasmáticas máximas de $C_{max} = 3,48 \pm 0,52$ mg.L⁻¹ em modelos de dois compartimentos com T_{1/2} de $0,31 \pm 0,11$ h (HU *et al.*, 2006).

Em bovinos, pela via subcutânea, na dose de 1,0 mg/kg, o FIP apresentou C_{max} de $378,06 \pm 137,44$ ng.mL⁻¹ e perfil de rápida absorção (T_{max} = 10h) e lenta eliminação (T_{1/2} = $288,17 \pm 91,58$ h) sendo quantificável por até 21 dias (CID *et al.*, 2016).

Recentemente, Poché e colaboradores (2020) administraram o FIP em uma baixa dose (0,005%), em forma de isca por 48 horas por via oral em camundongos, e encontraram concentrações médias de SULF de $79,41 \pm 15,6$ ng/mL após 19 dias, que foram capazes de proporcionar eficácia de 100% contra larvas do carrapato *Ixodes scapularis*.

Existem poucos relatos na literatura da farmacocinética do FIP em cães. Pela via tópica, Arisov e colaboradores (2019) relataram que o FIP aplicado na forma de “spot-on”, na dose de 27 mg/kg em cães é absorvido pela pele e atinge a circulação sistêmica apresentando concentração plasmática máxima (C_{max}) de 69,4 ng/mL em 63 h (T_{max}) e com ASC (área sob a curva) de $64,95$ ng.h.mL⁻¹.

Outro estudo de farmacocinética descritiva também foi realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, no qual o FIP foi administrado pela via oral em cães na dose de 2m/kg na forma de comprimidos. Nesse estudo foi obtida Cmax média de FIP de $3,13 \pm 1,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em aproximadamente duas horas. Nesse estudo o FIP também apresentou perfil farmacocinético de rápida absorção e metabolização e lenta eliminação, sendo detectável por até 28 dias (DOS SANTOS *et al.*, 2020).

2.4 Estudos de Farmacocinética e Farmacodinâmica

A farmacocinética pode ser definida como a medida e a interpretação formal de alterações temporais nas concentrações de um fármaco em uma ou mais regiões do organismo em relação à dose administrada (RANG *et al.*, 2011).

O conhecimento de farmacocinética é fundamental para o desenvolvimento de fármacos, tanto para se entender os testes pré-clínicos de toxicidade e toda farmacologia animal, quanto para decidir sobre o esquema posológico apropriado para ser empregado nos ensaios de eficácia. Na prática, os estudos de farmacocinética têm como foco os dados de concentrações do fármaco no plasma sanguíneo em relação aos tempos do estudo, nos quais são utilizados modelos matemáticos (RANG *et al.*, 2011).

Existem diversos tipos de modelos farmacocinéticos e a concepção destes depende do tipo de resultado que se deseja obter. Em casos de infusão intravascular utiliza-se o modelo monocompartimental, onde o plasma é foco da análise. Nos casos de administração extravascular utilizam-se os modelos bicompartimentais e os modelos multicompartmentais (GALLO-NETO, 2012).

A determinação de parâmetros farmacocinéticos pode ser útil para ajustar o esquema posológico (RANG *et al.*, 2011). Dentre os principais parâmetros que podem ser determinados são o pico de concentração plasmática do fármaco (Cmax), tempo correspondente ao momento do pico de concentração plasmática (Tmax), a área sob a curva (ASC), e meia-vida de eliminação (T1/2) (SHARGEL *et al.*, 2004).

A Cmax corresponde à concentração plasmática, sanguínea ou sérica mais elevada do fármaco ou metabólito ativo após a administração (DELUCIA *et al.*, 2007). Para a maioria dos fármacos, existe uma relação entre o efeito farmacodinâmico e concentração plasmática. Esse parâmetro indica se o fármaco é suficientemente absorvido sistemicamente para prover uma resposta terapêutica ou até mesmo atingir possíveis níveis tóxicos. É expresso em unidades de concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$, ng.mL^{-1}) (SHARGEL, *et al.*, 2004).

A ASC (área sob a curva), representa a quantidade de fármaco absorvido após a administração em dose única, isto é, a quantidade de fármaco potencialmente ativo presente no organismo durante um determinado intervalo de tempo (DELUCIA *et al.*, 2007). Ela mede a extensão da biodisponibilidade do fármaco, e pode ser determinada por um procedimento de integração numérico, como o método da regra do trapézóide. É expressa em unidades de concentração por tempo (mg.h.mL^{-1}) Para a maioria dos fármacos, a ASC é diretamente proporcional à dose (SHARGEL *et al.*, 2004).

O tempo de coleta no qual foi observada a ocorrência da Cmax corresponde ao Tmax, que relaciona-se com a velocidade de absorção do fármaco. No Tmax, ocorre o pico de absorção e a taxa de absorção é exatamente igual a taxa de eliminação do fármaco. A absorção do fármaco continua após atingir o Tmax, porém com uma taxa menor. É expresso em unidade de tempo (ANVISA, 2002; SHARGEL *et al.*, 2004).

A T1/2 mede a taxa de remoção do fármaco absorvido na circulação sistêmica. É o tempo necessário para que as concentrações plasmáticas sejam reduzidas em 50%. É expressa em unidades de tempo (ANVISA, 2002; SHARGEL *et al.*, 2004).

Uma característica desejável de um medicamento é a farmacocinética linear, e uma das condições necessárias para a sua avaliação é a proporcionalidade da dose, sendo sua avaliação fundamental durante o desenvolvimento clínico de um novo candidato a medicamento. A C_{max} e a ASC são os parâmetros geralmente utilizados para avaliar a proporcionalidade de dose (EISENBLAETTER *et al.*, 2011).

Existem várias abordagens para a avaliação da proporcionalidade de dose. A escolha do método estatístico adequado deve ser orientada pela capacidade de produzir medidas de falta de proporcionalidade. Essas medidas devem ter intervalos de confiança associados e serem adequadas para a aplicação de regras de decisão pré-definidas para alegar proporcionalidade (GOUGH *et al.*, 1995).

Embora não exista um modelo pré-definido, Hummel e colaboradores (2009), consideraram o modelo de potência a melhor abordagem para avaliar a proporcionalidade da dose, onde outras metodologias devam ser utilizadas apenas quando houver evidência de falta de ajuste do modelo de potência. O critério de equivalência aplicado ao método de potência é atraente, embora ainda não tenha sido comumente utilizado em trabalhos publicados.

O modelo de potência assume distribuições log-normais dos parâmetros farmacocinéticos ASC e C_{max} em relação ao log da dose. Após a transformação em uma relação linear, a proporcionalidade da dose é considerada se a inclinação (β) estiver dentro dos valores 0,8 - 1,25 em um intervalo de confiança de 95% (GOUGH *et al.*, 1995; (SMITH *et al.*, 2000, HUMMEL *et al.*, 2009; EISENBLAETTER *et al.*, 2011).

A farmacodinâmica corresponde aos eventos consequentes da interação do fármaco com seu receptor e outros sítios de ação (RANG *et al.*, 2011).

A modelagem farmacodinâmica visa estabelecer uma relação entre a concentração do fármaco e sua ação no organismo. Para esse tipo de abordagem é necessária a realização de procedimento experimental e a união desses dois modelos é chamada modelagem PK/PD (“Pharmacokinetics/Pharmacodynamics”) (GALLO-NETO, 2012).

As análises dos modelos farmacocinéticos/farmacodinâmicos (PK/PD) são ferramentas utilizadas para caracterizar a relação entre a farmacocinética e farmacodinâmica quantitativamente de uma maneira dependente do tempo. A modelagem quantitativa de PK/PD com base em mecanismos, pode ajudar a prever o resultado clínico e selecionar doses seguras e eficazes e regimes de dose no desenvolvimento clínico inicial a partir de dados pré-clínicos (GOTO *et al.*, 2019).

A modelagem PK/PD consiste em descrever e explicar o curso do tempo do efeito do fármaco através do curso do tempo de sua concentração no plasma. Na medicina veterinária, a seleção de uma dose é geralmente baseada em estudos de variação de dose usando um modelo paralelo simples, no entanto, esse modelo não é capaz de fornecer informações sobre a forma da relação dose-resposta individual, e também, em segundo lugar, a dose designada como “dose efetiva” não é obrigatoriamente a dose ideal (RIVIERE, 2011).

O modelo mais geral para uma relação de efeito x concentração é o conhecido como modelo Sigmoidal Emax. Esse modelo fornece uma inclinação da relação concentração-efeito, onde serão determinados os parâmetros Emax (Efeito máximo determinado pelo modelo) e CE_{50} (concentração plasmática do fármaco que produz 50% do Emax) (RIVIERE, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes

Foram empregados os seguintes reagentes:

- Acetonitrila, Sigma-Aldrich, grau HPLC $\geq 99,9\%$;
- Metanol, Sigma-Aldrich, grau HPLC $\geq 99,9\%$.

3.1.2 Equipamentos e acessórios

Foram empregados os seguintes equipamentos e acessórios:

- Balança analítica Tecnal, modelo 210;
- Centrífuga, modelo CIENTEC, modelo 6000;
- Cromatógrafo líquido Dionex, modelo Ultimate 3000, equipado com duas bombas quaternárias, válvula de sete vias, forno para coluna, detector UV-VIS ULTIMATE 3000RS DIONEX e software CHROMELEON 6.80 DIONEX;
- Coluna cromatográfica Kromasil C18 100 x 4,6 mm x 3,5 μ m;
- Pré – coluna C18 Kromasil 3 x 4,6 mm x 3,5 μ m;
- Cartuchos de extração de fase polimérica HLB 30 cc – Oasis (Waters);
- Manifold à vácuo com capacidade para 12 cartuchos Visiprep (Sigma);
- Bomba à vácuo – Tecnal – modelo Eco;
- Ultrapurificador acoplado ao sistema de purificação por osmose reversa OS 10 LZ (Gehaka);
- Tubos de coleta de heparina.

3.1.3 Substâncias químicas de referência

A substância química de referência (S.Q.R), usada como padrão interno, Etiprol foi adquirida da Sigma-Aldrich, lote SZBD234XV, de teor declarado 98,2%.

A substância química de referência (S.Q.R), Fipronil Sulfona Pestanal foi adquirida da Sigma-Aldrich, lote BCNT9592, de teor declarado 99,0%.

O FIP utilizado foi doado pela empresa CEVA - Saúde Animal, Paulínia-SP, com teor 99,50% determinado.

3.2 Localização do Estudo

O estudo foi realizado nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Departamento de Parasitologia Animal/Instituto de Veterinária (DPA/IV), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no município de Seropédica, BR 465, Km 07 no estado do Rio de Janeiro.

3.3 Aprovação pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais

O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) protocolada sob o CEUA nº 4108300818 (Anexo A).

O ensaio de eficácia clínica foi delineado para atender as especificações da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca), Decreto nº 6899, de 15 de julho de 2009 e às resoluções normativas que envolvem a regulamentação da experimentação animal no Brasil.

3.4 Seleção dos Animais e Identificação

Os animais empregados no estudo foram selecionados do canil experimental do LQEPV constituído de cães da raça Beagle. Foram selecionados 24 cães adultos (14 machos e 10 fêmeas), com idade entre um e seis anos e peso corpóreo entre 10 e 14 kg. Todos os animais estavam identificados com *transponder* implantados no tecido subcutâneo. Todos os animais apresentaram bom estado sanitário e nutricional e foram devidamente vermifugados e vacinados.

Os cães não foram expostos a ectoparasiticidas nos três meses anteriores ao estudo. Durante todo o período experimental, os cães foram mantidos individualmente em canis totalmente cobertos com parte delas em telhas transparentes de forma a permitir a entrada de raios solares. Os canis apresentam as seguintes dimensões: altura de dois metros; largura de um metro e cinquenta centímetros, comprimento de um metro e cinquenta centímetros. O canil foi limpo todos os dias, efetuando-se a retirada das fezes, e a limpeza com jato de água da superfície do chão. Uma vez por semana foi passada em todos os canis vassoura de fogo para manutenção do ambiente isento de formas evolutivas de carrapatos. A alimentação durante este período foi realizada através de comedouros, fornecida duas vezes ao dia. Durante o período experimental, os animais foram alimentados diariamente com 300g de ração comercial para cães adultos. A água foi fornecida em bebedouros apropriados à vontade.

3.5 Origem e Manutenção das Pulgas e Carrapatos

As pulgas da subespécie *C. felis felis* foram provenientes da colônia do LQEPV mantida há 12 anos sem reintrodução externa de pulgas oriundas de outros animais. O protocolo de manutenção desta cepa tem aprovação na CEUA-IV/UFRRJ sob o número 4313110419. Para as infestações foram utilizadas 100 pulgas (50 machos e 50 fêmeas), não alimentadas, com idade de 14 dias.

Os carrapatos da espécie *R. sanguineus* carrapatos também foram provenientes da colônia do LQEPV mantidos há 14 anos sem reintrodução externa de carrapatos oriundos de outros animais. O protocolo de manutenção desta cepa tem aprovação na CEUA-IV/UFRRJ sob o número 093/2014. Para as infestações foram utilizados 25 casais de carrapatos adultos.

3.6 Randomização

Com base nas contagens de pulgas, carrapatos e no sexo, os animais foram divididos em quatro grupos de seis animais, sendo um grupo controle e três grupos tratados.

No dia – 7 todos os animais foram desinfestados, removendo mecanicamente, todos os ectoparasitos presentes nos mesmos e em seguida, os animais foram infestados. No dia – 5 foi realizada a remoção mecânica e contagem do número de pulgas e carrapatos vivos encontrados

em cada animal. Apenas animais que apresentaram retenção mínima de 25% para pulgas e 20% para carrapatos foram incluídos no estudo (MARCHIONDO *et al.*, 2013). Para o ranqueamento, foi construída uma lista decrescente com as contagens de carrapatos presentes nos animais. Foi efetuado um sorteio de cada animal do mais parasitado para o menos parasitado, alocando-se um animal em cada grupo, e assim sucessivamente até que se completou as seis repetições distribuídas em cada grupo experimental. Os animais foram divididos em 4 grupos (6 cães/grupo) sendo denominados de Grupo Controle e Grupo 1, 2 e 3, os quais receberam tratamento (Anexo B).

3.7 Tratamento

Os comprimidos utilizados no tratamento foram desenvolvidos por dos Santos e colaboradores (2020). Esses comprimidos de FIP foram preparados utilizando o método de granulação úmida seguido por compressão. Resumidamente, o FIP e os excipientes (polivinilpirrolidona em solução, lauril sulfato de sódio, talco, estearato de magnésio e lactose monohidratada) foram misturados por diluição geométrica e homogeneizados até obtenção de uma massa úmida. Essa massa passou por uma peneira para a obtenção dos grânulos que foram submetidos ao processo de compactação. Os comprimidos utilizados no tratamento estão demonstrados na Figura 5.



Figura 5 - Comprimidos de fipronil desenvolvidos por dos Santos e colaboradores (2020) - Arquivo pessoal).

Os estudos de farmacocinética e eficácia foram realizados concomitantemente a partir de um único tratamento pela via oral. Após a administração do comprimido cada animal recebeu 10 mL de água. O Grupo Controle permaneceu sem tratamento. O Grupo 1 recebeu a dose de 2 mg/kg de peso corporal, o Grupo 2 recebeu a dose de 4 mg/kg de peso corporal e o Grupo 3 a dose de 6 mg/kg de peso corporal. A Figura 6 ilustra o momento do tratamento dos cães.

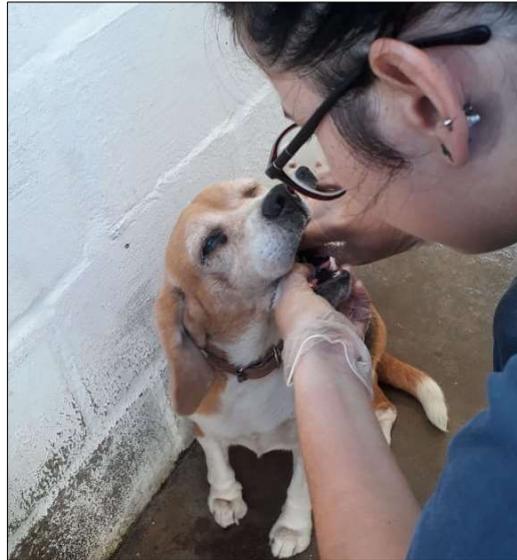


Figura 6 - Momento do tratamento por via oral dos cães (Canil experimental LQEPV/UFRRJ - Arquivo pessoal).

3.8 Avaliação *in vivo* da Eficácia dos Comprimidos de Fipronil no Controle de *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus* em Cães

Para a avaliação da eficácia, todos os animais foram infestados com 100 pulgas adultas não alimentadas, sendo 50 machos e 50 fêmeas, da subespécie *C. felis felis* e com 25 casais de carrapatos adultos não lamentados da espécie *R. sanguineus*. Após a infestação cada animal foi contido por um período de cinco minutos para permitir a dispersão e início da fixação dos mesmos. As infestações se iniciaram no dia -7 do estudo.

No dia 0 foi realizado o tratamento. No dia +2 foi realizada a desinfestação através de remoção mecânica e a contagem do número de pulgas vivas e de carrapatos vivos para determinação da eficácia. As infestações sucessivas ocorreram nos dias +5, +12, +19, +26 e as desinfestações e contagens nos dias +7, +14, +21, +28.

O esquema cronológico para a avaliação da eficácia *in vivo* do FIP administrado pela via oral descrito acima está demostado na Figura 7.

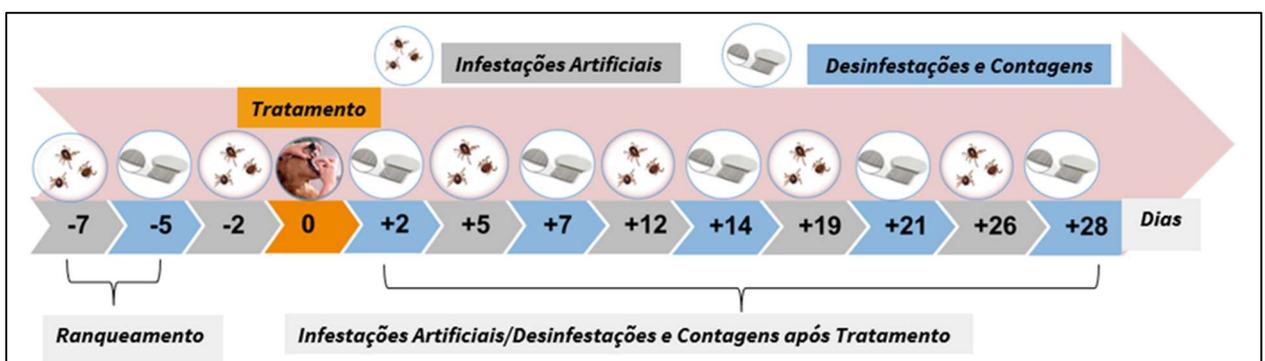


Figura 7 – Esquema cronológico avaliação da eficácia *in vivo* do FIP administrado pela via oral.

A eficácia foi calculada a partir da média geométrica do número de pulgas vivas e carrapatos vivos e fixados encontrados no grupo controle (GC) e grupo tratado (GT) de acordo com as fórmulas (MARCHIONDO *et al.*, 2013):

- Eficácia Pulicida (%) = $100 \times (\text{média de pulgas vivas recuperadas do GC} - \text{média de pulgas vivas recuperadas do GT}) / (\text{média de pulgas vivas recuperadas do GC})$.
- Eficácia Carrapaticida (%) = $100 \times (\text{média de carrapatos vivos e fixados recuperados no GC} - \text{média de carrapatos vivos e fixados recuperados no GT}) / (\text{média de carrapatos vivos e fixados recuperados no GC})$.

Os números médios de pulgas adultas vivas e carrapatos adultos vivos e fixados, foram submetidos a análise estatística para comparação de valores de médias. Inicialmente os dados das contagens de parasitos foram avaliados quanto à normalidade de distribuição através de Shapiro Wilk. Os resultados que apresentaram distribuição normal (paramétricos) foram avaliados por meio da análise de variância ANOVA, (seguido pelo teste de Tukey quando as variâncias se apresentassem desiguais). Os resultados que não apresentaram distribuição normal (não paramétricos) foram avaliados através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Student-Newman Keuls. O nível de significância considerado em todos os testes foi de 95% ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico computacional livre Bioestat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007).

3.9 Estudo de Farmacocinética

3.9.1 Preparo das curvas bioanalíticas de fipronil e fipronil-sulfona

Para a construção das curvas bioanalíticas, inicialmente foram preparadas soluções mães (SM) de FIP (CEVA Saúde Animal, Paulínia-SP – 99,50%) e de SULF (Fipronil Sulfona Pestanal – Sigma-Aldrich, lote BCNT9592, de teor declarado 99,0%). Foram pesados, com precisão analítica, quantidades equivalentes a 25,00 mg de FIP e de SULF e transferidos para um balão volumétrico de 25,00 mL, cujo volume foi completado com acetonitrila (ACN), resultado numa solução de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Foi utilizado como padrão interno o Etiprol Pestanal (Sigma-Aldrich, lote SZBD234XV, de teor declarado 98,2%). Para o preparo da sua solução mãe foram pesados, com precisão analítica, quantidades equivalentes a 5,00 mg de etiprol e transferidos para balão volumétrico de 10 mL cujo volume foi completado com ACN, resultado numa solução de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para a construção das curvas, foram coletadas amostras de sangue de cães que não foram submetidos a tratamento com antiparasitários por um período mínimo de três meses. Para a coleta foram utilizados tubos heparinizados de 10 mL com vácuo através de venopunção jugular. O plasma foi obtido por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C.

Para a construção da curva de FIP, o plasma foi contaminado com a SM de FIP para a obtenção das concentrações finais de 0,05, 0,10, 0,50, 0,75, 1,00, 1,50 e 2,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A SM etiprol foi adicionada ao plasma para uma concentração final de $1,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para a construção da curva de SULF o plasma foi contaminado com a SM de SULF para a obtenção das concentrações finais de 0,10, 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,50 e 5,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A SM de etiprol foi adicionada ao plasma para uma concentração final de $1,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Após as contaminações as amostras foram acondicionadas em freezer (-20°C) até o momento da análise.

3.9.2 Preparo das amostras e análise cromatográfica

O preparo de amostra foi realizado através de procedimento de extração em fase sólida. Foram utilizados cartuchos HLB – Oasis (Waters) acoplados a manifold (Supelco) com capacidade para 12 cartuchos ligados a uma bomba a vácuo (Tecnal) a 10 mm de Hg. Inicialmente os cartuchos foram acondicionados com 2,0 mL de metanol e 2,0 mL de água. Em seguida foram adicionadas 1,0 mL de amostra (plasma) e depois se procedeu à etapa de lavagem utilizando 1,0 mL de água. A eluição foi feita com 1,0 mL de metanol. O eluato foi evaporado em concentrador a vácuo e reconstituído em 100 μ L de ACN. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta (UV) através da metodologia desenvolvida por CID *et al.*, (2012) e adaptada por dos SANTOS *et al.*, (2020) nas seguintes condições:

- Sistema Cromatográfico: CLAE Dionex Ultimate 3000
- Software: Chromeleon 6.8
- Coluna: Kromasil C18 100 x 4,6 mm x 3,5 μ m
- Pré-coluna: Kromasil C18 (5 μ m, 4.6 \times 10 mm)
- Fase móvel: ACN:Água (60:40, v/v)
- Comprimento de onda: 210 nm
- Fluxo: 1,00 mL.min⁻¹
- Volume de injeção: 10 μ L
- Temperatura: 25°C
- Tempo de corrida: 15 minutos

3.9.3 Construção da curva de concentração plasmática e determinação dos parâmetros farmacocinéticos

Para a construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo foram coletadas amostras de sangue dos animais de cada grupo em 0, 1, 2, 4, 6, 8, 24 horas e 2, 3, 7, 14, 21, 28 dias após o tratamento. As coletas de sangue foram realizadas por venopunção jugular em tubos heparinizados de 10 mL com vácuo. O momento das coletas de sangue dos cães para estudo de farmacocinética está ilustrado na Figura 8.



Figura 8 - Momento das coletas de sangue dos cães para estudo de farmacocinética (Canil experimental LQEPV/UFRRJ - Arquivo pessoal).

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4°C e o plasma separado em microtubos com duas alíquotas de 1 mL e armazenados a -20°C até a análise. O preparo das amostras e a análise cromatográfica foi realizada de acordo com o item 3.9.2.

Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados por meio do programa PK Solver (Microsoft Excel®, Redmond, WA, EUA) e analisados por modelo não compartimental de administração extravascular. Todos os parâmetros farmacocinéticos foram calculados usando os dados de concentração plasmática individual de cada animal seguido do cálculo da média aritmética e desvio padrão. A C_{max} (a concentração máxima medida para um determinado animal) e T_{max} (o tempo desde a administração da dose até a concentração máxima) foram retirados diretamente dos dados de concentração de plasma *versus* tempo. A constante de taxa de eliminação, λ_z , foi calculada usando a regressão com o maior R^2 ajustado com base nos últimos três pontos de dados da curva. A área sob a curva de zero até o último tempo t (ASC_{0-t}) foi calculada usando o método trapezoidal linear e extrapolada para o tempo infinito (ASC_{0-inf}). Outros parâmetros, como tempo de meia-vida plasmática ($T_{1/2}$), tempo médio de residência (TMR), depuração (Cl), volume de distribuição (V_z) foram calculados diretamente no programa PK solver (ZHANG *et al.*, 2010).

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e os dados analisados estatisticamente por One-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (software GraphPad Prism 6.0). O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$.

3.9.4 Análise de proporcionalidade de dose

A análise de proporcionalidade da dose foi avaliada estatisticamente usando o Modelo de Potência baseado em Hummel e colaboradores, (2009). A relação linear entre parâmetros farmacocinéticos C_{max} e ASC_{0-t} e as doses foi definida como $Y = \alpha * Dose^\beta$. Os parâmetros farmacocinéticos e as doses foram log-transformados e representados pela equação $\text{Log}(Y) =$

$\text{Log}(\alpha) + \beta * \text{Log}(\text{Dose})$, onde $Y = C_{\text{max}}$, AUC_{0-t} , $\text{Log}(\alpha)$ é o intercepto e β é a inclinação da equação.

A proporcionalidade da dose foi considerada se a inclinação (β) estivesse dentro de 0,8-1,25 em um intervalo de confiança de 95%. A proporcionalidade da dose foi analisada pelo software GraphPad Prism 6.0.

3.10 Análise da Relação Farmacocinética e Eficácia

A relação entre a concentração plasmática de FIP e SULF e a porcentagem de eficácia foi descrita usando um modelo Emax. As contagens de pulgas ou carrapatos obtidas 48 horas após o tratamento dos Grupos 1, 2 e 3 foi comparada com a contagem de pulgas ou carrapatos ao mesmo tempo em cães do Grupo Controle. A diferença do número de pulgas ou carrapatos dos grupos tratados em relação ao Grupo Controle foi calculada da seguinte forma: $\{1 - [\text{contagem (48h pós-tratamento) para o cão } X \text{ do GT} / [\text{contagem média geométrica para o cão do GC 48h pós-tratamento}]]\} \times 100$, onde contagem = o número de pulgas ou carrapatos vivos e x = corresponde a cada cão dos diferentes grupos. A eficácia percentual *versus* concentração plasmática de FIP e SULF foi inserida no programa de resolução de PK (Microsoft Excel®, Redmond, WA, EUA) e ajustada a um modelo PD Sigmoid Emax. No modelo, o efeito é definido como 0% quando as concentrações plasmáticas são 0. O efeito máximo, Emax, é um parâmetro determinado pelo modelo e deve ser próximo a 100% e é uma medida da eficácia máxima.

A seguinte equação foi usada para ajustar os dados: $E = E_{\text{max}} \times C(t)^{\text{gamma}} / C(t)^{\text{gamma}} + CE_{50}^{\text{gamma}}$. CE_{50} é a concentração plasmática correspondente a $E_{\text{max}}/2$ e é uma medida de potência. $C(t)$ é a medida da concentração plasmática de FIP em 48 horas, e gamma , uma medida da seletividade, está relacionada à inclinação da concentração plasmática *versus* curva de efeito.

O CE_{90} , a concentração plasmática de FIP estimada para fornecer 90% de eficácia, foi então calculada com as estimativas de parâmetro usando a seguinte equação: $CE_{90} = CE_{50} \times (90/(100-90))^{1/\text{gamma}}$.

Os gráficos da relação entre as concentrações plasmáticas de FIP, SULF e o seus somatórios (FIP + SULF) foram construídos usando Microsoft Excel®, Redmond, WA, EUA e os gráficos da relação dose x eficácia foram construídos usando um modelo sigmoidal software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA). Na aplicação do modelo de Emax foram utilizadas as concentrações plasmáticas de FIP e SULF porque o modelo não se aplicou somente às concentrações de FIP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ranqueamento

Os dados referentes a divisão dos grupos (Controle e Grupos 1, 2 e 3), como número de animais, sexo, peso e a dose de FIP administrado estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Sexo, peso e dose administrada de fipronil aos animais em cada grupo.

Grupos	Número de Animais	Sexo	Peso (kg)*	Comprimido (mg)
Controle	6	2 F e 4 M	11,15 ± 1,08	--
Grupo 1	6	3 F e 3 M	11,68 ± 1,88	20
Grupo 2	6	2 F e 3 M	11,98 ± 1,68	40
Grupo 3	6	3 F e 3 M	12,62 ± 2,90	60

* Média e desvio padrão; F = fêmea; M = macho

4.2 Eficácia do Fipronil no Controle de *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus* em Cães após Administração pela Via Oral

Os valores das contagens individuais de carrapatos e pulgas obtidas durante o estudo e o resumo dos dados estatísticos (desvio padrão e *p*-valor) estão disponíveis nos Anexos C e D, respectivamente.

O número médio das contagens de pulgas e carrapatos dos grupos avaliados (Controle, Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3) no período pré-tratamento variou de 56,00 – 53,67 e 29,00 - 24,33, respectivamente e não apresentou diferença significativa entre os grupos (*p* > 0,05).

Os números médios de carrapatos vivos recuperados dos grupos avaliados após o tratamento com os comprimidos FIP estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Média geométrica da contagem de carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*) vivos e fixados nos cães do grupo controle e tratados e eficácia do fipronil administrado pela via oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg.

Dia Experimental	Média Geométrica de carrapatos vivos (Eficácia %)			
	Grupo Controle	Grupo 1 (2 mg/kg)	Grupo 2 (4 mg/kg)	Grupo 3 (6 mg/kg)
+2	28,62 ^a	7,29 ^{a,b} (74,54)	1,24 ^{b,c} (95,65)	0,26 ^c (99,09)
+7	30,32 ^a	8,34 ^a (72,50)	13,81 ^a (54,45)	10,45 ^a (65,53)
+14	24,58 ^a	12,65 ^a (48,55)	7,39 ^a (69,95)	16,88 ^a (31,34)
+21	22,87 ^a	15,45 ^a (32,47)	12,60 ^a (44,89)	19,44 ^a (15,00)
+28	20,32 ^a	24,15 ^a (0,00)	16,95 ^a (16,61)	15,61 ^a (23,21)

^{a, b, c} Colunas com as mesmas letras não apresentam diferença estatística (*p* ≤ 0,05).

As médias das contagens de carrapatos após o tratamento variaram de 22,87 a 30,32 para o Grupo Controle e de 0,26 a 24,15 para os grupos tratados. A análise estatística mostrou diferença significativa (*p* < 0,05) entre os grupos Controle os Grupos 2 e 3 no dia +2. Não houve

diferença significativa ($p > 0,05$) entre os Grupo Controle e tratados (1, 2 e 3) após o dia +7. Os valores máximos de eficácia foram observados no dia +2, atingindo 74,54%, 95,65% e 99,09% para os Grupos 1, 2 e 3, respectivamente. A partir do dia + 7 a eficácia começa a declinar gradativamente até atingir valores de 0,00%, 16,61% e 23,21% para os Grupos 1, 2 e 3, respectivamente no dia + 28. (Tabela 2).

Os percentuais de eficácia contra o carrapato *R. sanguineus* encontrados nesse estudo não foram semelhantes aos encontrados por Melo e colaboradores (2012), que também administraram o FIP por via oral em cães, no entanto, na forma de cápsulas gelatinosas, também nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg. Na maior dose (6 mg/kg) os valores de eficácia observados por eles nos dias 2 e 7 após o tratamento foram inferiores (43,67% e 23,28%) aos observados nesse estudo (99,09 %- 65,53%).

Os números médios de pulgas vivas recuperadas dos grupos avaliados após o tratamento com os comprimidos FIP estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Média geométrica da contagem de pulgas (*Ctenocephalides felis felis*) vivas nos cães dos grupos controle e tratados e eficácia do fipronil administrado pela via oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg.

Dia Experimental	Média Geométrica de pulgas vivas (Eficácia %)			
	Grupo Controle	Grupo 1 (2 mg/kg)	Grupo 2 (4 mg/kg)	Grupo 3 (6 mg/kg)
+2	35,03 ^a	4,17 ^a (88,11)	0,00 ^b (100)	0,35 ^b (99,01)
+7	61,83 ^a	6,86 ^b (88,91)	4,96 ^b (91,98)	1,04 ^b (98,32)
+14	36,65 ^a	5,56 ^{a,b} (84,84)	7,97 ^{a,b} (78,26)	5,54 ^b (84,88)
+21	34,02 ^a	24,31 ^a (28,55)	23,43 ^a (37,58)	14,32 ^a (57,91)
+28	37,54 ^a	27,38 ^a (27,06)	25,88 ^a (23,93)	18,89 ^a (49,68)

^{a, b} Colunas com as mesmas letras não apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

As médias geométricas das contagens de pulgas nos cães do Grupo Controle variaram de 34,02 a 61,03 e de 0,00 a 27,38 para os grupos tratados (1, 2 e 3). A análise estatística mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle e tratados (1, 2 e 3) dos dias +2 ao dia +14 após o tratamento. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos Controle e tratados (1, 2 e 3) após o dia + 21. A eficácia máxima contra pulgas foi alcançada no dia + 2, atingindo 88,0%, 100% e 99,01% para o Grupo 1, 2 e 3, respectivamente. Os valores de eficácia declinaram ligeiramente até o dia +14, mantendo valores variando entre 78,26% e 84,88%. A partir do dia+ 21 a eficácia diminuiu gradativamente até atingir valores de 27,06%, 23,93% e 49,68% para Grupo 1, 2 e 3, respectivamente no dia + 28 (Tabela 3).

Melo e colaboradores (2012), a partir da administração oral de FIP em cães , sob a forma de cápsulas de gelatina na dose de 6mg/kg encontraram níveis de eficácia entre 97,88 % e 88, 73%, respectivamente para 2 e 14 dias após o tratamento, contra *C. felis felis*, similares aqueles encontrados no nosso estudo para a mesma dose no mesmo intervalo de tempo de 99,00% e 84,88%, respectivamente.

4.3 Curvas Bioanalíticas Fipronil e Fipronil-sulfona

A Figura 9 A e B representam as curvas bioanalíticas dos padrões analíticos de FIP e SULF e padrão interno (Etiprol) em plasma canino. Uma resposta linear foi observada, para o FIP, na faixa de 0,05 a 2,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ com coeficiente de correlação linear de 0,9945 e equação da reta $y = 0,9351x - 0,0391$ e para SULF, na faixa de 0,10 a 5,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, coeficiente de correlação linear de 0,9977 e equação da reta $y = 0,9089x - 0,1121$, demonstrando a aplicabilidade do método para a quantificação do FIP e SULF nas amostras.

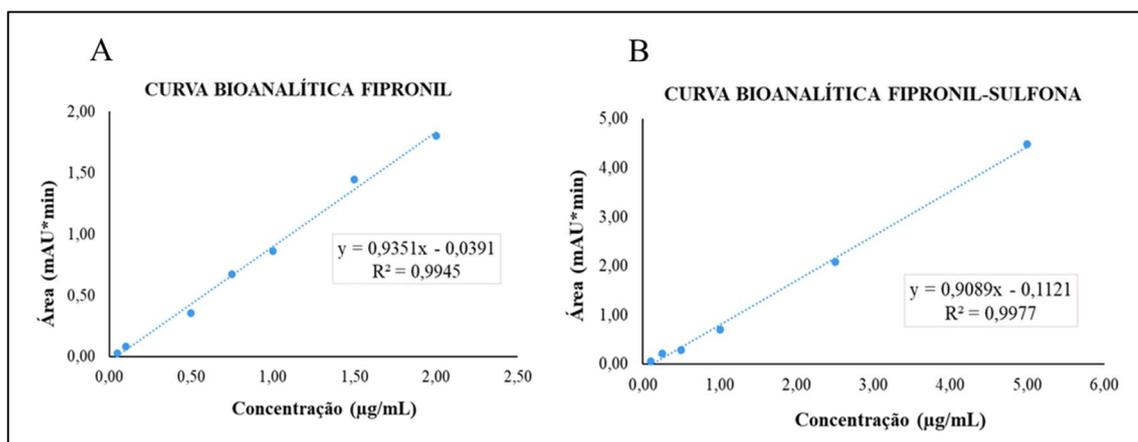


Figura 9 – Curvas bioanalíticas dos padrões analíticos (A) fipronil e (B) fipronil-sulfona) e padrão interno (Etiprol) em plasma canino.

4.4 Curvas de Concentração Plasmática *versus* Tempo

Na Tabela 4 estão registrados os valores das médias aritméticas e desvios padrões das concentrações plasmáticas de FIP encontradas nas amostras de plasma coletadas de cada grupo de cães tratados por via oral com comprimidos de FIP (Grupos 1, 2 e 3) nos períodos determinados no estudo.

Tabela 4 - Média e desvio padrão (n = 6) das concentrações plasmáticas ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de fipronil em cada tempo (horas) após a administração oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg de peso corporal.

Tempo (horas)	Média concentração plasmática ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de fipronil em cada dose		
	Grupo 1 (2mg/kg)	Grupo 2 (4mg/kg)	Grupo 3 (6mg/kg)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	2,28 ± 0,96	2,90 ± 1,06	2,91 ± 1,28
2	3,17 ± 1,42	5,36 ± 1,96	5,80 ± 2,27
4	1,69 ± 1,05	2,05 ± 0,73	3,08 ± 0,96
6	1,60 ± 0,89	1,84 ± 0,47	3,08 ± 1,14
8	1,58 ± 0,75	1,67 ± 0,60	2,04 ± 0,79
24	1,12 ± 0,43	1,18 ± 0,30	1,31 ± 0,52
48	1,04 ± 0,44	1,10 ± 0,38	1,48 ± 0,84
72	0,80 ± 0,19	1,00 ± 0,28	0,97 ± 0,33
168	0,46 ± 0,20	0,52 ± 0,19	0,73 ± 0,29
336	0,50 ± 0,15	0,67 ± 0,21	0,47 ± 0,19
504	0,30 ± 0,08	0,53 ± 0,35	0,29 ± 0,07
672	0,23 ± 0,05	0,34 ± 0,18	0,42 ± 0,13

O estudo foi realizado até +28 dias (672 horas) após o tratamento, foi possível detectar o FIP até o último tempo, as concentrações plasmáticas de FIP variaram de $3,17 \pm 1,42$ a $0,23 \pm 0,05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o Grupo 1, de $5,36 \pm 1,96$ a $0,34 \pm 0,18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o Grupo 2 e $5,80 \pm 2,27$ a $0,42 \pm 0,13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o Grupo 3. As curvas de concentração plasmática *versus* tempo do FIP estão representadas pela Figura 10.

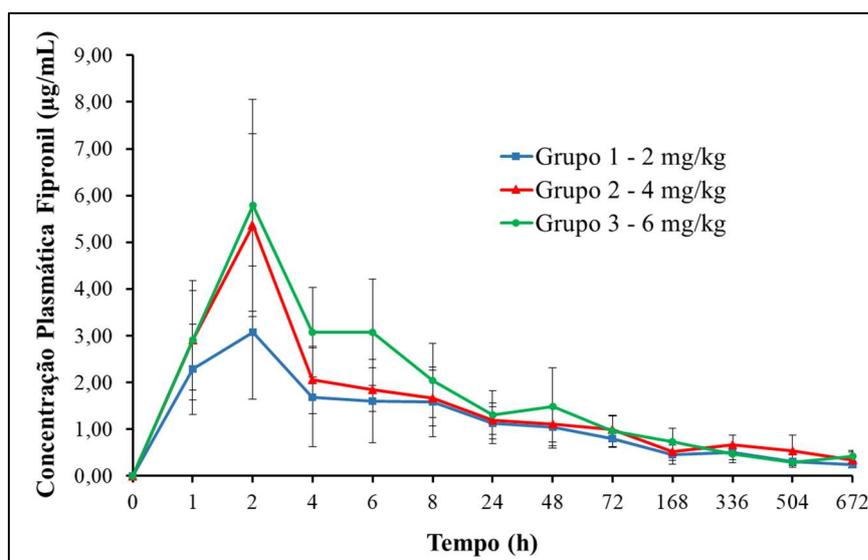


Figura 10 - Curvas de concentração plasmática média (n = 6) do fipronil em plasma canino a partir de administração oral nas doses 2, 4, e 6 mg/kg.

A partir do tratamento de cães pela via oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg com comprimidos de FIP, foi possível observar curvas com perfis farmacocinéticos semelhantes para as três doses administradas (Figura 10). As concentrações plasmáticas de FIP aumentaram rapidamente e atingiram seu máximo (C_{max}) em aproximadamente 2 horas (T_{max}), os valores encontrados foram $3,17 \pm 1,42 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a dose de 2 mg/kg (Grupo 1), $5,36 \pm 1,96 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a dose de 4 mg/kg (Grupo 2) e $5,80 \pm 2,27 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a dose de 6 mg/kg (Grupo 3). Após atingir o T_{max} os níveis de FIP caíram drasticamente nos três grupos. Em 72 horas (+ 3 dias) após o tratamento as concentrações plasmáticas de FIP nos três grupos atingiram níveis de 0,8 a $1,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$, após 168 horas (+ 7 dias) esses níveis foram inferiores a $0,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os valores das médias aritméticas e desvios padrões das concentrações plasmáticas de SULF encontradas nas amostras de plasma coletadas de cada grupo de cães tratados por via oral com comprimidos de FIP (Grupos 1, 2 e 3) nos períodos determinados no estudo, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Média e desvio padrão (n=6) das concentrações plasmáticas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de fipronil - sulfona em cada tempo (horas) após a administração oral de fipronil nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg de peso corporal.

Tempo (horas)	Média concentração plasmática ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de fipronil sulfona em cada dose		
	Grupo 1 (2mg/kg)	Grupo 2 (4mg/kg)	Grupo 3 (6mg/kg)
0	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
1	$0,56 \pm 0,19$	$0,84 \pm 0,72$	$0,78 \pm 0,33$
2	$1,61 \pm 0,95$	$2,36 \pm 1,77$	$2,53 \pm 1,79$
4	$0,66 \pm 0,30$	$1,10 \pm 0,69$	$1,33 \pm 0,50$
6	$0,63 \pm 0,37$	$0,62 \pm 0,30$	$1,05 \pm 0,42$
8	$0,33 \pm 0,17$	$0,58 \pm 0,40$	$1,04 \pm 0,66$
24	$0,46 \pm 0,18$	$0,56 \pm 0,22$	$0,98 \pm 0,43$
48	$0,36 \pm 0,14$	$0,57 \pm 0,29$	$0,89 \pm 0,58$
72	$0,40 \pm 0,12$	$0,75 \pm 0,35$	$1,02 \pm 0,58$
168	$0,44 \pm 0,19$	$0,66 \pm 0,32$	$1,20 \pm 0,69$
336	$0,37 \pm 0,19$	$0,47 \pm 0,22$	$0,56 \pm 0,31$
504	$0,25 \pm 0,14$	$0,30 \pm 0,11$	$0,37 \pm 0,23$
672	$0,16 \pm 0,09$	$0,25 \pm 0,12$	$0,25 \pm 0,06$

Foram encontradas concentrações plasmáticas de SULF variando de $1,61 \pm 0,95$ a $0,16 \pm 0,09 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $2,36 \pm 1,77$ a $0,25 \pm 0,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2,53 \pm 1,79$ a $0,25 \pm 0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para os Grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Foi possível determinar as concentrações de SULF até o dia +28 dias (672 horas) de estudo. A curva de concentração plasmática *versus* tempo da SULF está representada pela Figura 11.

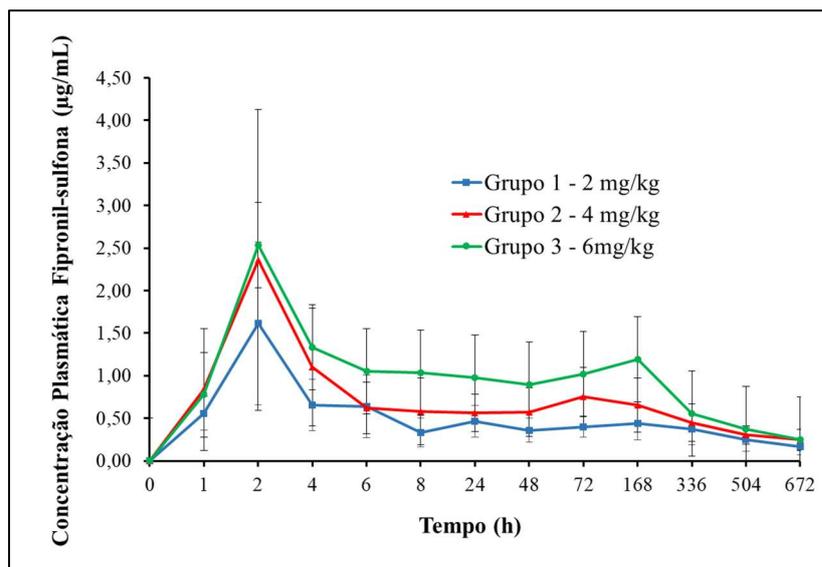


Figura 11 - Curvas de concentração plasmática média (n = 6) da fipronil-sulfona em plasma canino a partir de administração oral de fipronil nas doses 2, 4, e 6 mg/kg.

Foi possível observar a rápida metabolização do FIP, uma vez que as C_{max} nos três grupos foram também atingidas em aproximadamente duas horas, assim como o FIP. Em 4 horas ocorreu um decaimento nas concentrações de SULF, como também foi observado para o FIP (Figura 10), no entanto observa-se que entre 4 e 168 horas (+ 7 dias) o decaimento nas concentrações de SULF ocorre de forma mais lenta em relação ao FIP. A maior persistência da SULF no organismo também foi observada após administração oral em ratos (ROQUES *et al.*, 2012). Após 504 horas (+ 21 dias), as concentrações de SULF reduziram para faixa de 0,37-0,16 µg.mL⁻¹.

As curvas de concentração plasmática de FIP e de SULF foram semelhantes a observada por dos Santos e colaboradores (2020), com FIP administrado pela via oral na dose de 2mg/kg, onde a C_{max} também foi atingida em 2 horas (T_{max}).

Os valores médios e os desvios padrões dos parâmetros farmacocinéticos do FIP e da SULF dos três grupos, calculados a partir das concentrações plasmáticas, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros farmacocinéticos do fipronil e da fipronil-sulfona após a administração oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg de peso corporal.

Parâmetros Farmacocinéticos	Fipronil			Fipronil-sulfona		
	Grupo 1 (2 mg/kg)	Grupo 2 (4 mg/kg)	Grupo 3 (6 mg/kg)	Grupo 1 (2 mg/kg)	Grupo 2 (4 mg/kg)	Grupo 3 (6 mg/kg)
C_{max} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	3,17 ^a ± 1,39	5,40 ^b ± 2,10	5,80 ^b ± 2,39	1,62 ^a ± 1,05	2,51 ^a ± 1,84	2,93 ^a ± 1,88
T_{max} (h)	1,83 ^a ± 0,41	1,83 ^a ± 0,41	2,20 ^a ± 1,10	2,00 ^a ± 0,00	2,67 ^a ± 1,03	2,80 ^a ± 8,70
λz (h^{-1})	0,0024 ^a ± 0,007	0,0026 ^a ± 0,0013	0,0021 ^a ± 0,001	0,0023 ^a ± 0,00	0,0022 ^a ± 0,001	0,0021 ^a ± 0,001
ASC_{0-t} ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$)	339,00 ^a ± 65,62	442,39 ^b ± 137,25	421,32 ^b ± 102,84	227,53 ^a ± 97,70	316,15 ^a ± 98,70	494,00 ^a ± 167,05
$ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$)	454,38 ^a ± 121,92	641,73 ^a ± 294,78	631,02 ^a ± 144,15	306,01 ^a ± 134,08	455,97 ^{a,b} ± 160,00	630,53 ^b ± 172,86
$T_{1/2}$ (h)	319,60 ^a ± 108,40	335,62 ^a ± 189,80	338,82 ^a ± 167,81	350,17 ^a ± 175,04	393,93 ^a ± 224,24	394,31 ^a ± 185,30
$MRT_{0-\infty}$ (h)	472,52 ^a ± 128,50	521,81 ^a ± 257,97	597,19 ^a ± 139,21	523,38 ^a ± 189,25	588,94 ^a ± 313,44	487,97 ^a ± 187,13
Vz/F (mg)/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	20,25 ^a ± 4,44	30,07 ^a ± 8,84	60,96 ^b ± 28,35	37,48 ^a ± 25,19	55,47 ^a ± 45,02	61,04 ^a ± 28,71
Cl/F (mg)/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)/h	0,046 ^a ± 0,008	0,074 ^{a,b} ± 0,032	0,106 ^b ± 0,026	0,0072 ^a ± 0,019	0,096 ^a ± 0,03	0,112 ^a ± 0,038

C_{max} = Concentração plasmática máxima; T_{max} = Tempo para atingir a concentração plasmática máxima; λz = constante de taxa de eliminação; ASC_{0-t} = área sob a curva do tempo 0 até a última concentração detectável; $ASC_{0-\infty}$ = a sob a curva de concentração-tempo do tempo 0 ao infinito; $T_{1/2}$ = tempo necessário para que metade do fármaco seja eliminado; $MRT_{0-\infty}$ = tempo médio de residência do tempo 0 ao infinito; F = biodisponibilidade; Vz/F = volume aparente de distribuição durante a fase terminal após administração oral; Cl/F = depuração total aparente do fármaco do plasma após administração oral.

^{a, b} - Colunas com as mesmas letras não apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados utilizando o macro PK solver a partir de um modelo matemático não-compartimental de administração extravascular.

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores T_{max} , constante de eliminação λ_z (h^{-1}), $ASC_{0-\infty}$ ($\mu g/mL \cdot h$), $T_{1/2}$ (h) e $MRT_{0-\infty}$ (h) para o FIP para os três grupos.

Embora tenha sido observado aumento na C_{max} de FIP com o aumento da dose, os valores encontrados para o Grupo 2 ($5,40 \pm 2,10 \mu g \cdot mL^{-1}$) e 3 ($5,80 \pm 2,39 \mu g \cdot mL^{-1}$) não se diferenciaram estatisticamente entre si. O mesmo foi observado para a ASC_{0-t} (Grupo 2 = $442,39 \pm 137,25 \mu g/mL \cdot h$ e Grupo 3 = $421,32 \pm 102,84 \mu g/mL \cdot h$). O incremento na dose de 4 para 6 mg/kg não levou a um aumento significativo na biodisponibilidade do FIP o que pode estar relacionado com o efeito de primeira passagem sofrido pelo fármaco, pois em mamíferos o FIP é rapidamente metabolizado em SULF por reação de oxidação catalisada pela isoforma CYP3A4 do citocromo P450 (WANG *et al.*, 2016).

A conversão de FIP em SULF ocorreu rapidamente nas três doses administradas. As C_{max} de SULF corresponderam a pelo menos 50% da C_{max} de FIP em cada grupo. A alta conversão de FIP em SULF por meio do metabolismo hepático já foi relatada após administração oral em ratos (CHATA *et al.*, 2019; ROQUES *et al.*, 2012).

A biotransformação do FIP não foi dose-dependente, uma vez que não foram observadas diferenças significativas para os valores de C_{max} e AUC_{0-t} da SULF entre as doses. Embora SULF seja o principal metabólito ativo do FIP em mamíferos, diferenças nos microsomas hepáticos entre as espécies devem ser consideradas (TANG *et al.*, 2004) e, portanto, dados sobre o processo de biotransformação do FIP em cães ainda precisam ser melhores investigados.

A depuração (Cl/F) do FIP por via oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg foi $0,0046 \pm 0,008$, $0,076 \pm 0,032$ e $0,106 \pm 0,0026$ (mg)/($\mu g \cdot mL^{-1}$)/h, respectivamente e aumentou significativamente ($p < 0,05$) com a dose. Não foram observadas diferenças significativas na depuração da SULF em relação à dose.

A combinação dos resultados relativamente altos obtidos para $MRT_{0-\infty}$ (h) e $T_{1/2}$ (h) para FIP e para SULF nas três doses administradas juntamente com as baixas taxas de constante de eliminação de ($\lambda_z h^{-1}$) sugerem a lenta eliminação FIP e SULF. De acordo com Gupta e colaboradores (2014), a meia-vida prolongada do FIP no sangue (150-245 h) pode refletir da sua liberação lenta pela gordura corporal.

Os resultados dos parâmetros farmacocinéticos do FIP e SULF (Tabela 6) indicaram perfil de rápida absorção e biotransformação e lenta eliminação, corroborando com os resultados descritos por dos Santos e colaboradores (2020), que já haviam determinado os parâmetros C_{max} , T_{max} , ASC_{0-t} e $T_{1/2}$ também após a administração de FIP em cães pela via oral. Os demais parâmetros farmacocinéticos determinados nesse estudo ainda não haviam sido explorados na literatura em cães pela via oral.

4.5 Proporcionalidade de Dose

Os dados da análise de proporcionalidade de dose observados nesse estudo estão demonstrados na Tabela 7 e na Figura 12.

Tabela 7 - Avaliação da proporcionalidade de dose do fipronil (2, 4 e 6 mg/kg) ajustados para o modelo de potência com limite de confiança de 95% (n = 6).

Parâmetros Farmacocinéticos	Intercepto	Inclinação		Limite de Confiança		Dose Proporcional
		Estimativa	DP	Máximo	Mínimo	
Cmax	0,2589	0,7653	0,1255	0,4856	1,045	Não
ASC0-t	2,440	0,3209	0,1072	0,0849	0,5570	Não

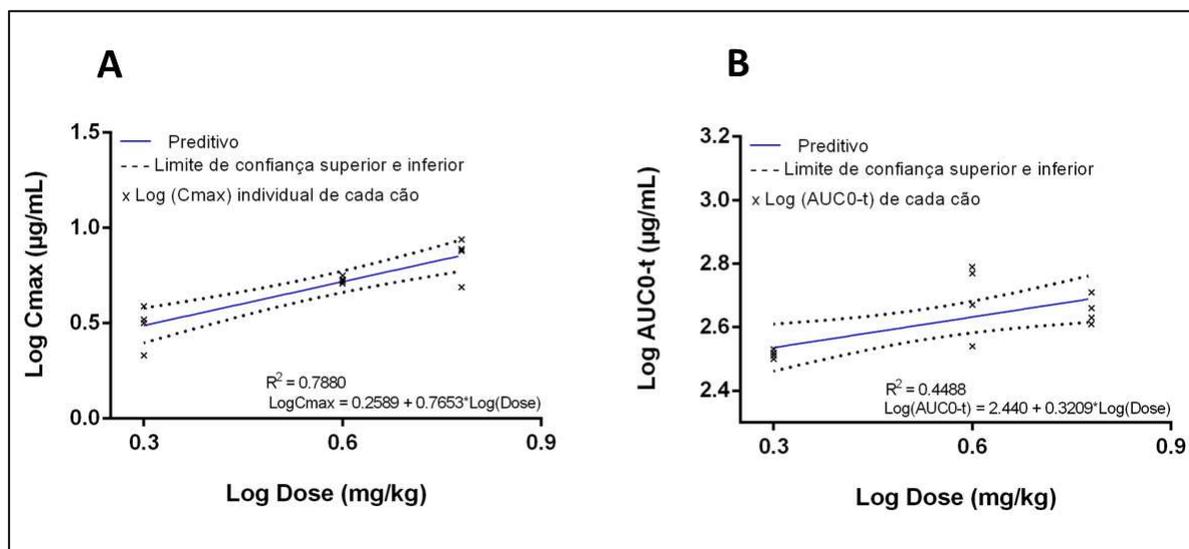


Figura 12 - Log do Cmax (A) e ASC0-t (B) do Fipronil versus log da dose após administração oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg em cães Beagles. Linhas tracejadas representam o intervalo de confiança de 95%. Linhas azuis representam o ajuste utilizando regressão linear. (x) representam os valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos em de cada animal.

Nesse estudo, após administração oral do FIP em doses únicas de 2, 4 e 6 mg/kg em cães, não foi observada proporcionalidade de dose a partir do modelo de potência. Os valores de β (inclinação) observados (Cmax = 0,7653 e ASC0-t = 0,3209) estavam fora do intervalo de confiança de 95% entre 0,8 e 1,25. Uma vez que esses parâmetros não aumentaram proporcionalmente com a dose, acredita-se que o processo de absorção foi saturado devido algum processo fisiológico (HUMMEL *et al.*, 2009). A falta de proporcionalidade de dose (implicando em farmacocinética não linear) pode ser devido a muitos mecanismos, mas é normalmente devido à saturação de algum componente do sistema, como enzimas metabolizantes ou transportadores (EISENBLAETTER *et al.*, 2011). Essa mesma limitação na absorção foi também observada quando analisamos os valores de Cmax e ASC0-t dos Grupos 2 e 3, pois os mesmos não apresentaram diferença significativas entre si ($p > 0,05$).

Até onde sabemos a farmacocinética linear do FIP ainda não havia sido avaliada em cães pela via oral. No entanto, Chang e colaboradores (2020) encontraram proporcionalidade de dose quando o FIP foi administrado pela via oral em ratos usando uma faixa mais ampla de doses (3, 10 e 30 mg/kg).

4.6 Análise da Relação Farmacocinética e Eficácia Ectoparasiticida

Para avaliação da relação foi utilizado o somatório das concentrações de FIP e SULF, pois os valores das concentrações individuais de FIP em cada animal não foram conclusivos em relação às eficácias individuais apresentadas. Além disso, para realizar o cálculo da EC90, o modelo utilizado (Emax) não se ajustou quando foram utilizadas somente as concentrações plasmáticas de FIP. Como já é de conhecimento, a SULF também atua no receptor GABA e acredita-se que ela apresenta maior toxicidade em relação ao FIP (WANG *et al.*, 2016 e WANG *et al.*, 2018), não invalidando a sua utilização para a avaliação da eficácia. No entanto, dados referentes à eficácia somente da SULF contra *C. felis felis* e *R. sanguineus* ainda precisam ser explorados.

A relação entre os perfis de concentração de FIP + SULF no plasma canino *versus* tempo e os dados de eficácia nas diferentes doses estão demonstrados nas Figuras 13 A, B e C.

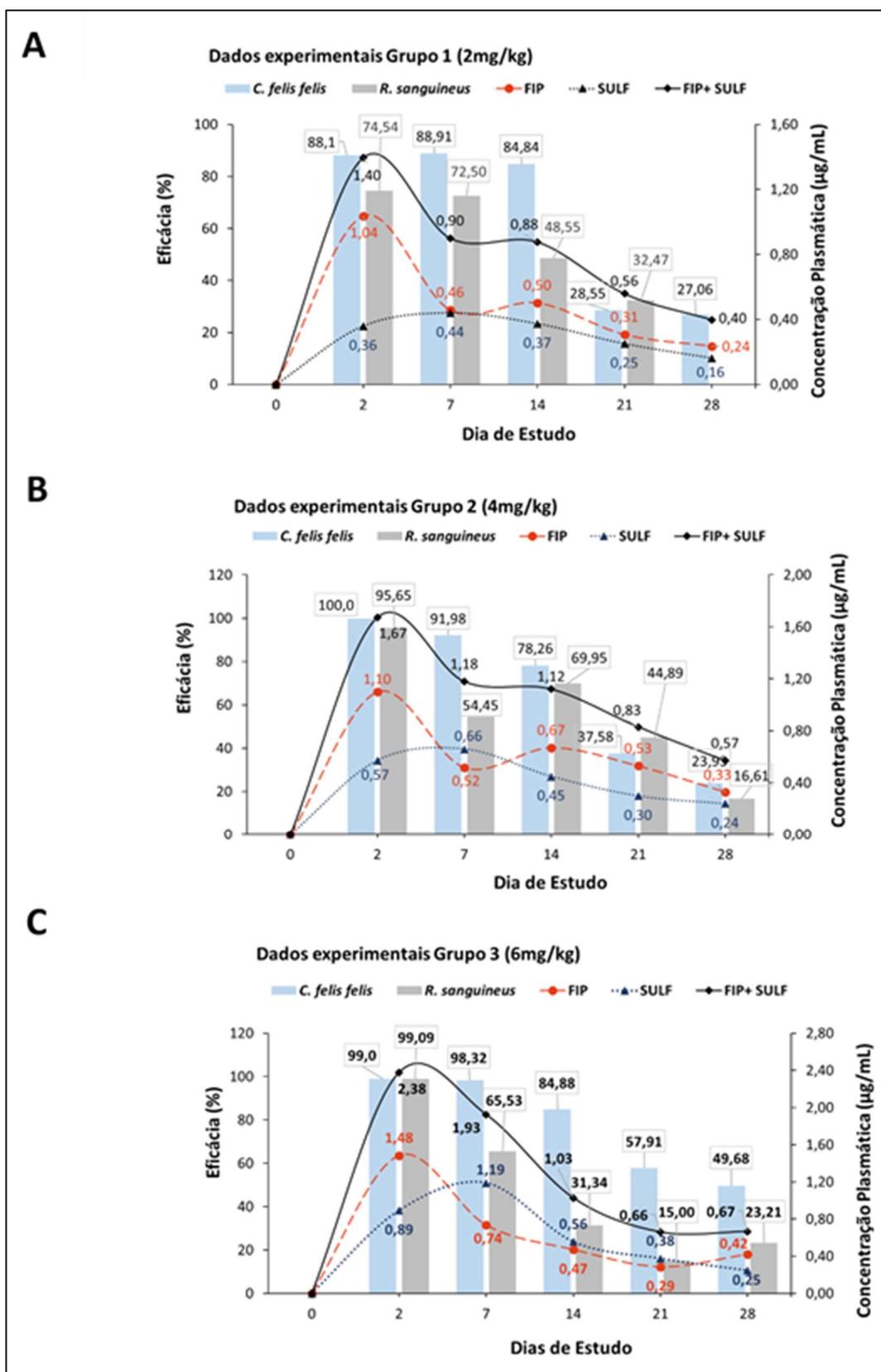


Figura 13 - % Média de eficácia contra *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus* versus concentração plasmática-tempo (FIP, SULF e FIP + SULF) após administração oral de FIP a cães Beagles nas doses de (A) 2 mg/kg - Grupo 1, (B) 4 mg/kg - Grupo 2 e (C) 6 mg/kg - Grupo 3.

De forma geral foram observados os dados de concentrações plasmáticas e eficácia dos Grupos 2 (4 mg/kg) e 3 (6 mg/kg), uma vez que nesses grupos foram atingidos níveis de concentrações que proporcionaram valores superiores a 90% de eficácia para pulga e para carrapato.

Foi possível observar que níveis de 100% de eficácia foram atingidos quando as pulgas foram expostas a uma concentração superior a 1,67 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de FIP+SULF (dia +2, Grupo 2). Nos dias +7, as concentrações de FIP + SULF dos Grupos 2 (1,18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 3 (1,93 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) mantiveram os níveis de eficácia para pulga acima de 90%. Em níveis de concentração inferiores a 1,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (dia +14), foi possível observar valores de eficácia 78,26 e 84,88, para os Grupos 2 e 3, respectivamente. Abaixo de 0,83 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ os níveis de eficácia variam de 23 a 57% (dias +21 e +28).

Em relação à eficácia contra carrapatos, concentrações superiores a 2,38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de FIP + SULF foram necessárias para atingir um nível de controle de 99,09 % (dia +2), enquanto concentrações entre 0,90 - 1,93 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ fornecem níveis de eficácia variando de 54,45 a 96,7% (dias +2 e +7) e concentrações abaixo de 0,90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não atingiram mais de 50% de eficácia (dias +14 a +28).

Nesse estudo, como o efeito foi observado fora do corpo do animal, em um organismo secundário (pulgas e carrapatos), optamos por utilizar o termo eficácia. O estudo da relação farmacocinética-eficácia foi realizado utilizando o modelo Sigmoidal Emax, com os valores de concentrações plasmáticas individuais e eficácia apresentada em cada animal no período de 48 horas após o tratamento.

Na Tabela estão demonstrados os dados referentes ao cálculo da CE90 estimados pelo modelo PD Sigmoidal Emax.

Tabela 8 - Parâmetros farmacodinâmicos do fipronil utilizando modelo de Emax após administração oral nas doses 2, 4 e 6 mg/kg (n = 18).

Parâmetro	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Ctenocephalides felis felis</i>
Emax (%)	97,80	98,05
EC50 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,67	0,65
Gamma	2,80	4,54
EC90 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	2,16	1,30
R ²	0,892	0,958

Emax = Efeito máximo determinado pelo modelo.

CE50 = Concentração Plasmática do fármaco a 50% do Emax ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

CE90 = Concentração Plasmática do fármaco a 90% do Emax ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Gamma = Inclinação da curva concentração plasmática x efeito.

Os valores de EC90 (FIP + SULF) estimados pelo modelo para *C. felis felis* (CE 90 = 1,30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e para *R. sanguineus* (CE 90 = 2,16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram próximos dos valores observados na relação entre do perfil concentração *versus* tempo de FIP + SULF no plasma canino e os dados de eficácia acima de 90%, 1,67 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 2,38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para pulgas e carrapatos, respectivamente (Figura 13).

A relação da eficácia do FIP contra pulga e carrapato em função da dose administrada também foi avaliada usando um modelo sigmoidal para os três diferentes grupos (1, 2 e 3) e está representada na Figura 14 A e B, respectivamente.

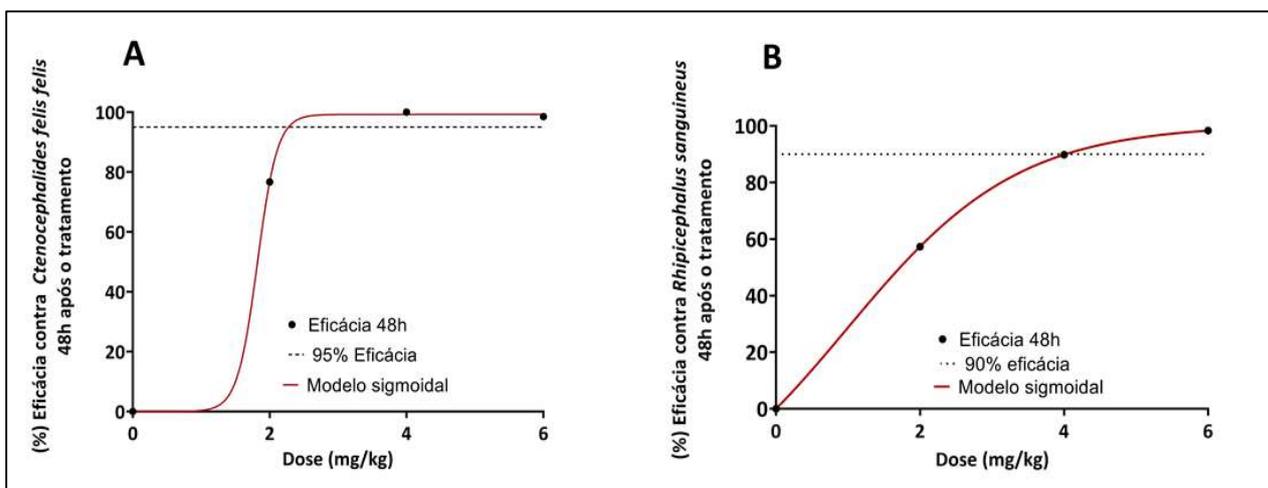


Figura 14 – Percentual médio de eficácia contra *Ctenocephalides felis felis* (A) e *Rhipicephalus sanguineus* (B) versus a dose após administração oral de FIP a cães Beagle. A linha vermelha representa o ajuste ao modelo sigmóide e o símbolo são os valores experimentais 48 horas após o tratamento.

A relação dose *versus* eficácia aponta para uma variação na eficácia dependendo da dose administrada. O controle efetivo foi observado para *R. sanguineus* e *C. felis felis* tanto na dose de 4 mg/kg quanto na dose de 6 mg/kg, ou seja, uma dose a partir de 4 mg/kg é capaz de produzir níveis de eficácia acima de 95% para pulgas e carrapatos em 48 horas. Os produtos utilizados no controle de ectoparasitas devem atingir padrões de eficácia para serem registrados, variando entre 90 e 95% de eficácia em 24 ou 48 horas dependendo do órgão regulador (MARCHIONDO *et al.*, 2013).

Pelo que sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar a relação entre a extensão da absorção de FIP administrado por via oral em cães e sua eficácia contra pulgas e carrapatos. Clinicamente, não foram observadas reações adversas em nenhum dos cães tratados com comprimidos.

O uso do FIP como antiparasitário pela via oral tem sido encorajado através da avaliação da eficácia contra diferentes espécies de ectoparasitos em diferentes animais apresentando resultados bastante promissores. Em alguns desses estudos foram observados valores de eficácia iguais a 100% contra larvas de mosquito em ratos (INGENLOFF *et al.*, 2013), 100% contra de larvas e adultos de mosquitos em bovinos (POCHÉ *et al.*, 2013) e 100% contra pulgas (POCHÉ *et al.*, 2018) e larvas de carrapatos (POCHÉ *et al.*, 2020) em roedores.

Apesar de ter sido observado nesse estudo a eficácia do FIP pela via oral por um curto período de tempo, não sendo eficaz contra reinfestação por pulgas após 14 dias e carrapatos após sete dias, o seu uso pela via oral demonstrou-se promissor. O ideal seria manter níveis de concentrações plasmáticas que mantivessem a eficácia por um período mais longo. Foi possível determinar as concentrações que proporcionam eficácia máxima contra os dois ectoparasitas, sendo assim, uma alternativa farmacêutica para a manutenção dessas concentrações seria propor um sistema de liberação modificada do FIP que permitisse essa manutenção, já que o ajuste de administração do FIP não é recomendado devido sua toxicidade. Muitos ativos farmacêuticos

exibem baixa biodisponibilidade devido a sua baixa solubilidade aquosa e a baixa permeabilidade. Algumas estratégias empregadas na tecnologia farmacêutica são capazes de aumentar a biodisponibilidade desses ativos através de modificações no sistema de liberação de fármacos (SONG *et al.*, 2016).

Uma nova formulação por via oral contendo FIP para controle de ectoparasitas em cães poderia ser alternativa mais segura para animais, seres humanos e meio ambiente, alinhado ao conceito de Saúde Única. No entanto, ainda se faz necessário dados relacionados à eliminação do FIP e seus metabólitos pelas fezes a partir dessa formulação, para garantir a redução de sua liberação no meio ambiente.

5 CONCLUSÃO

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar a extensão da absorção do FIP administrado pela via oral em cães e relacioná-la com a sua eficácia contra pulgas carrapatos

Nas doses administradas o FIP apresentou perfil farmacocinético pela via oral em cães de rápida absorção, metabolização e lenta eliminação. A biotransformação do FIP em cães demonstrou não ser dependente da dose administrada. A SULF também apresentou perfil de lenta eliminação e sugeriu permanecer por mais tempo no organismo que o FIP.

Foi possível determinar as concentrações de FIP + SULF capazes de fornecer eficácia igual e superior a 90% para pulgas e carrapatos, demonstrando o potencial para o uso do FIP pela via oral no controle de ectoparasitas em cães, em uma dose única na dosagem de 4 mg/kg. No entanto, apesar de atingir níveis de plasmáticos que proporcionassem eficácia máxima contra os ectoparasitas, esses níveis não se mantiveram suficientes para controlar as reinfestações após 14 dias, sendo necessário repensar em uma nova formulação uma vez que administrações sucessivas de FIP não são recomendadas devido a sua toxicidade.

O potencial da administração oral como uma via alternativa de tratamento em cães encoraja o desenvolvimento de sistemas de controle de liberação de FIP.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABINPET. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Disponível em: Abinpet.org.br | Mercado Acesso: 25/11/2020.
- ABREU, M. R., DELALIBERA JUNIOR, I., PEREIRA, N. R. C., CAMARGO-MATHIAS, M. I. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) to Ozonated Water: Integument Response Ozone. **Science & Engineering**, v. 42, n. 6, p. 1–10, 2020.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de boas práticas em Biodisponibilidade: Bioequivalência/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos. Brasília, 2002.
- ARISOV, M. V., INDYUHOVA, E. N., ARISOVA, G. B. Pharmacokinetics of combination antiparasitic drug preparation for dogs and cats in the form of spot-on solution. **Journal of advanced veterinary and animal research**, v. 6, n. 1, p. 25–32, 2019.
- ARMSTRONG, R. D., LIEBENBERG, J. E., HEANEY, K., GUERINO, F. Flea (*Ctenocephalides felis*) control efficacy of topical indoxacarb on dogs subsequently bathed with a chlorhexidine-ketoconazole shampoo. **Australian Veterinary Journal**, v. 93, n. 8, p. 293–294, 2015.
- AYRES, M., AYRES J. R. M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BioEstat 4.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá/Imprensa Oficial do Estado do Pará, Belém, 4ª Edição, 324 p., 2007.
- BAUER, E. C., OGG, C.L., STONE D.L. Protecting Your Cats and Dogs from Pesticide Poisoning. **NebGuide**, 2015.
- BEUGNET, F., LIEBENBERG, J., HALOS, L. Comparative speed of efficacy against *Ctenocephalides felis* of two oral treatments for dogs containing either afoxolaner or fluralaner. **Veterinary Parasitology**, v. 207, p. 297–301, 2015.
- BEUGNET, F., MARIÉ, J. LOU. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 298–305, 2009.
- BHARDWAJ, U., KUMAR, R., KAUR, S., SAHOO, S. K., MANDAL, K., BATTU, R.S., SINGH, B. Persistence of fipronil and its risk assessment on cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 301–308, 2012.
- BITAM, I. DITTMAR, K., PAROLA, P., WHITING, M. F., & RAOULT, D. Fleas and flea-borne diseases. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. e667-e676, 2010.
- BLAGBURN, B. L., YOUNG, D. R., MORAN, C., MEYER, J. A., LEIGH-HEFFRON, A., PAARLBERG, T., SNYDER, D. E. Effects of orally administered spinosad (Comfortis®) in dogs on adult and immature stages of the cat flea (*Ctenocephalides felis*). **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 3-4, p. 312-317, 2010.
- BONMATIN, J.M., GIORIO, C., GIROLAMI, V., GOULSON, D., KREUTZWEISER, D. P., KRUPKE, C., TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 35-67, 2015.

BOUHSIRA, E., YOON, S. S., ROQUES, M., MANAVELLA, C., VERMOT, S., CRAMER, L. G., FRANC, M. Efficacy of fipronil, amitraz and (S)-methoprene combination spot-on for dogs against adult dog fleas (*Ctenocephalides canis*, Curtis, 1826). **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 4, p. 351-353, 2011.

BRASIL. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do conselho nacional de controle de experimentação animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e sua secretaria-executiva, cria o cadastro das instituições de uso científico de animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jul. 2009

BRASIL. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 dez. 2008.

BUDD, R., ENSMINGER, M., WANG, D., & GOH, K. S. Monitoring fipronil and degradates in California surface waters, 2008–2013. **Journal of Environmental Quality**, v. 44, n. 4, p. 1233-1240, 2015.

CAVALLERI, D., MURPHY, M., SEEWALD, W., DRAKE, J., NANCHEN, S. Assessment of the speed of flea kill of lotilaner (Credelio™) throughout the month following oral administration to dogs. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2017.

CHANG, Y. N., TSAI, T. H. Preclinical transplacental transfer and pharmacokinetics of fipronil in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, 48, 886–893, 2020.

CHATA, C., PALAZZI, P., GROVA, N., HAAN, S., EMOND, C., VAILLANT, M., APPENZELLER, B. M. Blood pharmacokinetic of 17 common pesticides in mixture following a single oral exposure in rats: implications for human biomonitoring and exposure assessment. **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 10, p. 2849–2862, 2019.

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

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

COCHRAN, R. C., YU, L.; KRIEGER, R. I.; ROSS, J. H. Post application Fipronil Exposure Following Use on Pets. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 78, n. 19, p. 1217–1226, 2015.

COLES, T. B., DRYDEN, M. W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.

COMAC. Comissão de Animais de Companhia. Disponível em: Mercado – COMAC (comacvet.org.br) Acesso: 25/11/2020.

CRAVEDI, J. P., DELOUS, G., ZALKO, D., VIGUIÉ, C., & DEBRAUWER, L. Chemosphere Disposition of fipronil in rats. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2276–2283, 2013.

CVEJIĆ, D. SCHNEIDER, C., NEETHLING, W., HELLMANN, K., LIEBENBERG, J., NAVARRO, C. The sustained speed of kill of ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) and fleas (*Ctenocephalides felis felis*) on dogs by a spot-on combination of fipronil and permethrin (Effitix®) compared with oral afoxolaner (NexGard®). **Veterinary Parasitology**, v. 243, n. June, p. 52–57, 2017.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3, p. 173–185, 2008.

DANTAS-TORRES, F., LATROFA, M. S., RAMOS, R. A. N., LIA, R. P., CAPELLI, G., PARISI, A. Biological compatibility between two temperate lineages of brown dog ticks, *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato). **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

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

DE ALMEIDA, G. P. S., CAMPOS, D. R., AVELAR, B. R. D., SILVA, T. X. D. A. D., LAMBERT, M. M., ALVES, M. S. R., CORREIA, T. R. Development of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in different substrates for maintenance under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 2, p. 1–5, 2020.

DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; PLANETA, C. S.; GALLACCI, M.; AVELLAR, M.C.W., (Eds). **Farmacologia Integrada**. 5. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. 701p.

DOS SANTOS, G. C. M., ROSADO, L. H. G., ALVES, M. C. C., DE PAULA LIMA, I., FERREIRA, T. P., BORGES, D. A., CID, Y. P. Fipronil Tablets: Development and Pharmacokinetic Profile in Beagle Dogs. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 1, 2020.

DYK, M.B., LIU, Y., CHEN, Z., VEGA, H., KRIEGER, R.I. Fate and distribution of fipronil on companion animals and in their indoor residences following spot-on flea treatments. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 47, n. 10, p. 913–924. 2012.

EADS, DAVID A., BIGGINS, D. E., BOWSER, J., BROERMAN, K., LIVIERI, T. M., CHILDERS, E., GRIEBEL, R. L. Evaluation of five pulicides to suppress fleas on black-tailed prairie dogs: encouraging long-term results with systemic 0.005% fipronil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 19, n. 6, p. 400–406, 2019.

EISENBLAETTER, T.; TEICHERT, L. **Dose Linearity and Proportionality. Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology**, p. 23–40, 2011.

ENSMINGER, M., BUDD, R., KELLEY, K. C., & GOH, K. S. Pesticide occurrence and aquatic benchmark exceedances in urban surface waters and sediments in three urban areas of California, USA, 2008–2011. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 5, p. 3697–3710, 2013.

ESCCAP Guideline 03 –**Control of Ectoparasites in Dogs and Cats**. European Scientific Counsel Companion Animal Parasites, Sixth edition, 2018.

ESCCAP Guideline 05 - **Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats**. European Scientific Counsel Companion Animal Parasites, Third edition, 2019.

FURIHATA, S., KASAI, A., HIDAKA, K., IKEGAMI, M., OHNISHI, H., & GOKA, K. Ecological risks of insecticide contamination in water and sediment around off-farm irrigated rice paddy fields. **Environmental Pollution**, v. 251, p. 628-638, 2019.

GALLO-NETO, M. **Modelagem farmacocinética e análise de sistemas lineares para a predição da concentração de medicamentos no corpo humano**. Dissertação de Mestrado – Escola Politécnica. Universidade de São Paulo, 2012.

GOTO, A., ABE, S., KOSHIBA, S., YAMAGUCHI, K., SATO, N., KURAHASHI, Y. Current status and future perspective on preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic (PK/PD) analysis: Survey in Japan pharmaceutical manufacturers association (JPMA). **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 34, n. 2, p. 148–154, 2019.

GOUGH, K., HUTCHISON, M., KEENE, O., BYROM, B., ELLIS, S., LACEY, L., MCKELLAR, J. Assessment of dose proportionality: Report from the statisticians in the pharmaceutical industry/pharmacokinetics UK joint working party. **Therapeutic Innovation & Regulatory Science**, v. 29, n. 3, p. 1039–1048, 1995.

GRAY, J., DANTAS-TORRES, F., ESTRADA-PEÑA, A., LEVIN, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 171–180, 2013.

GUNASEKARA, A. S., TRUONG, T., GOH, K. S., SPURLOCK, F., & TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, n. 3, p. 189–199, 2007.

GUPTA, R. C.; ANADÓN, A. **Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles**. Academic press. Third Edition, p. 533–538, 2018.

GUPTA, R. C.; MILATOVIC, D. Insecticides. **Biomarkers in Toxicology**, 2014.

HALOS, L., CARITHERS, D. S., SOLANKI, R., STANFORD, H., GROSS, S. J. Preference of Dogs between Two Commercially Available Oral Formulations of Ectoparasiticide Containing Isoxazolines Afoxolaner or Fluralaner. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 5, n. 02, p. 25, 2015.

HALOS, L., FOURIE, J. J., FANKHAUSER, B., BEUGNET, F. Knock-down and speed of kill of a combination of fipronil and permethrin for the prevention of *Ctenocephalides felis* flea infestation in dogs A new combination of fipronil and permethrin for the control of ectoparasites of dogs. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2016.

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

HUMMEL, J., MCKENDRICK, S., BRINDLEY, C., FRENCH, R. Exploratory assessment of dose proportionality: Review of current approaches and proposal for a practical criterion. **Pharmaceutical Statistics**, v. 8, n. 1, p. 38–49, 2009.

INGENLOFF, K. GARLAPATI, R., POCHÉ, D., SINGH, M. I., REMMERS, J. L., POCHÉ, R. M. Feed-through insecticides for the control of the sand fly *Phlebotomus argentipes*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 1, p. 10-18, 2013.

ISLAM, R.; LYNCH, J. W. Mechanism of action of the insecticides, lindane and fipronil, on glycine receptor chloride channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 8, p. 2707–2720, 2012.

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

LEE, S. J., MULAY, P., DIEBOLT-BROWN, B., LACKOVIC, M. J., MEHLER, L. N., BECKMAN, J., CALVERT, G. M. Acute illnesses associated with exposure to fipronil-surveillance data from 11 states in the United States, 2001-2007. **Clinical Toxicology**, v. 48, n. 7, p. 737–744, 2010.

LEGHAIT, J., GAYRARD, V., PICARD-HAGEN, N., CAMP, M., PERDU, E., TOUTAIN, P. L., VIGUIÉ, C. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**, v. 255, n. 1–2, p. 38–44, 2009.

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

LINARDI, P. M.; SANTOS, J. L. C. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 345–354, 2012.

MAGALHÃES, J. Z., SANDINI, T. M., UDO, M. S. B., FUKUSHIMA, A. R., DE SOUZA SPINOSA, H. Fipronil: usos, características farmacológicas e toxicológicas. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 11, n. 1, p. 67–83, 2018.

MALEKI-RAVASAN, N., SOLHJOUY-FARD, S., BEAUCOURNU, J. C., LAUDISOIT, A., MOSTAFAVI, E. The Fleas (Siphonaptera) in Iran: Diversity, Host Range, and Medical Importance. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1–24, 2017.

MARCHIONDO, A. A., HOLDSWORTH, P. A., FOURIE, L. J., RUGG, D., HELLMANN, K., SNYDER, D. E., DRYDEN, M. W. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition: Guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestations on dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v. 194, n. 1, p. 84–97, 2013.

MCMAHEN, R. L., STRYNAR, M. J., DAGNINO, S., HERR, D. W., MOSER, V. C., GARANTZIOTIS, S., LINDSTROM, A. B. Identification of fipronil metabolites by time-of-flight mass spectrometry for application in a human exposure study. **Environment International**, v. 78, p. 16–23, 2015.

MCMAHEN, R. L., STRYNAR, M. J., MCMILLAN, L., DEROSE, E., LINDSTROM, A. B. Comparison of fipronil sources in North Carolina surface water and identification of a novel

fipronil transformation product in recycled wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 569–570, p. 880–887, 2016.

MCNAIR, C. M. Ectoparasites of medical and veterinary importance: Drug resistance and the need for alternative control methods. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 351–363, 2015.

MEADOWS, C., GUERINO, F., SUN, F. Estudo de campo, randomizado, cego, controlado, realizado nos EUA para avaliar o uso de fluralaner solução tópica no controle de infestações de pulgas felinas. **Parasites & Vectors**, 10:37, 2017.

MELO, R. C., TAVARES, P. V., BATISTA, L. C. S. O., CARNEIRO, M. B., CORREIA, T. R., CID, Y. P., COUMENDOUROS, K., SCOTT, F. B. Eficácia do fipronil oral no controle de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) e *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) em cães. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 34, 15–20, 2012.

MENDES, T. D. M., T., BALBINO, J. N. F., SILVA, N. C. T., DE FARIAS, L. A. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*: a review on the prospects, distribution and resistance. **Revista PubVet**, p. 127, 2019.

MICHEL, N., FREESE, M., BRINKMANN, M., POHLMANN, J. D., HOLLERT, H., KAMMANN, U., HANEL, R. Fipronil and two of its transformation products in water and European eel from the river Elbe. **Science of The Total Environment**, v. 568, p. 171-179, 2016.

MIZE, S. V.; PORTER, S. D.; DEMCHECK, D. K. Influence of fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate communities in streams of southwestern Louisiana, USA. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 2, p. 491–503, 2008.

MOHAMED, F., SENARATHNA, L., PERCY, A., ABEYEWARDENE, M., EAGLESHAM, G., CHENG, R., EDDLESTON, M. Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil - A GABAA-gated chloride channel blocker. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 42, n. 7, p. 955–963, 2004.

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

NARAHASHI, T., ZHAO, X., IKEDA, T., NAGATA, K., YEH, J. Z. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. **Human & Experimental Toxicology**, v. 26, n. 4, p. 361-366, 2007.

NAVA, S., BEATI, L., VENZAL, J. M., LABRUNA, M. B., SZABÓ, M. P., PETNEY, T., ESTRADA-PENÑA, A. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 6, p. 1573-1585, 2018.

OLIVEIRA, I. M. S., DO CARMO, I. B., CRUZ, J. H. S., DOS SANTOS, M. J., DE FARIAS. A importância dos endoparasitoides e ectoparasitoides em animais domésticos - Revisão. **Revista Pubvet**, v. 11, n. 3, p. 281–284, 2017.

- OTRANTO, D., DANTAS-TORRES, F., TARALLO, V. D., DO NASCIMENTO RAMOS, R. A., STANNECK, D., BANETH, G. DE CAPRARIIS, D. Apparent tick paralysis by *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3–4, p. 325–329, 2012.
- PAROLA, P. *Rickettsia felis*: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in sub-Saharan Africa. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 7, p. 996–1000, 2011.
- PERKINS, R., WHITEHEAD, M., CIVIL, W., GOULSON, D. Potential role of veterinary flea products in widespread pesticide contamination of English rivers. **Science of The Total Environment**, v. 755, p. 143560, 2021.
- PFISTER, K.; ARMSTRONG, R. Systemically and cutaneously distributed ectoparasiticides: A review of the efficacy against ticks and fleas on dogs. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, 2016.
- POCHÉ, D. M., FRANCKOWIAK, G., CLARKE, T., TSEVEENJAV, B., POLYAKOVA, L., & POCHÉ, R. M. Efficacy of a low dose fipronil bait against blacklegged tick (*Ixodes scapularis*) larvae feeding on white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) under laboratory conditions. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2020.
- POCHÉ, D. M., TORRES-POCHÉ, Z., YESZHANOV, A., POCHE, R. M., BELYAEV, A., DVOŘÁK, V., AIMAKHANOV, B. Field evaluation of a 0.005 % fipronil bait, orally administered to *Rhombomys opimus*, for control of fleas (Siphonaptera: Pulicidae) and phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Central Asian Republic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006630, 2018.
- POCHÉ, R. M., GITHAKA, N., VAN GOOL, F., KADING, R. C., HARTMAN, D., POLYAKOVA, L., LOZANO-FUENTES, S. Preliminary efficacy investigations of oral fipronil against *Anopheles arabiensis* when administered to Zebu cattle (*Bos indicus*) under field conditions. **Acta Tropica**, v. 176, p. 126 -133, 2017.
- POCHÉ, R. M., GARLAPATI, R., SINGH, M. I., POCHÉ, D. M. Evaluation of Fipronil Oral Dosing to Cattle for Control of Adult and Larval Sand Flies Under Controlled Conditions Evaluation of Fipronil Oral Dosing to Cattle for Control of Adult and Larval Sand Flies Under Controlled Conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 4, p. 833–837, 2013.
- POLITI, F. A. S., SOUZA-MOREIRA, T. M., RODRIGUES, E. R., DE QUEIROZ, G. M., FIGUEIRA, G. M., JANUÁRIO, A. H., PIETRO, R. C. L. R. Chemical characterization and acaricide potential of essential oil from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) against engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Parasitology Research**, v. 112, n. 6, p. 2261–2268, 2013.
- RANG, R., RITTER, J. M., FLOWER, R. J., HENDERSON, G. Rang & Dale **Farmacologia**. Elsevier Brasil. 2015.
- REMONDEGUI, C. Tick paralysis cases in Argentina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 533-534, 2012.
- RIVIERE, J. E. **Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications**, Second Edition. 2011.

- ROMERO, A., RAMOS, E., ARES, I., CASTELLANO, V., MARTÍNEZ, M., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R., MARTÍNEZ, M. A. Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. **Toxicology Letters**, v. 252, p. 42–49, 2016.
- ROQUES, B. B., LACROIX, M. Z., PUEL, S., GAYRARD, V., PICARD-HAGEN, N., JOUANIN, I., PERDU, E., MARTIN, P. G., & VIGUIÉ, C. CYP450- Dependent biotransformation of the insecticide fipronil into fipronil sulfone can mediate fipronil-induced thyroid disruption in rats. **Toxicological Sciences**, 127, 29–41, 2012.
- RUST, M. K. The biology and ecology of cat fleas and advancements in their pest management: a review. **Insects**, v. 8, n. 4, p. 118, 2017.
- SADARIA, A. M., SUTTON, R., MORAN, K. D., TEERLINK, J., BROWN, J. V., HALDEN, R. U. Passage of fiproles and imidacloprid from urban pest control uses through wastewater treatment plants in northern California, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 1473–1482, 2017.
- SÁNCHEZ-MONTES, S., SALCEDA-SÁNCHEZ, B., BERMÚDEZ, S. E., AGUILAR-TIPACAMÚ, G., BALLADOS-GONZÁLEZ, G. G., HUERTA, H., COLUNGA-SALAS, P. *Rhipicephalus sanguineus* Complex in the Americas: Systematic, Genetic Diversity, and Geographic Insights. **Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1118, 2021.
- SHARGEL, L., WU-PONG, S., YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5ª Edição, Editora McGraw-Hill. São Paulo, SP.2004
- SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Mercado Veterinário por Espécie Animal e Classe Terapêuticas. Disponível em: SINDAN | Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal Acesso: 23/11/2020.
- SKOTARCZAK, B. The role of companion animals in the environmental circulation of tick-borne bacterial pathogens. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 25, n. 3, p. 473–480, 2018.
- SLUIJS V., JEROEN P., AMARAL-ROGERS, V., BELZUNCES, L. P., VAN LEXMOND, M. B., BONMATIN, J. M., CHAGNON, M., WIEMERS, M. Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 148-154, 2015.
- SMITH, B. P., VANDENHENDE, F. R., DESANTE, K. A., FARID, N. A., WELCH, P. A., CALLAGHAN, J. T., FORGUE, S. T. Confidence interval criteria for assessment of dose proportionality. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 10, p. 1278–1283, 2000.
- SONG, Y., PERESSIN, K., WONG, P. Y., PAGE, S. W., GARG, S. Key Considerations in Designing Oral Drug Delivery Systems for Dogs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 105 (5), 1576-1585, 2016.
- SOUZA, A.P., PAIM, F., BELLATO, V., SARTOR, A. A., MOURA, A. B., ROSA, L. D., MIQUELLUTI, D. J. Avaliação da eficácia do fipronil em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em tratamentos consecutivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n.1, p.55-60, 2014.

- STARR, J. M., LI, W.; GRAHAM, S. E.; BRADHAM, K. D.; STOUT II, D. M.; WILLIAMS, A.; SYLVA, J. Using paired soil and house dust samples in an in vitro assay to assess the post ingestion bioaccessibility of sorbed fipronil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 312, p. 141–149, 2016.
- TANG, J., AMIN USMANI, K., HODGSON, E., ROSE, R. L. In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. **Chemico-Biological Interactions**, 147, 319–329, 2004.
- TATIBANA, L. S., COSTA-VAL, A. P. Relação homem-animal de companhia e o papel do médico veterinário. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**, n. 103. 2009.
- TAVARES, R. B., DE ALMEIDA, G. P. S., CHAVES, J. K. O., CAMPOS, D. R., CORREIA, T. R. Influence of the age of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera, Pulicidae) adults on the response to fipronil in in vitro testing. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 42 p. 1–5, 2020.
- TAYLOR, M. A. Recent Developments in Ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 3, p. 253–268, 2001.
- TEERLINK, J., HERNANDEZ, J., BEBUDD, R. Fipronil washoff to municipal wastewater from dogs treated with spot-on products. **Science of the Total Environment**, v. 599–600, p. 960–966, 2017.
- TESTA, C., SALIS, S.; RUBATTU, N.; RONCADA, P.; MINIERO, R.; BRAMBILLA, G. Occurrence of Fipronil in residential house dust in the presence and absence of pets: a hint for a comprehensive toxicological assessment. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 54, n. 6, p. 441–448, 2019.
- USEPA. Fipronil - Review of incident report for three products. Washington, 2011.
- WANG, K., VASYLIEVA, N., WAN, D., EADS, D. A., YANG, J., TRETEN, T., XU, T. Quantitative Detection of Fipronil and Fipronil-Sulfone in Sera of Black-Tailed Prairie Dogs and Rats after Oral Exposure to Fipronil by Camel Single-Domain Antibody-Based Immunoassays. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 2, p. 1532–1540, 2019.
- WANG, X., MARTÍNEZ, M. A., WU, Q., ARES, I., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R., ANADÓN, A., YUAN, Z. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 876–899, 2016.
- WESTON, D. P.; LYDY, M. J. Toxicity of the insecticide fipronil and its degradates to benthic macroinvertebrates of urban streams. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 1290–1297, 2014.
- WU, J., LU, J., LU, H., LIN, Y. WILSON, P. C. Occurrence and ecological risks from fipronil in aquatic environments located within residential landscapes. **Science of the Total Environment**, v. 518, p. 139-147, 2015.
- ZARDO, V.I.L., PEREIRA, M.L. Segurança, eficácia e praticidade dos ectoparasiticidas para pulgas e carrapatos de cães e gatos. Revisão em clínica médica de pequenos animais, **Investigação**, v. 18, n. 4, p. 22–31, 2019.

ZHANG, W. Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1, 2018.

ZHANG, Y., HUO, M., ZHOU, J., XIE, S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 99, p. 306–314, 2010.

7 ANEXOS

Anexo A – Certificado de aprovação na CEUA-IV/UFRRJ do estudo intitulado “Estudo da relação dose efeito de comprimidos de fipronil no controle de ectoparasitas em cães.”

 UFRRJ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro	Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Veterinária	 CEUA
---	--	---

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da relação dose efeito de comprimidos de fipronil no controle de ectoparasitas em cães", protocolada sob o CEUA nº 4108300818 (02/02/2019), sob a responsabilidade de **Yara Peluso Cid** e equipe; Fabio Barbour Scott; Gabriela Carmelinda Martins dos Santos; Priscila Cardim de Oliveira - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 12/02/2019.

We certify that the proposal "Study of the dose-effect relationship of fipronil tablets in the control of ectoparasites in dogs", utilizing 12 Dogs (males and females), protocol number CEUA 4108300818 (02/02/2019), under the responsibility of **Yara Peluso Cid** and team; Fabio Barbour Scott; Gabriela Carmelinda Martins dos Santos; Priscila Cardim de Oliveira - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 02/12/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2019 a 11/2020** Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária da UFRRJ**

Espécie: Cães	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 2 a 6 anos	N: 12
Linhaagem: Beagle		Peso: 8 a 12 kg	

Local do experimento: O estudo ocorrerá na UFRRJ, Departamento de Parasitologia Animal, no LQEPV. Endereço: BR465 - Km07, CEP23890-00- Seropédica-RJ, BR, coordenadas geográficas 22o 45' 48"S 43o 41' 23"W

Seropédica, 13 de fevereiro de 2019.

 Prof. Dr. Fabio Barbour Scott Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro	A definir Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
--	--

BR 465, Km 7 | Campus da UFRRJ - Seropédica - Rio de Janeiro - CEP: 23890-000 - tel: 55 (21) 2482-2011
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8 às 17h - e-mail: ceuasig@ufrrj.br
CEUA nº 4108300818

Anexo B - Valores das contagens individuais de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* e de pulgas da subespécie *Ctenocephalides felis felis* para o ranqueamento dos cães e divisão dos grupos.

Animal/Grupo	Sexo	Número de pulgas adultas vivas recuperadas	Número de Carrapatos Adultos Vivos e Fixados Recuperados
Grupo 3			
288359	M	100	36
458734	F	100	41
459433	F	0	20
459366	M	85	50
458708	M	47	21
288363	F	4	6
Média		56,00	29,00
Grupo 2			
503633	M	100	22
103356	F	100	47
459359	F	16	48
288429	M	71	22
257913	M	16	10
458721	M	21	5
Média		54,00	25,67
Grupo 1			
503573	M	100	50
458673	F	77	23
044422	F	61	44
503362	M	63	39
503595	M	18	7
376352	F	3	7
Média		53,67	28,33
Controle			
503582	M	100	50
604590	F	76	27
459358	F	56	11
503622	M	60	36
595372	M	17	21
503370	M	23	1
Média		55,33	24,33

Anexo C – Valores das contagens individuais de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, adultos, vivos e fixados recuperados sobre os cães da raça Beagle do grupo e controle e tratado com fipronil em comprimidos nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg.

Grupos	Número de Carrapatos Adultos Vivos e Fixados Recuperados					
	Dia -5	+2	+7	+14	+21	+28
Controle						
503582	50	32	25	28	27	13
604590	27	42	45	34	39	48
459358	11	24	24	40	26	27
503622	36	22	27	43	23	23
595372	21	35	48	50	50	50
503370	1	22	22	2	4	3
Média aritmética	24,33	29,50	31,83	32,83	28,17	27,33
Desvio Padrão	16,00	7,48	10,51	15,41	14,21	17,11
Média Geométrica	16,42	28,62	30,32	24,58	22,87	20,32
Grupo 1						
503573	50	48	32	41	14	36
458673	23	8	0	24	32	16
044422	44	6	17	14	17	36
503362	39	34	30	40	36	30
503595	7	2	3	1	4	12
376352	7	0	8	4	11	26
Média aritmética	28,33	16,33	15,00	20,67	19,00	26,00
Desvio Padrão	17,16	18,09	12,49	15,85	11,37	9,24
Média Geométrica	21,81	7,29	8,34	12,65	15,45	24,15
Eficácia Geométrica (%)		74,54	72,50	48,55	32,47	0,00
Grupo 2						
503633	22	1	27	16	33	29
103356	47	1	24	31	36	31
459359	48	15	17	31	35	42
288429	22	1	30	3	13	17
257913	10	0	8	0	4	8
458721	5	0	2	4	1	4
Média aritmética	25,67	3,00	18,00	14,17	20,33	21,83
Desvio Padrão	16,60	5,39	10,15	12,90	14,81	13,38
Média Geométrica	19,85	1,24	13,81	7,39	12,60	16,95
Eficácia Geométrica (%)		95,65	54,45	69,95	44,89	16,61
Grupo 3						
288359	36	0	20	50	50	40
458734	41	0	26	50	18	23
459433	20	0	16	5	13	16
459366	50	3	5	40	31	32
458708	21	0	12	16	23	37
288363	6	0	2	2	6	0
Média aritmética	29,00	0,50	13,50	27,17	23,50	24,67
Desvio Padrão	14,76	1,12	8,28	20,24	14,17	13,71
Média Geométrica	24,20	0,26	10,45	16,88	19,44	15,61
Eficácia Geométrica (%)		99,09	65,53	31,34	15,00	23,21
p - valor		+2	+7	+14	+21	+28
Controle X Grupo 1		0,2568	0,1919	0,6464	0,7184	0,9987
Controle X Grupo 2		0,0051	0,2567	0,2984	0,8030	0,9206
Controle X Grupo 3		0,0030	0,1430	0,9457	0,9486	0,9707
Grupo 1 X Grupo 2		0,9537	0,7119	0,9212	0,9987	0,9630
Grupo 1 X Grupo 3		0,0352	0,7119	0,9212	0,9535	0,9915
Grupo 2 X Grupo 3		0,5763	0,6005	0,5977	0,9828	0,9974

Anexo D - Valores das contagens individuais de pulgas vivas da espécie *Ctenocephalides felis felis* recuperadas de cães da raça Beagle do grupo e controle e tratado com fipronil comprimidos nas doses 2, 4 e 6 mg/kg.

Grupos	Valores de pulgas vivas recuperadas					
	Dia -5	+2	+7	+14	+21	+28
Controle						
503582	100	100	100	45	33	49
604590	76	100	70	25	30	46
459358	56	57	62	53	100	78
503622	60	47	40	67	76	71
595372	17	76	82	58	24	48
503370	23	0	39	10	8	4
Média aritmética	55,33	63,33	65,50	43,00	45,17	49,33
Desvio Padrão	28,75	34,56	21,78	19,66	32,05	23,66
Média Geométrica	46,63	35,03	61,83	36,65	34,02	37,54
Grupo 1						
503573	100	32	67	34	30	43
458673	77	3	3	6	42	23
044422	61	5	17	8	71	41
503362	63	2	11	35	22	50
503595	18	7	3	0	16	6
376352	3	0	0	0	6	32
Média aritmética	53,67	8,17	16,83	13,83	31,17	32,50
Desvio Padrão	33,34	10,88	23,15	14,90	21,03	14,61
Média Geométrica	35,53	4,17	6,86	5,56	24,31	27,38
Eficácia Geométrica		88,11	88,91	84,84	28,55	27,06
Grupo 2						
503633	100	0	6	20	64	33
103356	100	0	1	3	5	16
459359	16	0	13	51	57	42
288429	71	0	56	16	100	44
257913	16	0	1	0	14	4
458721	21	0	1	6	10	2
Média aritmética	54,00	0,00	13,00	16,00	41,67	23,50
Desvio Padrão	37,63	0,00	19,71	17,16	34,76	17,09
Média Geométrica	39,88	0,00	4,96	7,97	25,88	15,00
Eficácia Geométrica		100,00	91,98	78,26	23,93	60,04
Grupo 3						
288359	100	0	1	7	100	36
458734	100	0	0	0	14	34
459433	0	0	0	2	0	2
459366	85	2	0	33	30	47
458708	47	1	5	31	54	82
288363	4	0	5	2	4	3
Média aritmética	56,00	0,50	1,83	12,50	33,67	34,00
Desvio Padrão	42,10	0,76	2,27	13,96	34,71	27,27
Média Geométrica	23,39	0,35	1,04	5,54	14,32	18,89
Eficácia Geométrica		99,01	98,32	84,88	57,91	49,68
p - valor		+2	+7	+14	+21	+28
Controle X Grupo 1		0,1298	0,0136	0,0516	0,8623	0,6028
Controle X Grupo 2		0,0030	0,0091	0,0779	0,8623	0,2513
Controle X Grupo 3		0,0015	0,0030	0,0397	0,8623	0,6699
Grupo 1 X Grupo 2		0,0053	0,7287	0,9968	0,8623	0,9075
Grupo 1 X Grupo 3		0,0337	0,0758	0,9992	0,8623	0,9995
Grupo 2 X Grupo 3		0,3504	0,1190	0,9868	0,8623	0,8623

ORIGINAL ARTICLE

Oral pharmacokinetic profile of fipronil and efficacy against flea and tick in dogs

Gabriela Carmelinda Martins dos Santos¹ | Fabio Barbour Scott² |
Diefrey Ribeiro Campos¹ | Viviane de Sousa Magalhães² | Debora Azevedo Borges¹ |
Fernando Rocha Miranda¹ | Melina Cardilo Campos Alves¹ | Geraldo Augusto Pereira¹ |
Leandra Oliveira Moreira¹ | Emily Andressa Santos Lima¹ | Marisa Beatriz da Silva Rocha¹ |
Yara Peluso Cid³ 

¹Post graduation Program of Veterinary Science, Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil

²Animal Parasitology Department, Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil

³Pharmaceutical Science Department, Health and Biological Science Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil

Correspondence

Yara Peluso Cid, Pharmaceutical Science Department, Health and Biological Science Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465, km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil.
Email: yarapcid@gmail.com

Abstract

Fipronil (FIP) is an ectoparasiticide of the phenylpyrazole class, used in veterinary medicine in topical form. Supported by evidence of uncontrolled human exposure to FIP and environmental damage caused by commercially available formulations, its use by oral administration has become promising. The effectiveness of FIP against the flea *Ctenocephalides felis felis* and the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its pharmacokinetics and main active metabolite, fipronil sulfone (SULF) were evaluated after single oral administration of tablets in three different doses (2, 4, and 6 mg/kg) in dogs. Through the plasma concentration curves, it was possible to observe that the FIP showed rapid absorption and metabolization and slow elimination. The values of C_{max} ($\beta = 0.7653$) and AUC_{0-t} ($\beta = 0.3209$) did not increase proportionally with increasing dose. At 48 h after treatment, doses of 4 mg/kg ($AUC_{0-t} = 442.39 \pm 137.35 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$) and 6 mg/kg ($AUC_{0-t} = 421.32 \pm 102.84 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$) provided 100% and 99% efficacy against fleas, and 95% and 98% against ticks, respectively. The estimated EC_{90} of FIP +SULF was 1.30 $\mu\text{g/ml}$ against *C. felis felis* and 2.16 $\mu\text{g/ml}$ against *R. sanguineus*. The correlation between the FIP pharmacokinetic and efficacy data demonstrated its potential for oral administration in the form of tablets for the control of ectoparasites in dogs, as a safer alternative for animals, humans, and the environment, aligned with the One Health concept.

KEYWORDS

dose, ectoparasites, efficacy, oral, pharmacokinetics, phenylpyrazoles

1 | INTRODUCTION

The main ectoparasites that affect dogs are the flea *Ctenocephalides felis felis* (Rust, 2017) and the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Dantas-Torres, 2010). These are vectors of a series of pathogens that affect animals (Rust, 2017; Shaw et al., 2001). In addition to veterinary importance, these pathogens can also affect humans due to their zoonotic potential

(Becker et al., 2019; Chandra et al., 2020). Thus, the prevention and treatment of infestations by these ectoparasites is a major concern of veterinarians and dog owners and requires the regular or occasional use of drugs that are capable of repelling and/or killing them without jeopardizing animal safety (Beugnet et al., 2015; Cvejić et al., 2017).

In the 1990s, topical formulations (spot-on) represented a great advance for flea and tick control. However, more recently

the development of oral formulations has become a major trend (Beugnet et al., 2015; Halos et al., 2015), gaining the preference by the owner and/or veterinarian due to the ease of administration of the drug (Petry et al., 2014).

Fipronil (FIP) is a broad-spectrum phenylpyrazole pesticide widely used in veterinary medicine to control fleas and ticks in domestic animals through topical formulations (spray and spot-on) (Taylor, 2001; Ziliotto et al., 2017). The predominant pathway of FIP metabolism in mammals is oxidation, which is considered a bioactivation pathway as it results in the main active metabolite, fipronil sulfone (SULF; Cravedi et al., 2013; Das et al., 2006).

Although most topical formulations available in the market are effective for at least 30 days (Bonneau et al., 2010; Khalid et al., 2017; Kužner et al., 2013; Postal et al., 1995), there is growing concern about the possible damage that FIP can cause to humans due to non-occupational exposure during the application of these formulations, through contact of the animal with its owners, and residence of the drug in the home environment after treatment (Cochran et al., 2015; Dyk et al., 2012; Starr et al., 2016; Testa et al., 2019), as well as damage to the environment as fipronil and its metabolites are removed during dog bathing and introduced into surface and wastewater systems (McMahen et al., 2016; Sadaria et al., 2017; Teerlink et al., 2017).

Supported by evidence of human exposure and environmental damage, the use of FIP as a drug for oral administration is considered a safer way to control ectoparasites that afflict different animals (Wang et al., 2019), such as flies on roof rats (Ingenloff et al., 2013) and cattle (Poché et al., 2013), mosquitos on cattle (Poché et al., 2017), fleas on dogs (Melo et al., 2012), great gerbils (Poché et al., 2018) and black-tailed prairie dogs (Eads et al., 2019), and tick larvae on mice (Poché et al., 2020). The systemic bioavailability of FIP in dogs was reported by dos Santos et al. (2020) through oral administration of tablets, where FIP presented a pharmacokinetic profile of rapid absorption and biotransformation and slow elimination, indicating its potential for oral systemic use to control fleas and ticks on dogs. The aim of this study was to elucidate the influence of the dose of FIP administered orally on the extent of absorption and efficacy in the control of *R. sanguineus* and *C. felis felis* on dogs.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals and treatment

The protocol of the study was approved by the Ethics Committee of the Veterinary Institute of Federal Rural University of Rio de Janeiro (number 4108300818). Twenty-four beagle dogs (14 males and 10 females, 12–72 months of age, weighing 10.0 ± 2.0 kg) were included in the study. The dogs had not been exposed to ectoparasiticides in the 3 months prior to treatment. All animals were housed individually and received commercial food once daily in a sufficient amount to maintain bodyweight appropriate for the breed, and water was provided *ad libitum*. Clinical evaluations and hematological and

biochemical examinations were performed prior to treatment to ensure inclusion of only healthy animals in the study. These evaluations were performed throughout the post-treatment period to monitor the health status of the animals.

The animals were divided into 4 groups (6 dogs/group): Control Group (CG), untreated; and Groups 1 (G1), 2 (G2) and 3 (G3), receiving FIP tablets, in a single treatment, in three doses: G1–2 mg/kg body weight, G2–4 mg/kg body weight and G3–6 mg/kg body weight.

Fipronil tablets were prepared using the wet granulation method followed by compression as described by dos Santos et al., 2020. Briefly, fipronil and excipients (polyvinylpyrrolidone, sodium lauryl sulfate, talc, magnesium stearate and lactose monohydrate) were mixed by geometric dilution and homogenized to a moist mass. This mass went through a sieve to obtain the granules that were submitted to the compaction process.

2.2 | Pharmacokinetic analyses

After treatment, blood was collected from the animals of groups 1, 2, and 3 in heparin tubes by jugular venipuncture before and 1, 2, 4, 6, 8, 24 h and 2, 3, 7, 14, 21, and 28 days after administration. Plasma was obtained by centrifugation at 756 g for 10 min at 4°C and was stored at –20°C until analysis.

Pharmacokinetic parameters were determined using the PK solver program (Microsoft Excel®, Redmond, WA, USA) analyzed using the non-compartmental model of extravascular administration. All PK parameters were calculated using the individual plasma concentration versus time data. The maximum measured concentration for a particular animal (C_{max}) and the time from dosing to the maximum concentration (T_{max}) were measured individually. The parameter data were used to calculate the mean and standard deviation. The elimination rate constant, λ_z , was calculated using the regression with the largest adjusted R^2 value based on the last three data points. The area under the zero curve to last time t (AUC_{0-t}) was calculated using the linear trapezoidal method and extrapolated to infinity ($AUC_{0-\infty}$). The other parameters, terminal plasma half-life ($T_{1/2}$), mean residence time (MRT), clearance (Cl), and volume of distribution based on the terminal slope (V_z) were calculated directly with PK Solver (Zhang et al., 2010).

Results are expressed as arithmetic mean \pm standard deviation (SD). Data were statistically analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey test for multiple comparisons using GraphPad Prism 6.0 with 95% significance ($p \leq .05$).

2.3 | Analytical procedures

The plasma concentrations of FIP were analyzed by high-performance LC with UV detection and solid-phase extraction (SPE) according to the procedure described by Cid et al. (2012) and adapted by dos Santos et al. (2020). Plasma samples were subjected to SPE clean-up

using Oasis® HLB cartridges (Waters, Massachusetts, USA), using methanol as eluent solvent. The eluate was evaporated to dryness and reconstituted in 100 µl of acetonitrile. The chromatographic separation was performed using a C18 column (Kromasil, 3.5 µm; 4.6 × 100 mm; Tedia, Rio de Janeiro, Brazil), preceded by a C18 guard-column (Kromasil, 3.5 µm; 4.6 × 10 mm; Tedia, Rio de Janeiro, Brazil), both maintained at 25°C. The mobile phase consisted of acetonitrile: water (60:40, v/v) with a flow rate of 1.0 ml/min. The UV wavelength was set at 210 nm, and the injection volume was 10 µl.

2.4 | Dose proportionality

The dose proportionality was assessed using the power model (Hummel et al., 2009) to calculate the strength of the linear relationship after logarithmic transformation between dose and C_{max} and dose and AUC_{0-t} , using linear regression. The C_{max} and AUC_{0-t} were fitted to the model: $Y = \alpha * Dose^\beta$. This equation can be expressed as $\text{Log}(Y) = \text{Log}(\alpha) + \beta * \text{Log}(Dose)$, where $Y = C_{max}$ or AUC_{0-t} . $\text{Log}(\alpha)$ is the intercept and β is the slope of the equation. Dose proportionality was considered present if the slope of the Log dose versus Log parameter (C_{max} and AUC_{0-t}) was completely within the 95% confidence interval of 0.80–1.25. The dose proportionality was analyzed by GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA).

2.5 | Efficacy studies

The study was design in accordance with the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestation on dogs and cats (Marchiondo et al., 2013).

On days -9, -2, 5, 12, 19, and 26, each dog was infested with 50 male fleas and 50 female fleas, not fed, aged 14 days. On the same days, the dogs were infested with 25 male-female pairs of ticks. The animals were randomly assigned to groups based on the count of parasites present on the animals on day -7, in which the entire coat of the dog was systematically inspected and ticks and fleas were counted and removed. The ticks were removed manually and the fleas using an extra fine anti-flea comb. Only animals that had a minimum retention of 25% for fleas and 20% for ticks were included in the study. On the days -7, 2, 7, 14, 21, and 28, the parasitic loads of the animals were determined by counting after mechanical removal of fleas and ticks.

Efficacy evaluation of FIP was assessed by calculating the mean percentage reduction of the control group in relation to the treated group at each post-treatment time point using the formula $[(C - T)/C] \times 100$, where C is the geometric mean of the control group and T is the geometric mean of the treated group. Treatment at each time point was declared to be effective when the calculated efficacy exceeded 90% (Marchiondo et al., 2013). Normal distribution (parametric or nonparametric) of the data was evaluated for

each experimental day for the treated and untreated groups using the Shapiro–Wilk test. The comparison of the mean values of tick and flea counts between the treated and untreated (control) groups was performed by analysis of variance (Tukey test for parametric data and the Kruskal–Wallis test followed by the Student–Newman–Keuls test for nonparametric data). The significance level was 95% ($p \leq .05$) using Biostat 5.0 (Ayres et al., 2007).

2.6 | Plasma concentration and dose versus efficacy

The relationship between plasma concentration and percent efficacy was determined by evaluating the experimental data and also using an E_{max} model. The sum of the plasma concentrations of FIP and SULF were used as the model was not applied using only the concentrations of FIP, and the correlations between the efficacy data with the plasma concentrations of FIP alone were not conclusive.

The flea or tick count taken 48 h after treatment was compared with the flea or tick count at the same time on control (untreated) dogs, and the percent difference in relation to the control was calculated as follows: $\{1 - [\text{count}(48 \text{ h post-treatment}) \text{ for dogs} / [\text{geometric mean count for the control dogs at 48 h post-treatment}]]\} \times 100$, where count = the number of live fleas or ticks. The percent efficacy versus the total plasma concentration FIP + SULF was analyzed with PK Solver (Microsoft Excel®, Redmond, WA, USA) to fit the PD Sigmoid E_{max} model. The effect was set to 0% when plasma concentrations were not detected. The maximal effect, E_{max} , is a parameter determined by the model and is expected to be close to 100%. The following equation was used to fit the data: $E = E_{max} \times C^{\text{gamma}} / C^{\text{gamma}} + EC_{50}^{\text{gamma}}$, where EC_{50} is the plasma concentration corresponding to $E_{max}/2$ and is a measure of potency, $C(t)$ is the measure of FIP + SULF plasma concentration at 48 h, and Gamma, a measure of the selectivity, is related to the slope of the plasma concentration versus effect curve. The EC_{90} , the FIP + SULF plasma concentration estimated to provide 90% efficacy, was then calculated with the parameter estimates using the following equation: $EC_{90} = EC_{50} \times (90 / (100 - 90))^{1/\text{gamma}}$.

The dose–efficacy relationship was assessed using the dose–response curve and also using a sigmoidal model. For the construction of the curve, the individual efficacy percentages of each animal in relation to the dose in each group were used, 48 h after treatment. The model was applied using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA).

3 | RESULTS

3.1 | Pharmacokinetic analysis

Clinically, no adverse reactions were observed in any of the dogs treated with FIP tablets. In all experimental groups, plasma concentrations of FIP were quantified at all post-treatment sampling times.

TABLE 1 Mean \pm standard deviation of pharmacokinetic parameters for fipronil following oral administration of fipronil in tablets to dogs Beagles ($n = 6$)

Parameters	Fipronil			Fipronil-sulfone		
	G1 (2 mg/kg)	G2 (4 mg/kg)	G3 (6 mg/kg)	G1 (2 mg/kg)	G2 (4 mg/kg)	G3 (6 mg/kg)
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	3.17 ± 1.39^a	5.40 ± 2.10^b	5.80 ± 2.39^b	1.62 ± 1.05^a	2.51 ± 1.84^a	2.93 ± 1.88^a
T_{max} (h)	1.83 ± 0.41^a	1.83 ± 0.41^a	2.20 ± 1.10^a	2.00 ± 0.00^a	2.67 ± 1.03^a	2.80 ± 8.70^a
λ_z (h^{-1})	0.0024 ± 0.007^a	0.0026 ± 0.0013^a	0.0021 ± 0.001^a	0.0023 ± 0.001^a	0.0022 ± 0.001^a	0.0021 ± 0.001^a
AUC_{0-t} ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	339.00 ± 65.62^a	442.39 ± 137.25^b	421.32 ± 102.84^b	227.53 ± 97.70^a	316.15 ± 98.70^a	494.00 ± 167.05^a
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	454.38 ± 121.92^a	641.73 ± 294.78^a	631.02 ± 144.15^a	306.01 ± 134.08^a	$455.97 \pm 160.00^{a,b}$	630.53 ± 172.86^b
$T_{1/2}$ (h)	319.60 ± 108.40^a	335.62 ± 189.80^a	338.82 ± 167.81^a	350.17 ± 175.04^a	393.93 ± 224.24^a	394.31 ± 185.30^a
$MRT_{0-\infty}$ (h)	472.52 ± 128.50^a	521.81 ± 257.97^b	597.19 ± 139.21^b	523.38 ± 189.25^a	588.94 ± 313.44^a	487.97 ± 187.13^a
V_z/F ($\text{mg}/(\mu\text{g/ml})$)	20.25 ± 4.44^a	30.07 ± 8.84^a	60.96 ± 28.35^b	37.48 ± 25.19^a	55.47 ± 45.02^a	61.04 ± 28.71^a
Cl/F ($\text{mg}/(\mu\text{g/ml})/\text{h}$)	0.046 ± 0.008^a	$0.074 \pm 0.032^{a,b}$	0.106 ± 0.026^b	0.0072 ± 0.019^a	0.096 ± 0.029^a	0.112 ± 0.038^a

Notes: C_{max} : peak plasma concentration; T_{max} : time to reach peak plasma concentration; $T_{1/2}$: terminal half-life; AUC: area under the curve from time 0 to the last detectable concentration; $AUC_{0-\infty}$: area under concentration-time curve from time 0 to infinity; λ_z : elimination rate constant; $MRT_{0-\infty}$: mean residence time from time 0 to infinity; V_z/F : apparent volume of distribution during terminal phase after oral administration; Cl/F : apparent total clearance of the drug from plasma after oral administration.

^{a,b}Columns with same letters have no statistical difference ($p \leq .05$).

The calculated mean values of the pharmacokinetic parameters of each group for FIP and SULF are shown in Table 1. The FIP (A) and SULF (B) plasma concentration versus time curves of groups are shown in Figure 1.

FIP plasma concentrations increased quickly, indicating rapid absorption, at all evaluated doses. C_{max} values were 3.17 ± 1.39 , 5.40 ± 2.10 , and 5.80 ± 2.39 $\mu\text{g/ml}$ and the absorption extensions (AUC_{0-t}) were 339.00 ± 65.62 , 442.39 ± 137.25 , and 421.32 ± 102.84 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$, for G1 (2 mg/kg), G2 (4 mg/kg), and G3 (6 mg/kg), respectively (Table 1).

The values of T_{max} to reach C_{max} (1.62 ± 1.05 , 2.51 ± 1.84 , and 2.93 ± 1.88 $\mu\text{g/ml}$) for SULF were 2.00 ± 0.00 , 2.67 ± 1.03 , and 2.80 ± 8.70 h, respectively for G1, G2, and G3. No significant differences ($p > .05$) were observed between T_{max} and half-life values of FIP and SULF, indicating that FIP biotransformation occurred quickly. The dose did not influence T_{max} or C_{max} , or any other pharmacokinetic parameter, as no significant differences were observed between doses for any parameters evaluated (Table 1).

The values of clearance (Cl/F) of FIP by the oral route at doses of 2, 4, and 6 mg/kg were 0.0046 ± 0.008 , 0.076 ± 0.032 , and 0.106 ± 0.0026 ($\text{mg}/(\mu\text{g/ml})/\text{h}$), respectively, and increased significantly ($p < .05$) with the dose.

3.2 | Dose proportionality and pharmacokinetics

Figure 2a,b shows graphs of $\text{Log } C_{max}$ versus Dose and $\text{Log } AUC_{0-t}$ versus Dose covering the range of doses tested in the power model. C_{max} ($\beta = 0.7653$) and AUC_{0-t} ($\beta = 0.3209$) did not increase proportionally with dose, indicating nonlinear pharmacokinetics.

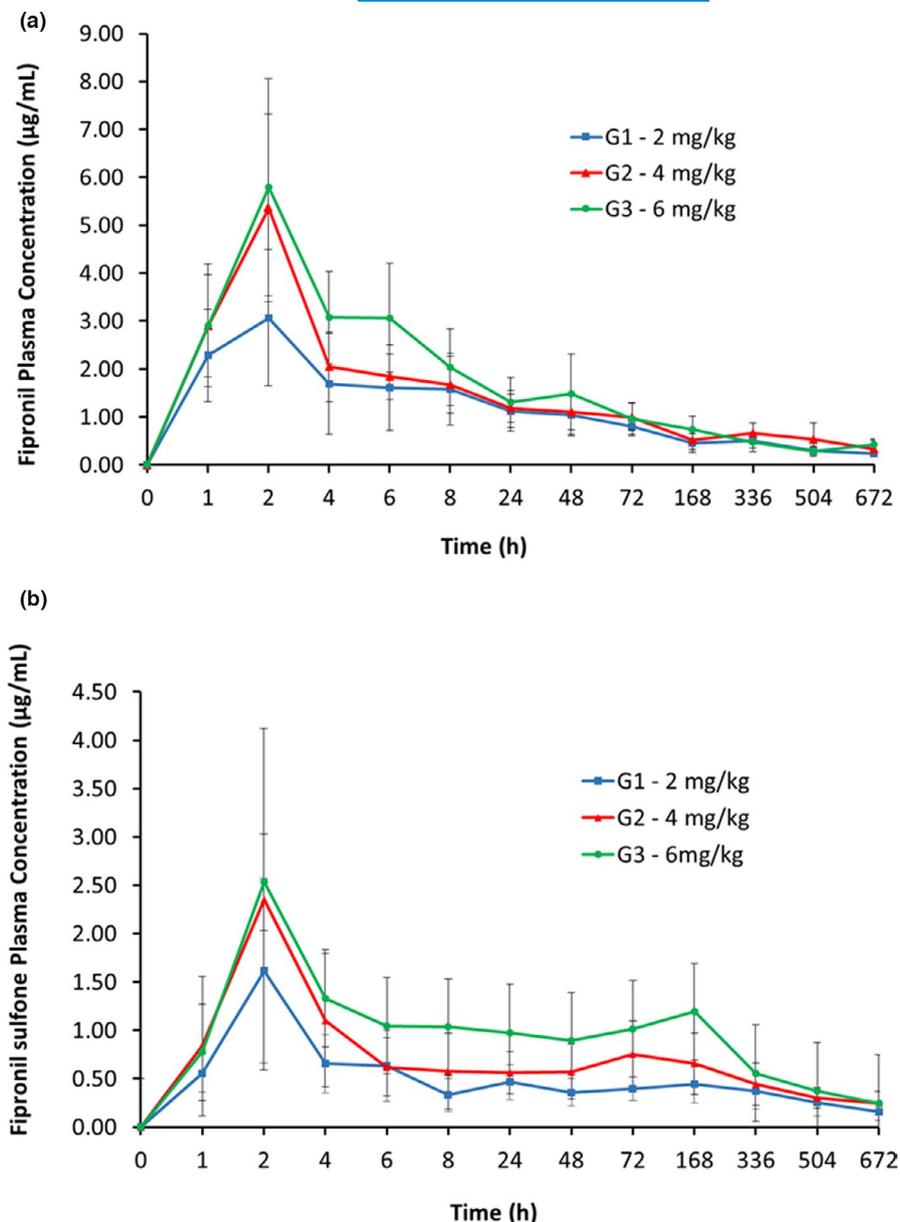
3.3 | Efficacy studies

The mean number of fleas and ticks of the evaluated groups (CG, G1, G2, and G3) in the pretreatment period ranged from 24.33 to 29.00 and 53.67 to 56.00, respectively, with no significant difference between the groups ($p > .05$) (Table 2).

The mean number of ticks after the treatment period ranged from 22.87 to 30.32 for CG and from 0.26 to 24.15 for treated groups. The statistical analysis showed significant differences ($p < .05$) between CG on the one hand and G2 or G3 on the other on the 2nd day P.T. No significant differences ($p > .05$) between CG and treated groups (G1, G2 and G3) after 7th day P.T. were noticed. The maximum efficacy values were observed at day 2 P.T. achieving 74.54%, 95.65%, and 99.09% for G1, G2, and G3, respectively. From the 7th day P.T, efficacy began to wane gradually until reaching values of 0.0%, 16.61%, and 23.21% for G1, G2, and G3, respectively, at day 28 P.T. (Table 2).

Regarding efficacy against fleas, the mean counts after the treatment period ranged from 34.02 to 61.03 for the CG and from 0.0 to 27.38 for the treated groups. The statistical analysis showed significant differences ($p < .05$) between CG and treated groups (G1, G2,

FIGURE 1 Mean \pm SD of plasma concentration of fipronil and fipronil-sulfone following oral administration of fipronil tablets in G1, G2, and G3 to beagle dogs (n = 6)



and G3) from the 2nd day until 14th day P.T. No significant differences ($p > .05$) between CG and treated groups (G1, G2, and G3) after 21st day P.T. were observed. The same as for ticks, maximum flea efficacy was reached at day 2 P.T., achieving 88.00%, 100%, and 99.01% for G1, G2, and G3, respectively. Efficacy declined slightly until the 14th day P.T., with values ranging between 78.26% and 84.88%. From the 21st day P.T., efficacy began to decrease gradually until reaching values of 27.06%, 23.93%, and 49.68% for G1, G2, and G3 respectively on the 28th day P.T. (Table 2).

3.4 | Plasma concentration and dose versus efficacy

The percentage efficacy values for flea and tick and plasma concentration of FIP, SULF and FIP + SULF on each evaluation day for the three doses (G1, G2, and G3) are shown in Figure 3a-c respectively.

G1 (Figure 3a) showed mean plasma concentrations ranging from 1.04 to 0.24 μ g/ml for FIP and from 0.36 to 0.16 μ g/ml for SULF and efficacy values ranging from 88.01 to 27.06% against fleas and from 74.54 to 0.00% against ticks (2–7 days PT). For G2 (Figure 3b), the mean plasma concentrations ranged from 1.10 to 0.33 and from 0.57 to 0.24 μ g/ml for FIP and SULF, respectively, with flea efficacy values of 100.00% and 23.90% and for ticks of 95.65 and 16.61% (2–7 days PT). For G3, the mean plasma concentrations were between 1.48 and 0.42 μ g/ml and 0.89 and 0.25 μ g/ml for FIP and SULF, respectively, with efficacy values between 99.00 and 49.68% for fleas and 99.09 and 23.21 for ticks (2–7 days P.T.).

The comparison of concentration–time profile of FIP + SULF in plasma of treated dogs with the efficacy data at different doses (Figure 3) indicated that 100% control was reached when fleas were exposed to concentrations higher than 1.67 μ g/ml (2–7 days P.T.). By contrast, the resulting level of control decreased to 78.26–91.98% (7–14 days P.T.) when fleas were exposed to concentrations between

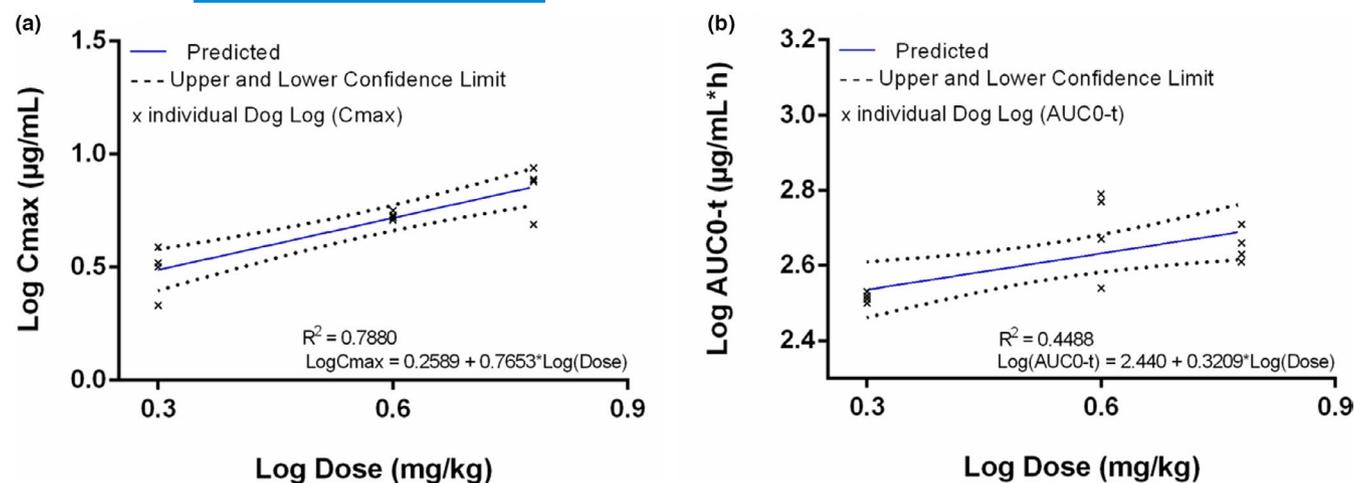


FIGURE 2 Log of C_{max} (A) and AUC_{0-t} (B) of fipronil versus log of dose after oral administration at doses of 2 (G1), 4 (G2) and 6 mg/kg (G3) in beagle dogs ($n = 6$). Dashed lines represent the 95% confidence interval; blue lines represent the fit using linear regression; (x) represents the individual values of the pharmacokinetic parameters for each animal

TABLE 2 Geometric means of tick *Rhipicephalus sanguineus* and flea *Ctenocephalides felis felis* and percent efficacy relative to control group for dogs Beagles treated orally with fipronil tablets in doses 2, 4, and 6 mg/kg ($n = 6$)

Study day	Geometric mean* (% efficacy**)							
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>				<i>Ctenocephalides felis felis</i>			
	Control	G1 (2 mg/kg)	G2 (4 mg/kg)	G3 (6 mg/kg)	Control	G1 (2 mg/kg)	G2 (4 mg/kg)	G3 (6 mg/kg)
2	28.62 ^a	7.29 ^{a,b} (74.54)	1.24 ^{b,c} (95.65)	0.26 ^c (99.09)	35.03 ^a	4.17 ^a (88.11)	0.00 ^b (100)	0.35 ^b (99.01)
7	30.32 ^a	12.47 ^a (72.50)	13.81 ^a (54.45)	10.45 ^a (65.53)	61.03 ^a	6.86 ^b (88.91)	4.96 ^b (91.98)	1.04 ^b (98.32)
14	24.58 ^a	12.65 ^a (48.55)	7.39 ^a (69.95)	16.88 ^a (31.34)	36.65 ^a	5.56 ^{a,b} (84.84)	7.97 ^{a,b} (78.26)	5.54 ^b (84.88)
21	22.87 ^a	15.45 ^a (32.47)	12.60 ^a (44.89)	19.44 ^a (15.00)	34.02 ^a	24.31 ^a (27.38)	23.43 ^a (37.58)	14.32 ^a (57.91)
28	20.32 ^a	24.15 ^a (0.00)	16.95 ^a (16.61)	15.61 ^a (23.21)	37.54 ^a	27.38 ^a (27.06)	25.88 ^a (23.93)	18.89 ^a (49.68)

*Geometric mean (GM) is computed by subtracting 1 from the anti-logarithm of the mean of $\ln(\text{count} + 1)$.

**Percent efficacy = $100(1 - T/C)$, where C is GM of control and T is GM of each treated group.

^{a,b,c}Columns with same letters have no statistical difference, p value $\leq .05$.

0.88 and 1.40 $\mu\text{g/ml}$ of FIP + SULF and to 27 – 60% when fleas were exposed to concentrations below 0.83 $\mu\text{g/ml}$ (14–28 days P.T.). Regarding efficacy against ticks, concentrations higher than 2.38 $\mu\text{g/ml}$ of FIP + SULF were required to achieve 100% control (2 days P.T.), while concentrations between 0.90 and 1.93 $\mu\text{g/ml}$ provided efficacy levels ranging from 54.45% to 96.7% (2–7 days P.T.) and concentrations below 0.90 $\mu\text{g/ml}$ did not reach more than 50% efficacy (14–28 days P.T.).

A direct relationship between plasma concentration and percent efficacy relative to the control group was modeled using a PD Sigmoidal E_{max} model. E_{max} values of 97.80 and 98.05% were observed for ticks and fleas, respectively. The EC_{90} values of FIP + SULF concentrations were estimated to be 1.30 $\mu\text{g/ml}$ for *C. felis felis* and 2.16 $\mu\text{g/ml}$ *R. sanguineus*, 48 h P.T. (Table 3).

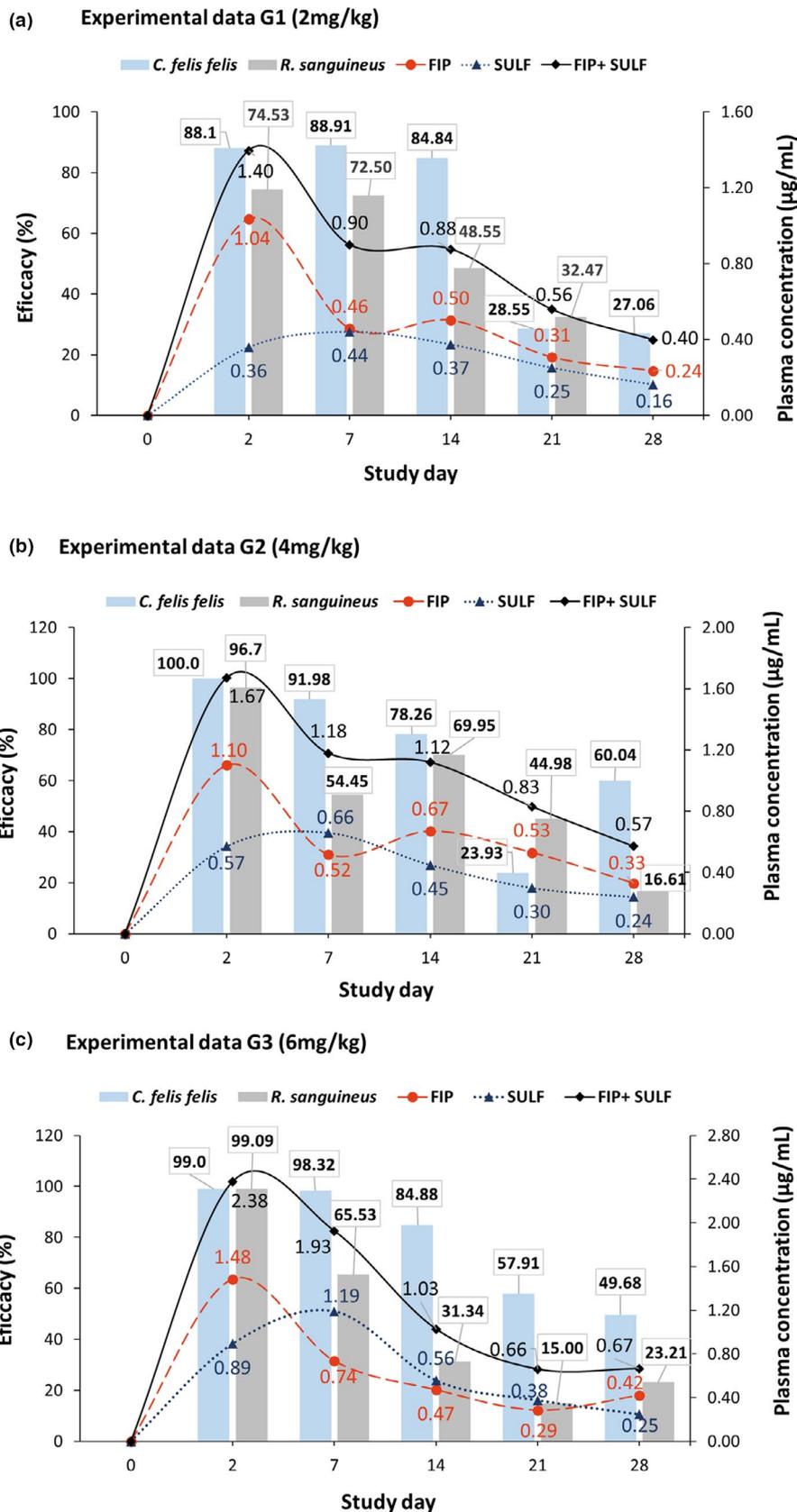
The dose versus efficacy relationship is shown in Figure 4a,b. Control above 90% was observed for *R. sanguineus* and *C. felis felis* in G2 and G3, 48 h after treatment.

4 | DISCUSSION

We present here pharmacokinetic data of FIP in a formulation for oral use in dogs in different doses and its relationship with ectoparasiticide efficacy. Although several studies with promising results have encouraged the oral administration of FIP for control of flies on roof rats (Ingenloff et al., 2013) and cattle (Poché et al., 2013), mosquitos on cattle (Poché et al., 2017), fleas on great gerbils (Poché et al., 2017), and black-tailed prairie dogs (Eads et al., 2019), there are few reports of the pharmacokinetics of FIP administered orally to dogs (dos Santos et al., 2020). Moreover, there is a lack of information about the relationship between FIP and SULF plasma levels with their antiparasitic efficacy, especially in dogs.

Our results of FIP pharmacokinetic parameters (Table 1) when administered orally indicated a profile of rapid absorption and bio-transformation and slow elimination, regardless of dose. Although a direct correspondence was observed between the doses of 2 mg/

FIGURE 3 Mean % efficacy against *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus sanguineus* versus plasma concentration of FIP, SULF and (FIP+SULF) following oral administration of FIP to beagle dogs on the different study days. [A] G1 (2 mg/kg), [B], G2 (4 mg/kg), and [C] G3 (6 m/kg)



kg (G1) and 4 mg/kg (G2) and the values of C_{max} and AUC_{0-t} , that is, the increase in the dose led to an increase in values of these parameters, this correspondence was not reproduced when the dose was increased to 6 mg/kg (G3). Dose evaluated by the power

model showed that C_{max} and AUC_{0-t} did not increase proportionally with increasing dose (Figure 2) after oral administration in single doses of 2, 4, and 6 mg/kg, with values of β (slope) outside the 95% confidence interval between 0.8 and 1.25. These parameters

could indicate the absorption was saturated with increasing dose (Hummel et al., 2009). Chang and Tsai (2020) found dose proportionality for FIP administered orally in rats using a broader range (3, 10, and 30 mg/kg), observing C_{max} values between 8.81 ± 1.91 and 47.62 ± 20.16 ng/ml and AUC_{0-t} values between 72.26 ± 16.80 and 454.30 ± 182.20 h*ng/ml.

The conversion of FIP to SULF occurred quickly at the three doses administered. High conversion of FIP to SULF through hepatic metabolism has been reported after oral administration in rats (Chata et al., 2019; Roques et al., 2012). Biotransformation of FIP was not dose-dependent, as no significant difference was observed for the values of C_{max} and AUC_{0-t} of SULF between doses. These results do not corroborate those reported by Chang and Tsai (2020), that biotransformation of FIP was dose-dependent when administering FIP orally to rats, with C_{max} values for SULF ranging from 18.87 ± 11.56 to 152.5 ± 35.62 ng/ml and AUC_{0-t} 286.70 ± 146.40 to 3005 ± 671.60 h*ng/ml.

Although there was no significant difference between the values of FIP and SULF, the plasma concentration profile showed a more pronounced decline in FIP concentrations in relation to SULF after 4 h P.T. (Figure 1), suggesting that the elimination process of SULF

is slower. The greater persistence of SULF in the body has also been observed after oral administration in rats (Roques et al., 2012).

The combination of the relatively high results obtained for $MRT_{0-\infty}$ (h) and $T_{1/2}$ (h) for FIP and for SULF at the three doses administered coupled with the low rates of the elimination constant of (λ_z/h) suggest slow elimination FIP and SULF. According to Gupta and Milatovic (2014), the prolonged half-life of fipronil in the blood (150–245 h) may reflect its slow release from body fat.

Considering the differences between species and between experimental conditions, such as breed, sex, route of administration, and formulation, the comparison of the results obtained is inconsistent (Flajs et al., 2002). Although SULF is the main active metabolite of FIP in mammals, differences in liver microsomes between species must be considered (Tang et al., 2004), so data on the biotransformation process of FIP in dogs need to be investigated.

Melo et al. (2012) studied oral administration of FIP to dogs in gelatin capsule form at a dose of 6 mg/kg and found efficacy levels between 97.88% and 88.73% (2–14 days P.T.) against *C. felis felis*, similar to our findings for the same dose in the same time interval (99.0%–84.88%). In turn, the efficacy values against *R. sanguineus* at the dose of 6 mg/kg (2–7 days P.T) reported by (Melo et al., 2012) were lower than those found by us (99.09%–65.53%), with values between 43.67% and 23.28%.

The values of EC_{90} (FIP +SULF) estimated by the PD Sigmoidal E_{max} model of 1.30 $\mu\text{g/ml}$ for *C. felis felis* and 2.16 $\mu\text{g/ml}$ for *R. sanguineus* (Table 3) are close to the values observed in the comparison of concentration–time profile of FIP +SULF in plasma, with efficacy above 90% (1.67 $\mu\text{g/ml}$ and 2.38 $\mu\text{g/ml}$ for fleas and ticks respectively) (Figure 3).

The dose x effect relationship (Figure 4) points to a variation in effectiveness depending on the dose administered. Effective control was observed for both *R. sanguineus* and *C. felis felis* at the doses of 4 mg/kg and 6 mg/kg. In other words, as a dose starting at 4 mg/kg was able to produce efficacy levels above 95% for fleas and ticks within 48 h P.T. The products used in the control of ectoparasites must attain varying efficacy standards to be registered (Marchiondo

TABLE 3 Pharmacodynamic parameters of FIP following orally a single in doses 2, 4, and 6 mg/kg ($n = 18$)

Parameter	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Ctenocephalides felis felis</i>
E_{max} (%)	97.80	98.05
EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	0.67	0.65
Gamma	2.80	4.54
EC_{90} ($\mu\text{g/ml}$)	2.16	1.30
R^2	0.892	0.958

Notes: E_{max} = Maximum effect determined by the model.
 EC_{50} = Drug plasma concentration at 50% of E_{max} ($\mu\text{g/ml}$);
 EC_{90} = Drug plasma concentration at 90% of E_{max} ($\mu\text{g/ml}$);
 Gamma = slope of plasma concentration curve \times effect.

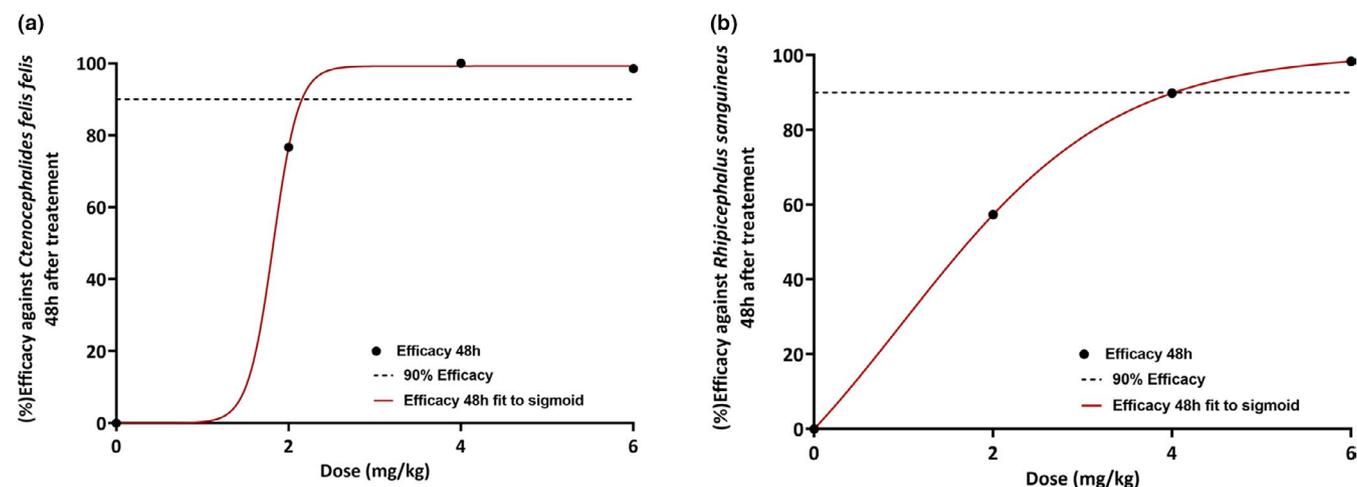


FIGURE 4 Mean % efficacy against *Ctenocephalides felis felis* [A] and *Rhipicephalus sanguineus* [B] versus dose following oral administration of FIP to beagle dogs. The line represents the fit to the sigmoid model and symbols are the experimental values after 48 h

et al., 2013), ranging between 90 and 95% effectiveness in 24 or 48 h depending on the regulatory agency (Bobey, 2015).

The correlation between pharmacokinetic parameters and efficacy data indicates the potential of oral administration of FIP to dogs for the control of fleas and ticks. PK/PD assessments allowed ascertaining the relationship between the extent of absorption of FIP administered orally to dogs and its efficacy against fleas and ticks. It was possible to estimate the concentrations of FIP + SULF capable of providing $\geq 90\%$ efficacy against fleas and ticks, as well as to determine the dose responsible for reaching such concentrations.

Plasma levels above EC_{90} were achieved for both fleas and ticks at doses of 4 and 6 mg/kg, but these concentrations were not maintained at sufficient levels to obtain effective control against reinfestation after 14 days. Thus, the results obtained in this study indicate the need to improve the formulation through the use of pharmaceutical strategies such as the implementation of a controlled release system to achieve pharmacokinetic conditions to maintain effective control of ectoparasites for a longer period.

Fipronil short-term oral toxicity studies reported toxic effects at the high dosages, 10 mg/kg/d for 13 weeks in Beagle dogs, (Holmes, 1991). Oral administration of fipronil (>1 mg/kg/d) for one year revealed neurological signs and a NOAEL of between 0.2–0.3 mg/kg/d was calculated for the dog (Holmes, 1992, 1993). Nevertheless, these data refer to chronic toxicity and, therefore, do not serve as a standard compared with the proposed doses at work for single dose administration (2, 4 and 6 mg/kg). Although, clinically, no adverse reactions were observed in any of the dogs treated with FIP tablets, safety studies must be carried out to enable the recommendation of its use in dogs.

5 | CONCLUSION

The results of this study indicate that the plasma availability of fipronil tablets administered orally in single dose of 4 mg/kg in dogs provides efficacy against *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* above 95% in 48 h P.T.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Apoio à Pesquisa Tecnológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (FAPUR), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We also thank the Brazilian National Research Council (CNPq) for the Scientific Productivity Grants of Professor Scott, F.B.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors have read and approved the final manuscript.

ANIMAL WELFARE AND ETHICS STATEMENT

The authors declare that the experiments were conducted following the animal welfare and ethics protocols.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Yara Peluso Cid  <https://orcid.org/0000-0003-0775-0704>

REFERENCES

- Ayres, M., Ayres Junior, M., Ayres, D.L., & Santos, A.A., & . (2007). *Manual Biostat Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas*. Belém (PA), Brasil.
- Becker, S., Webster, A., Doyle, R. L., Martins, J. R., Reck, J., & Klafke, G. M. (2019). Resistance to deltamethrin, fipronil and ivermectin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto, Latreille (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick Borne Dis.*, 10, 1046–1050. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.05.015>
- Beugnet, F., Liebenberg, J., & Halos, L. (2015). Comparative speed of efficacy against *Ctenocephalides felis* of two oral treatments for dogs containing either afoxolaner or fluralaner. *Veterinary Parasitology*, 207, 297–301. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.007>
- Bobey, M. C. (2015). Harmonization of regulatory guidelines on efficacy of ectoparasiticides for companion animals: Status and missing points. *Veterinary Parasitology*, 208, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.020>
- Bonneau, S., Gupta, S., & Cadiegues, M. C. (2010). Comparative efficacy of two fipronil spot-on formulations against experimental tick infestations (*Ixodes ricinus*) in dogs. *Parasitology Research*, 107, 735–739. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1930-y>
- Chandra, S., Ma, G. C., Burleigh, A., Brown, G., Norris, J. M., Ward, M. P., Emery, D., & Šlapeta, J. (2020). The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu Roberts, 1965 across Australia: Morphological and molecular identification of *R. sanguineus* s.l. tropical lineage. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(1), 101305 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101305>
- Chang, Y. N., & Tsai, T. H. (2020). Preclinical transplacental transfer and pharmacokinetics of fipronil in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 48, 886–893. <https://doi.org/10.1124/DMD.120.000088>
- Chata, C., Palazzi, P., Grova, N., Haan, S., Emond, C., Vaillant, M., & Appenzeller, B. M. R. (2019). Blood pharmacokinetic of 17 common pesticides in mixture following a single oral exposure in rats: implications for human biomonitoring and exposure assessment. *Archives of Toxicology*, 93, 2849–2862. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02546-y>
- Cid, Y. P., Ferreira, T. P., Medeiros, D. M. V. C., Oliveira, R. M., Silva, N. C. C., Magalhães, V. S., & Scott, F. B. (2012). Determination of fipronil in bovine plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. *Química Nova*, 35, 2063–2066. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001000029>
- Cochran, R. C., Yu, L., Krieger, R. I., & Ross, J. H. (2015). Postapplication Fipronil Exposure Following Use on Pets. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78, 1217–1226. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1076363>
- Cravedi, J. P., Delous, G., Zalko, D., Viguié, C., & Debrauwer, L. (2013). Chemosphere disposition of fipronil in rats. *Chemosphere*, 93, 2276–2283. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.083>
- Cvejić, D., Schneider, C., Neethling, W., Hellmann, K., Liebenberg, J., & Navarro, C. (2017). The sustained speed of kill of ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) and fleas (*Ctenocephalides felis felis*) on

- dogs by a spot-on combination of fipronil and permethrin (Effitix®) compared with oral afoxolaner (NexGard®). *Veterinary Parasitology*, 243, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.011>
- Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>
- Das, P. C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E., & Rose, R. L. (2006). Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 164, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.09.013>
- dos Santos, G. C. M., Rosado, L. H. G., Alves, M. C. C., de Paula Lima, I., Ferreira, T. P., Borges, D. A., de Oliveira, P. C., de Sousa Magalhães, V., Scott, F. B., & Cid, Y. P. (2020). Fipronil tablets: Development and pharmacokinetic profile in beagle dogs. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 21. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1571-0>
- Dyk, M. B., Liu, Y., Chen, Z., Vega, H., & Krieger, R. I. (2012). Fate and distribution of fipronil on companion animals and in their indoor residences following spot-on flea treatments. *Journal of Environmental Science and Health, Part B, Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 47, 913–924. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.706548>
- Eads, D. A., Biggins, D. E., Bowser, J., Broerman, K., Livieri, T. M., Childers, E., Dobesh, P., & Griebel, R. L. (2019). Evaluation of five pulicides to suppress fleas on black461 tailed prairie dogs: Encouraging long-term results with systemic 0.005% fipronil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 19(6), 1–7. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2339>
- Flajs, V. C., Grabnar, I., & Faculty, V. (2002). Ivermectin pharmacokinetics. *Slovenian Veterinary Research*, 39, 167–178. UDC 615.015:615.28.
- Gupta, R. C., & Milatovic, D. (2014). Insecticides. *Biomarkers in Toxicology*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00023-3>
- Halos, L., Carithers, D. S., Solanki, R., Stanford, H., Gross, S. J., & Merial, S. A. S. (2015). Preference of dogs between two commercially available oral formulations of ectoparasiticide containing isoxazolines, afoxolaner or fluralaner. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 5, 25–29. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2015.52004>
- Holmes, P. (1991) *Toxicity study by oral (capsules) administration to beagle dogs for 13 weeks*. Life Sci Res Ltd. Report No: 90/RHA310/0842.
- Holmes, P. (1992) *Toxicity by oral (capsule) administration to Beagle dogs for 52 weeks*. Life Sci Res Ltd. Report No:92/RHA311/0464
- Holmes, P. (1993) *Toxicity study by dietary administration to Beagle dogs for 52 weeks*. Life Sci Res Ltd. Report No: 93/RHA465/0243;
- Hummel, J., McKendrick, S., Brindley, C., & French, R. (2009). Exploratory assessment of dose proportionality: Review of current approaches and proposal for a practical criterion. *Pharmaceutical Statistics*, 8, 38–49. <https://doi.org/10.1002/pst.326>
- Ingenloff, K. R., Garlapati, R., Poché, D., Singh, M. I., Remmers, J. L., & Poché, R. M. (2013). 457 Feed-through insecticides for the control of the sand fly *Phlebotomus argentipes*. *Medical and Veterinary Entomology*, 10–18, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.00995.x>
- Khalid, S., Rehman, A., Amir, M. Y., Rehman, A., Sarfaraz, I., & Asif, M. (2017). Comparative efficacy of ivermectin and fipronil on controlling tick infestation in commercial layers: A randomized controlled trial. *Pakistan Journal of Zoology*, 49, 1139–1142. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.3.sc9>
- Kužner, J., Turk, S., Grace, S., Soni-Gupta, J., Fourie, J. J., Marchiondo, A. A., & Rugg, D. (2013). Confirmation of the efficacy of a novel fipronil spot-on for the treatment and control of fleas, ticks and chewing lice on dogs. *Veterinary Parasitology*, 193, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.006>
- Marchiondo, A. A., Holdsworth, P. A., Fourie, L. J., Rugg, D., Hellmann, K., Snyder, D. E., & Dryden, M. W. (2013). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition: Guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestations on dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 194, 84–97. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.003>
- McMahan, R. L., Strynar, M. J., McMillan, L., DeRose, E., & Lindstrom, A. B. (2016). Comparison of fipronil sources in North Carolina surface water and identification of a novel fipronil transformation product in recycled wastewater. *Science of the Total Environment*, 569–570, 880–887. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.085>
- Melo, R. C., Tavares, P. V., Batista, L. C. S. O., Carneiro, M. B., Correia, T. R., Cid, Y. P., Coumendouros, K., & Scott, F. B. (2012). Eficácia do fipronil oral no controle de *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) e *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) em cães. *Revista Brasileira De Medicina Veterinaria*, 34, 15–20.
- Petry, G., Fourie, J., & Wolken, S. (2014). Comparison of the Palatability of a New Flavoured Drontal® Plus Tablet (Drontal® Plus Treat 10 kg) and Milbemax® chewable tablets when presented to privately owned dogs. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 163–9, <https://doi.org/10.4236/ojvm.2014.48018>
- Poché, D. M., Franckowiak, G., Clarke, T., Tseveenjav, B., Polyakova, L., & Poché, R. M. (2020). Efficacy of a low dose fipronil bait against blacklegged tick (*Ixodes scapularis*) larvae feeding on white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) under laboratory conditions. *Parasites and Vectors*, 13, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04258-0>
- Poché, D. M., Sayakova, Z., Polyakova, L., & Aimakhanov, B. (2018). Field evaluation of a 0.005% fipronil bait, orally administered to *Rhombomys opimus*, for control of fleas (Siphonaptera: Pulicidae) and phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Central Asian Republic of Kazakhstan. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006630>
- Poché, R. M., Garlapati, R., Singh, M. I., David, M., Garlapati, R., & Singh, M. I. (2013). Evaluation of fipronil oral dosing to cattle for control of adult and larval sand flies under controlled conditions evaluation of fipronil oral dosing to cattle for control of adult and larval sand flies under controlled conditions. *Vector Control, Pest Management, Resistance, Repellents.*, 50, 833–837. <https://doi.org/10.1603/ME12259>
- Poché, R. M., Githaka, N., Gool, F. V., Kading, R. C., Hartman, D., Polyakova, L., Okoth, E., Nene, V., & Lozano-fuentes, S. (2017). Acta Tropica Preliminary efficacy investigations of oral fipronil against *Anopheles arabiensis* when administered to Zebu cattle (*Bos indicus*) under field conditions. *Acta Tropica*, 176, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.030>
- Postal, J. M., Jeannin, P. C., & Consalvi, P. J. (1995). Field efficacy of a mechanical pump spray formulation containing 0.25% of fipronil in the treatment and control of fleas infestation and association dermatological signs in dogs and cats. *Veterinary Dermatology*, 6, 153–158.
- Roques, B. B., Lacroix, M. Z., Puel, S., Gayraud, V., Picard-Hagen, N., Jouanin, I., Perdu, E., Martin, P. G., & Viguié, C. (2012). CYP450-Dependent biotransformation of the insecticide fipronil into fipronil sulfone can mediate fipronil-induced thyroid disruption in rats. *Toxicological Sciences*, 127, 29–41. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs094>
- Rust, M. K. (2017). The biology and ecology of cat fleas and advancements in their pest management: a review. *Insects*, 8(4), 118. <https://doi.org/10.3390/insects8040118>
- Sadaria, A. M., Sutton, R., Moran, K. D., Teerlink, J., Brown, J. V., & Halden, R. U. (2017). Passage of fiproles and imidacloprid from urban pest control uses through wastewater treatment plants in northern California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36, 1473–1482. <https://doi.org/10.1002/etc.3673>
- Shaw, S. E., Day, M. J., Birtles, R. J., & Breitschwerdt, E. B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*, 17(2), 74–80. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(00\)01856-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(00)01856-0)
- Starr, J. M., Li, W., Graham, S. E., Bradham, K. D., Stout, D. M., Williams, A., & Sylva, J. (2016). Using paired soil and house dust samples in an in vitro assay to assess the post ingestion bioaccessibility of sorbed

- fipronil. *Journal of Hazardous Materials*, 312, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.053>
- Tang, J., Amin Usmani, K., Hodgson, E., & Rose, R. L. (2004). In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chemico-Biological Interactions*, 147, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.03.002>
- Taylor, M. A. (2001). Recent developments in ectoparasiticides. *The Veterinary Journal*, 161, 253–268. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0549>
- Teerlink, J., Hernandez, J., & Budd, R. (2017). Fipronil washoff to municipal wastewater from dogs treated with spot-on products. *Science of the Total Environment*, 599–600, 960–966. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.219>
- Testa, C., Salis, S., Rubattu, N., Roncada, P., Miniero, R., & Brambilla, G. (2019). Occurrence of Fipronil in residential house dust in the presence and absence of pets: a hint for a comprehensive toxicological assessment. *Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 54, 441–448. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1607133>
- Wang, K., Vasylieva, N., Wan, D., Eads, D. A., Yang, J., Tretten, T., Barnych, B., Li, J., Li, Q. X., Gee, S. J., Hammock, B. D., & Xu, T. (2019). Quantitative detection of fipronil and fipronil-sulfone in sera of black-tailed prairie dogs and rats after oral exposure to fipronil by camel single-domain antibody-based immunoassays. *Analytical Chemistry*, 91, 1532–1540. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04653>
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., & Xie, S. (2010). PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 99, 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>
- Ziliotto, L., Luna, S. P. L., Filho, D. A. A., Resende, L. O., Aun, A. G., & Braz, M. G. (2017). Genotoxicity assessment of fipronil (frontline plus®) in *Canis familiaris*. *Pesqui. Vet. Bras.*, 37, 257–260. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000300009>

How to cite this article: dos Santos, G. C. M., Scott, F. B., Campos, D. R., Magalhães, V. D. S., Borges, D. A., Miranda, F. R., Alves, M. C. C., Pereira, G. A., Moreira, L. O., Lima, E. A. S., Rocha, M. B. D. S., & Cid, Y. P. (2021). Oral pharmacokinetic profile of fipronil and efficacy against flea and tick in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 00, 1–11. <https://doi.org/10.1111/jvp.13004>