

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de Comprimidos de Fipronil para cães: Farmacocinética
e Eficácia Ectoparasiticida**

Gabriela Carmelinda Martins dos Santos

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE FIPRONIL PARA
CÃES: FARMACOCINÉTICA E EFICÁCIA ECTOPARASITICIDA**

GABRIELA CARMELINDA MARTINS DOS SANTOS

Sob Orientação da Professora
Yara Peluso Cid

e Co-orientação do Professor
Luiz Henrique Guerreiro Rosado

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2018

S237d Santos, Gabriela Carmelinda Martins, 1986-
Desenvolvimento de comprimidos de fipronil para
cães: farmacocinética e eficácia ectoparasiticida /
Gabriela Carmelinda Martins Santos. - 2018.
88 f.: il.

Orientadora: Yara Peluso Cid.
Coorientador: Luiz Henrique Guerreiro Rosado .
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Química, 2018.

1. Farmacocinética . 2. Fipronil . 3. Eficácia
Ectoparasiticida. I. Cid, Yara Peluso, 1982-, orient.
II. Rosado , Luiz Henrique Guerreiro , 1981-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GABRIELA CARMELINDA MARTINS DOS SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química Analítica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2018

Prof. Dra. Yara Peluso Cid, UFRRJ
(Orientadora)

Prof. Dra. Raquel Rennó Braga, IFRJ

Prof. Dra. Vanessa Gomes Kelly Almeida, UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a todos aqueles que acreditaram e que acreditam na ciência como instrumento transformador da sociedade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e proteção.

À universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por ter aberto meus olhos para o mundo e a todos os mestres, com os quais tive o prazer em conviver, pela vontade de querer nos fazer pessoas melhores.

À toda equipe do LQEPV, principalmente aos alunos e ex-alunos do setor de farmacometria, meus companheiros de laboratório, pela convivência diária e amizade. Em especial a Fernanda, Liliane, Leandra, Aline, Byanca e João.

À amiga Thais, por toda ajuda, conselhos e companheirismo, pelo pensar positivo e pelo modo leve de encarar a vida sempre com um sorriso no rosto. Pelas conversas descontraídas e ensinamentos.

À Viviane Magalhães pela acolhida, sugestões, orientações e por compartilhar parte de seu conhecimento conosco.

Ao professor Luiz Guerreiro, pela idealização desse projeto e apoio durante parte do desenvolvimento.

À professora Marcela Coutinho do IFRJ pela parceria no desenvolvimento dos comprimidos.

À Priscila e a Débora por todo apoio durante a parte experimental desse trabalho.

À amiga Melina Alves, por desenvolver esse trabalho junto comigo, por todo companheirismo, momentos de descontração, apoio, força e carinho durante todos esses anos.

À amiga, Isabela Lima pela convivência diária e pela troca de conhecimentos, por todo companheirismo no dia-dia de aulas e experimentos.

À companheira de laboratório, e acima de tudo, grande amiga Isabela Hastenreiter, por sempre estar disposta a me ajudar, pelas conversas, paciência e por sempre me entender.

Aos animais que contribuíram para este trabalho. Respeito e agradecimento.

Em especial, a minha orientadora, professora Yara Peluso Cid, pela paciência na orientação, total apoio e disponibilidade. Pela confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado e por acreditar em mim mais que eu mesma. Obrigada pelas palavras de incentivo, amizade e por transmitir seu

conhecimento de maneira leve, simples e fácil de ser compreendida, típico dos acadêmicos que conseguem se destacar tanto na pesquisa como no ensino. Você é minha inspiração!

Aos queridos amigos, Augusto Pereira, Leonardo Bastos, Michel Brauner, Arthur Valbon, por sempre ouvirem minhas lamentações, segurarem minha barra, e também pelos momentos de descontração. Levarei vocês pra sempre no meu coração.

Por fim, agradeço em especial àqueles que sempre me apoiaram, me incentivaram, possibilitaram que eu desenvolvesse meus projetos de vida, entenderam minha ausência nesse tempo e que seguramente são os mais que compartilham da minha alegria: minha família. Vocês são minha base, meu tudo! Amor incondicional a vocês.

EPÍGRAFE

*“Na garra cruel da circunstância,
Eu não recuei nem gritei.
Sob os golpes de azar
Minha cabeça está sangrando, mas ereta.
Encontra-me e deve encontrar-me sempre destemido.
Não importa quão estreito o portão,
Quão carregado de castigos o pergaminho,
Eu sou o mestre do meu destino
Eu sou o capitão da minha alma.”*

William Ernest Henley

RESUMO

SANTOS, Gabriela Carmelinda Martins. **Desenvolvimento de comprimidos de fipronil para cães: farmacocinética e eficácia ectoparasiticida.** 2018. 74p Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O fipronil (FIP) é um inseticida pertencente a classe dos fenilpirazóis. É amplamente utilizado na agricultura e na medicina veterinária. Seu mecanismo de ação está envolvido no bloqueio da transmissão de sinal devido ao antagonismo dos receptores γ -aminobutíricos (GABA) presentes nos ácaros e nos insetos. O aumento do convívio entre humanos e animais de estimação faz com que haja preocupação com a prevenção e tratamento das infestações por pulgas e carrapatos. Os produtos disponíveis no mercado para o tratamento de ectoparasitas em cães e gatos encontram-se em sua maioria na forma tópica, no entanto estão associados a danos causados para o animal, proprietário e para o meio ambiente, devido a exposição não controlada ao fármaco, levando a necessidade de desenvolvimento de novos produtos. As formas farmacêuticas para administração oral de fármacos são as mais utilizadas pela conveniência que proporcionam, constituindo uma via de administração não invasiva e por possuírem baixo custo. O objetivo do presente estudo foi o delineamento farmacotécnico e o controle de qualidade físico-químico de comprimidos de liberação imediata de fipronil, bem como determinar a sua farmacocinética e a eficácia ectoparasiticida em cães. Os resultados demonstraram que foi possível produzir comprimidos de FIP obedecendo os critérios estabelecidos na Farmacopeia Brasileira. Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que o melhor diluente a ser utilizado no desenvolvimento dos comprimidos é a lactose devido ao adequado perfil de liberação para comprimidos de liberação imediata. O FIP administrado pela via oral na dose de 2 mg/kg atingiu a circulação sistêmica ($C_{max} = 2,17 \pm \mu\text{g/mL}$) sendo rapidamente absorvido ($t_{max} = 2,67 \pm 1,37$ h) e metabolizado, uma vez que seu metabolito SULF apresentou $C_{max} = 1,32 \pm 0,55 \mu\text{g/mL}$ em um $t_{max} = 3,5 \pm 1,23$ h. Tanto a sua eliminação como a da SULF ocorreram de forma lenta, ($t_{1/2} = 385,93 \pm 405,31$ h) e ($t_{1/2} = 385,93 \pm 36,26$ h) respectivamente, mantendo níveis plasmáticos quantificáveis no sangue por até 28 dias após o tratamento. O teste de eficácia carrapaticida e pulicida demonstrou que o FIP administrado por via oral na dose de 2 mg/kg apresentou eficácia pulicida média de 80% contra *C. felis felis* por 15 dias após o tratamento, no entanto não apresentou eficácia carrapaticida contra *R. sanguineus*.

Palavras chave: Fipronil, farmacocinética, eficácia ectoparasiticida.

ABSTRACT

SANTOS, Gabriela Carmelinda Martins. **Development of fipronil tablets for dogs: pharmacokinetics and ectoparasiticide efficacy.** 2018. 74p Dissertation (Master in Chemistry). Institute of Exact Sciences, Department of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Fipronil (FIP) is an insecticide belonging to the class of phenylpyrazoles. It is widely used as an insecticide in agriculture and in veterinary medicine. Its mechanism of action is involved with blocking the signal transmission due to the γ -aminobutyric receptor antagonism (GABA) present in acari and insects. Increased human-pet interaction makes concern for the prevention and treatment of flea and tick infestations. The products commercially available for ectoparasites treatment in dogs and cats are mostly in the topical form, however they are associated with damage to the animal, owner and to the environment, due to uncontrolled exposure to the drug, leading to requirement of new product development. Pharmaceutical forms for oral administration of drugs are most common used for the convenience they provide, constituting a non-invasive route of administration and having a low cost. The objective of the study was the pharmaceutic design and physical-chemical quality control of immediate release tablets of fipronil, as well as to determine its pharmacokinetics and the ectoparasiticide efficacy in dogs. The results showed that it was possible to produce FIP tablets according the criteria established in the Brazilian pharmacopoeia. *In vitro* release studies have shown that the best diluent to be used in tablet development is lactose due to the appropriate release profile for immediate release tablets. FIP administered orally at the dose of 2 mg/kg reached the systemic circulation ($C_{max} = 2.17 \pm 0.84 \mu\text{g/mL}$) and was fast absorbed ($t_{max} = 2.67 \pm 1.37 \text{ h}$) and metabolized, once its SULF metabolite presented $C_{max} = 1.32 \pm 0.55 \mu\text{g/mL}$ in a $t_{max} = 3.5 \text{ h}$. Both elimination, FIP and SULF occurred slowly ($t_{1/2} = 385.93 \pm 405.31 \text{ h}$) and ($t_{1/2} = 385.93 \pm 36.26 \text{ h}$) respectively, maintaining quantifiable plasma levels in the blood for up to 28 days after treatment. The *in vivo* ectoparasiticide efficacy tests proved that FIP administered orally at the dose of 2 mg / kg had a efficacy of 80% against *C. felis felis* for 15 days after treatment but it did not show any efficacy against *R. sanguineus*.

Key words: Fipronil, pharmacokinetics, ectoparasiticide efficacy

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades Físico-Químicas do Fipronil	6
Tabela 2. Composição dos granulados placebos preparados em escala laboratorial.....	19
Tabela 3. Composição dos granulados de fipronil preparados em escala laboratorial.....	20
Tabela 4. Propriedades de fluidez de pós através do IC	23
Tabela 5. Critérios de avaliação da determinação de peso para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária.....	25
Tabela 6. Condições para desenvolvimento do método de dissolução.....	28
Tabela 7. Quantificação do teor de fipronil na matéria-prima.....	32
Tabela 8. Caracterização dos grânulos desenvolvidos como formulações placebo.	33
Tabela 9. Peso médio, dureza e friabilidade dos comprimidos placebos	36
Tabela 10. Caracterização dos grânulos das formulações contendo Fipronil.....	37
Tabela 11. Peso médio, dureza e friabilidade dos comprimidos contendo Fipronil.....	40
Tabela 12. Resultados dos ensaios de doseamento e uniformidade de dose dos comprimidos de Fipronil.	41
Tabela 13. Caracterização dos granulados desenvolvidos para ajuste de dose.	42
Tabela 14. Caracterização Físico-Química dos CP desenvolvidos para ajuste de dose.	43
Tabela 15. Solubilidade ($\mu\text{g/mL}$) do Fipronil nos diferentes meios de dissolução.	44
Tabela 16 - Porcentagem de fipronil dissolvida em casa tempo no estudo de liberação <i>in vitro</i> dos comprimidos de fipronil desenvolvidos em diferentes condições e meios de dissolução.....	45
Tabela 17. Resumo dos dados estatísticos da porcentagem de fipronil liberado após 30 minutos de estudo de liberação <i>in vitro</i> utilizando HCl 0,1 M + SDS 1% a 100 rpm utilizando como aparato pá em diferentes pH's.	48
Tabela 18. Resumo dos dados estatísticos da porcentagem de FIP liberado após 30 minutos de estudo de liberação <i>in vitro</i> das formulações utilizando lactose e celulose como diluentes em diferentes meios de liberação.	49
Tabela 19. Resumo dos dados estatísticos da porcentagem de FIP liberado após 30 minutos de estudo de liberação <i>in vitro</i> utilizando HCl 0,1 M + SDS 1%, variando o aparato, a rotação e a formulação.....	50
Tabela 20. Determinação do fluxo (J) e cinética de liberação ($n=6$) dos comprimidos de FIP utilizando diferentes diluentes e meios de dissolução.....	51

Tabela 21. Resumo dos dados estatísticos do fluxo (<i>J</i>) após estudo de liberação <i>in vitro</i> das formulações utilizando lactose como diluente em diferentes meios de liberação utilizando pá como aparato com rotação a 100 rpm.....	52
Tabela 22. Eficiência de Dissolução das formulações nos diferentes meios de liberação.	53
Tabela 23. Concentração de Fipronil encontrada em cada animal.	56
Tabela 24. Concentração de Fipronil-sulfona encontrada em cada animal.	57
Tabela 25. Parâmetros Farmacocinéticos	59
Tabela 26. Eficácia de fipronil oral no controle de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em Cães.	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da molécula de fipronil.....	6
Figura 2. Principais metabólitos do fipronil em mamíferos.	7
Figura 3. Aparato para determinação do ângulo de repouso	21
Figura 4. Compressora Monopress LM-1 Lemaq.	24
Figura 5. Curva de calibração do padrão (Fipronil S.Q.R).	32
Figura 6. Resultado de determinação de peso dos comprimidos placebos 1 e 2 desenvolvidos com lactose.	34
Figura 7. Resultado de determinação de peso dos comprimidos placebos 3 e 4 desenvolvidos com celulose	35
Figura 8. Resultado de peso médio dos comprimido contendo fipronil correspondente aos lotes 1 e 2 da formulação 1.	38
Figura 9. Resultado de peso médio dos comprimido contendo fipronil correspondente aos lotes 1 e 2 da formulação 2.	39
Figura 10. Curva padrão de calibração do FIP	41
Figura 11. Resultado de peso médio dos comprimidos desenvolvidos para ajuste de dose.....	42
Figura 12. Comprimidos desenvolvidos no ajuste de dose	43
Figura 13. Solubilidade do FIP em diferentes meios de dissolução.....	44
Figura 14. Perfis de dissolução de comprimidos utilizando lactose como diluente, usando o aparato pá com rotação a 100 rpm e 1% de tensoativo (SDS).	46
Figura 15. Perfis de dissolução de comprimidos de Fipronil com lactose como diluente em HCl 0,1M com diferentes concentrações de tensoativo SDS, utilizando o aparato pá a 100 rpm.	46
Figura 16. Perfis de dissolução de comprimidos utilizando lactose como diluente comparando a influência do aparato e da rotação no ensaio de dissolução, usando HCl 0,1M + SDS 1,0%.	47
Figura 17. Perfis de dissolução de comprimidos de Fipronil com celulose como diluente em HCl 0,1M com diferentes concentrações de tensoativo SDS, utilizando o aparato pá a 100 rpm.	47
Figura 18. Perfis de dissolução de comprimidos utilizando lactose e celulose como diluente, usando como meio de liberação HCl 0,1 + SDS 1%, aparato Pá a 100 rpm.	48
Figura 19. Curvas bioanalíticas da relação de área dos padrões analíticos (Fipronil e Fipronil-sulfona) e padrão interno (Etiprol) em plasma canino.	55
Figura 20. Curva de concentração plasmática do Fipronil e fipronil sulfona a partir de administração oral em dose única de comprimidos de fipronil em cães.	58
Figura 21. Correlação farmacocinética-farmacodinâmica dos comprimidos de fipronil	61

LISTA DE ABREVIACOES

- ABINPET** – Associação Brasileira de Produtos para Animais de Estimação
- ACN** – Acetonitrila
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATR** – rea total do retângulo.
- AUC** – rea sob a curva
- CEUA** - Comissão de tica no Uso de Animais
- CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- Cmax** – Concentração plasmática máxima
- CP** – Comprimidos
- Da** – Densidade aparente
- DPR** – Desvio padrão relativo
- ED** – Eficiência de Dissolução
- EPA** – Agência de Proteção Ambiental
- FIP** – Fipronil
- GABA** – γ -aminobutricos
- IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IC** – ndice de compressibilidade
- IFRJ** – Instituto Federal do Rio de Janeiro
- J** – Fluxo de liberação
- LLE** – Extração em fase líquida
- Log P** – Coeficiente de partição
- LPME** – Microextração em fase líquida
- LQEPV** – Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária
- MAPA** –Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
- Mg** – Magnésio
- MP** – Matéria-prima
- N** - Newtons
- PVP** – Polivinilpirrolidona
- qsp** – Quantidade suficiente para
- RDC** - Resolução da Diretoria Colegiada
- rpm** – Rotação por minuto

S.Q.R. – Substância Química de Referência
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SINDAN – Sindicato Nacional de Produtos de Saúde Animal
SM – Solução mãe
SPE – Extração em fase sólida
SPME – Microextração em fase sólida
SULF – Fipronil-sulfona
t_{1/2} – Tempo de meia-vida
TGI – Trato-gastrointestinal
t_{max} – Tempo máximo
UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
USP – Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeia*)
UV – Ultravioleta
V – Velocidade compressão
 α – Ângulo de repouso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A Importância dos Animais de Companhia.....	3
2.2 O Segmento Pet do Mercado de Produtos Farmacêuticos Veterinários	3
2.3 Ectoparasitas que Acometem Cães e Gatos.....	4
2.4 Fipronil	5
2.5 Delineamento de novas formas farmacêuticas veterinárias.....	8
2.6 Desenvolvimento de Comprimidos	9
2.7 Ensaio Físico-Químico para a Caracterização de Comprimidos.....	11
2.8 Estudo de Liberação <i>in vitro</i>	11
2.9 Influência das formas farmacêuticas na absorção de fármacos	14
2.10 Estudo de Farmacocinética Descritiva.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material.....	17
3.1.1 Reagentes.....	17
3.1.2 Matérias-primas	17
3.1.3 Substâncias químicas de referência Fipronil, Fipronil-Sulfona e Etiprol.....	17
3.1.4 Equipamentos e acessórios	18
3.2 Determinação do teor do fipronil matéria-prima.....	19
3.3 Obtenção das Formulações	19
3.3.1 Desenvolvimento de formulações placebos.....	19
3.3.2 Incorporação do ativo fipronil às formulações	20
3.3.3 Ajuste de dose.....	20
3.4 Caracterização dos Grânulos	21
3.4.1 Determinação do ângulo de repouso.....	21
3.4.2 Velocidade de escoamento	22
3.4.3 Determinação da densidade aparente.....	22
3.4.4 Determinação do índice de compressibilidade	23
3.5 Compactação.....	19
3.6 Ensaio Físico-Químico de Controle de Qualidade dos Comprimidos.....	24
3.6.1 Determinação de peso.....	24

3.6.2 Friabilidade	25
3.6.3 Dureza.....	26
3.6.4 Ensaio de doseamento dos comprimidos	26
3.6.5 Uniformidade de doses unitárias	26
3.6.6 Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	27
3.6.6.1 Estudo da solubilidade de Fipronil e escolha do meio de dissolução.....	27
3.6.6.2 Desenvolvimento do ensaio de dissolução	27
3.6.6.3 Estudo da cinética de dissolução e análise de fluxo de liberação <i>in vitro</i>	28
3.6.6.4 Cálculo da eficiência de dissolução.....	28
3.7 Estudo <i>in vivo</i>	27
3.7.1 Localização do Estudo.....	29
3.7.2 Seleção dos animais e identificação	29
3.7.3 Origem e Manutenção das Pulgas e Carrapatos	29
3.7.4 Tratamento.....	29
3.7.5 Avaliação <i>in vivo</i> da Eficácia dos Comprimidos de Fipronil no Controle de <i>Ctenocephalides felis felis</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em Cães	30
3.7.6 Estudos de farmacocinética descritiva.....	30
3.7.6.1 Método bioanalítico	30
3.7.6.2 Construção da curva de concentração plasmática	31
4 RESULTADOS e DISCUSSÕES	32
4.1 Quantificação do teor de FIP na matéria-prima.....	32
4.2 Caracterização dos Grânulos Placebos	32
4.3 Ensaio Físico-Químicos dos comprimidos.....	32
4.4 Caracterização dos Grânulos das Formulações Contendo o Ativo Fipronil.....	36
4.5 Ensaio Físico-Químico dos comprimidos contendo fipronil.....	328
4.6 Ensaio de doseamento e uniformidade de conteúdo dos comprimidos de FIP.....	40
4.7 Ajuste de dose.....	42
4.8 Ensaio de Liberação <i>in vitro</i>	44
4.8.1 Estudo de Solubilidade.....	44
4.8.2 Estudo de Perfil de Dissolução <i>in vitro</i>	44
4.8.3 Estudo de Cinética de Liberação.....	54
4.8.4 Cálculo da eficiência de dissolução.....	53
4.9 Estudo <i>in vivo</i>	55
4.9.1 Estudo de Farmacocinética.....	57

4.9.2 Avaliação da eficácia ectoparasiticida.....	64
5 CONCLUSÃO.....	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 INTRODUÇÃO

Os animais de estimação tem se tornado cada vez mais importantes na vida das pessoas, sendo muitas vezes considerados amigos e até mesmo familiares. Atrrelado a isso existe a 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. Além da preocupação da saúde animal o convívio entre humanos e animais, faz com que haja uma preocupação em saúde pública no tocante a transmissão de patógenos dos animais para o homem.

Dentre as pulgas e carrapatos que parasitam o cão destacam-se *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus*, por serem espécies cosmopolitas, ambas com capacidade vetorial de uma série de patógenos, não só para os animais, mas também para o homem.

Existe um ampla gama de ativos disponíveis no mercado para o controle de pulgas e carrapatos em animais domésticos. Dentre as substâncias com ação terapêutica antiparasitária utilizadas estão as amidinas, lactonas macrocíclicas, carbamatos, nitroguanidinas, piretróides, benzofeniluréias e fenilpirazoles. Esses produtos estão disponíveis no mercado tanto para aplicação tópica, como no caso dos shampoos, coleiras, pulverização, *sprays*, *spot-on* e *pour-on*, talcos e espumas, e para administração oral (comprimidos e tabletes mastigáveis) e parenteral (injeção subcutânea ou intramuscular).

O fipronil (FIP) é um pesticida da classe dos fenilpirazóis utilizado na medicina veterinária como um antiparasitário de uso tópico para aplicação em cães e gatos. Atualmente está disponível no mercado veterinário nas formas de apresentação *spray* e *spot-on* para aplicação tópica em cães e gatos.

Os produtos tópicos são seguros quando usados de acordo com as instruções, no entanto podem ocorrer exposições excessivas ou não intencionais, acarretando a danos ao animal, ao proprietário e ao meio ambiente, além disso o aumento da terapêutica veterinária leva a necessidade de desenvolvimento de novos produtos. O desenvolvimento de formas farmacêuticas adequadas, para pacientes com diferentes necessidades é um desafio para os farmacêuticos.

Aspectos como a facilidade no tratamento dos animais, a duração da eficácia e a velocidade de morte dos parasitos são considerados importantes tanto para os veterinários como para os proprietários de animais. Sendo a conveniência na administração um fator chave para o cumprimento do tratamento. As formas farmacêuticas para administração oral de fármacos são as mais utilizadas pela conveniência que proporcionam, constituindo uma via de administração não invasiva, além de possuírem baixo custo. No entanto existem algumas limitações associadas à administração por esta via que influenciam na biodisponibilidade dos fármacos, podendo estes serem pouco absorvidos pelo trato gastrointestinal (TGI) ou necessitarem de uma elevada frequência de administração decorrente da sua rápida eliminação e conseqüente curta ação terapêutica. A velocidade e a extensão com as quais um fármaco é absorvido a partir TGI podem ser afetadas por diversos fatores físico-químicos, como a solubilidade, dissolução, forma cristalina e permeabilidade do fármaco, assim como pelo tipo de forma farmacêutica e por fatores fisiológicos.

Atualmente no mercado existem três moléculas da família das isoxazolininas, que representam uma nova classe de ectoparasiticidas que atuam sistematicamente após a administração oral, o afoxolaner (Nexgard®), o fluralaner (Bravecto™) e o Sarolaner (Simparic®). As três formulações são altamente palatáveis para facilitar a administração e proporcionam atividade inseticida e acaricida duradoura contra pulgas e carrapatos. No entanto,

além esses produtos possuem alto custo, o que dificulta sua aquisição pelo proprietário do animal, eles ainda expõe o animal a uma elevada dose de ativo, e em casos de intoxicação ainda não há conhecimento de um antídoto para reverter os efeitos indesejáveis, como ocorre com as forma tópica que pode ser retirada através da realização de banhos.

A ação sistêmica do fipronil já foi evidenciada em outros estudos através da administração subcutânea do FIP em bovinos e da administração por fipronil via oral em cães para o controle de ectoparasita.

Este trabalho teve como objetivo realizar o delineamento farmacotécnico e o controle de qualidade físico-químico de comprimidos de liberação imediata de fipronil, bem como determinar a sua farmacocinética e a eficácia ectoparasiticida em cães. A formulação proposta se caracteriza como uma alternativa às formas farmacêuticas disponíveis no mercado para o controle de ectoparasitos em cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Importância dos Animais de Companhia

A relação entre o homem e os animais de estimação tem início desde a pré-história. Nos Estados Unidos estima-se que 30,65 % das famílias possuem cães e 30,4 % possuem gatos (BAUER et al., 2015). Cada vez mais os animais de estimação tem-se tornado importante na vida das pessoas, sendo muitas vezes considerados amigos e até mesmo familiares (MAGALHÃES et al., 2016).

Os animais de companhia, atualmente, possuem funções na sociedade que estão se modificando de acordo com as necessidades e as transformações da civilização. Cães e gatos estão assumindo grande importância na manutenção da saúde mental e até mesmo física das pessoas uma vez que com o rápido desenvolvimento da civilização moderna os seres humanos tendem a se isolarem uns dos outros, e às vezes, o animal é o único fator constante no ambiente humano, ajudando a manter o equilíbrio emocional (TATIBANA; COSTA-VAL, 2009).

Vaccari e Almeida (2007) demonstraram que a inserção de animais no tratamento terapêutico de crianças em internação hospitalar poderia contribuir para que elas se tornassem mais cooperativas nos procedimentos hospitalares, provavelmente pelo fato de se sentirem mais relaxadas e conseguirem confiar no ambiente. Além disso, o alívio da dor e do desconforto foi outro benefício constatado neste estudo, seja pelo fato dos animais atuarem como estratégia de distração para a criança, fazendo-a esquecer da dor, ou simplesmente por trazerem descontração ao ambiente, aliviando a tensão e a ansiedade.

Alguns países da Europa estimularam idosos a adotarem cães, acreditando que isso seria capaz de melhorar a sua saúde, pois à medida que eles se sentissem responsáveis por algo, mais dispostos estariam a sair de casa e passear. Notou-se até uma diminuição na quantidade de medicamentos utilizados por eles (TATIBANA; COSTA-VAL, 2009).

Devido ao aumento da relação entre humanos e animais de companhia 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 (BAUER et al., 2015).

Além da preocupação da saúde animal o convívio entre humanos e animais, faz com que haja uma preocupação em saúde pública no tocante a transmissão de patógenos dos animais para o homem (MELO et al., 2012).

Diante desses fatores relacionados acima existe a necessidade de novos produtos, novos conhecimentos e novas formas farmacêuticas junto aos médicos veterinários, uma vez que a terapêutica veterinária cresce a cada ano que passa (VIEIRA; PINHEIRO, 2004).

2.2 O Segmento Pet do Mercado de Produtos Farmacêuticos Veterinários

O faturamento no segmento brasileiro de animais de estimação ocupa atualmente a terceira posição no ranking mundial o que corresponde a 5,14 % desse mercado, ficando atrás somente do Reino Unido com 5,8 % e do líder Estados Unidos, com 42,2%. Em 2016, esse faturamento correspondeu a R\$ 18,9 bilhões, sendo 7,8% correspondente aos medicamentos veterinários. Em relação a dados populacionais, a população pet no Brasil corresponde a 132,4 milhões dos 1,56 bilhões da população mundial, ocupando 4º lugar (ABINPET, 2016).

Ainda segundo a ABINPET, Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (2016), os cães representam a maior parcela da população pet mundial,

correspondendo a 360,8 milhões. No Brasil, há cerca de 52,2 milhões de cães criados em domicílios, de acordo com dados da Pesquisa Nacional de Saúde, divulgada no ano de 2015 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015).

A expansão do mercado de saúde animal pode ser atribuída, principalmente, a três fatores: continuidade da ameaça de doenças animais, aumento do interesse da população sobre a segurança alimentar e conseqüente aumento do rigor do arcabouço regulatório e, finalmente, crescimento da população de animais de companhia (CAPANEMA et al., 2007).

Os produtos veterinários destinados ao segmento pet são muito dependentes da estrutura social de cada país, do seu nível de renda e da sua cultura, sendo a maioria das empresas de produtos para saúde animal multinacionais, que são também grandes empresas da saúde humana. A elaboração de medicamentos tanto para humanos como para animais caracteriza a complementaridade do setor veterinário em relação ao farmacêutico tradicional, o que facilita a diluição de custos elevados na pesquisa e desenvolvimento (CAPANEMA et al., 2007).

De acordo com o Sindicato Nacional de Produtos para a Saúde Animal, (SINDAN, 2014) os medicamentos veterinários presentes no mercado, estão divididos nas seguintes classes: biológicas, antimicrobianas, ectoparasiticidas, endectocidas, terapêuticas, tônicos e fortificantes, desinfetantes, dermatológicas, suplementos nutricionais e embelezadores. A classe dos antiparasitários são as que mais contribuem para o mercado de produtos destinados à saúde animal, correspondendo uma parcela de aproximadamente 29% entre os anos 2011 e 2016.

Na segunda metade da década de 90 o segmento pet foi impulsionado pelo lançamento de novos produtos antiparasitários, como o Fipronil, fabricado pela Merial, e o Imidacloprid, da Bayer. O faturamento desse segmento totalizou US\$ 6,8 bilhões em 2005, o que equivaleu a 39% do mercado global de produtos para saúde animal (CAPANEMA et al., 2007).

Em 2012, a empresa Zoetis ocupou o primeiro lugar no *ranking* em faturamento das indústrias farmacêuticas de saúde animal, seguida da Merck e da Merial. As nacionais Ourofino e Vallée ocuparam, respectivamente, o quarto e quinto lugar, somando um faturamento de 559 milhões de reais (FERNANDES et al., 2013).

O aumento do vínculo entre cães e seus proprietários parece estar fazendo com que os produtos de saúde caninos ganhem atenção no mercado global e se tornem mais especializados nas últimas décadas (SONG et al., 2016).

2.3 Ectoparasitas que Acometem Cães e Gatos

Diversos artrópodes vivem como ectoparasitos em animais domésticos, sendo o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e a pulga *Ctenocephalides felis felis* as principais espécies que acometem cães e gatos, podendo transmitir diversos patógenos, uma vez que exercem hematofagia (SOARES et al., 2006).

A pulga da espécie *Ctenocephalides felis felis*, representa o ectoparasito mais importante na infestação de cães e gatos em todo o mundo em virtude de sua distribuição geográfica, devido a dupla ação parasitológica como agente infestante e vetor de doenças (LINARDI; SANTOS, 2012).

As pulgas causam desconforto tanto nos animais de estimação como em seus donos, e dependendo de fatores individuais e do número de pulgas, as picadas podem causar dermatite alérgica, prurido, hemorragias, lesões cutânea e anemia ferropriva em animais jovens (BEUGNET et al., 2016; LINARDI; SANTOS, 2012).

Mais de vinte diferentes tipos de patógenos foram associados a espécies de *Ctenocephalides* como vetores biológicos ou hospedeiros intermediários, incluindo bactérias, protozoários e helmintos, representando assim um potencial risco para a saúde humana e

animal. Dentre os principais patógenos destacam-se as espécies *Rickettsia felis*, *Yersinia pestis*, *Dipylidium caninum*, *Dipetalonema reconditum* e *Bartonella henselae* LINARDI; SANTOS, 2012; KUZNER et al., 2013).

Bartonella henselae é uma bactéria intracelular, gram-negativa, que parasita eritrócitos ou células epiteliais em uma variedade de hospedeiros mamíferos, transmitida através de vetores artrópodes. Em humanos, os sintomas da infecção por *Bartonella* incluem endocardite, linfadenite e meningite. Os sinais clínicos devido a infecções naturais em outros mamíferos (incluindo animais de companhia) são difíceis de confirmar, pois outras etiologias podem resultar em sintomas similares (MORSE et al., 2012). *Rickettsia felis*, também é uma bactéria, é o patógeno da doença febril conhecida como tifo (AHMED et al., 2016).

O carrapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, que parasita principalmente cães tem importância veterinária e médica significativas, uma vez que é um importante vetor de vários patógenos incluindo *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* (ALVES et al., 2017).

A erliquiose é doença, transmitida pela bactéria *Ehrlichia canis*, que acomete os cães, muito frequente no Brasil. Pode manifestar de forma aguda, subclínica ou crônica, em cães de idade variada (BORIN et al., 2009). O estágio agudo dura de duas a quatro semanas e possui sinais clínicos e hematológicos inespecíficos, tais como apatia, anorexia, vômitos, febre, secreção ocular e nasal, perda de peso, lesões oculares, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, dispnéia, anemia, leucopenia, trombocitopenia (PARPINELLI et al., 2017).

A babesiose está frequentemente relacionado a anemia. Essa doença causa vários transtornos para os tutores de cães, pois, quando se desenvolvem levam a um quadro clínico que fragiliza muito o animal, necessitando de auxílio veterinário e muitas vezes de internação (CARVALHO et al., 2018).

2.4 Fipronil

O FIP (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluormetil) fenil]-4-[(trifluormetil) sulfinil]-1H pirazol-3-carbonitrila) é um pesticida da família dos fenilpirazóis com ampla utilidade no controle de muitas pragas agrícolas e domésticas, incluindo espécies de gafanhotos, formigas, baratas, pulgas e carrapatos (ROMERO et al., 2016).

Na medicina veterinária, o fipronil é utilizado como um antiparasitário de uso tópico para aplicação em cães e gatos com indicação contra pulgas (*Ctenocephalides felis felis*) e carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*), sendo encontrado no mercado na forma de *spot-on* (Frontline® Top Spot e Fiprolex® Drop Spot) e de *spray* (Frontline® Spray). Também está disponível em associação com metoprene sob a forma de *spot-on* (Frontline® Plus Top Spot). Para aplicações em animais de produção o fipronil está disponível em duas formulações: *pour-on* (Topline® e Superhion®) e *spray* (Topline® Spray) (MAGALHÃES, 2016).

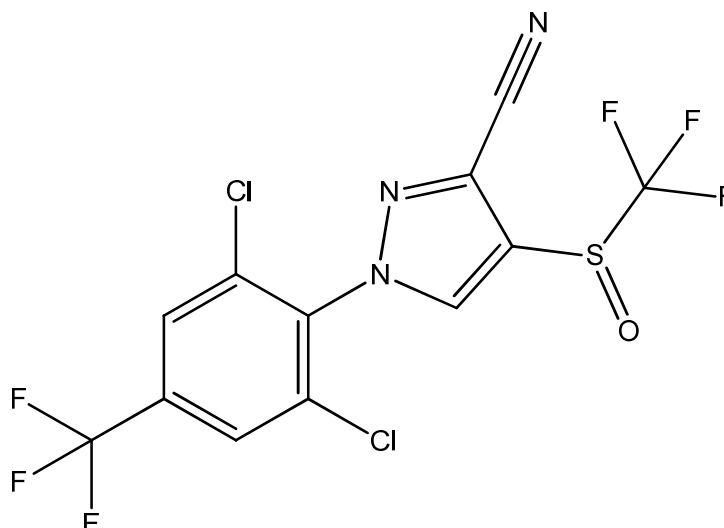


Figura 1. Estrutura química da molécula de fipronil

O fipronil possui solubilidade de baixa a moderada, por isso tem preferência a por matrizes lipofílicas, como lipídeos, óleos, proteínas e solventes orgânicos. É estável a temperatura ambiente porém suscetível a fotólise (GUNASEKARA et al., 2007). Na Tabela 1 encontram-se descritas as propriedades físico-químicas do FIP.

Tabela 1. Propriedades Físico-Químicas do Fipronil

Aspecto	Pó branco, odor mofado.
Peso molecular	437,2 g/mol
Solubilidade em água a 20 ° C	0,00,0019 g/L (pH 5); 0,0024 g/L (pH 9).
Densidade 20 ° C	1,477-1,626
log P (coeficiente de partição)	3,60

Fonte (TECHNICAL FACT SHEET FIPRONIL - EPA, 1998)

Seu mecanismo de ação ocorre pelo antagonismo do receptor GABA (ácido γ -aminobutírico), bloqueando os canais de cloreto, interferindo na neuromodulação, levando à morte do inseto por hiperexcitação (SOUZA et al., 2014).

Em mamíferos, o fipronil pode ser metabolizado através de três vias principais: oxidação na fração sulfinilo gerando fipronil sulfona; redução na fração sulfinilo gerando fipronil sulfeto; e hidrólise da porção ciano gerando fipronil amônia (Figura 2). O fipronil sulfona, também atua no receptor GABA e é o principal metabólito ativo do fipronil, apresentando toxicidade similar ao composto de origem em mamíferos (WANG et al., 2016).

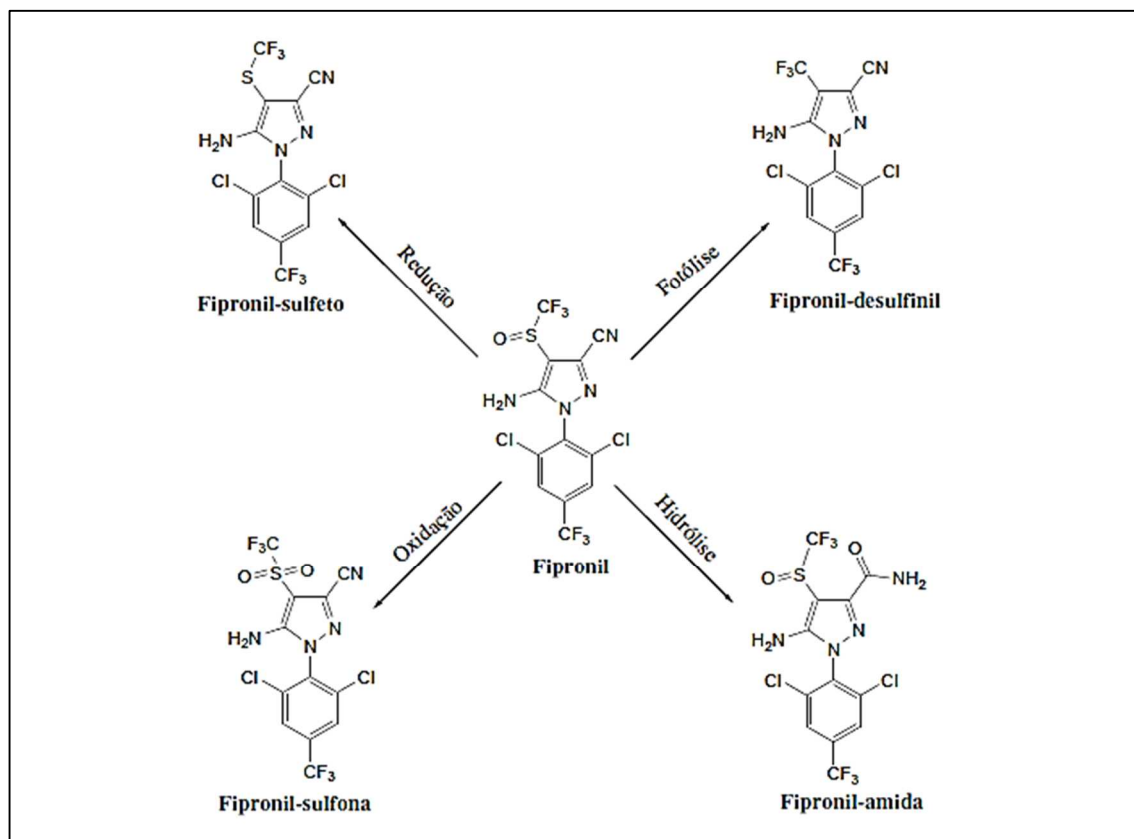


Figura 2. Principais metabólitos do fipronil em mamíferos. (Fonte: BHARDWAJ et al., 2012)

O FIP quando administrado por via oral em mamíferos é absorvido pelo trato gastrointestinal e rapidamente metabolizado. A concentração máxima do fipronil no sangue ocorre de 4 a 6 horas após sua ingestão e começa a declinar lentamente (processo de eliminação lento). A excreção do fipronil e de seus metabólitos ocorre principalmente pelas fezes e em menor quantidade pela urina (COUTINHO et al. 2005).

Embora o FIP apresente maior afinidade para com os receptores GABA dos insetos alguns estudos demonstraram que o FIP se liga aos receptores GABA dos mamíferos, revelando assim sua toxicidade (GUNASEKARA et al., 2007).

A toxicidade aguda do FIP foi caracterizada em ratos (dose > 50 mg/kg peso corporal), sendo apresentados tremores, locomoção alterada, postura encurvada, agitação, convulsões, mortalidade e alterações no sistema nervoso central após 7 horas de administração (WANG et al., 2016).

O metabólito fipronil sulfona, bem como o produto da fotodegradação, o fipronil-desulfenil, foram relatados como sendo mais tóxicos para os insetos, mamíferos, peixes e aves do que o composto FIP (DAS et al., 2006).

Os efeitos da exposição humana aguda ao fipronil incluem dor de cabeça, tonturas, vômitos e convulsões. As informações sobre os efeitos crônicos do fipronil ainda são um pouco limitadas, no entanto EPA (Agência de Proteção Ambiental) dos Estados Unidos classificou fipronil como um possível carcinógeno humano com base em dados que mostram um aumento de tumores de células foliculares tireoidianas em ratos (MCMAHEN et al., 2015).

Muito pouco se sabe sobre a exposição da população ao fipronil em geral. No entanto Dick et al., 2012 descreveram que a exposição humana não ocupacional ao fipronil pode ocorrer através do contato com animais de estimação que receberam aplicações de fipronil no

tratamento de pulgas e carrapatos. O estudo demonstra que o produto de uso tópico pode contaminar tanto o tutor bem como o meio ambiente.

No estudo realizado por McMahan et al., (2015) ao analisarem amostras de urina humana observou a ausência de fipronil e seus metabolitos, o que pode estar relacionado com sua eliminação através das fezes, como ocorre nos roedores. Outro fator que também pode estar relacionado é que as amostras analisadas eram referentes a indivíduos que não tinham uma informação conhecida a exposição ao fipronil, dificultando a análise devido as baixas concentrações na matriz. Apesar dos resultados negativos para as amostras de urina humana, 25% das amostras de plasma continham quantidades mensuráveis de fipronil sulfona comprovando a exposição regular dos humanos ao fipronil.

Além da exposição humana os medicamentos à base de fipronil utilizados em animais de estimação para o tratamento de pulgas e carrapatos podem ser introduzidos no sistema de tratamento de águas residuais durante a rotina de banho dos cães, uma vez que estes animais são banhados frequentemente em banheiros residências ou através de serviços profissionais onde os resíduos são direcionados diretamente para o esgoto (TEERLINK; HERNANDEZ; BUDD, 2017).

2.5 Delineamento de novas formas farmacêuticas veterinárias

Segundo a definição de medicamento de uso veterinário estabelecida pela Lei Nº 12.689, de 19 de julho de 2012, “pode-se classificar como medicamento toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada, cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com alimentos, destinados à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo os aditivos, suplementos, promotores, melhoradores da produção animal, antissépticos, desinfetantes de uso ambiental ou equipamentos, pesticidas e todos os produtos que utilizados nos animais e/ou no *habitat* protejam, restaurem ou modifiquem as funções orgânicas e fisiológicas.

Difícilmente os fármacos são administrados na forma da sua substância química pura, sendo mais frequente a sua administração através de formulações. Para a obtenção de medicamentos com elevada qualidade e para a incorporação de um fármaco em uma forma farmacêutica deve-se levar em consideração fatores como a via de administração, as propriedades físico-químicas do fármaco bem como as considerações terapêuticas relativas a sintomatologia a ser tratada (AULTON, 2005).

O desenvolvimento de novas formas farmacêuticas veterinárias requer formulações que agreguem melhoria na eficácia terapêutica, custo adequado, facilidade de administração e, ao mesmo tempo, requisitos que atendam às exigências para fins de registro junto MAPA. O delineamento dessas formulações farmacêuticas demanda conhecimento nas áreas de farmacologia, biofarmácia e farmacotécnica (VILLANOVA et al., 2014).

A biofarmacotécnica ou biofarmácia pode ser definida como estudo do modo como as propriedades físico-químicas do fármaco, a forma farmacêutica e a via de administração afetam a velocidade e o grau de absorção dos fármacos (AULTON, 2005).

Desenvolver uma nova formulação requer amplo conhecimento sobre as propriedades físico-químicas tanto do fármaco como dos seus excipientes. No passado era comum associar a eficácia clínica de um medicamento apenas a atividade farmacológica intrínseca ao fármaco, porém várias evidências mostraram que os excipientes e as técnicas de fabricação utilizadas podem gerar tanto medicamentos ineficazes quanto tóxicos, o que colaborou com a criação do conceito de Biofarmácia. Estudos relacionados aos processos de liberação, dissolução e biodisponibilidade adquiriram importância vital no desenvolvimento farmacotécnico de medicamentos (STORPIRTIS et al., 2009).

2.6 Desenvolvimento de Comprimidos

As formas farmacêuticas podem ser classificadas como: sólidas, semi-sólidas e líquidas ou quanto sua via de administração: oral, tópica e parenteral. As formas farmacêuticas para administração oral de fármacos são as mais utilizadas pela conveniência que proporcionam, constituindo uma via de administração não invasiva, além de possuírem baixo custo. No entanto, existem algumas limitações associadas à administração por esta via que influenciam diretamente na biodisponibilidade dos fármacos (NABAIS; VEIGA; FIGUEIRAS, 2016). As formas sólidas representam de modo geral, o maior número das prescrições médicas. As cápsulas e os comprimidos são usados com maior frequência dentre as formas farmacêuticas sólidas (PRISTA et al., 1991). Além disso, quando comparadas as formas farmacêuticas líquidas estas são mais estáveis podendo ser embaladas, transportadas e armazenadas mais convenientemente (FERREIRA, 2010).

Os comprimidos são preparações farmacêuticas de consistência sólida, forma variada, obtidas agregando por meio de pressão, várias substâncias medicamentosas secas e podendo ou não serem revestidos, tomando, nesse caso, a denominação de drágea (PRISTA, 1991). Segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010), comprimido é a forma farmacêutica sólida contendo uma dose única de um ou mais princípios ativos, com ou sem excipientes, obtida pela compressão de volumes uniformes de partículas. Pode ser de uma ampla variedade de tamanhos, formatos, apresentar marcações na superfície e ser revestido ou não. São vantajosos pela facilidade da fabricação da formulação, além disso, os procedimentos de obtenção permitem maior precisão da concentração de fármacos.

A ideia de obtenção de formas farmacêuticas sólidas por compressão de materiais particulados se dá desde 1843, quando foi concedida a primeira patente de uma máquina de comprimir, assim o emprego de comprimidos como forma farmacêutica recebeu grande interesse devido ao crescimento da indústria farmacêutica (AULTON, 2005).

Com base nas características de cedência os comprimidos podem ser classificados como de liberação imediata, liberação prolongada e liberação retardada. Nos comprimidos de liberação imediata o fármaco é liberado rapidamente após a administração e constitui o tipo mais comum de comprimido. Segundo a RDC Nº. 31, De 11 de Agosto de 2010, as formas farmacêuticas de liberação imediata são aquelas em que a dose total da substância ativa é disponibilizada rapidamente após sua administração. Em ensaios *in vitro* apresenta, em geral, dissolução média de no mínimo 75% da substância ativa em até 45 minutos, podendo ainda apresentar tipos de dissoluções diferenciadas em rápida 85% da substância ativa em até 30 minutos e muito rápida 85% da substância ativa em até 15 minutos.

Comprimidos de liberação modificada possuem adjuvantes diferentes dos usados em comprimidos de liberação imediata. O fármaco é liberado de maneira lenta e em velocidade aproximadamente constante. Para os comprimidos de cedência retardada, o fármaco é liberado algum tempo depois após a administração e assim que o período termina, a cedência normalmente é rápida, no entanto a liberação retardada também pode ser combinada com um produto de baixa velocidade de cedência (AULTON, 2005).

A produção de comprimidos pode ser efetuada através de três métodos: granulação por via úmida, granulação por via seca e compressão direta (LACHMAN; LIBERMAN, 2010).

Nos métodos de granulação os comprimidos são produzidos através da compactação de sistemas granulados pelo emprego de uma pressão até que o sistema se arranje estruturalmente e deforme, obtendo uma massa compacta de forma definida (MARSHALL, 2001).

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), granulado é a forma farmacêutica sólida contendo uma dose única de um ou mais princípios ativos, com ou sem excipientes. Consiste de agregados sólidos e secos de volumes uniformes de partículas de pó resistentes ao manuseio.

Na granulação por via úmida um líquido aglutinante é adicionado a mistura de pós que será granulado, consistindo o processo das seguintes etapas: (1) mistura dos componentes sólidos da formulação através da diluição geométrica com auxílio do gral e pistilo, (2) umedecimento com a agente agregante para obtenção da massa úmida, (3) granulação pela passagem desta massa pelo tamis, (4) secagem e (5) calibração do granulado (FERREIRA, 2010).

A granulação por via seca é um método de obtenção de comprimidos que não utiliza solução de aglutinante. Os pós são misturados e submetidos a um processo de compactação, obtendo granulados irregulares que são fragmentados em moinhos e tamizados obtendo grânulos de tamanho definido (FERREIRA, 2010). Para este processo o fármaco, diluente e aglutinante devem ter propriedades coesivas suficientes para compactação sem adesão de líquido (LACHMAN; LIBERMAN; 2010).

A compressão direta é mais simples quando comparada com os processos de granulação, uma vez que ocorre em duas etapas: mistura e compressão. Apesar desse processo estar ganhando espaço pela simplicidade e menor tempo de processo produtivo, o desenvolvimento desta técnica depende das características da matéria-prima e dos seus excipientes, visando a otimização dos processos de mistura, fluidez e compressibilidade do pó. Em alguns casos a granulação úmida ainda é a melhor alternativa, pois elimina alguns dos problemas da compressão direta, a exemplo a segregação do pó (POSSATO et al., 2016).

A formulação de um comprimido envolve a combinação de um ou mais ingredientes ativos com alguns componentes inativos, conhecidos como excipientes. Uma vez que as características dos ativos são conhecidas, estas devem ser ajustas à uma forma farmacêutica, e para este fim adiciona-se excipientes, dando a princípios ativo características ou funcionalidades terapêuticas, estabilidade e reprodutibilidade (ROBLES, 2011).

Os excipientes são considerados constituintes essenciais que garantem o desempenho do medicamento e otimizam a obtenção do efeito terapêutico. São capazes de modificar a liberação e a estabilidade das substâncias ativas e assim a sua biodisponibilidade (FRAGA; FREITAS, 2015).

A seleção de excipientes e processos adequados para a produção de formas farmacêuticas sólidas influenciam diretamente nas propriedades físico-químicas como dureza e friabilidade, que são necessárias para que o comprimido apresente resistência a choques mecânicos durante as etapas de manuseio, produção, embalagem e transporte, além das propriedades de desintegração e dissolução, necessárias para que o fármaco seja absorvido pelo organismo e apresente biodisponibilidade adequada (TOLLER; SCHMIDT, 2005).

Os excipientes farmacêuticos podem ser classificados em diluentes, desluzantes, lubrificantes, aglutinantes, surfactantes, conservantes, corantes, entre outros (FERREIRA, 2010).

Os diluentes são produtos ordinariamente inertes, que se adicionam aos pós a comprimir com a finalidade de originarem comprimidos de peso conveniente, quando os princípios ativos são empregados em pequenas quantidades. Alguns exemplos de diluentes são celulose microcristalina, lactose, amido, cloreto de sódio, manitol fosfato de cálcio (PRISTA, 1991).

A lactose destaca-se como um dos excipientes mais utilizados na indústria farmacêutica, pois se dissolve rapidamente, não é higroscópica, apresenta boa compressibilidade e baixa reatividade química. Além disso possui baixo custo e originam comprimidos de bom aspecto devido a sua característica aglutinante (CURY et al., 2007; FRAGA; FREITAS, 2015). Pode ser encontrada na forma anidra ou monohidratada e apresentam boas características de escoamento, aglutinação e lubrificação (AULTON, 2005).

A celulose microcristalina é um pó branco, cristalino poroso e inodoro. É o tipo mais comum de celulose utilizada no desenvolvimento de comprimidos. É obtida por hidrólise da celulose, seguida da secagem por aspersão, obtendo-se partículas constituídas por agregados de pequenas fibras de celulose (AULTON, 2005).

Os deslizantes são agentes utilizados no desenvolvimento de cápsulas e comprimidos para melhorar a propriedade de fluxo na mistura de pós, são exemplos de deslizantes talco e aerosil (FERREIRA, 2010). Tradicionalmente o talco tem sido utilizado como deslizante na concentração de 1 a 2 %, no entanto ele também pode desempenhar as funções de diluente e lubrificante quando utilizado em maiores concentrações (AULTON, 2005).

Os lubrificantes são capazes de cumprir várias funções durante o desenvolvimento de comprimidos. Eles impedem que a massa adira à superfície das matrizes e punções, reduz a fricção entre as partículas, facilita a ejeção dos comprimidos das matrizes, melhoram a fluidez do granulado ou da mistura de pós. Os lubrificantes comumente utilizados são o talco, estearato de magnésio, estearato de cálcio e ácido esteárico. A maioria dos lubrificantes é usada em concentração menor que 1%, com exceção do talco que se usa numa concentração média de 5% (FERNANDES, 2003).

Os aglutinantes são utilizados no desenvolvimento de comprimidos com o objetivo de assegurar que os grânulos e os comprimidos sejam formados com resistência mecânica desejada, uma vez que promovem a adesão das partículas. Podem ser adicionados tanto na forma de pó seco como na forma de solução, sendo estas consideradas mais efetivas. São exemplos de aglutinantes povidona, gelatina, amido, polivinilpirrolidona, entre outros (AULTON, 2005; FERREIRA, 2010).

São tensoativos são utilizados para aumentar a molhabilidade dos pós insolúveis em água, inclusive os fármacos. Através da diminuição da tensão superficial pó/água, contribui para um aumento da solubilidade aquosa de vários fármacos aumentando assim o contato do fármaco com o meio. Exemplos: lauril sulfato de sódio, e polissorbato (FRAGA; FREITAS, 2015). Estão entre as classes de excipientes cuja influência na biodisponibilidade dos fármacos em formas sólidas se mostra bastante elevada, já que sua ação visa aumentar a velocidade de dissolução dos mesmos (AMARAL et al., 2016).

2.7 Ensaios Físico-Químicos para a Caracterização de Comprimidos

Para garantir a eficácia, todas as formas farmacêuticas devem atender um número de especificações que estão relacionadas às características físicas, químicas e biológicas. Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) os comprimidos devem conter características que garantam sua integridade, homogeneidade, dose, aspecto, resistência mecânica e liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica.

Os ensaios preconizados pela ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estão contidos nos métodos gerais aplicados a medicamento da Farmacopeia Brasileira 5ª edição, (2010) como: peso, dureza, friabilidade, desintegração, doseamento uniformidade de doses unitárias e dissolução.

No ensaio de determinação de peso para produtos de dose unitária, o teste permite verificar se as unidades de um mesmo lote apresentam uniformidade de peso. A tolerância é de somente duas unidades fora dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira, sendo que para comprimidos de até 80 mg o limite estabelecido é de $\pm 10\%$, comprimidos entre 80 e 250 mg de $\pm 7,5\%$ e para comprimidos acima de 250mg $\pm 5,0\%$ (ANVISA, 2010).

Os ensaios de resistência mecânica tais como dureza e friabilidade auxiliam na avaliação da qualidade de comprimidos bem como atestam as características físicas dos mesmos frente à

ruptura por quedas ou fricção durante os processos de revestimento, embalagem, transporte e armazenagem (ORDONES et al., 2012).

O ensaio de dureza determina a resistência do comprimido ao esmagamento ou ruptura sob pressão radial, sendo proporcional ao logaritmo da força de compressão e inversamente proporcional à sua porosidade (RAFAEL; FARIA, 2013). O teste consiste em submeter o comprimido à ação do aparelho (durômetro) que mede a força aplicada diametralmente necessária para esmagá-lo. A força é medida em Newtons (N) e a dureza mínima aceitável é de 30N (ANVISA, 2010a).

A friabilidade dos comprimidos corresponde o grau de resistência que pode ser manifestado em relação ao choque, atrito, rolamento, agitação e flexão (PRISTA, 1991).

A medição é realizada pelo aparelho friabilômetro e avalia a tendência do comprimido se fragmentar quando submetido a 25 rotações por minuto por 4 minutos. E nenhum comprimido pode apresentar-se, ao final do teste, quebrado, lascado, rachado ou partido e são considerados aceitáveis os comprimidos com perda igual ou inferior a 1,5% (ANVISA, 2010).

O teste de desintegração permite verificar se os comprimidos se desintegram dentro do limite de tempo especificado para cada monografia, quando seis unidades são submetidas à ação do dissolutor sob condições experimentais específicas. É aferido por testes *in vitro*, com auxílio do aparelho dissolutor que contém cestas e pás e um recipiente adequado para o líquido de imersão. O limite de tempo estabelecido para a desintegração de comprimidos é de 30 minutos (ANVISA, 2010).

O doseamento dos fármacos é de extrema importância na avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos, visto que determina a quantidade de princípio ativo presente na formulação a ser administrada no organismo (DAFEVÉRI et al., 2012). Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) a escolha do método analítico a ser utilizado para quantificação do fármaco depende das características físico-químicas do mesmo assim como das propriedades dos excipientes presentes na formulação. Deve ser seletivo e garantir a sensibilidade adequada para quantificação do fármaco no medicamento sem a interferência dos excipientes da formulação. O ensaio consiste em pesar uma quantidade de unidades de comprimidos suficiente para efetuar o doseamento, reduzi-los a pó fino até obtenção de uma mistura homogênea, usar solventes apropriados ou outros procedimentos para obter solução contendo o fármaco. Empregar alíquotas apropriadas desta solução para os ensaios especificados.

A avaliação da uniformidade de dose unitárias visa verificar a distribuição do fármaco presente nos comprimidos, analisando-os individualmente (PERTELE; BUENO, 2016). Podendo está ser realizada através da uniformidade de conteúdo e através da variação de peso. O método de uniformidade de conteúdo para preparações em doses unitárias baseia-se no doseamento do conteúdo individual do componente ativo de um número de doses unitárias para determinar o conteúdo individual está dentro dos limites especificados. O teste é realizado pesando-se exatamente e individualmente 10 comprimidos, preservando a identidade de cada um. O produto é aprovado se o Valor de Aceitação for no máximo 15,0. O método de variação de peso pode ser aplicado de acordo com a forma farmacêutica apresentada. No caso de comprimidos não revestidos, contendo 25 mg ou mais de uma substância ativa compreendendo 25% ou mais, em peso, da dose unitária ou, no caso de substâncias ativas presentes em menores proporções deve ser demonstrada pelo método de uniformidade de conteúdo.

A ensaio de dissolução é o processo através do qual avalia-se a porcentagem de fármaco que é liberada em um determinado tempo, a partir de uma forma farmacêutica, e torna-se disponível para ser absorvido. O ensaio de dissolução *in vitro* determina o percentual de um fármaco que passa da forma farmacêutica para a forma solúvel em um meio de dissolução (BUENO; PEREIRA, 2015).

2.8 Estudo de liberação *in vitro*

Para um fármaco ser absorvido é necessário que este esteja dissolvido em fluido no local de absorção. Por exemplo, um fármaco administrado pela via oral na forma de comprimido só será absorvido se as partículas do fármaco estiverem dissolvidas ou solubilizadas em algum ponto ao longo do trato gastrointestinal (AULTON, 2005)

Os ensaios de dissolução apresentam várias aplicações no desenvolvimento e produção de medicamentos. É amplamente utilizado no desenvolvimento de formulações, no monitoramento de processos, como teste de controle de qualidade, estudos de estabilidade, para subsidiar a definição dos excipientes durante o desenvolvimento de medicamentos, estudos de equivalência farmacêutica, em casos de modificação pós-registo e em estudos de correlação *in vivo/in vitro* (MATIAS et al., 2014; SIEWERT et al., 2003).

Nesse teste, comprimidos e cápsulas são colocados em um volume conhecido de um meio de liberação e a quantidade dissolvida é mostrada ao longo do tempo. Um procedimento de dissolução deve ser desenvolvido e validado como qualquer técnica analítica de ensaio (MATIAS et al., 2014).

Embora o teste de dissolução *in vitro* tenham sido primeiramente desenvolvido para as formas farmacêuticas orais (cápsulas e comprimidos) nos últimos anos a aplicação desses testes foi estendida a uma grande variedade de formas farmacêuticas de liberação modificada (SIEWERT et al., 2003). A orientação atual é que nenhum produto farmacêutico no qual exista uma fase sólida seja desenvolvido sem a caracterização do ensaio de dissolução (ANVISA, 2010).

O poder discriminatório de um ensaio de dissolução é sua capacidade de detectar o efeito de pequenas alterações no processo e em uma formulação. A demonstração do poder discriminatório de um método de dissolução é desafiador e importante particularmente no monitoramento dos parâmetros de ingredientes farmacêuticos ativos e de fármacos pouco solúveis (KAMALAKKANNAM et al., 2011).

A quantidade de fármaco dissolvido é geralmente analisada de modo contínuo em termos de concentração, em séries consecutivas de tempos quando o produto é submetido ao dissolutor sob condições experimentais descritas. O resultado é expresso em porcentagem da quantidade declarada no rótulo do medicamento (AULTON, 2005).

Um aparelho dissolutor é composto pelos seguintes componentes: (1) recipiente cilíndrico de vidro com fundo arredondado, transparente e inerte, (2) haste metálica que agita o meio, podendo ser pá ou cesta. Os recipientes são submergidos a uma temperatura de 37° C durante o teste. Os aparatos mais empregados para a agitação são o aparato 1, a cesta, e o 2, a pá. Para o primeiro, a velocidade usual é de 100 rpm e, para o segundo, normalmente é de 50 ou 75 rpm (ANVISA, 2010).

A avaliação quantitativa da solubilidade da substância ativa na faixa de pH fisiológico constitui a primeira etapa dos estudos para desenvolvimento de um ensaio de dissolução segundo a nota técnica n° 003/2013, que dispõe sobre a avaliação da solubilidade de fármacos e o desenvolvimento de métodos de dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo (ANVISA, 2013).

Outro fator importante no ensaio de dissolução é manter a condição *sink* do meio de dissolução, para evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste. Para isso volume de meio utilizado é superior a, cerca de 3 vezes, o volume necessário para saturar a dose do fármaco no meio proposto. Portanto, seu objetivo é garantir que a velocidade de dissolução não seja reduzida pela aproximação da concentração do fármaco à sua concentração de saturação (CARDOSO et al., 2006).

A composição do meio de dissolução pode variar nas diferentes situações de ensaio. Pode-se usar água, no entanto, na maioria dos casos utiliza-se um meio de dissolução que possa mimetizar alguns fluídos biológicos. Agentes tensoativos também podem ser empregados para alterar a tensão superficial do líquido e a solubilidade do fármaco (AULTON, 2005).

2.9 Influência das formas farmacêuticas na absorção de fármacos

Quando um fármaco é administrado por via intravenosa ele é colocado diretamente no sangue e por essa razão temos certeza de que todo fármaco alcançou a circulação e está 100% biodisponível. No entanto quando o fármaco é administrado por outra via de administração não existe garantia de que a totalidade da dose chegou a circulação sistêmica de forma intacta. A quantidade relativa da dose administrada de um fármaco em particular, que atinge a circulação sistêmica de forma intacta, e a velocidade com que isso acontece são eventos conhecidos como biodisponibilidade (AULTON, 2005).

A absorção de fármacos a partir das formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral, depende de sua liberação e dissolução nas condições fisiológicas além da permeabilidade das membranas biológicas que estes necessitam atravessar (AGUIAR et al., 2005).

As mesmas considerações que são avaliadas no desenvolvimento de formulações farmacêuticas orais humanas aplicam-se aos produtos farmacêuticos orais caninos como a solubilidade, permeabilidade intestinal, tempo de esvaziamento gástrico, tipo de formulações e excipientes (SONG et al., 2016).

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 ou através do aumento da solubilidade do fármaco (SONG et al., 2016).

Para fármacos que apresentam biodisponibilidade escassa ou delineamento e desenvolvimento de sistemas de liberação controlada ou sustentada é necessário acompanhar o trânsito da forma farmacêutica e a liberação do fármaco. O sistema de classificação biofarmacêutica, classifica o fármaco de acordo com sua solubilidade ao longo da faixa de pH gastrintestinal e sua permeabilidade pela mucosa, em quatro diferentes classes (AULTON, 2005).

De acordo com Amidon et al., 1995 os fármacos de classe I são aqueles que apresentam alta solubilidade e alta permeabilidade. Esses fármacos dissolvem-se rapidamente quando administrados em formas farmacêuticas de liberação imediata e são transportados rapidamente pela parede do intestino.

Os fármacos da classe II possuem baixa solubilidade e alta permeabilidade. A etapa de dissolução está sujeita a ser etapa limitante da velocidade de absorção oral, sendo possível obter uma forte correlação entre a dissolução *in vitro* e a absorção *in vivo* (AMIDON et al., 1995; AULTON, 2005).

Os fármacos da classe III possuem alta solubilidade e baixa permeabilidade enquanto os da classe IV apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade, não sendo indicado para administração oral (AMIDON et al., 1995).

2.10 Estudo de farmacocinética

A farmacocinética constitui um segmento da farmacologia que estuda processos sofridos pelo fármaco no organismo, processos estes que interferem diretamente em sua concentração no sangue e nos tecidos-alvo. O princípio fundamental da farmacocinética é a relação que existe entre os efeitos farmacológicos de um fármaco e sua concentração no sangue ou no plasma, que traduz, para a maioria das substâncias, a sua concentração nos sítios de ação (SOUZA et al., 2013).

O monitoramento do perfil de concentração do fármaco em função do tempo em fluido fisiológico adequado permite a determinar a fração do fármaco absorvido na circulação sanguínea, ou seja, sua biodisponibilidade, avaliando o efeito farmacológico em solução nos fluidos biológicos do local de absorção, sua estabilidade, permeabilidade e metabolismo pré-sistêmico sobre a velocidade de extensão de absorção (GOODMAN; GILMAN, 2003). O perfil de concentração em função do tempo também fornece informações sobre outros parâmetros farmacocinéticos, como distribuição, que é a medida do espaço do organismo disponível para conter o fármaco e a depuração, que é a medida da eficiência da eliminação do fármaco pelo organismo. O método mais comumente utilizado para avaliação de biodisponibilidade envolve a construção de uma curva de concentração plasmática sanguínea em função do tempo (AULTON, 2005).

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

A AUC (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 AUC é diretamente proporcional a dose (SHARGEL et al., 2004).

A C_{max} é concentração plasmática, sanguínea ou sérica mais elevada 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 (mg/mL, ng/mL) (SHARGEL, et al., 2004).

T_{max} é o tempo necessário para atingir o C_{max} . No t_{max} , ocorre o pico de absorção e a taxa de absorção é exatamente igual a taxa de eliminação do fármaco. A absorção do fármaco continua após atingir o t_{max} , porém com uma taxa menor. É expresso em unidade de tempo (SHARGEL et al., 2004).

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

A farmacocinética se correlaciona com a farmacodinâmica que investiga a correlação da concentração do fármaco no sítio de ação com o efeito resultante, incluindo o tempo de percurso e a intensidade do efeito terapêutico e adversos (DELUCIA et al., 2007).

Praticamente todos os fluidos orgânicos podem ser utilizados para análise farmacocinética, como é o caso do plasma, sangue, soro, leite e a urina (TOZER; ROWLAND, 2009).

Dentre as técnicas utilizadas em estudos de farmacocinética pode-se destacar a cromatografia líquida. Esse processo consiste na separação de componentes de misturas moleculares através de duas fases imiscíveis, uma delas deslocando-se (fase móvel) em relação à outra, que permanece estacionária e se constitui por um meio líquido, sólido ou gelatinizado. Dentre os tipos de cromatografias, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência, por sua precisão e rapidez nos resultados (SILVA, 2010).

Os métodos analíticos necessitam ser validados para garantir confiabilidade e credibilidade nos estudos farmacêuticos. De acordo com a ANVISA, os métodos cromatográficos destinados à determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas são inseridos no contexto dos métodos bioanalíticos (PASCHOAL et al., 2008). A importância de garantir o resultado confiável para um método bioanalítico através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade está sendo cada vez mais reconhecida e exigida (RIBANI et al., 2004). A validação dos métodos bioanalíticos no Brasil é normatizada RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012, da ANVISA, que tem como objetivo de estabelecer os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos (ANVISA, 2012).

A complexidade das matrizes biológicas utilizadas nas análises e o aumento crescente na gama de substâncias a serem investigadas tornam particularmente importante a seleção de métodos de preparo de amostra adequados para resolução de problemas analíticos. Para tanto, é necessário o conhecimento básico dos princípios químicos e operacionais das mais variadas técnicas disponíveis e suas principais aplicações, assim como exige uma constante otimização destas técnicas, a fim de se aprimorar as etapas de extração e análise. Além disso, as propriedades dos compostos de interesse e as características das matrizes biológicas devem ser cuidadosamente avaliadas antes que uma técnica seja adotada para o processamento das amostras. Todos esses fatores são extremamente importantes uma vez que interferem no desempenho das análises e, portanto, direcionam a produção dos diagnósticos que podem contribuir para a elucidação de questões de interesse legal (BORDIN et al. 2015).

Os principais objetivos da preparação da amostra são promover a extração, aumentar a concentração dos analitos de interesse e a remoção de possíveis interferentes (*clean-up*). Essa é a etapa mais onerosa e demorada envolvida no processo analítico, consumindo o maior tempo da análise (JARDIM, 2010).

A preparação das amostras é um passo essencial e consiste em procedimentos, como centrifugação, para a remoção de materiais insolúveis de soluções, *clean-up* e pré-concentração, utilizando diferentes métodos de extração. As técnicas mais comuns são a precipitação de proteína, extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE) microextração em fase líquida (LPME) e microextração em fase sólida (SPME) (BOURGOGNE et al, 2015; PETERSEN et al, 2011)

Várias estratégias de preparação de amostras podem ser usadas para desenvolver bioanálises. A maioria delas depende de fatores tais como volume da amostra, limite de quantificação, a duração e o custo de desenvolvimento de métodos por amostra (BOURGOGNE et al, 2015).

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes

Foram empregados os seguintes reagentes de grau analítico e pureza:

- Lauril sulfato de sódio (Dodecil sulfato de sódio), Vetec, lote 1107519;
- Polivinilpirrolidona, Vetec, lote DCBD7072V;
- Acetonitrila, Sigma-Aldrich, grau HPLC $\geq 99,9\%$, lote SHBF8238V;
- Ácido clorídrico P.A, Vetec 0506099;
- Acetato de Sódio, Merk, lote 106267;
- Fosfato de sódio dibásico, Vetec, lote 1102792;
- Fosfato de sódio monobásico Vetec, lote DCBC2256.

3.1.2 Matérias-primas

Foram empregadas as seguintes matérias-primas, de grau farmacêutico de pureza, no preparo dos comprimidos:

- Lactose monohidratada malha 200, Fragon, lote 3595;
- Celulose microcristalina, Fragon, lote C1210009;
- Talco, lote 941;
- Aerosil, lote 6737;
- Estearato de magnésio, Isofar, lote 032410;
- Fipronil (FIP), doado pela empresa Ceva, lote SE 150520151218.

3.1.3 Substâncias químicas de referência Fipronil, Fipronil-Sulfona e Etiprol

A substância química de referência (S.Q.R) Fipronil Pestanal, Sigma-Aldrich, lote SZBA0033X, de teor declarado 100%, foi empregada como substância química de referência nas determinações analíticas.

A fipronil-sulfona (SULF) foi adquirido comercialmente da Accustandard, lote 215041209 em uma solução de 1mL de acetona na concentração de 100 μ g/mL.

A substância química, usada como padrão interno, Etiprol Pestanal, Sigma-Aldrich, lote SZBD234XV, de teor declarado 98,2%, foi empregada como substância química de referência nas determinações analíticas.

3.1.4 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Tecnal, modelo 210;
- Tamis *mesh* 14;
- Compressora Monopress LM-1 Lemaq®;
- Jogo de punções e matriz de 10 mm;
- Aparelho para determinação do ângulo de repouso desenvolvido pelo próprio LQEPV segundo a descrição de Lachman, Lieberman, Kanig, 2010;
- 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 3,5µm;
- Pré – coluna C18 Kromasil 3 x 4,6 mm x 3,5µm;
- Aparelho de dissolução Ethik, modelo 299;
- Filtro Millex 0,45U, membrana durapore 13mm;
- Durômetro Nova Ética, modelo 28 DPG;
- Friabilômetro, Nova Ética _ Modelo Friabilidade 300;
- 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;
- Peagâmetro Quimis;
- Ultrapurificador acoplado ao sistema de purificação por osmose reversa OS 10 LZ (Gehaka);
- Tubos de coleta de heparina.

3.2 Determinação do teor de fipronil na matéria-prima

O FIP matéria-prima (MP) fornecida pela empresa CEVA foi quantificado frente a S.Q.R. com teor conhecido (100%) adquirido comercialmente, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Ultravioleta (CLAE-UV), utilizando metodologia descrita por CID et al., (2012), seguindo as seguintes condições cromatográficas: Coluna Kromasil C18 100 x 4,6 mm (3,5µm); Fase móvel ACN:H₂O (60:40); Fluxo de 1,0 mL/min; λ : 220nm; Volume de injeção 10 µL.

Para o preparo da solução mãe (SM) de FIP foram pesados com precisão analítica quantidades equivalentes de 5 mg de FIP padrão de trabalho com teor 100% (lote SZBA0033X) e transferidos para um balão de 5 mL cujo o volume foi completado com diluente acetonitrila (ACN), resultando em uma solução de 1 mg/mL, denominada solução estoque (SM).

Para o preparo da curva padrão, a partir da SM de 1 mg/mL foram feitas diluições para obtenção de soluções com concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 µg/mL de FIP, utilizando como diluente ACN.

3.3 Obtenção das Formulações

3.3.1 Desenvolvimento de formulações placebos

Para o desenvolvimento dos comprimidos de fipronil inicialmente foram produzidos quatro granulados placebo, variando o tipo, a proporção e o modo de adição de aglutinante assim como o diluente utilizado, conforme descrito na Tabela 2. Nos placebos 1, 3 e 4 o aglutinante foi adicionado em solução a 10% e no placebo 2 diretamente na mistura de pós. Foram avaliados o comportamento dos componentes frente ao processo de compactação, assim como o desempenho da compressora.

Tabela 2. Composição dos granulados placebos preparados em escala laboratorial.

Placebos/ Componentes	1	2	3	4	%	Função
Lactose	X	X	--	--	qsp 100	Diluente
Celulose	--	--	X	X	qsp 100	Diluente
SDS	X	X	X	X	1,5	Tensoativo
PVP	X	X	X	--	1,0	Aglutinante
Amido	--	--	--	X	1,0	Aglutinante
Talco	X	--	X	--	0,2	Deslizante
Modo de adição do aglutinante	Solução a 10% (m/v)	Mistura de pós	Solução a 10% (m/v)	Solução a 1% (m/v)	---	---

SDS = dodecil sulfato de sódio

PVP = polivinilpirrolidona

O método de granulação utilizado foi o por via úmida. Os componentes foram homogeneizados geometricamente e em seguida foi adicionada a solução aglutinante até a formação de uma massa de consistência firme. A formulação na qual o aglutinante foi adicionado diretamente na mistura de pós utilizou-se água destilada como líquido de granulação. A passagem da massa foi forçada através de um tamis de *mesh* 14 obtendo-se grânulos úmidos que foram secos em temperatura ambiente por 24 horas.

Após o processo de granulação, os granulados placebos foram submetidos aos ensaios de caracterização descritos no item 3.4 e em seguida foram compactados. Os comprimidos obtidos foram submetidos aos ensaios físicos de peso médio, dureza e friabilidade e a partir dos

resultados mais satisfatórios foram definidas quais formulações seriam utilizadas para a incorporação do ativo descritas no item 3.3.2.

3.3.2 Incorporação do ativo fipronil às formulações

Após os ensaios de caracterização foi definido que os placebos 1 e 3 seriam utilizados para incorporação do ativo e desenvolvimento das formulações. O granulado 1 foi dividido em 2 lotes, uma vez que no lote 2 foi necessário a adição do estearato de magnésio como lubrificante, pois quando adicionado somente o talco os comprimidos não foram formados adequadamente, ficando o material aderido ao punção da compressora e ocorrendo a quebra dos mesmos durante a sua ejeção. O granulado 3 também foi dividido em 2 lotes, variando em cada um apenas a velocidade de compressão, para avaliar o desempenho da compressora. A tabela 3 representa a composição das formulações contendo o ativo Fipronil.

Foi estimada uma porcentagem de FIP a ser adicionada de acordo com o peso médio obtido nos comprimidos placebos e estipulou que a concentração de tensoativo (SDS) utilizada na formulação seria a mesma de fármaco.

Tabela 3. Composição dos granulados de fipronil preparados em escala laboratorial

Formulações/ Componentes	1		3		%	Função
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2		
Fipronil	X	x	X	x	7,0	Ativo
Lactose	X	x	--	--	qsp 100	Diluyente
Celulose	--	--	X	x	qsp 100	Diluyente
SDS	X	x	X	x	7,0	Tensoativo
PVP	X	x	X	x	1,0	Aglutinante
Talco	X	x	X	x	0,5	Aglutinante
Estearato de Mg	--	x	--	--	1,0	Deslizante
V CP/min	27	27	5	27	--	--

Estearato de Mg = estearato de magnésio

V CP/min = velocidade da compressora – comprimidos/minuto

3.3.3 Ajuste de dose

Uma vez escolhida a formulação que melhor atendeu aos requisitos estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (2010) observou-se que os comprimidos obtidos não obtinham a dose desejada. A partir do peso médio dos comprimidos foi realizado cálculo para o ajuste de dose. A dose de Fipronil em cada comprimido foi definida de acordo com Melo (2012), onde foram

realizados ensaios de eficácia do Fipronil contra *Ctenocephalides felis felis* administrado através de cápsulas por via oral nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg em cães da raça Beagle. Por questões de segurança a dose de 2mg/kg foi a escolhida para o desenvolvimento dos comprimidos. Baseando-se na faixa de peso de cães de médio porte (10 kg), o ativo foi adicionado às formulações na concentração de 20 mg por comprimido.

3.4 Caracterização dos Grânulos

Os granulados produzidos foram submetidos a testes de caracterização, a fim de definir parâmetros importantes para otimizar o processo de compactação, como, ângulo de repouso, velocidade de escoamento, densidade aparente e índice de compressibilidade. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.1 Determinação do ângulo de repouso

O ângulo de repouso foi determinado segundo o método descrito por Lachman, Lieberman, Kanig, (2010) em um equipamento adaptado montado no próprio LQEPV. O equipamento constituiu de uma base horizontal plana, com um suporte fixo onde foi adaptado um funil de vidro. Uma massa de 50 g de granulado foi despejada através do funil até atingir a base horizontal levando a formação de um triângulo, como demonstrado na Figura 3.

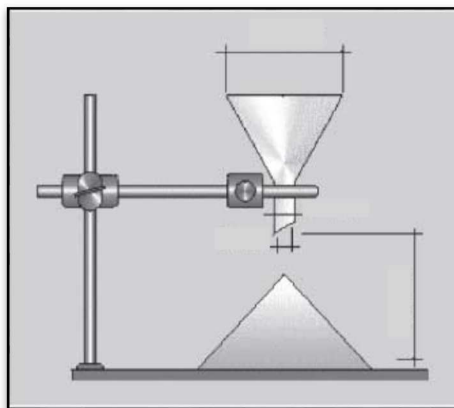


Figura 3. Aparato para determinação do ângulo de repouso adaptado de LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2010.

O ângulo foi calculado através da tangente do ângulo desse triângulo, sendo R o raio e H a altura do triângulo, utilizando a equação 1.

Equação para o cálculo do ângulo de repouso:

$$\tan \alpha = H / R \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

α = ângulo de repouso

H = corresponde à altura do cone.

R = corresponde à metade da base do cone.

O ângulo de repouso avalia o fluxo de pós, sendo esse considerado um parâmetro crítico durante a produção de comprimidos, devido a necessidade de uma alimentação uniforme da matriz da compressora. De acordo com Lachman, Lieberman, Kanig, (2010), valores para o ângulo de repouso menores que 30° indicam um material com fluxo bom, enquanto que, valores maiores que 40° são materiais com dificuldades de escoamento, e, portanto necessitam de agentes deslizantes para otimizar a alimentação dos grânulos à matriz da máquina de compressão.

3.4.2 Velocidade de escoamento

O equipamento empregado foi o mesmo demonstrado na figura 3. A velocidade foi determinada através do tempo em minutos (tempo de escoamento) necessário para que uma massa de 50g de grânulo escoasse através do orifício do funil de vidro e o cálculo foi realizado através da equação 2.

Equação para o cálculo da velocidade de escoamento, expressa em g/s:

$$V = m/t \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

V = Velocidade de escoamento do pó

m = massa de pó em gramas

t = tempo de escoamento do pó em segundos

3.4.3 Determinação da densidade aparente

A determinação das densidades foi realizada pela transferência de 50g de granulado para uma proveta de 100mL, representando o volume aparente, e para garantir o assentamento do pó as amostras foram submetidas a um número padronizado de batidas em uma superfície plana, representando o volume real. Realizou-se a leitura do volume ocupado pelo granulado na proveta, antes e após as batidas. Para o cálculo da densidade aparente foi utilizada a equação 3, sendo o resultado expresso em g/mL.

Equação para cálculo da densidade aparente.

$$D_a = m/v \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

D_a = densidade aparente

m = massa de pó em gramas.

v = volume que o pó ocupa na proveta em mL.

3.4.4 Determinação do índice de compressibilidade

O índice de compressibilidade foi calculado utilizando os valores da densidade dos pós antes e depois do assentamento através da equação 4.

Equação para o cálculo do índice de compressibilidade.

$$IC = (V_i - V_f) \times 100 / V_i \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

IC = índice de compressibilidade em %

V_i = volume inicial ocupado na proveta em mL.

V_f = volume final ocupado na proveta em mL.

O índices de compressibilidade são medidas que proporcionam resultados que permitem avaliar a compressibilidade dos pós avaliando as interações interparticulares. No caso de pós que têm boa fluidez, estas interações são menos significativas e o índice é pequeno. Segundo A USP-36 (Farmacopeia Americana) (2013) a fluidez de um pó pode ser classificada a partir do IC de acordo com a tabela 4.

Tabela 4. Propriedades de fluidez de pós através do IC

IC (%)	Fluidez
5 – 11	Excelente
12 – 17	Bom
18 -22	Satisfatório
23 – 32	Pobre
33 – 39	Muito pobre
> 40	Extremamente pobre

Fonte: USP-36 (2013) - *NF 31– Bulk Density and Tapped Density of Powders*

3.5 Compactação

As formulações foram comprimidas no Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ) – campus do Maracanã, em máquina compressora modelo Monopress LM-1 Lemaq®, com capacidade de produção de 5-35 comprimidos por minuto, de enchimento manual da matriz (Figura 4). O equipamento é totalmente encabinado, com a porta frontal acrílico transparente, sendo, a potência do motor de 1,5 CV e diâmetro máximo do comprimido de 10 mm. A medição da força não é realizada pela máquina.



Figura 4. Compressora Monopress LM-1 Lemaq.

3.6 Ensaios Físico-Químicos de Controle de Qualidade dos Comprimidos

Os ensaios de controle de qualidade foram realizados segundo os ensaios descritos na Farmacopeia Brasileira (2010) para comprimidos não revestidos, que estabelece parâmetros para assegurar a padronização e garantir a qualidade do produto em estudo.

Os ensaios de determinação de peso, friabilidade e dureza foram realizados com os comprimidos placebos e os comprimidos contendo Fipronil. Já os ensaios de uniformidade de dose, dissolução e doseamento foram realizados apenas para os comprimidos contendo Fipronil.

3.6.1 Determinação de peso

O ensaio se aplica para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária, pós para injetáveis, e formas farmacêuticas sólidas e semissólidas. O procedimento foi realizado com a pesagem individual de 20 comprimidos, em balança analítica. O peso médio foi obtido pelo cálculo da média aritmética das 20 determinações de peso.

A avaliação da determinação de peso foi realizada conforme a especificação da Farmacopeia Brasileira (2010) para comprimidos não revestidos de acordo com critérios limites especificados na Tabela 5.

Tabela 5. Critérios de avaliação da determinação de peso para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária.

Formas farmacêuticas em dose unitária	Peso médio	Limites de variação
Comprimidos não revestidos ou revestidos com filme, comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguais, comprimidos vaginais e pastilhas.	80 mg ou menos;	± 10,0%
	Mais que 80 mg e menos que 250 mg;	± 7,5%
	250 mg ou mais.	± 5,0%

3.6.2 Friabilidade

O ensaio friabilidade, visa demonstrar resistência dos comprimidos à ruptura por quedas ou fricção durante os processos de revestimento, embalagem, transporte e armazenagem. O teste foi realizado com a pesagem de 20 comprimidos em balança analítica (peso inicial) e introduzidos no aparelho friabilômetro sendo submetidos 25 rotações por minuto e o tempo do teste de 4 minutos, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010). Decorridos 4 minutos, apenas os comprimidos íntegros e sem resíduos foram retirados do aparelho, e, novamente pesados (peso final). Foi calculada a perda percentual de massa dos 20 comprimidos baseada na diferença de valores do peso inicial e peso final conforme a equação 5.

O teste foi considerado aceitável se os comprimidos obtiverem perda igual ou inferior a 1,5% (ANVISA, 2010).

Equação para o cálculo da friabilidade.

$$f = (P_i - P_f) \times 100 / P_i \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

f = friabilidade em %.

P_i = peso inicial dos comprimidos em gramas

P_f = peso final dos comprimidos em gramas

3.6.3 Dureza

O teste de dureza permite determinar a resistência do comprimido ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial. A dureza de um comprimido é proporcional à força de compressão e inversamente proporcional à sua porosidade. O teste se aplica, principalmente, a comprimidos não revestidos. O teste consiste em submeter o comprimido à ação de um aparelho (Durômetro) que mede a força, aplicada diametralmente, necessária para esmagá-lo. A determinação da dureza foi realizada com 10 comprimidos, que são testados individualmente. O resultado foi expresso pela média obtida nas determinações, por unidade de Newton (N).

Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010) a dureza mínima aceitável deve ser de 30N.

3.6.4 Ensaio de doseamento dos comprimidos

O ensaio de doseamento tem por objetivo quantificar o teor da substância ativa em medicamentos. Neste ensaio foram pesados 20 comprimidos e reduzidos a pó fino com auxílio do gral e pistilo para obter uma mistura homogênea. De acordo com o peso médio, foram pesadas três alíquotas desse pó, que foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL e avolumado com ACN. Foi realizada uma diluição 1:100 transferindo após filtração 1 mL deste balão para um balão de 10 mL e também avolumada com ACN.

As amostras preparadas no ensaio de doseamento e a curva padrão foram analisada por CLAE-UV utilizando metodologia, descrita por CID et al, 2012, seguindo as condições cromatográficas descritas no item 3.2.

Para o preparo da solução (SM) de FIP, foram pesados, com precisão analítica, a quantidade equivalente a 25 mg de FIP com teor de 99,5% e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi completado com ACN, resultando em uma solução de 1mg/mL denominada de solução mãe (SM).

Para o preparo da curva padrão, a partir da SM, foram realizadas diluições nas concentrações finais de 1, 5, 10, 25, 50, 75 µg/mL, para obtenção da curva padrão, utilizando ACN como diluente.

3.6.5 Uniformidade de doses unitárias

O ensaio de uniformidade de dose é realizado para assegurar formulações com doses corretas. O teste foi através da avaliação da uniformidade de conteúdo. Foram pesados individualmente 10 comprimidos e transferidos cada unidade para um balão de 100 mL, com peso previamente aferido e anotado. Posteriormente, foram dissolvidos com ACN com auxílio do ultrassom, e avolumaram-se os balões. Uma alíquota de 1 mL deste balão foi filtrada e transferida para um balão de 10 mL e avolumado com ACN. Após a diluição, uma alíquota foi transferida para o vial e analisada por CLAE-UV utilizando metodologia descrita no item 3.2. Calculou-se o valor de aceitação conforme a Equação 6:

Equação para o cálculo do valor de aceitação.

$$VA = | M - X | + ks$$

Equação 6

Onde:

M: se $98,5\% \leq X \leq 101,5\%$, então $M = 100\%$

(X:) Média dos conteúdos individuais (x_1, x_2, \dots, x_n)

k: constante de aceitabilidade = 2,4

s: desvio padrão da amostra

O valor máximo permitido para o valor de aceitação é de 15,0.

3.6.6 Ensaio de liberação *in vitro*

3.6.6.1 Estudo da solubilidade de Fipronil e escolha do meio de dissolução

O estudo de solubilidade foi realizado segundo a metodologia de *shake flask*, em plataforma de agitação onde foram avaliados os seguintes meios: HCl 0,1 (pH 1,2), tampão acetato de sódio (pH 4,5) e tampão fosfato de sódio (pH 6,8). Também foram avaliadas a solubilidade na ausência do tensoativo (SDS) e na presença deste em diferentes concentrações (0,10; 0,50; e 1,0 %).

O ensaio foi realizado seguindo as recomendações da Norma Técnica 003/2013 da ANVISA. Um excesso de FIP foi adicionado em erlenmeyers contendo 50 mL de cada meio a ser avaliado. Os erlenmeyers foram colocados sob agitação constante por um período de 24 horas a temperatura de 37°C. Posteriormente as soluções foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana 0,45 μm e analisado por CLAE-UV utilizando as mesmas condições cromatográficas do 3.2. A análise estatística para a solubilidade em cada meio foi realizada através do teste One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey).

3.6.6.2 Desenvolvimento do ensaio de dissolução dos comprimidos

No desenvolvimento do ensaio de dissolução algumas condições foram aplicadas, de forma a avaliar quais forneceriam um teste de dissolução satisfatório. O estudo do perfil de dissolução foi realizado em dissolutor de coleta manual.

A escolha do meio de dissolução levou em consideração a solubilidade do fármaco. O volume do ensaio de dissolução foi de 900 mL. As coletas foram realizadas nos tempos de 5, 15, 30, 45 e 60 minutos, para os comprimidos utilizando lactose como diluente e os tempos de 75, 90 e 120 minutos foram acrescentados para os comprimidos que utilizaram celulose. Em cada tempo de dissolução, foi retirada e filtrada uma alíquota de 10 mL de cada cuba, com reposição do meio de dissolução. Para o meio de dissolução utilizando HCl, o pH foi ajustado entre 2,5 e 3,0 com ácido oxálico e trietilamina e a concentração determinada por CLAE-UV utilizando metodologia analítica previamente validada. Os parâmetros aparato, velocidade de rotação foram avaliados conforme a Tabela 6. A análise estatística para avaliar a porcentagem dissolvida em cada meio de dissolução foi realizada através do teste One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey).

Tabela 6. Condições para desenvolvimento do método de dissolução

Meio de Dissolução	pH	% Tensoativo (SDS)	Rotação (rpm)	Aparato
HCl 0,1M	1,2	-	100	Pá Cesta
		0,1		
		0,5		
		1,0		
		1,0		
		1,0	50	Pá
Tampão acetato de sódio	4,5	1,0	100	Pá
Tampão fosfato de sódio	6,8			

3.6.6.3 Estudo da cinética de dissolução e análise de fluxo de liberação *in vitro*

A determinação da cinética de liberação foi realizada através de análise de regressão linear do gráfico de dispersão xy, aplicando três modelos:

- Ordem zero: quantidade liberada em $\mu\text{g/mL}$ versus tempo (min);
- Higuchi: quantidade liberada em $\mu\text{g/mL}$ versus raiz do tempo (min);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada em $\mu\text{g/mL}$ versus tempo (min).

A partir da análise do coeficiente linear (r) obtido para cada um dos modelos, determinou-se a cinética de liberação. O modelo que apresentou maior valor de r foi o escolhido. O valor de fluxo de liberação (J) corresponde a inclinação (a) da porção linear da curva de liberação para cada formulação. O fluxo foi calculado para cada cuba (n=6) e o valor foi expresso pela média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do teste One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey).

3.6.6.4 Cálculo da eficiência de dissolução

A eficiência da dissolução (ED%) foi calculada de acordo com a metodologia desenvolvida por Khan (1975), através da razão entre a área sob a curva de dissolução (AUC) do fármaco no intervalo de tempo de dissolução total e a área total do retângulo (ATR) definido pela ordenada (% de dissolução) e pela abscissa. A ED% também permitirá comparar adequadamente os perfis de dissolução de fármacos (KHAN, 1975). Esta variável está relacionada com a quantidade real de fármaco que se encontra dissolvida no meio e, desta forma, pôde-se ter um melhor prognóstico dos resultados *in vivo*.

3.7 Estudo *in vivo*

3.7.1 Localização do Estudo

Os ensaios foram realizados nas dependências do Laboratório de Quimioterapia experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Departamento de Parasitologia Animal/Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 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. O estudo foi previamente aprovado pela comissão de ética do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) protocolada sob o CEUA nº 5760051016.

3.7.2 Seleção dos animais e identificação

Os animais empregados no estudo foram selecionados do plantel do canil do LQEPV constituído de cães da raça Beagle. Foram selecionados 14 cães entre machos e fêmeas, adultos com idade entre 1 e 6 anos e peso corpóreo entre 10 e 14 Kg. Todos os animais estavam identificados com *transponder* implantados no tecido subcutâneo. Com base nas contagens de pulgas, carrapatos e no sexo os animais foram divididos em 2 grupos, 6 animais no grupo controle e 6 no grupo tratado.

3.7.3 Origem e Manutenção das Pulgas e Carrapatos

As pulgas da espécie *Ctenocephalides felis felis* foram provenientes da colônia do LQEPV mantida a 12 anos sem reintrodução externa de pulgas oriundas de outros animais. Os carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* carrapatos também foram provenientes da colônia do LQEPV mantidos a 14 anos sem reintrodução externa de carrapatos oriundos de outros animais.

3.7.4 Tratamento

Os estudos de farmacocinética e eficácia foram realizados concomitantemente a partir de um único tratamento. Os animais foram divididos em 2 grupos, controle e tratado. Cada animal do grupo tratado recebeu por via oral um comprimido de FIP de 20 mg no mesmo dia e horário.

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

Os animais foram alojados em canis individuais e no dia -14 de estudo foram submetidos a avaliações clínicas para garantir a participação de animais sadios no estudo.

Todos os animais foram infestados com 50 pulgas machos e 50 fêmeas, adultas não alimentadas, com idade de 14 dias e com 25 casais adultos carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* no dia -9. No dia -7 os animais foram penteados (*comb test*) e todas as pulgas e carrapatos foram retirados e contados. Apenas animais que apresentaram retenção mínima de 25% para pulgas e 20% para carrapatos foram incluídos no estudo.

O ranqueamento dos animais foi baseado na contagem dos parasitos presentes nos animais. Dividiu-se os animais em dois grupos como 6 animais em cada grupo. Para isso realizou um sorteio de cada animal mais parasitado para menos parasitado, alocando-se um animal em cada grupo, e assim sucessivamente completar 6 animais em cada grupo. O grupo 1 foi mantido sem tratamento, grupo controle. O grupo 2 foi tratado por via oral com comprimido de fipronil de 20 mg. Nos dias -2, +5, +12 os animais foram reinfestados com 50 pulgas machos e 50 fêmeas da espécie *Ctenocephalides felis felis*, adultas não alimentadas, com idade de 14 dias e com 25 casais adultos carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*.

A avaliação das cargas parasitárias dos animais foram realizadas até que a eficácia do produto se encontrasse abaixo de 80% para pulgas e carrapatos. Sendo assim nos dias -7, +2, +7, +14 foram realizadas a retirada mecânica e a contagem das pulgas e carrapatos, e os resultados de eficiência foram obtidos a partir da equação 8.

Equação para o cálculo da eficácia pulguicida e carrapaticida.

$$\% \text{ Eficácia} = (nc - nt) \times 100 / nt \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

nc = número médio de pulgas/carrapatos vivos recuperados no grupo controle.

nt = número médio de pulgas/carrapatos vivos recuperados no grupo tratado.

3.7.6 Estudos de farmacocinética descritiva

3.7.6.1 Método bioanalítico

As concentrações plasmáticas de FIP e seu metabólito SULF foram analisadas por CLAE-UV após o procedimento de extração por fase sólida (SPE) de acordo com método descrito por CID et al., 2012a e MAGALHÃES, 2016, respectivamente.

Resumidamente as amostras de plasma foram submetidas à extração usando cartuchos de SPE Oasis HBL (Waters) utilizando metanol como eluente. A separação cromatográfica foi realizada utilizando com coluna Kromasil C18 100 x 4,6 mm x 3,5µm, fase móvel acetonitrila:água (60:40) com fluxo 1,0 mL/min. O comprimento de onda utilizado foi 210 nm e volume de injeção 10 µL.

3.7.6.2 Construção da curva de concentração plasmática

Para a construção da curva de concentração plasmática das formulações foram coletadas amostras de sangue de cada animal do grupo tratado em 0, 2, 4, 6, 8, 24 horas e 2, 3, 7, 14, 21, 28 dias após o tratamento.

Durante a coleta de sangue foram utilizados tubos heparinizados vacutainer de 10 mL. Após a coleta as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4°C e o plasma foi separado em microtubos com duas alíquotas de 1 mL. Após o tratamento de extração as amostras foram analisados por CLAE-UV, através de metodologia analítica adaptada de CID *et al.*, (2012) e Magalhães (2016).

Os valores de concentração plasmática encontrados foram analisados individualmente para cada animal. Os parâmetros farmacocinéticos determinados foram: concentração máxima absorvida (C_{max}), tempo onde ocorre o C_{max} (T_{max}), tempo de meia vida (t_{1/2}), área sob a curva de zero até a última concentração possível quantificada (AUC 0-t) e área sob a curva de zero a infinito (AUC 0-∞). Os resultados foram expressos em relação à média aritmética ± CV. A construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo e os parâmetros farmacocinéticos foi realizada utilizando o macro PK Solver do Microsoft Excel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação do teor de FIP na matéria-prima

O teor de FIP MP utilizada para o desenvolvimento das formulações foi determinado por CLAE-UV.

A figura 5 representa a curva de calibração obtida a partir da SQR de FIP. A equação da reta é $y = 0,3594x + 0,0143$ e o coeficiente de correlação $r = 0,9999$

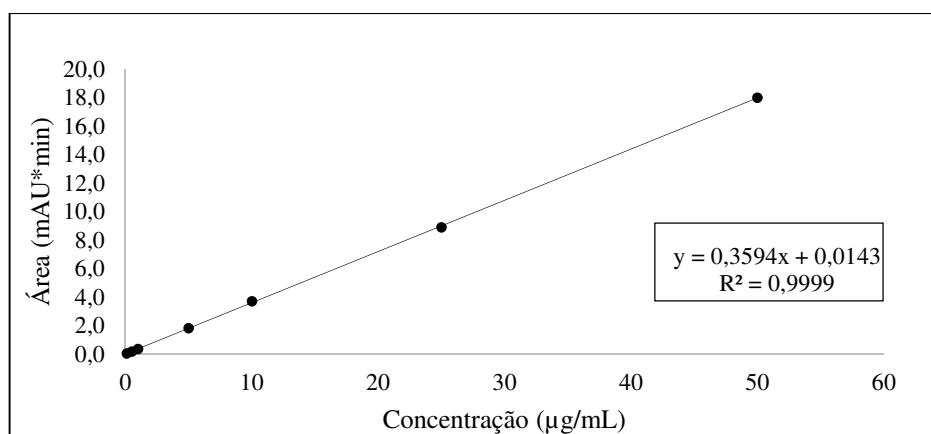


Figura 5. Curva de calibração do padrão (Fipronil S.Q.R).

A tabela 7 mostra os resultados de teor de FIP obtido na matéria-prima utilizada para o desenvolvimento das formulações.

Tabela 7. Quantificação do teor de fipronil na matéria-prima.

Amostra	Teor (%)	Teor médio (%)	DP	DPR (%)
1	99,22			
2	98,10	99,5	1,58	1,59
3	101,22			

dp = desvio padrão e dpr= desvio padrão relativo

A matéria-prima utilizada apresentou um teor de 99,5%.

4.2 Caracterização dos Grânulos Placebos

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos na caracterização dos grânulos utilizados nas formulações placebo seguidos do desvio padrão. Os placebos 1 e 2 foram desenvolvidos utilizando lactose como diluente e os placebos 3 e 4 utilizaram celulose.

Tabela 8. Caracterização dos grânulos desenvolvidos como formulações placebo.

Placebos	α (°)	V. esc (g/s)	Da (g/mL)	IC (%)
1	32,7 ± 1,08	11,83 ± 0,53	0,53 ± 0,01	6,0 ± 1,53
2	32,6 ± 0,42	8,71 ± 0,25	0,43 ± 0,01	4,60 ± 0,38
3	32,6 ± 1,27	9,20 ± 0,14	0,32 ± 0,01	3,00 ± 0,12
4	30,3 ± 0,76	5,70 ± 0,15	0,26 ± 0,01	7,30 ± 0,46

Legenda: α : ângulo de repouso, Vesc (g/s): velocidade de escoamento, Da: Densidade aparente (g/mL) e IC (%): índice de compressibilidade.

*Valores expressos em média ± dp (n=10)

Uma das técnicas de desenvolvimento de comprimidos é a granulação por via úmida, sendo necessário a caracterização prévia desses granulados antes do processo de compactação.

As técnicas utilizadas para a avaliação de pós ou granulados prévias à compactação são o ângulo de repouso, velocidade de escoamento, densidade aparente e índice de compressibilidade (AULTON, 2005).

Além das propriedades de mistura e compressão, a fluxibilidade de um pó é uma propriedade de importância crítica na produção de formas farmacêuticas pois é a propriedade de fluxo que permite a reprodutibilidade de enchimento da máquina de comprimir garantindo a uniformidade de peso, bem como permite a obtenção de comprimidos com propriedades físico-químicas mais consistentes (AULTON, 2005).

Os placebos desenvolvidos apresentaram valores de ângulo de repouso variando entre 30,3° e 32,7°, apresentando boas propriedades de fluxo. Prista (1991) considera com boas propriedades de escoamento, um pó com ângulo de repouso inferior a 30°, ângulos de repouso superiores a 40° sugerem um difícil fluxo de pós ou granulados. Já Aulton (2005) considera que ângulos de repouso maiores que 50° possuem como regra geral, propriedades de fluxo deficientes, enquanto ângulos de repouso próximos a 25°, correspondem a propriedades de fluxo muito boas.

Outro método simples de determinar diretamente a fluxibilidade de um pó é medir a velocidade com que ele escoar pelo alimentador até a matriz da compressora, servindo essa velocidade como parâmetro para a comparação com outros pós. Os valores de velocidade de escoamento encontrados variaram entre 5,70 e 11,83 g/s, e foi possível observar que os placebos que obtiveram maiores velocidades de escoamento compactaram de forma mais satisfatória.

A densidade de um pó é dependente do empacotamento das partículas e modifica-se à medida que o pó consolida-se. A facilidade com que um pó torna-se consolidado pode ser utilizada indiretamente para quantificar o fluxo dele (AULTON, 2005). Formulações que possuem alta densidade podem agregar bom escoamento ao material, garantindo homogeneidade do processo de enchimento das matrizes da compressora, melhorando consequentemente o processo de compressão (NIAZI, 2004). A partir das densidades de um pó é possível calcular seu percentual de compressibilidade. Os valores de índice de compressibilidade encontrados variaram entre 3,0 e 7,3% que de acordo com USP-36 (2013) diante dos valores obtidos os pós apresentaram uma fluidez excelente (5-11%).

Após a caracterização os grânulos foram compactados e submetidos aos ensaios físicos (determinação de peso, dureza e friabilidade).

4.3 Ensaio Físicos dos Comprimidos Placebos

Os resultados do ensaio de determinação de peso dos comprimidos placebos de 1 e 2 desenvolvidos com lactose e 3 e 4, desenvolvidos com celulose estão demonstrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

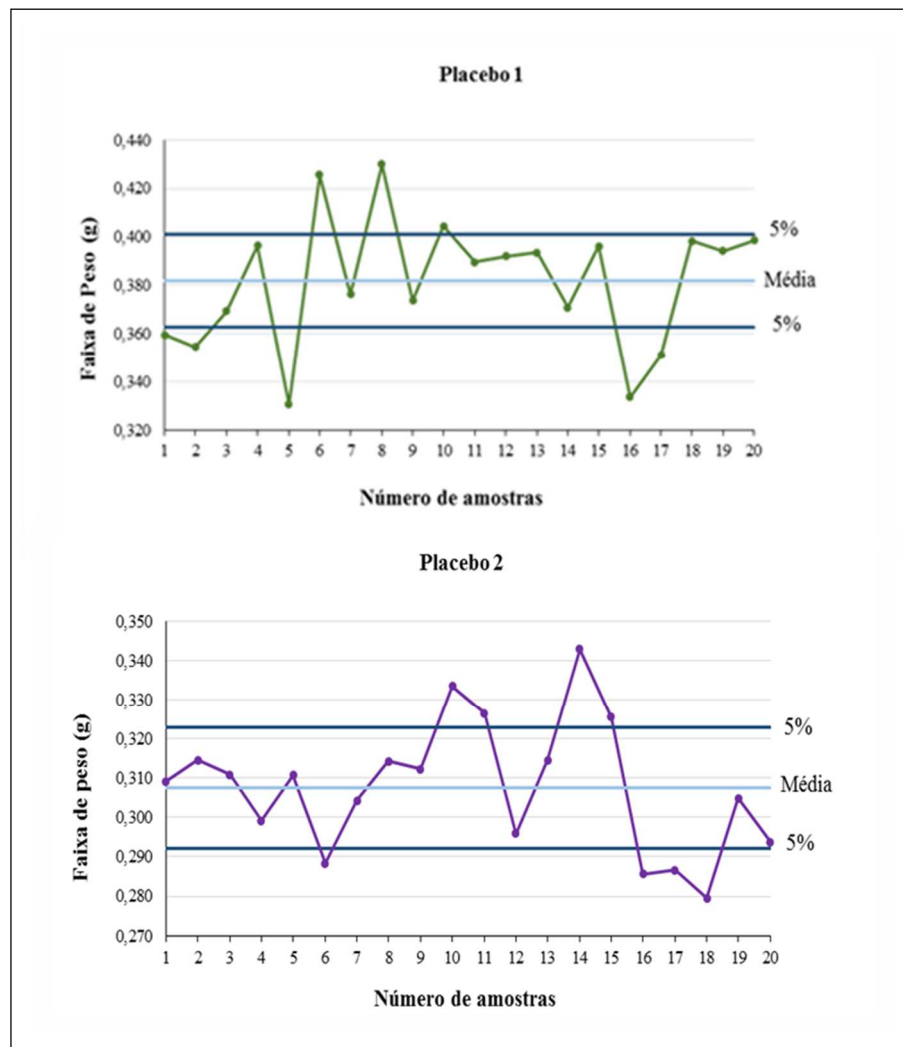


Figura 6. Resultado de determinação de peso dos comprimidos placebos 1 e 2 desenvolvidos com lactose.

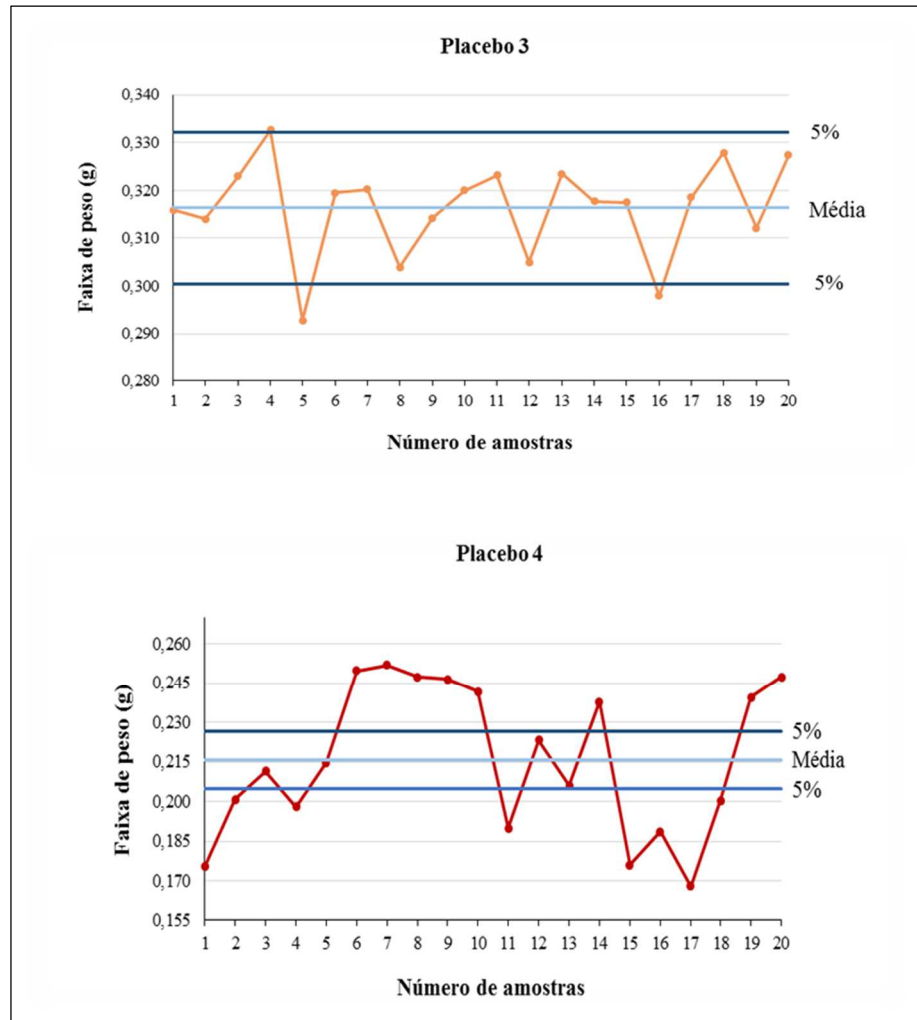


Figura 7. Resultado de determinação de peso dos comprimidos placebos 3 e 4 desenvolvidos com celulose

Os resultados dos de determinação de peso, dureza e friabilidade e o peso médio dos comprimidos placebos estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9. Peso médio, dureza e friabilidade dos comprimidos placebos

Comprimidos Placebos	Peso médio (g)*		Dureza (N)**	Friabilidade (%)
	Média	Faixa $\pm 5\%$		
1	0,3818	(0,4008-0,3627)	32,0 \pm 10,72	0,95
2	0,3077	(0,3220-0,2933)	14,35 \pm 4,17	11,02
3	0,3163	(0,3322-0,3005)	42,45 \pm 6,93	0,09
4	0,2157	(0,2265-0,2049)	20,4 \pm 9,59	0,85

Legenda: * Valores expressos em média (n=20)

**Valores expressos em média \pm dp (n=10)

O placebo 1 obteve comprimidos mais pesados, os placebos 2 e 3, apresentaram valores de peso médio próximos a 0,300g, sendo o placebo 4 o comprimido de menor peso. Os melhores resultados de dureza, foram encontrados para os placebos 1 e 3.

A Farmacopeia Brasileira (2010) especifica que os valores de friabilidade devem ser até 1,5%, portanto, os placebos 1, 3, 4 foram aprovados no ensaio, porém o placebo 2 (lactose, sem adição de talco) foi reprovado, apresentando valor acima do recomendado.

Os valores obtidos nos ensaios de dureza devem ser no mínimo de 30 N, segundo as especificações da Farmacopeia Brasileira (2010), somente os placebos 1 (lactose) e 3 (celulose) atenderam a este requisito. O que provavelmente pode estar relacionado com a velocidade de escoamento dos grânulos, uma vez que os grânulos referentes a estes placebos que fluíram melhor pela compressora apresentaram melhor compactação e proporcionando comprimidos menos friáveis e com melhor resistência.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de caracterização físico-química das formulações placebos, as formulações 1 e 3 foram selecionadas para a incorporação do ativo fipronil, uma vez que estas formulações apresentaram resultados mais satisfatórios em relação aos critérios estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (2010).

4.4 Caracterização dos Grânulos das Formulações Contendo o Ativo Fipronil

Foram realizados ensaios de caracterização dos grânulos desenvolvidos com incorporação do ativo FIP, a compactação dos mesmos e os ensaios de controle de qualidade.

Os valores de ângulo de repouso, velocidade de escoamento, densidade aparente e índice de compressibilidade estão descritos na Tabela 10. Os grânulos de Fipronil que contêm lactose como diluente (1) foram divididos em dois lotes, devido a necessidade da adição de estearato de magnésio 1,0 % na formulação, uma vez que adicionado somente o talco o material a ser compactado estava ficando aderido aos punções da compressora.

Tabela 10. Caracterização dos grânulos das formulações contendo Fipronil.

Granulados de Fipronil	Lote	α (°)	V. esc (g/s)	Da (g/mL)	IC (%)
1	1	34,21 \pm 0,64	11,13 \pm 0,21	0,52 \pm 0,01	6,5 \pm 0,25
(Lactose)	2	29,80 \pm 0,98	13,3 \pm 0,61	0,53 \pm 0,01	4,0 \pm 0,12
3	-	31,30 \pm 0,58	10,4 \pm 0,25	0,36 \pm 0,01	2,0 \pm 0,15
(Celulose)					

Legenda: α : ângulo de repouso; V.esc: velocidade de escoamento; Da: Densidade aparente; IC: índice de compressibilidade.

Os valores de α variaram entre 29,80 e 34,21° semelhantes os resultados encontrados nos grânulos placebos demonstrando a fidelidade no processo de granulação. Esses valores também se encontram na faixa recomendada por Prista (1991) e Auton (2005), que determinam que para um pó ter um bom fluxo este deve apresentar valores de ângulo de repouso entre 20 e 40°. Os valores de velocidade de escoamento foram encontrados na faixa de 10,40 e 13,30 g/s e os índices de compressibilidade obtidos estão entre 2,0 e 6,0%, apresentando boas propriedades de fluidez, de acordo com os valores estabelecidos pela USP-36 (2013) (Tabela 4).

A partir desses grânulos foram desenvolvidas duas formulações e cada uma dividida em 2 lotes, variando os diluentes, na formulação 1 e a velocidade da compressora na formulação 3. Após o processo de compactação os comprimidos foram avaliados nos ensaios físico-químicos.

4.5 Ensaios Físicos dos Comprimidos Contendo Fipronil

Os resultados obtidos nos ensaios de determinação de peso das formulações 1 (lactose) e 3 (celulose) contendo fipronil estão demonstrados nas figuras 8 e 9. As formulações foram divididas em 2 lotes, sendo na formulação 1, o lote 1 adicionado de 0,5% de talco e lote 2 adicionado de 0,5% talco e 1,0% estearato de magnésio. E a formulação 3 variando a velocidade da compressora, sendo o lote 1 produzindo 5 CP/min e o lote 2 27 CP/min).

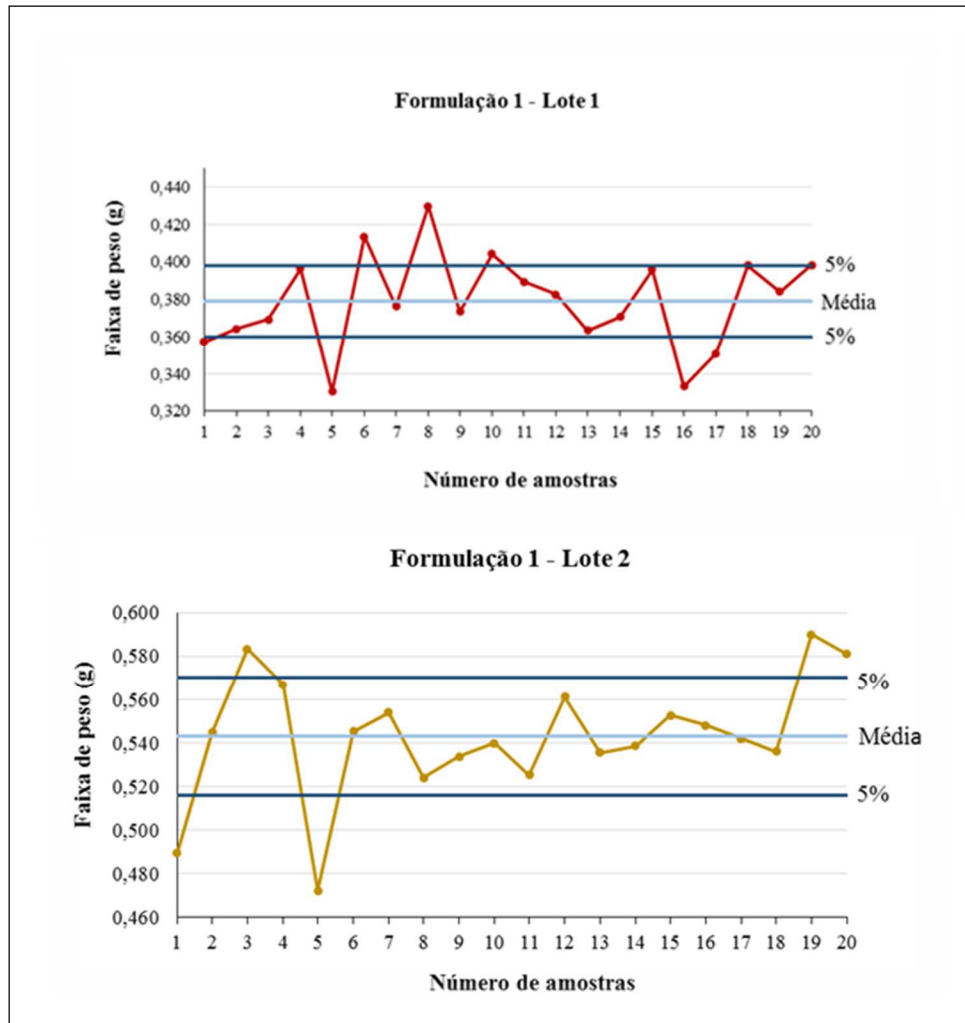


Figura 8. Resultado de peso médio dos comprimido contendo fipronil correspondente aos lotes 1 e 2 da formulação 1.

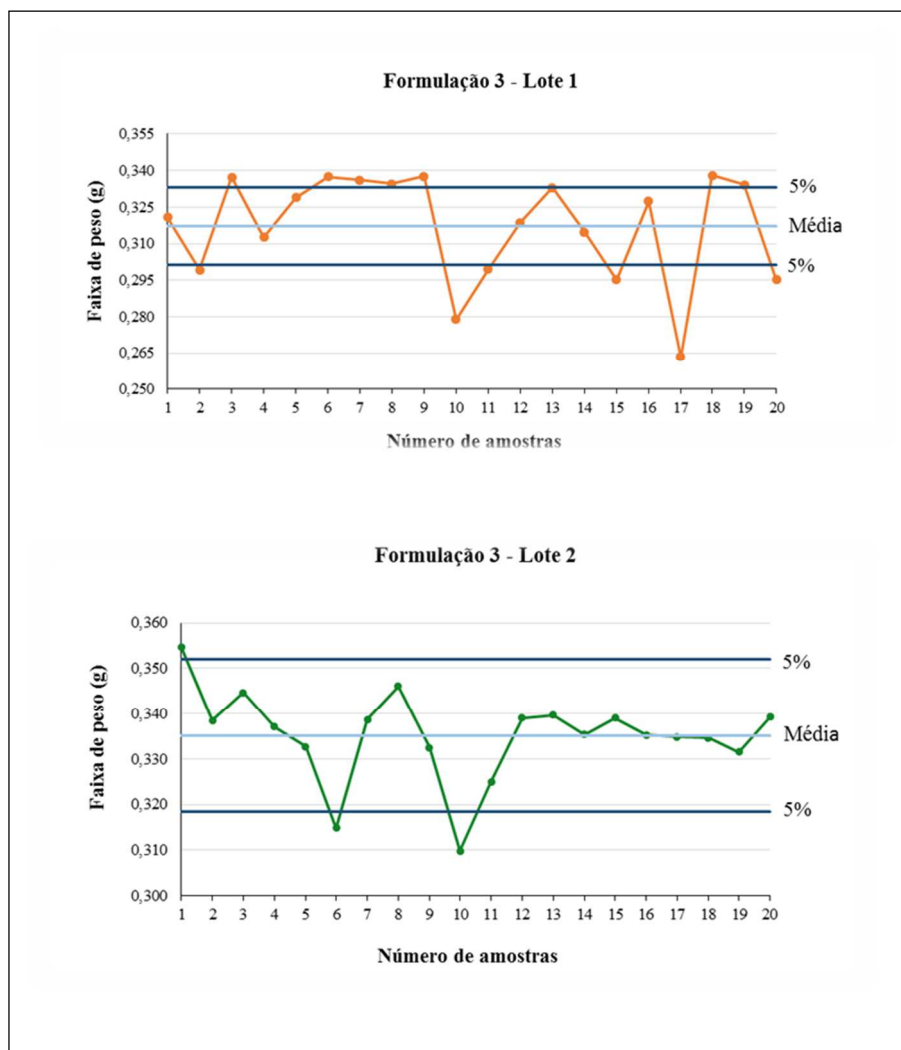


Figura 9. Resultado de peso médio dos comprimido contendo fipronil correspondente aos lotes 1 e 2 da formulação 2.

Nenhuma das formulações foram aprovados no ensaio de variação de peso, assim como foi observado para os comprimidos placebos, não atendendo a tolerância de somente duas unidades fora dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (2010) para comprimidos acima de 250 mg e com variação de $\pm 5,0\%$. A obtenção desses resultados pode estar atribuída a uma variabilidade do processo de compactação, em que se faz necessário um ajuste fino da compressora.

Os resultados obtidos nos ensaios de determinação de peso, dureza e friabilidade e o peso médio dos comprimidos contendo fipronil estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Peso médio, dureza e friabilidade dos comprimidos contendo Fipronil.

Comprimidos de Fipronil	Lote	Peso médio (g)*	Dureza (N)**	Friabilidade (%)
		Média Faixa ± 5%		
1 (Lactose)	1	0,3818 (0,4008-0,3627)	32,0 ± 10,7	0,95
	2	0,5432 (0,5704-0,5160)	83,2 ± 17,2	0,55
3 (Celulose)	1	0,3171(0,3330-0,3012)	31,8 ± 7,74	0,27
	2	0,3351(0,3519-0,3183)	32,5 ± 7,83	0,15

Legenda:

Comprimidos de Fipronil 1: utilizou Lactose como diluente (lote 1 – adição de 0,5% de talco e lote 2 – adição de 0,5% talco e 1,0% estearato de magnésio)

Comprimidos de Fipronil 3: utilizou celulose como diluente (lote 1 - velocidade da compressora = 5 CP/min e lote 2 = 27 CP/min).

* Valores expressos em média (n=20); ** Valores expressos em média ± dp (n=10).

Para os resultados de dureza e friabilidade os dois lotes das formulações 1 (lactose) e 3 (celulose) atenderam as especificações da Farmacopéia Brasileira (2010), no entanto o lote 2 da formulação 1 apresentou maior dureza quando comparado lote 1 provavelmente devido a adição do estearato de magnésio, que facilitou o deslizamento do granulado pela compressora realizando um enchimento eficiente da matriz. Além da maior dureza foi possível observar que os comprimidos do lote 2 da formulação 1 (lactose) apresentaram peso maior quando comparados aos comprimidos do lote 1, além de se apresentarem com brilho, o que também está relacionado a adição do lubrificante (estearato de magnésio). Segundo (Prista, 1991) os lubrificantes são capazes de assegurarem um completo enchimento da matriz da compressora e de evitarem a aderência dos pós aos punções da máquina. O estearato de magnésio pode ser empregado nas porcentagens de 1 a 3%, conferindo muito brilho aos comprimidos. Além da adição do lubrificante quando comparamos o diluente utilizado observamos que os granulados desenvolvidos com lactose possuem uma velocidade de escoamento (Tabela 10) maior (11,13 e 13,3 g/s) em relação aos desenvolvidos com celulose, o que permite o maior enchimento da matriz, resultando em comprimidos com massa maior (0,3818 e 0,5432 g). Em contrapartida, os grânulos desenvolvidos utilizando celulose apresentou valores de velocidade de escoamento menor (10,04 g/s) e, portanto, dificultou o total preenchimento da matriz, resultando em comprimidos com menor peso (0,3171 e 0,335 g). Como os lotes 2, das duas formulações apresentaram melhores resultados na caracterização, eles foram selecionados para a realização dos ensaios de doseamento e uniformidade de conteúdo e estudo de dissolução.

4.6 Ensaios de doseamento e uniformidade de conteúdo dos comprimidos de Fipronil

A Figura 10 representa a curva de calibração obtida a partir do padrão de FIP. A equação da reta é $y = 0,5104x + 0,0076$ e o coeficiente de correlação $r = 0,9994$.

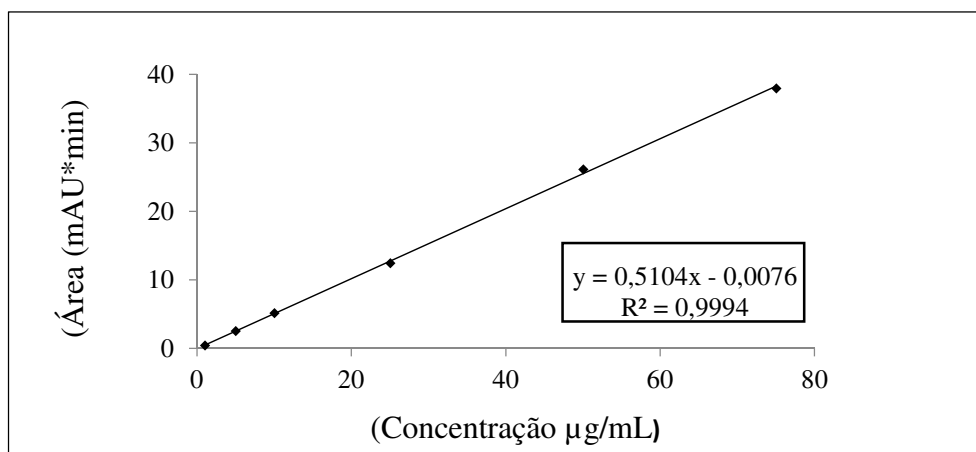


Figura 10. Curva padrão de calibração do FIP

Os resultados dos ensaios de teor e uniformidade estão descritos na Tabela 12. Os lotes 2 dos comprimidos 1 e 3 foram selecionados para realizar os respectivos ensaios, pois apresentaram melhores resultados de variação de peso e resistência mecânica quando comparados com os comprimidos dos lotes 1.

Tabela 12. Resultados dos ensaios de doseamento e uniformidade de dose dos comprimidos de Fipronil.

Comprimidos de Fipronil	Doseamento*	DPR (%)	Uniformidade de dose*	VA
1 (Lactose)	106,1 ± 1,19	8,9	99,0 ± 6,30	13,96
3 (Celulose)	93,08 ± 9,4	1,27	94,41 ± 2,92	1,04

Legenda: *% em relação ao declarado. Valores expressos em média ± dp. VA: valor de aceitação, DPR: desvio padrão relativo.

Os resultados obtidos no doseamento e na uniformidade de dose unitária, para as formulações 1 e 3 estavam dentro dos valores preconizados pela Farmacopeia Brasileira (2010). Os comprimidos contendo lactose (1) apresentaram a média de dose de 34,7 mg e os comprimidos contendo celulose (3) apresentaram dose de 20,6 mg, sendo portanto, necessário ajustar a dose de Fipronil nos comprimidos que utilizaram lactose, uma vez que a dose desejava era de 20 mg. Essa maior dose pode ser explicada devido ao seu maior peso médio quando comparado aos comprimidos utilizando celulose como diluente. Por este motivo, o ajuste de dose foi necessário, uma vez que o peso médio dos comprimidos é maior, a quantidade do ativo também é elevada.

Após esses ensaios foram desenvolvidas formulações com a dose de fipronil ajustada obtendo comprimidos com a dose 20 mg, sendo estes aprovados no ensaios físico-químicos estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (2010), como demonstrado no item 4.7.

4.7 Ajuste de dose

A formulação desenvolvida para o ajuste de dose nos comprimidos utilizando lactose apresentou resultados semelhantes as demais formulações nos ensaios de caracterização dos grânulos como demonstrado na tabela 13.

Tabela 13. Caracterização dos granulados desenvolvidos para ajuste de dose.

Parâmetros	α	V. esc (g/s)	Da (g/mL)	IC (%)
CP 20 mg	29,80 \pm 0,98	13,3 \pm 0,61	0,53 \pm 0,01	4,0 \pm 0,01

O comprimido desenvolvido para ao ajuste de dose apresentou peso médio de 0,550 g (Figura 11), não estando nenhuma unidade fora da faixa de aceitação (5%) estabelecida pela Farmacopéia Brasileira (2010). Os resultados dos ensaios físico-químicos estão disponíveis na Tabela 14.

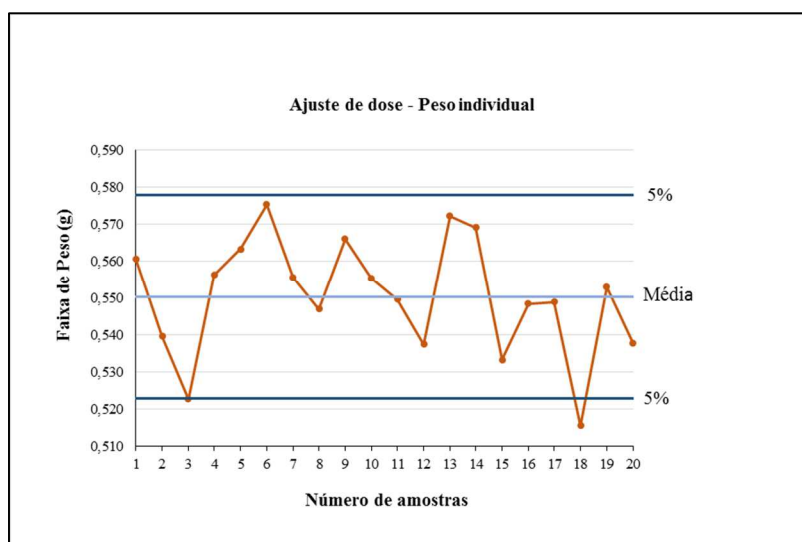


Figura 11. Resultado de peso médio dos comprimidos desenvolvidos para ajuste de dose.

Tabela 14. Caracterização Físico-Química dos comprimidos desenvolvidos para ajuste de dose.

Parâmetros	Dureza (N)	Friabilidade (%)	Doseamento* (%)	DPR	Uniformidade de conteúdo	VA
CP 20 mg	53,40 ± 7,80	0,67	109,06 ± 1,18	1,08	104,43 ± 2,55	10,82

Legenda: *% em relação ao declarado. Valores expressos em média ± dp. VA: valor de aceitação, DPR: desvio padrão relativo

Quando realizado o ajuste de dose, os ensaio de caracterização dos grânulos apresentou resultados semelhantes aos obtidos nos placebos e nas formulações desenvolvidas, demonstrando fidelidade no processo de granulação. Além disso, formulação atendeu a todos os requisitos estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (2010) para os ensaio de caracterização físico-química dos comprimidos, como demonstrado na Figura 10 e Tabela 14, ao contrário das demais formulações que não foram aprovadas no ensaio de peso médio, demonstrando assim um melhor ajuste da compressora no desenvolvimento dessa formulação.



Figura 12. Comprimidos desenvolvidos no ajuste de dose

Foram obtidos comprimidos 0,5 cm de espessura 50 mm de diâmetro, de cor branca, superfície lisa e uniforme, sem manchas e com brilho, como demonstrado na Figura 12, com valores de dureza, friabilidade, doseamento e uniformidade de conteúdo (Tabela 14) dentro dos padrões estabelecidos pelos métodos gerais da Farmacopéia Brasileira.

Esses comprimidos foram utilizados para realização dos ensaios *in vivo*, após os resultados obtidos no estudo de liberação *in vitro*.

4.8 Ensaio de Liberação *in vitro*

Utilizou-se então os três meios para a avaliação da influência do pH no perfil de dissolução, utilizando as condições mais drásticas, pá a 100 rpm, analisando primeiramente os comprimidos desenvolvidos com lactose.

4.8.2 Estudo de Perfil de Dissolução *in vitro*

Para realizar o estudo do perfil de dissolução *in vitro* foram calculadas as porcentagens de fármaco dissolvidas ao longo do tempo e a eficiência de dissolução, e realizados também o estudo de cinética de dissolução e análise de fluxo. A partir da análise conjunta de todos esses parâmetros, definiu-se qual seria o melhor método de dissolução a ser utilizado para os comprimidos de fipronil.

A Tabela 16 representa as porcentagens dissolvidas de FIP no estudos de liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas.

Foram comparadas as condições de pH, concentração de tensoativo, aparato e rotação, para determinação de um método que fosse mais discriminativo para o perfil de liberação do FIP. Foi possível observar que a maior porcentagem dissolvida foi encontrada na condição HCl 0,1 com 1,0% de SDS utilizando pá a 100 rpm. As comparações dos ensaios de perfil de dissolução estão demonstradas nas figuras 13 a 17.

A maior porcentagem dissolvida foi observada em HCl 0,1 M (99,9%), seguida do tampão fosfato de sódio (84,7%) e acetato de sódio (84,6%).

Tabela 16 - Porcentagem de fipronil dissolvida em casa tempo no estudo de liberação in vitro (n=6) dos comprimidos de fipronil desenvolvidos em diferentes condições e meios de dissolução.

Tempo (min)	CP de Lactose – 1,0 % SDS - Pá 100 rpm ± DP		
	Fosfato pH 6,8	Acetato pH 4,5	HCl 0,1 M
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
5	24,30 ± 2,16	29,70 ± 3,31	26,64 ± 3,31
15	66,30 ± 3,95	70,60 ± 4,33	73,75 ± 9,32
30	84,40 ± 1,92	85,50 ± 2,14	96,91 ± 12,02
45	86,20 ± 2,06	84,70 ± 2,04	99,27 ± 12,50
60	84,70 ± 2,53	84,60 ± 1,76	99,90 ± 12,62
	CP de Lactose em HCl 0,1 M - Pá 100 rpm ± DP		
	Sem SDS	SDS 0,1%	SDS 0,5%
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
5	6,61 ± 0,09	13,37 ± 1,95	20,02 ± 1,04
15	6,81 ± 0,04	21,04 ± 6,59	54,96 ± 1,60
30	6,59 ± 0,06	27,70 ± 1,94	81,67 ± 7,42
45	6,55 ± 0,06	28,68 ± 0,86	84,15 ± 8,32
60	6,55 ± 0,05	28,31 ± 0,71	86,67 ± 6,19
	CP de Lactose - HCl 0,1 M + 1,0% SDS - Pá 100 rpm ± DP		
	Pá 50 rpm	Cesta 100 rpm	
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
5	19,55 ± 2,58	28,62 ± 3,34	
15	58,72 ± 7,15	69,92 ± 8,44	
30	83,51 ± 10,14	87,47 ± 11,40	
45	89,83 ± 11,07	91,31 ± 4,84	
60	88,74 ± 10,88	90,16 ± 11,66	
	CP de Celulose em HCl 0,1 + SDS 1% Pá 100 rpm ± DP		
	0,1% SDS	0,5% SDS	1,0% SDS
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
5	1,31 ± 5,59	1,37 ± 3,76	6,32 ± 0,96
15	13,31 ± 4,98	16,76 ± 3,48	26,17 ± 0,76
30	23,53 ± 3,51	29,84 ± 2,00	40,36 ± 2,15
45	22,88 ± 2,52	37,35 ± 1,93	46,70 ± 3,20
60	24,14 ± 2,59	41,70 ± 1,88	50,88 ± 0,91
75	23,16 ± 1,21	47,05 ± 1,52	50,04 ± 1,07
90	24,88 ± 0,81	50,79 ± 1,75	53,07 ± 0,98
120	26,68 ± 1,57	54,88 ± 1,25	56,08 ± 0,87

As figuras abaixo representam a curvas de dissolução nas diferentes condições de análise.

A Figura 14 representa os perfis de dissolução dos comprimidos utilizando lactose como diluente em meio de dissolução de diferentes valores de pH. Foi possível observar que pH 1,2 a formulação apresentou maior porcentagem dissolvida.

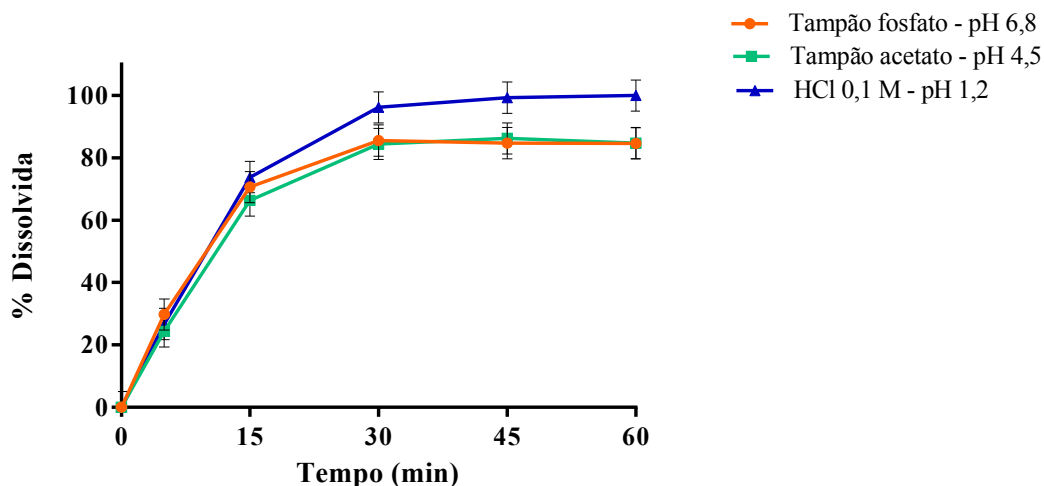


Figura 14. Perfis de dissolução de comprimidos utilizando lactose como diluente, usando o aparato pá com rotação a 100 rpm e 1% de tensoativo (SDS).

A Figura 15 representa o perfis de dissolução de comprimidos de FIP utilizando lactose como diluente em HCl 0,1M com diferentes concentrações de tensoativo SDS e utilizando o aparato pá a 100 rpm.

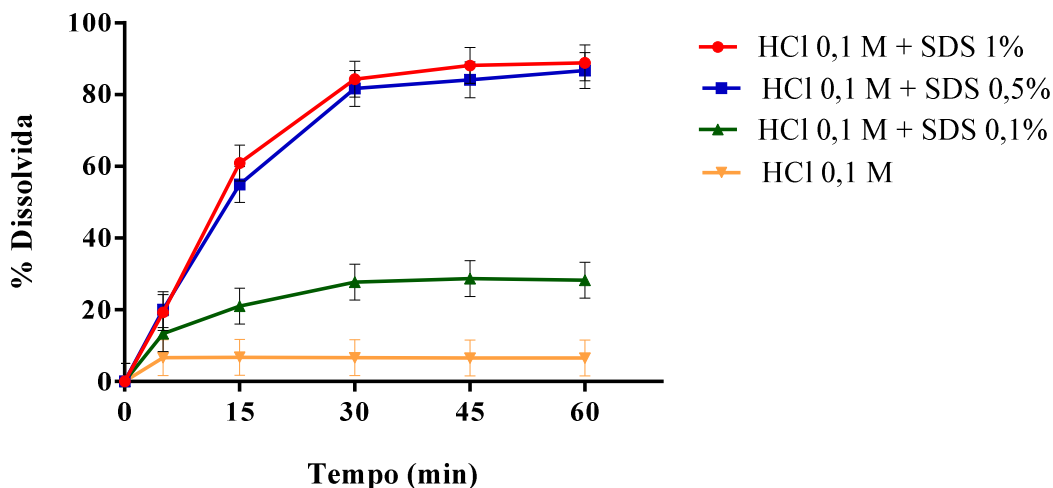


Figura 15. Perfis de dissolução de comprimidos de Fipronil utilizando lactose como diluente em HCl 0,1M com diferentes concentrações de tensoativo SDS, utilizando o aparato pá a 100 rpm.

A Figura 16 representa os resultados da variação dos aparatos e rotações utilizados nos ensaios de dissolução. A utilização da pá como aparato a 100 rpm demonstrou um perfil de liberação mais eficiente quando comparado aos outros métodos, sendo escolhido como método de eleição para a realização das próximas dissoluções.

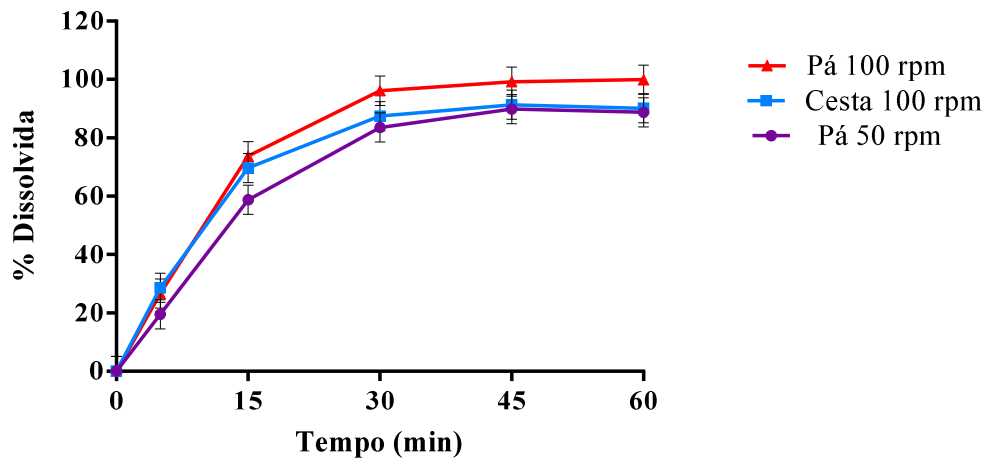


Figura 16. Perfis de dissolução de comprimidos utilizando lactose como diluente comparando a influência do aparato e da rotação no ensaio de dissolução, usando HCl 0,1M + SDS 1,0%.

A Figura 17 representa o perfil de dissolução dos comprimidos de FIP utilizando celulose como diluente em HCl 0,1 M com diferentes concentrações de tensoativo SDS e utilizando o aparato pá a 100 rpm.

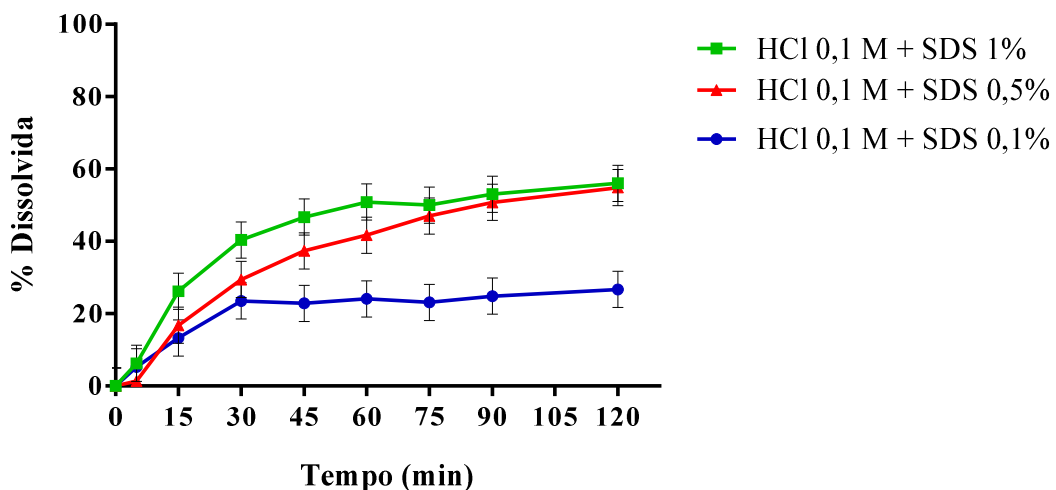


Figura 17. Perfis de dissolução de comprimidos de Fipronil utilizando celulose como diluente em HCl 0,1M com diferentes concentrações de tensoativo SDS, utilizando o aparato pá a 100 rpm.

A Figura 19 compara os dois perfis de liberação dos comprimidos contendo lactose e celulose como diluentes nas mesmas condições de dissolução, com a finalidade de comparar a

influência do diluente no ensaio de dissolução. O comprimido de Fipronil contendo celulose como diluente, apresenta um perfil mais lento e, portanto, não confere uma liberação imediata, que determina 75% de dissolução do fármaco em 45 minutos (ANVISA, 2010).

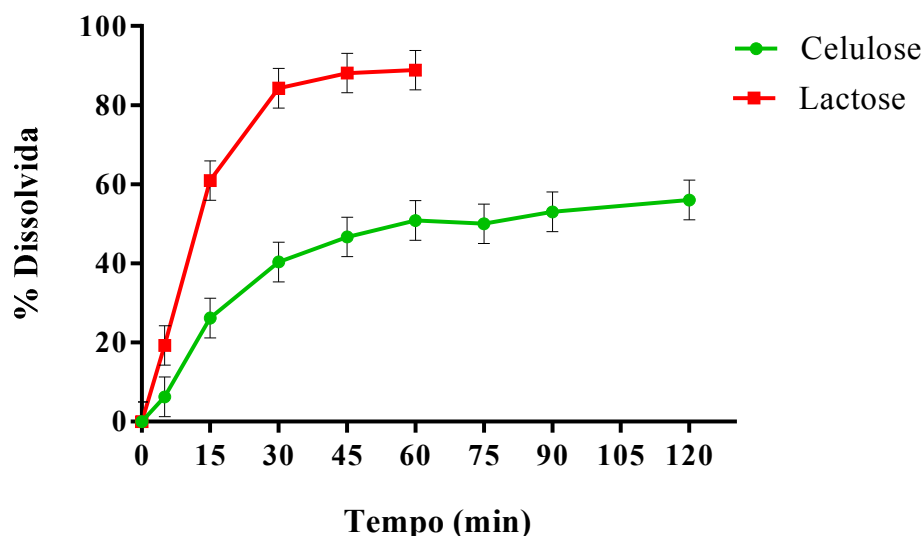


Figura 18. Perfis de dissolução de comprimidos utilizando lactose e celulose como diluente, usando como meio de liberação HCl 0,1 + SDS 1%, aparato Pá a 100 rpm.

Na Tabela 17 estão apresentados o resumo dos resultados estatísticos da porcentagem de fármaco dissolvida após 30 minutos de dissolução avaliando a influência do pH no perfil de dissolução para os comprimidos utilizando lactose com diluente.

Após a obtenção das porcentagens dissolvidas de FIP foram realizadas análises estatísticas (One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey)), com intuito de verificar se os resultados obtidos eram significativamente diferentes de acordo com as variações no método de dissolução, Inicialmente foi avaliada a porcentagem de fármaco dissolvida em 30 minutos de dissolução em diferentes valores de pH, como demonstrado na Tabela 17.

Tabela 17. Resumo dos dados estatísticos da porcentagem de fipronil liberado após 30 minutos de estudo de liberação *in vitro* utilizando HCl 0,1 M + SDS 1% a 100 rpm utilizando como aparato pá em diferentes pH's.

Comparação meios de liberação	Significância ^a
HCl 0,1 M x Tampão fosfato de sódio	P < 0,0001****
HCl 0,1 M x Tampão acetato de sódio	P < 0,0001****
Tampão acetato de sódio x Tampão fosfato de sódio	P > 0,05

(a) Significativo para P < 0,05. Teste estatístico: One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey)

Foi possível observar que os tampões acetato e fosfato de sódio não apresentaram diferença significativa entre si, no entanto ambos apresentaram diferença significativa em relação ao HCl 0,1M.

Na Tabela 18 está apresentado o resumo dos resultados estatísticos da porcentagem de fármaco dissolvida após 30 minutos de dissolução avaliando a influência da concentração de tensoativo utilizada nos diferentes ensaios, para ambos comprimidos. Foi possível observar que todos os perfis de dissolução apresentaram diferença significativa entre si quando variava-se a concentração de tensoativo utilizada.

Tabela 18. Resumo dos dados estatísticos da porcentagem de FIP liberado após 30 minutos de estudo de liberação *in vitro* das formulações utilizando lactose e celulose como diluentes em diferentes meios de liberação.

Comparação das concentrações de SDS		Significância ^a
CP Lactose	HCl 0,1 M x HCl 0,1 M + SDS 0,1%	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M x HCl 0,1 M + SDS 0,5%	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M x HCl 0,1 M + SDS 1,0%	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 0,1% x HCl 0,1 M + SDS 0,5%	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 0,1% x HCl 0,1 M + SDS 1,0%	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 0,5% x HCl 0,1 M + SDS 1,0%	P < 0,0001****
CP Celulose	HCl 0,1 M + SDS 0,5% x HCl 0,1 M + SDS 1,0%	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 0,1% x HCl 0,1 M + SDS 1,0%	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 0,1% x HCl 0,1 M + SDS 0,5%	P < 0,0001****

(a) Significativo para P < 0,05. Teste estatístico: One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey)

Na Tabela 19 está apresentado o resumo dos resultados estatísticos da porcentagem de fármaco dissolvida após 30 minutos de dissolução avaliando a influência da rotação e o aparato utilizada no perfil de dissolução para os comprimidos utilizando lactose com diluente. As variação dos aparatos, cesta e pá, apresentaram diferença significativa entre si, assim como a velocidade de rotação.

Tabela 19. Resumo dos dados estatísticos da porcentagem de FIP liberado após 30 minutos de estudo de liberação *in vitro* utilizando HCl 0,1 M + SDS 1%, variando o aparato, a rotação e a formulação.

Comparação aparato, rotação e formulação	Significância ^a
100 rpm cesta x 100 rpm Pá	P < 0,05*
50 rpm Pá x 100 rpm Pá	P < 0,001***
50 rpm Pá x 100 rpm Cesta	P > 0,05
Celulose x Lactose	P < 0,0001****

(a) Significativo para P < 0,05. Teste estatístico: One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey)

4.8.3 Estudo da cinética de dissolução e análise de fluxo de liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* visam à avaliação da liberação/cedência do fármaco a partir da formulação desenvolvida. A partir do perfil de liberação pode-se determinar a cinética para cada formulação. Para isso, escolheu-se a porção mais linear de cada perfil e aplicou-se os três modelos cinéticos (item 3.6.6.3) para determinação da equação da reta de regressão linear ($y = ax + b$). O modelo que apresentou maior valor de correlação linear (mais próximo de 1) foi escolhido como modelo cinético do estudo. O valor de fluxo (J) corresponde ao valor de inclinação a da equação da reta de regressão linear. Os valores de fluxo (J) e correlação linear (r) das formulações analisadas estão demonstrados na Tabela 20.

Os estudos de dissolução revelaram uma cinética pseudo-primeira ordem. O perfil de dissolução da formulação utilizando lactose no desenvolvimento, nas condições de HCl 0,1M com 1,0% de SDS utilizando pá a 100 rpm, foi que apresentou maior valor de fluxo de liberação (J).

Tabela 20. Determinação do fluxo (J) e cinética de liberação ($n=6$) dos comprimidos de FIP utilizando diferentes diluentes e meios de dissolução.

Excipiente	Meio de Liberação	SDS %	Aparato	Rotação (rpm)	Fluxo (J)*	Correlação linear (r)	Modelo Cinético
Lactose	HCl 0,1M	-	Pá	100	$0,114 \pm 0,060$	0,669	Pseudo- primeira ordem
		0,1			$1,100 \pm 0,184$	0,869	
		0,5			$4,204 \pm 0,545$	0,930	
		1,0	$5,177 \pm 0,008$		0,922		
		1,0	Cesta		100	$4,507 \pm 0,484$	
	1,0	Pá	50	$4,912 \pm 0,318$	0,926		
	Tampão Acetato	1,0	Pá	100	$2,091 \pm 0,225$	0,861	
Tampão Fosfato	1,0	Pá	100	$2,352 \pm 0,236$	0,882		
Celulose	HCl 0,1M	0,1	Pá	100	$1,742 \pm 0,103$	0,968	Pseudo- primeira ordem
		0,5	Pá	100	$1,972 \pm 0,130$	0,994	
		1,0	Pá	100	$1,009 \pm 0,235$	0,974	

* Valores expressos em média \pm dp

Os estudos de dissolução revelaram uma cinética pseudo-primeira ordem. O diluente utilizado no desenvolvimento das formulações, assim como das condições do ensaios de dissolução (concentração de SDS, aparato e rotação), não influenciaram no perfil cinético.

A Tabela 21 apresenta o resumo dos dados estatísticos para os valores de fluxo obtidos a partir dos estudos de cinética de liberação para todos os meios de dissolução testados.

Tabela 21. Resumo dos dados estatísticos do fluxo (*J*) após estudo de liberação *in vitro* das formulações utilizando lactose como diluente em diferentes meios de liberação utilizando pá como aparato com rotação a 100 rpm.

Comparação meios de liberação		Significância ^a
CP Lactose	Tampão acetato de sódio x Tampão fosfato de sódio	P > 0,05
	HCl 0,1 M + SDS 1,0% x Tampão acetato de sódio	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 0,5% x Tampão acetato de sódio	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 0,1% x Tampão acetato de sódio	P < 0,01**
	HCl 0,1 M x Tampão acetato de sódio	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 1,0% x Tampão fosfato de sódio	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 0,5% x Tampão fosfato de sódio	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 0,1% x Tampão fosfato de sódio	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M x Tampão fosfato de sódio	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 0,5% x HCl 0,1 M + SDS 1,0%	P > 0,05
	HCl 0,1 M + SDS 0,1% x HCl 0,1 M + SDS 1,0%	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M x HCl 0,1 M + SDS 1%	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 0,1% x HCl 0,1 M + SDS 0,5%	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M x HCl 0,1 M + SDS 0,5%	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M x HCl 0,1 M + SDS 0,1%	P < 0,001***
CP Celulose	HCl 0,1 M + SDS 0,5% x HCl 0,1 M + SDS 1%	P > 0,05
	HCl 0,1 M + SDS 0,1% x HCl 0,1 M + SDS 1,0%	P < 0,0001****
	HCl 0,1 M + SDS 0,1% x HCl 0,1 M + SDS 0,5%	P < 0,0001****

(a) Significativo para P < 0,05. Teste estatístico: One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey)

4.8.4 Cálculo da eficiência de dissolução

A Tabela 22 apresenta os dados de eficiência de dissolução para ambas formulações nos diferentes ensaios.

Tabela 22. Eficiência de Dissolução das formulações nos diferentes meios de liberação.

Dissolução	Excipiente	Meio de Liberação	SDS %	Aparato	Rotação (rpm)	% ED
1			-			6,3
2			0,1	Pá	100	23,8
3		HCl 0,1M	0,5			66,2
4	Lactose		1,0			80,0
5			1,0	Cesta	100	74,0
6			1,0	Pá	50	69,0
7		Tampão Acetato	1,0	Pá	100	71,5
8		Tampão Fosfato	1,0	Pá	100	70,1
9			0,1	Pá	100	21,4
10	Celulose	HCl 0,1M	0,5	Pá	100	37,7
11			1,0	Pá	100	43,6

O perfil de dissolução da formulação utilizando lactose no desenvolvimento, nas condições de HCl 0,1M com 1,0% de SDS utilizando pá a 100 rpm, foi que apresentou maior valor de eficiência de dissolução (80%).

Para a escolha do método de dissolução foi necessário correlacionar todas as análises realizadas no estudo do perfil de dissolução *in vitro*.

Quando analisado o fluxo de liberação (*J*) (Tabela 20), o maior valor apresentado foi na dissolução em HCl 0,1 M ($5,177 \pm 0,008$), assim como maior eficiência de dissolução (80%), seguidas do tampão acetato (71,5%) e fosfato (70,1%), como apresentado na Tabela 22, constatando que o melhor perfil de dissolução apresentado para o comprimido foi em HCl 0,1M, seguindo com este meio para a avaliação dos próximos parâmetros avaliados no estudo de dissolução. Uma vez que consideramos as condições mais drásticas, era necessário utilizar condições que diminuíssem essa drasticidade como recomendado pela nota técnica 003/2013. Foram testadas as diferentes condições como, concentração de tensoativo, aparato e rotação, e avaliados eficiência de dissolução (%ED), a porcentagem dissolvida em 30 minutos, o fluxo de liberação (*J*) para comparação.

Quando analisado o parâmetro concentração de tensoativo, observou-se que sem SDS e a concentração de 0,1%, não atingem 75% de dissolução em 45 minutos, o que caracteriza os comprimidos de liberação imediata segundo a RDC N°. 31, de 11 de agosto de 2010. Pode-se observar que a adição do tensoativo ao meio de liberação aumentou de maneira progressiva a eficiência de dissolução (Tabela 22), levando também a um aumento do fluxo de liberação (*J*) (Tabela 20), de maneira proporcional ao aumento da sua concentração.

Apesar da concentração em 0,5% de SDS ter apresentado 75% de liberação, assim como 1,0%, ambas foram diferentes significativamente e a ED foi superior na concentração de 1% de SDS, sendo então essa concentração definida para seguir com a avaliação dos próximos parâmetros (aparato e rotação). Sendo assim, o meio de dissolução definido foi HCl 0,1 M com 1,0% de SDS.

O aparato escolhido foi a pá com rotação a 100 rpm, pois foi a condição que apresentou melhores valores de porcentagem dissolvida, *J* e ED. Apesar dos valores de *J* para o perfil utilizando cesta ($4,505 \pm 0,484$) e a rotação a 50 rpm ($4,912 \pm 0,318$) serem bem próximos para o perfil usando pá a 100 rpm, eles diferem estatisticamente entre si. Sendo assim o melhor meio de dissolução foi HCl 0,1M com adição de 1,0% de SDS utilizando as condições pá a 100 rpm.

A escolha do melhor método de dissolução, assim como meio de liberação e da formulação desenvolvida fica evidenciada através dos resultados obtidos de porcentual dissolvido no perfil de liberação, assim como nos valores de fluxo de liberação encontrados e na eficiência de dissolução.

Ensaio de dissolução foram realizados para os comprimidos desenvolvidos com celulose, utilizando HCl 0,1M com diferentes concentrações de SDS (0,1; 0,5 e 1,0%), na condição escolhida, pá a 100 rpm. Esses comprimidos não atingiram a especificação estabelecida pela RDC Nº. 31, de 11 de agosto de 2010, para comprimidos de liberação imediata (75% em 45 min). Essa formulação apresentou uma liberação mais lenta e atingindo aproximadamente 50% de liberação em 90 minutos.

O método de dissolução escolhido é discriminativo para as duas formulações desenvolvidas. Ainda segundo a RDC Nº. 31, de 11 de agosto de 2010, um método é discriminativo quando o mesmo é capaz de evidenciar mudanças significativas nas formulações e nos processos de fabricação dos medicamentos testados que podem afetar o desempenho da formulação.

Para produzir seu efeito um medicamento depende da sua liberação, dissolução e solubilização em condições fisiológicas, além da sua permeabilidade através do trato TGI, e o ensaio de dissolução *in vitro* quando realizado de maneira adequada é capaz de prever o comportamento do fármaco *in vivo* (KAMALAKKANNAM et al., 2011). O tamanho da partícula influencia diretamente no tamanho da partícula do grânulo formado na granulação. A celulose possui tamanho menor quando comparada lactose (KUSHNER et al., 2011). Partículas menores, conduz a pós mais coesivos, produzindo agregados que são difíceis de serem quebrados reduzindo assim a velocidade de cedência dos comprimidos. É importante assegurar que um comprimido seja formulado de tal modo que se desintegre, e que os agregados sejam desmontados para que a área superficial do fármaco fique exposta ao meio de dissolução (AULTON, 2005). O que poderia explicar a liberação lenta da celulose.

Sendo assim a condição de de HCl 0,1M com 1,0% de SDS utilizando pá a 100 rpm foi a eleita a melhor condição para o ensaio de dissolução. E os comprimidos utilizando lactose como diluente foi o escolhido para a realização dos ensaio *in vivo*, uma vez que os comprimidos utilizando celulose não apresentaram perfil de dissolução adequado para comprimidos de liberação imediata (75% em 45 min) (ANVISA, 2010).

A partir do estudo determinou-se que os ensaios *in vivo* seriam executados utilizando os comprimidos utilizando lactose no desenvolvimento, pois estes foram classificados como comprimidos de liberação imediata. Os comprimidos de liberação imediata são escolhidos, devido ao tamanho do TGI dos cães, que é curto, além disso esvaziamento gástrico ocorre de maneira rápida (SONG, et al.2016).

4.9 Estudo *in vivo*

4.9.1 Estudo de farmacocinética descritiva

A Figura 20 representa as curvas bioanalíticas da relação de área do padrões analíticos (Fipronil e Fipronil-sulfona) e padrão interno (Etiprol) em plasma canino. A equação da reta é $y = 0,662x + 0,0143$ e o coeficiente de correlação $r = 0,9937$ para o FIP e $y = 0,4777x + 0,0135$ e o coeficiente de correlação $r = 0,9939$ para SULF.

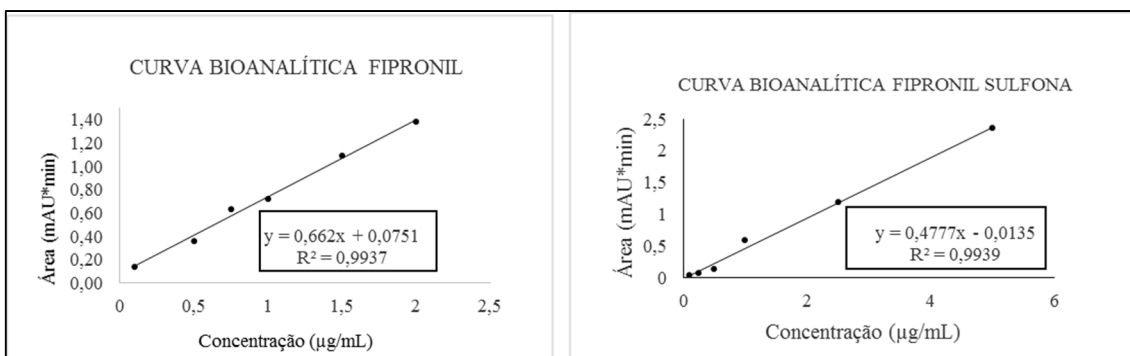


Figura 19. Curvas bioanalíticas da relação de área dos padrões analíticos (Fipronil e Fipronil-sulfona) e padrão interno (Etiprol) em plasma canino.

A partir das curvas acima foram calculadas as concentrações de FIP e SULF encontradas ao longo do tempo em cada animal, como demonstrado nas tabelas 23 e 24, respectivamente.

As médias dos valores de concentrações de FIP encontrados individualmente em cada animal estão demonstrados na Tabela 23.

Tabela 23. Concentração de Fipronil encontrada em cada animal.

Tempo (horas)	Concentração Plasmática de Fipronil ($\mu\text{g/mL}$) por animal						Média \pm dp
	1	2	3	4	5	6	
0	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0	0,000 \pm 0,000
1	1,683	1,703	1,265	1,956	0,467	3,167	1,707 \pm 0,809
2	0,792	1,646	0,906	0,100	1,743	0,879	1,011 \pm 0,555
4	1,799	0,519	1,790	0,710	0,616	4,034	1,578 \pm 1,220
6	1,018	0,502	0,862	0,287	0,642	1,126	0,739 \pm 0,292
8	0,886	0,312	0,851	0,685	0,268	1,041	0,674 \pm 0,291
24	0,538	0,049	0,213	0,203	0,108	0,990	0,350 \pm 0,325
48	0,362	0,189	1,261	0,524	0,088	0,727	0,525 \pm 0,390
72	0,416	0,343	0,914	0,540	0,982	0,491	0,614 \pm 0,244
96	0,344	0,209	0,493	0,192	0,784	0,427	0,408 \pm 0,200
168	1,249	0,275	0,539	0,298	0,299	0,296	0,493 \pm 0,350
336	0,100	0,120	0,137	0,120	0,035	0,022	0,089 \pm 0,044
504	0,100	0,100	0,058	0,110	0,275	0,051	0,116 \pm 0,075
672	0,100	0,100	0,177	0,100	0,138	0,039	0,109 \pm 0,042

As médias dos valores de concentrações de SULF encontrados individualmente em cada animal estão demonstrados na Tabela 24.

Tabela 24. Concentração de Fipronil-sulfona encontrada em cada animal.

Tempo (horas)	Concentração Plasmática de Sulfona ($\mu\text{g/mL}$) por animal						Média \pm dp
	1	2	3	4	5	6	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000 \pm 0,000
1	0,899	1,357	0,690	0,977	0,028	0,934	0,814 \pm 0,442
2	0,675	1,132	0,639	0,092	0,155	0,778	0,578 \pm 0,394
4	1,862	0,772	1,333	0,471	0,434	1,485	1,060 \pm 0,586
6	0,849	0,262	0,557	0,329	0,409	0,882	0,548 \pm 0,265
8	1,018	0,670	0,471	0,718	0,227	0,658	0,627 \pm 0,264
24	1,002	0,449	0,971	0,572	0,028	0,398	0,570 \pm 0,370
48	1,089	0,493	0,286	0,695	0,028	0,388	0,496 \pm 0,365
72	1,043	0,495	0,330	0,856	0,202	0,589	0,586 \pm 0,317
96	0,761	0,313	0,298	0,604	0,399	0,310	0,447 \pm 0,192
168	0,826	0,189	0,144	0,376	0,238	0,271	0,341 \pm 0,251
336	0,249	0,028	0,210	0,248	0,365	0,226	0,221 \pm 0,109
504	0,085	0,028	0,028	0,028	0,410	0,217	0,133 \pm 0,154
672	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028 \pm 0,000

Após o cálculo das concentrações individuais de FIP e SULF foi obtida a curva de concentração plasmática do FIP e do seu metabolito SULF e determinados os parâmetros farmacocinéticos como demonstrado na figura 21 e Tabela 25.

A Figura 21 demonstra a curva de concentração plasmática do FIP e do seu metabolito SULF a partir da administração oral em dose única de comprimidos de 20 mg de FIP em cães.

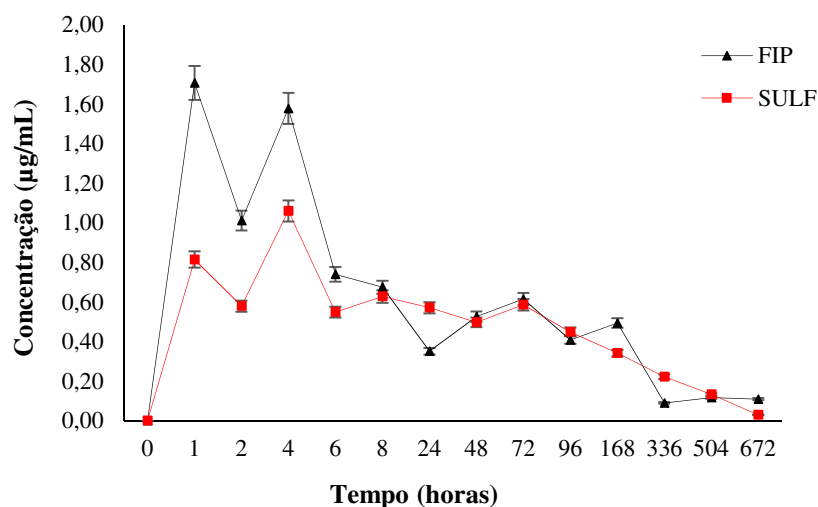


Figura 20. Curva de concentração plasmática do Fipronil e fipronil sulfona a partir de administração oral em dose única de comprimidos de fipronil em cães.

O FIP apresentou perfil farmacocinético com dois picos de C_{max}, o que provavelmente ocorreu devido ao metabolismo do fármaco. Uma vez que os fármacos administrados por via oral são absorvidos a partir do trato gastrointestinal para o sistema porta hepático alguns deles podem ser extensivamente biotransformados pelo fígado antes de alcançarem a circulação sistêmica sofrendo efeito de primeira passagem que se refere ao metabolismo que ocorre no fígado à medida que fármaco passa por esse órgão após a absorção. Esse efeito de primeira passagem, pode diminuir substancialmente a quantidade de fármaco ativo que alcança a circulação sistêmica, e desta forma, a biodisponibilidade. Além disso alguns fármacos são extensivamente metabolizados pelas enzimas do complexo citocromo P450, principalmente a CYP 3A4 (WINTER, 2012). Em mamíferos, o fipronil é biotransformado através de três principais vias de metabolização, a fipronil sulfona por oxidação na fração sulfinilo, a sulfeto de fipronil por redução na porção sulfinilo e a fipronil amida por hidrólise da porção ciano. O fipronil sulfona, também atua no receptor GABA e é o principal metabólito ativo do fipronil, apresentando toxicidade similar ao composto de origem em mamíferos (WANG et al., 2016).

O FIP assim como SULF apresentaram uma eliminação lenta sendo possível sua detecção até 28 dias após administração (672 horas).

Os parâmetros farmacocinéticos encontrados com a utilização do macro PK solver utilizando o modelo matemático não compartimentado de administração extravascular estão demonstrados na Tabela 25.

Tabela 25. Parâmetros Farmacocinéticos

Parâmetros Farmacocinéticos	Fipronil	Sulfona
C _{max} (µg/mL)	2,171 ± 0,84	1,32 ± 0,55
T _{max} (h)	2,67 ± 1,37	3,50 ± 1,23
AUC (µg/mL*h)	167,77 ± 43,88	203,67 ± 65,90
t _{1/2} (h)	385,93 ± 405,31	126,83 ± 36,26

No estudo de farmacocinética descritiva foi possível observar uma rápida absorção dos comprimidos de fipronil de liberação imediata de 20 mg, uma vez que os valores de C_{max} foram 2,0 e 1,3 µg/mL e t_{max} de 2 e 3 horas, para fipronil e fipronil sulfona respectivamente.

A ação sistêmica do fipronil já foi demonstrada em estudos anteriores realizados por este grupo de pesquisa. Em um estudo realizado por via subcutânea em bovinos, Cid et al., (2016) observaram que a injeção subcutânea de fipronil na dose de 1 mg/kg em bovinos forneceu eficácia contra carrapato *Rhipicephalus microplus* acima de 80%. O fipronil atingiu a circulação sistêmica obtendo uma concentração máxima (C_{max}) de 378,06 ng/mL, e foi rapidamente absorvido (t_{max}= 10 horas) e eliminado de forma lenta (t_{1/2}= 12 dias) mantendo níveis plasmáticos quantificáveis no sangue por até 21 dias. Magalhães (2016) demonstrou que o fipronil quando administrado pela via subcutânea em bovinos na dose de 2mg/kg de peso corporal atingiu a concentração máxima em aproximadamente 17 dias (C_{max} de 683 ng/mL) enquanto o metabólito fipronil sulfona levou 18 dias (C_{max} de 242 ng/mL) e obteve tempo de meia vida (t_{1/2}) de 36 horas para fipronil e 422 horas para fipronil sulfona respectivamente. E nessa dose demonstrou ação inseticida capaz de inibir o desenvolvimento de larva a adulto de *Haematobia irritans* e eficácia bernicida que se pronunciou após 14 dias do tratamento.

Apesar de ser uma via de administração diferente o FIP apresenta perfil farmacocinético semelhante as formulações subcutâneas desenvolvidas nos estudos anteriores, como rápida absorção e metabolização e lenta eliminação, o que possivelmente pode estar relacionado a sua característica lipofílica.

Os teste bioanalíticos desenvolvidos por CID et al., (2012) e MAGALHÃES (2016) foram desenvolvidos para avaliação de FIP no plasma bovino, essas metodologias foram validadas para plasma canino. O método bioanalítico se mostrou adequado para a aplicação nos estudos de farmacocinética, com valores de LQ (Limite de Quantificação) 0,1 µg/mL para FIP e SULF, que permitiram a quantificação de ambos no plasma até atingir a AUC_{0-t} (área sob a curva do tempo zero até o último dia de estudo) superior a 80 % da AUC_{0-∞} (área sob a curva de tempo zero até o infinito). As AUC_{0-t} do FIP e SULF correspondem a 82% e 96% respectivamente a AUC_{0-∞}. De acordo com a legislação vigente no Brasil a AUC_{0-t} deve ser igual ou superior a 80% da AUC_{0-∞}, para ideal estabelecimento dos parâmetros farmacocinéticos.

4.9.2 Eficácia de fipronil oral no controle de *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus* em cães

Na dose de 2 mg/kg por via oral a extensão de absorção do fipronil gera uma área sob a curva de (AUC) de 168 µg/mL.h (Tabela 26) que apresentou eficácia pulicida de 80% por até 15 dias, no entanto não apresentou eficácia carrapaticida, conforme apresentado na tabela 27.

Tabela 26. Eficácia de fipronil oral no controle de *Ctenocephalides felis felis* e *Rhipicephalus sanguineus* em Cães.

Grupo/Nº animais	Nº de pulgas vivas após o tratamento			Nº de carrapatos vivos após o tratamento		
	Dia +2	Dia + 7	Dia + 14	Dia +2	Dia + 7	Dia + 14
Controle						
Média	15,17	57,50	71,83	19,67	10,50	14,83
Tratado						
1	1	17	11	13	23	26
2	2	21	19	17	39	5
3	2	10	22	16	17	38
4	1	4	12	31	3	18
5	2	1	11	38	19	7
6	1	6	10	20	5	6
Total	9	59	85	135	106	100
Média	1,5	9,83	14,17	22,5	17,67	16,67
Eficácia %	90,1	82,89	80,27	0	0	0

Melo et al., (2012) empregou o fipronil por via oral em cápsulas de gelatina nas doses de 2, 4 e 6 mg/kg por peso corporal em cães, onde a formulação de 6mg/kg foi eficaz no controle de *Ctenocephalides felis felis* em cães por até 14 dias. Após a administração oral comprimido de FIP de 20 mg foi possível observar que nessa dose, o FIP e a SULF apresenta uma AUC de $167,77 \pm 43,88$ e $203,67 \pm 65,90$ µg/mL*h, respectivamente, apresentando eficácia pulicida de 80% nos 14 primeiros dias de estudo, corroborando com os dados de Melo et., al (2012), que também obteve 80 % de eficácia pulicida em até 14 dias de estudos. Baseados nesses resultados acredita-se que o fipronil provavelmente é um fármaco de Classe Biofarmacêutica II, ou seja apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade apresentando assim problemas de biodisponibilidade.

Na figura 21 está demonstrada a relação correlação farmacocinética-farmacodinâmica dos comprimidos de FIP.

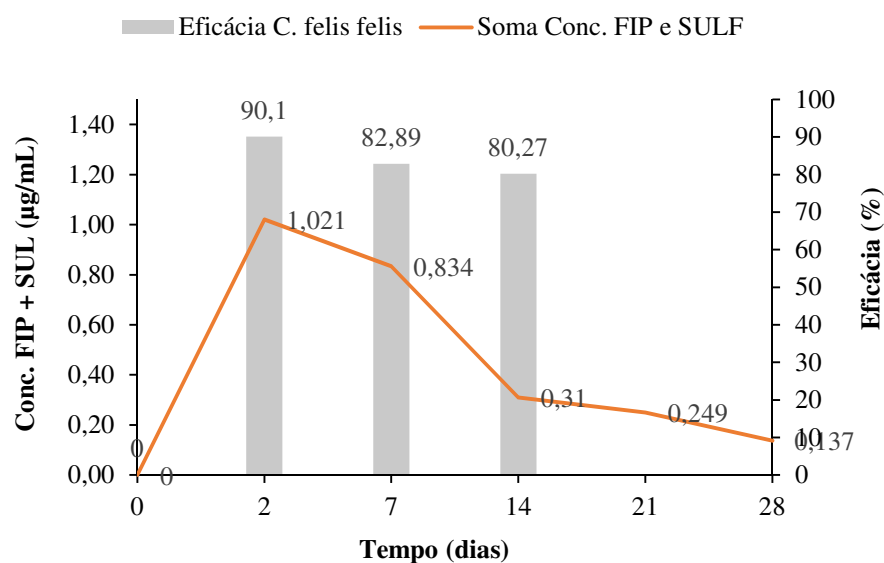


Figura 21. Correlação farmacocinética-farmacodinâmica dos comprimidos de fipronil

A maior eficácia foi observada no dia +2 de estudo, onde a concentração de FIP e SULF, assim como o seu somatório, estavam superior em relação aos outros dias analisados. Em +14 dias de estudo a eficácia atinge 80% e o estudo foi interrompido.

Correlacionando os estudos de farmacocinética e farmacodinâmica observamos que o maior resultado de eficácia pulicida (90,1%) ocorre no dia +2 de estudo, quando a concentração de FIP e SULF são de 0,525 e 0,500 µg/mL, respectivamente, ou com um somatório aproximado de 1,000 µg/mL. Em +7 dias de estudo observou-se um declínio na eficácia pulicida (82,89%), concomitante com decaimento nas concentrações individuais de FIP (0,493 µg/mL) e SULF (0,341 µg/mL) e conseqüentemente no somatório (0,834 µg/mL). Abaixo da concentração aproximada de 0,100 µg/mL de FIP e 0,200 µg/mL de SULF ou um somatório de 0,300 µg/mL, a eficácia pulicida fica abaixo de 80%. Para eficácia carrapaticida esses valores teriam que ser ainda maiores, pois nesses valores de concentração plasmática não foi observado.

O aumento da terapêutica veterinária tem levado o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas veterinárias. O desenvolvimento de um medicamento requer formulações que agreguem melhoria na eficácia terapêutica, custo adequado e facilidade na administração. O FIP é um pesticida da família dos fenilpirazóis, utilizado na medicina veterinária como antiparasitário de uso tópico para cães e gatos. Os produtos de uso tópico quando não usados seguramente podem trazer danos para o animal, para o proprietário e para o meio ambiente. As formas farmacêuticas de uso oral além de possuírem baixo custo, apresentam facilidade durante o tratamento do animal, pelo proprietário, além de garantirem uma dose na administração.

As análises de caracterização química são fundamentais durante o desenvolvimento de comprimidos, tanto para avaliar o controle de qualidade como para avaliar a performance das formulações, garantindo a eficiência terapêutica. Para realizar essas análises são necessários métodos que apresentem resultados confiáveis. No entanto existe uma carência de monografias oficiais na Farmacopéia Brasileira para medicamentos veterinários. A metodologia desenvolvida por CID et al. (2012), através CLAE-UV para determinação de FIP foi aplicável para as análises de teor, uniformidade de conteúdo e estudo de dissolução *in vitro*.

A Classificação Biofarmacêutica de fármaco correlaciona a dissolução *in vitro* com a biodisponibilidade *in vivo*. A dissolução do fármaco e a permeabilidade gastrointestinal são os principais parâmetros que controlam a taxa de absorção de fármacos e são responsáveis pela Classificação Biofarmacêutica (PAPICH, et al. 2015).

O FIP não possui Classificação Biofarmacêutica elucidada. Segundo a FAO (2009) solubilidade do FIP em água é de 1,61 mg/L e o logaritmo de coeficiente de partição (logP) é 3,62, sendo possível prever sua Classificação Biofarmacêutica, através da sua solubilidade e permeabilidade.

De acordo com Apley et al., (2015), para determinar a solubilidade do fármaco deve-se calcular os valores de DO (número da dose), que corresponde a razão entre a solubilidade do fármaco e a dose em 250 mL de água. O valor de DO encontrado para o FIP foi de 0,02. Para o fármaco apresentar alta solubilidade este deve apresentar valores de DO maiores que 1,0 e para apresentar alta permeabilidade valores log P maiores que 1,72. A partir do valores de log P e do valor de DO encontrado para o FIP nessa formulação podemos prever que o FIP possui baixa solubilidade e alta permeabilidade e possivelmente sua Classificação Biofarmacêutica é classe II, e devido a isso, a sua biodisponibilidade é controlada pela taxa de dissolução do ativo.

Segundo Khan (2017), fármacos de Classificação Biofarmacêutica II, exibem solubilidade dependente de pH, sendo altamente solúveis em pH mais baixos (1-3), e podem precipitar em pH maiores que 6,8 inibindo assim sua liberação, o que também foi observado para o FIP, no estudo de dissolução *in vitro*.

O uso sistêmico do fipronil para o controle de ectoparasitos poderia minimizar tanto a exposição do tutor ao medicamento como a contaminação ao meio ambiente.

Muitos ativos farmacêuticos exibem baixa biodisponibilidade devido a sua baixa solubilidade aquosa e/ou a baixa permeabilidade. Algumas estratégias empregadas na tecnologia farmacêutica são capazes de aumentar a biodisponibilidade desses ativos (SONG et al., 2016)

As formas farmacêuticas para administração oral de fármacos são as mais utilizadas pela conveniência que proporcionam, constituindo uma via de administração não invasiva, além de possuírem baixo custo essas formas farmacêuticas podem ser uma alternativa mais segura para o tutor e para o meio ambiente.

Os resíduos de FIP liberados no esgoto durante o enxague no banho de cães tanto em ambiente doméstico quanto em estabelecimentos profissionais é uma potencial fonte de contaminação nas bacia hidrográficas. Estudos demonstraram que o tratamento convencional das águas residuais de esgoto tem pouco efeito sobre a liberação de fipronil (SADARIA, et al., 2017; TEERLINK, et al., 2017).

A segurança do tutor e do meio ambiente garantida pelas formas farmacêuticas de administração oral entram em detrimento com segurança do animal, no entanto a formulação desenvolvida apresenta valores de toxicidade muito inferiores daqueles descritos na literatura. Holmes et al. 1999 destacou que a toxicidade oral crônica do FIP em Beagles é de 10 mg/kg/dia por um período de 13 semanas, e a toxicidade aguda em ratos em uma dose única oral foi acima de 25 mg/kg, estando esses valores bem abaixo da concentração da formulação desenvolvida.

CONCLUSÃO

Foi possível desenvolver comprimidos de liberação imediata de fipronil através de compressão por via úmida, assegurando todos os ensaios de controle de qualidade dentro das especificações exigidas dos métodos gerais da Farmacopeia Brasileira 5ª edição, para comprimidos não revestidos.

À partir dos ensaios de controle de qualidade realizados foi possível determinar a influência dos adjuvantes farmacotécnicos no desenvolvimento de comprimidos, e portanto, auxiliarem na escolha da melhor formulação. A formulação escolhida foi a desenvolvida utilizando lactose como diluente farmacêutico e talco e estearato de magnésio como deslizantes e lubrificante, respectivamente.

Foi possível aplicar as metodologias analíticas e bioanalíticas para quantificação de Fipronil mostrou nos ensaios químicos assim como na farmacocinética.

O ensaio de dissolução demonstrou que os comprimidos de lactose obtidos apresentam perfil característico de liberação imediata. Pelo fato de cerca de 80% do Fipronil estar liberado após trinta minutos de teste.

O estudo de farmacocinética demonstrou que o FIP administrado pela via oral sob a forma de comprimidos possui uma rápida absorção e metabolização e uma eliminação lenta.

Os comprimidos desenvolvidos na dose de 2mg/kg apresentaram eficácia pulicida nos primeiros 15 dias de estudo, no entanto não apresentaram eficácia carrapaticida.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABINPET. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (2014). Disponível em <http://abinpet.org.br/site/>. Acesso em: 28/08/2017
- AGUIAR, G., FARIA, L. G., FERRAZ, H. G., SERRA, C. H. R., PORTA, V. Avaliação biofarmacotécnica *in vitro* de formas farmacêuticas sólidas contendo doxiciclina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 4, p. 451–458, 2005.
- AHMED, R. PAUL, S. K., HOSSAIN, M. A., AHMED, S., MAHMUD, M. C., NASREEN, S. A., FERDOUSE, F., SHARMI, R. H., AHAMED, F., GHOSH, S., URUSHIBARA, N., AUNG, M. S., KOBAYASH, N. Molecular Detection of Rickettsia felis in Humans, Cats, and Cat Fleas in Bangladesh, 2013–2014. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 5, p. 356–358, 2016.
- ALVES, F.M. et al. Heat-stressed Metarhizium anisopliae: viability (*in vitro*) and virulence (*in vivo*) assessments against the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitol Research**, p.116:111–121. 2017
- AMARAL, P. A., FEDERICI, M.R., SANT'ANNA, J. L. U. C. **Análise de excipientes utilizados em cápsulas preparadas em farmácias magistrais**. v. 19, 2016.
- AMIDON, G.L. LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. - A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 413-420, 1995
- APLEY, M.; CRIST, M.A.G.; GONZALEZ, ROBERT, P.H.; MARLIN, N.M.; SANJA, M.; MARK, G.P.; ALAN, F.P.;JIM, E. R.; MARGARETH. R. C. M. Solubility Criteria for Veterinary Drugs. **Stimuli to the reversion process**. 2013.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêutica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BAUER, E. C. et al. **Protecting Your Cats and Dogs from Pesticide Poisoning**. 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
- 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.
- BORDIN, D. C. M., MONEDEIRO, F. F. S. S., CAMPOS, E. G., ALVES, M. N. R., BUENO, L. H. P., MARTINIS, B. S. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 125–143, 2015.
- BORIN, S.; CRIVELENTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.
- BOURGOGNE, E.; GRIVET, C.; VAREGIO, E.; HOPFGARTNER, G. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Generic on-line solid phase extraction sample preparation strategies for the analysis of drugs in biological matrices by LC – MS / MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 102, p. 290–298, 2015

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2010a

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica 003/2013. Dispõe sobre a avaliação da solubilidade de fármacos e o desenvolvimento de métodos de dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U.** Agosto 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U.** 22 de maio de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC Nº. 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U.** Agosto 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Lei 12.689 de 19 de Julho de 2012. Estabelece o medicamento genérico de uso veterinário; dispõe sobre o registro, a aquisição pelo poder público, a prescrição, a fabricação, o regime econômico-fiscal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U.** Julho de 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução –RDC 1.170 de 19 de Abril de 2006. Guia para Provas de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência de Medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U.** Abril de 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria 48 de 12 de Maio de 1997. Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U.** Maio de 1997.

BUENO, N.G., PEREIRA, A. V. Determinação espectrofotométrica de metildopa em ensaio de dissolução de comprimidos utilizando extrato de rabanete como fonte de peroxidase. **Quim. Nova.** v. 38, n. 8, p. 1107–1111, 2015.

CAPANEMA, L. X. DE L.; VELASCO, L. O. M.; SOUZA, J. O. B.; NOGUTI, M. B Panorama da indústria farmacêutica veterinária. **BNDES Setorial**, v.25, p. 57–174, 2007.

CARDOSO, S. G., BAJERSKI, L., MALESUIK, M. D., DORFEY, B. Desenvolvimento de método de dissolução e estudo comparativo de formas farmacêuticas sólidas contendo cetirizina. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 108–114, 2007.

CARVALHO, S.M.R., AMORIM, W.R., SÁ, M.V., OLIVEIRA, I.S., SÁ, I.S., GALENO, L.S., OLIVEIRA, R.P., BENVENUTTI, M.E.M., FARIAS, M.P.O., JÚNIOR, A. A. N. M. Pesquisa de Babesia spp . e Ehrlichia spp . em cães assintomáticos, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Piauí Search for Babesia spp . and Ehrlichia spp . in asymptomatic dogs, **Veterinary Hospital of the Federal**. p. 1–8, 2018.

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

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

CURY, B. S. F. et al. Influência das propriedades de granulados de lactose nas características físicas dos comprimidos. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 85–92, 2007.

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

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.

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. **J. Environ. Sci. Health B** 47, 913–924. 2012.

EMA- European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. **Guideline for the Testing and Evaluation of the Efficacy of Antiparasitic Substances for the Treatment and Prevention of Tick and Flea Infestation in Dogs and Cats**. 2007

FAO. Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides. 2009

FERNANDES, T. R. P. **Desenvolvimento farmacotécnico e validação de metodologia analítica para comprimidos revestidos à base de diclofenaco de potássio**. p. 74, 2003.

FERNANDES, M.J.M.; LANDIM, A.B.; PIMENTEL, V.P.; GOMES, R.P.; PIERONI, J.P. A Evolução recente da indústria farmacêutica veterinária brasileira. Informe Setorial. BNDS. 2013.

FERREIRA, O A. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. vol. 1 4ed. São Paulo: Pharmacobooks, 2010.

FRAGA, P. V., FREITAS, G. **Excipientes comumente utilizados em cápsulas e novas perspectivas excipients commonly used in capsules and new perspectives**. v. 46, p. 46–50, 2015.

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

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

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde. 2015.

JARDIM, Isabel Cristina Sales Fonte. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, 2(1), p. 13–25, 2010

KAMALAKKANNAN, V., PURATCHIKODY, A., RAMANATHAN, L., JAYAPRABA, S. Development and validation of a dissolution test with reversed-phase high performance liquid chromatographic analysis for Candesartan cilexetil in tablet dosage forms. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S867–S873, 2016.

KHAN, A. Development and validation of a discriminatory dissolution testing method for orally disintegrating tablets (ODTs) of domperidone. **Dissolution Technologies**, v. 24, n. 2, p. 28–36, 2017.

- KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 48–49, 1975
- KUSHNER, J. I. V., LANGDONE, B. A., HICKS, I., SONG, D., LI, F., KATHIRIA, L., KANE, A., RANADE, G., AGARWAL, K. A quality-by-design study for an immediate-release tablet platform: Examining the relative impact of active pharmaceutical ingredient properties, processing methods, and excipient variability on drug product quality attributes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 2, p. 527–538, 2014.
- LACHMAN, H. A.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. v.2. Lisboa: Calouste Gulbekian, 2001.
- 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** v. 21, p. 345–354, 2012.
- MAGALHÃES, V. S. et al. Evaluation of pharmacokinetics and efficacy of ivermectin following oral administration in dogs against experimental infection of *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 167–171, 2016
- MAGALHÃES, V. S. Fipronil injetável para bovinos: **Farmacocinética e Eficácia no Controle de *Haematobia irritans* e *Dermatobia hominis***. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária. 2016.
- MARIA AMÉLIA S. DEFÁVERI, LUCIANE VIRNE LAPORTA, MARCOS ROBERTO DOS SANTOS, ET AL. Avaliação da qualidade das cápsulas de cloridrato de sibutramina manipuladas em farmácias. **Ciências da Saúde**, v. 13, n. 104, p. 71–83, 2012.
- MARSHALL, K. Compressão e consolidação de sólidos em pó. In: Lachman L, Lieberman H, Kanig JL. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. v.1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. p.121-4
- MATIAS, R., RIBEIRO, P. R. S., SARRAGUÇA, M. C., LOPES, J. A. A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests. **Analytical Methods**, v. 6, n. 9, p. 3065, 2014.
- MCMAHEN, R. L. et al. 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.
- MELO, R. M.; VIEIRA, V. P. D. C.; TAVARES, P. V.; BATISTA, L. C.; 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**, V.34, supl. 1, p.15-20, 2012.
- NABAIS, I.; VEIGA, F.; FIGUEIRAS, A. **Evolution Therapy of Modified Release Systems for Oral Administration**. v. 4, p. 101–133, 2016.
- NIAZI S.K. Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations - **Guidance on Formulating Compressed Solids**. Vol.1, CRC Press LLC, 2004.
- ORDONES, D.S., CAMARGO, R.L., TESCAROLLO, I. L. Aspectos relevantes na determinação da uniformidade de doses unitárias de comprimidos de captopril. p. 1–69, 2012.
- PARPINELLI, N., SOUZA, I. M. M., GREGORIO, M. C. **Ocorrência de *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp. em cães no estado do Paraná** – revisão de literatura. p. 86–93, 2017.

- PASCHOAL, J. A. R., RATH, S. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.
- PETERLE, J. P., BUENO, F. **Estudo analítico e comparativo de comprimidos contendo citrato de sildenafila adquiridos no mercado formal e informal**. p. 226–233, 2016.
- PETERSEN, Nickolaj Jacob; RASMUSSEN, Knut Einar; PEDERSEN-BJERGAARD, Stig; GJELSTAD, Astrid. Electromembrane Extraction from Biological Fluids. **Analytical Sciences**, 27(10), p. 965, 2011
- POSSATO, J. C., ZALDGUER, E. O., SCUSSEL, R., AVILA, A. M., AGNES, E. J. **Artigo Original Tecnologias em Saúde Artigo Original Tecnologias em Saúde**. v. 5, p. 185–197, 2016.
- PRISTA, L.N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**, 5ed. V.1.Lisboa:Fundação Calouste Gulbekian, 1995. p.199-478
- RAFAEL, K., FARIA, M. G. I. **Controle de qualidade dos comprimidos de captopril : uma breve revisão literária**. v. 16, p. 49–53, 2013.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Revista Química Nova**, Campinas, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- ROBLES, L. V. Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos; **Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas**, v. 42, n. 1, p. 18–36, 2011.
- ROMERO, A. et al. Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. **Toxicology Letters**, v. 252, p. 42–49, 2016
- SADARIA, A. M. et al. 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, jun. 2017
- SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5ª Edição, Editora McGraw-Hill. São Paulo, SP.2004
- SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C. SHAH, V. FIP/AAP guidelines for dissolution in vitro release testing novel/special dosage forms. **Dissolution Technology**, v. 10. 2003
- SILVA, A. R. **Desenvolvimento de novas metodologias analíticas para monitorização de PPCPs em matrizes reais. 2010. 290f.** Tese (Doutorado em Química) – Faculdade Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa.
- SINDAN. Sindicato Nacional da Industria de Produtos para Saúde Animal. **Mercado Veterinário por Espécie Animal e Classe Terapêuticas – 2009**. Acesso<15 de janeiro de 2018.
- SOARES, A. O., SOUZA, A. D., FELICIANO, E. A., RODRIGUES, A. F. S. F., D’AGOSTO, M., D. **Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG.** 2006.
- SONG, Y. et al. Key Considerations in Designing Oral Drug Delivery Systems for Dogs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2016.
- SOUZA, A.P. et al. Avaliação da eficácia do fipronil em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em tratamentos consecutivos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66, n.1, p.55-60, 2014.
- SOUZA, F. C., MARQUES, E. B., SCARAMELLO, C. B. V. **Variações interindividuais na**

farmacocinética clínica de cardiotônicos. p. 213–220, 2013.

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

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.

TEERLINK, J.; HERNANDEZ, J.; BUDD, 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

TOLLER, A. B.; SCHMIDT, C. A. Excipientes À Base De Celulose E Lactose. **Disciplinarum Scientia**, v. 6, n. 1, p. 61–80, 2005.

TOZER, T. M.; ROWLAND, M. Introdução a farmacocinética e farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica. Porto Alegre: Artmed, 2009. 336 p.

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

USP 36- NF 31, Unites State Pharmacopea, 2013

VACCARI, A. M. H., ALMEIDA, F. A. A importância da visita de animais de estimação na recuperação de crianças hospitalizadas. **Einstein**, v. 5, n. 2, p. 111–116, 2007.

VIEIRA, C.F.; PINHEIRO, A.V. **Formulário Veterinário Farmacêutico.** São Paulo: Pharmacobooks, 2004, p403.

VILLANOVA, J. C. O., GUEDES, R. A., SEVERI, J. A. Desafios farmacêuticos no desenvolvimento de produtos veterinários. **Tópicos especiais em ciência animal III.** Editora: CAUFES, 1ª Edição, 2014.

WANG, X. et al. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. **Crit Rev Toxicol.**, v. 19, n. September, p. 1–24, 2016.

WINTER, E. M. **Farmacocinética Clínica Básica.** São Paulo: Pharmabooks, 4ª Edição,. 2012, p522.