

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

TESE DE DOUTORADO
ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ACARICIDA DE
Calea serrata* (ASTERACEAE) EM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus
E DA SUA TOXICIDADE EM ROEDORES

Vera Lucia Sardá Ribeiro

Orientadora: **Prof^a Dr^a Ionara Rodrigues Siqueira**

Porto Alegre, RS, Brasil

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

TESE DE DOUTORADO
ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ACARICIDA DE
Calea serrata* (ASTERACEAE) EM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus
E DA SUA TOXICIDADE EM ROEDORES

Vera Lucia Sardá Ribeiro

Orientadora: **Profª Drª Ionara Rodrigues Siqueira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Bioquímica.

Porto Alegre, RS, Brasil

2012

CIP - Catalogação na Publicação

SARDÁ RIBEIRO, VERA LUCIA

Estudo do mecanismo de ação da atividade acaricida de *Calea serrata* (Asteraceae) em *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* e da sua toxicidade em roedores / VERA LUCIA SARDÁ RIBEIRO. -- 2012. 101 f.

Orientadora: IONARA RODRIGUES SIQUEIRA.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. PLANTAS MEDICINAIS. 2. MECANISMO DE AÇÃO DE *Calea serrata*. 3. CARRAPATO *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. 4. TOXICIDADE EM ROEDORES. I. RODRIGUES SIQUEIRA, IONARA, orient. II. Título.

Epígrafe

*“Ando devagar porque já tive pressa,
 E levo esse sorriso, porque já chorei demais.
 Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe,
 Só levo a certeza de que muito pouco sei ou nada sei.
 Conhecer as manhas e as manhãs,
 O sabor das massas e das maçãs.
 É preciso amor para poder pulsar,
 É preciso paz para poder sorrir,
 É preciso a chuva para poder florir”.*

*“Penso que cumprir a vida, seja simplesmente
 Compreender a marcha, ir tocando em frente,
 Como um velho boiadeiro, levando a boiada
 Eu vou tocando os dias pela longa estrada, eu vou,
 Estrada eu sou”.*

*“Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,
 Um dia a gente chega, no outro vai embora,
 Cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si
 Carrega o dom de ser capaz, e ser feliz”.*

(Almir Sater)

*“De tudo, ficaram três coisas:
 A certeza de que estamos sempre começando.
 A certeza de que precisamos continuar.
 A certeza de que seremos
 interrompidos antes de terminar.
 Portanto devemos:
 Fazer da interrupção um caminho novo.
 Da queda um passo de dança.
 Do medo, uma escada.
 Do sonho, uma ponte.
 Da procura, um encontro.”*

(Fernando Sabino)

*"Quando alguém encontra seu caminho, precisa ter coragem suficiente para dar
 passos errados. As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas que Deus
 utiliza para mostrar a estrada."*

(Paulo Coelho)

Dedicatória

*Aos meus pais, **Luiz Emílio e Wanda**, cuja saudade é imensa e sentida todos os dias, é a vocês que dedico primeiramente este trabalho com muito carinho, pelo amor incondicional e maravilhoso que me ofertaram, além dos ensinamentos tão importantes que até hoje norteiam a minha vida.*

*Ao meu marido **Irineu** e ao meu filho **Thiago**, companheiros nessa jornada...*

*Aos professores da antiga disciplina Doenças Parasitárias, nossos mestres: Professores **Carlos Marcos Barcellos de Oliveira, João Carlos Gonzales, Nilton Rogério Santos da Silva e Raul Henrique Kessler** e in memoriam: Professores **Pedro Cabral Gonçalves, Roberto Mariano Gloss e Viviane Cecília Gutierrez** que com competência ressaltaram a importância dos parasitos, me direcionando para o mundo destes e aos quais, eu tenho a maior gratidão!!!*

*Aos colegas e ex-colegas da FAVET/UFRGS (**professores e funcionários**), companheiros de trabalho e da vida acadêmica...*

*Aos **alunos e ex-alunos** da **Faculdade de Veterinária /UFRGS**, nossos compromissos maiores na vida acadêmica, um dos motivos porque se estuda!!!*

***Aos animais**, nossos inspiradores, pois eles merecem ter saúde e bem-estar!!!*

***As plantas**, nossa admiração e respeito, pois mesmo na luta pela sobrevivência, ainda oferecem alimentos, perfume, beleza e muitos compostos químicos para controlar os males físicos e os da alma.!!!*

Agradecimentos

A Deus, nossa Matriz Espiritual, que tudo dirige e determina, guiando o nosso caminho e dando forças para encontrar a melhor estrada a perseguir ...

À minha família, como um todo, de onde conservo parte do DNA da “obstinação” para não me resignar e ir à luta, mesmo com todos os obstáculos “internos” que eu precisei transpor para ter a paz de espírito e a satisfação que eu sinto hoje!

*Em especial aos meus pais, **Luiz Emílio e Wanda**, os quais sempre me mostraram a importância do estudo para o nosso crescimento intelectual e espiritual, mas principalmente a minha mãe, espírito de luz, que até o último momento de sua vida sempre esteve preocupada comigo, me dando sempre o estímulo para seguir em frente. Mesmo no leito de morte, quando ela me disse para não chorar ao seu desencarne e continuar perseguindo a concretização dos meus sonhos!!! Eu sei que mesmo em outras esferas, eles continuam torcendo por mim...*

*Ao meu marido **Irineu**, pelo amor, pelo apoio e pela compreensão demonstrada para que eu sobrevivesse ao mundo bioquímico, tão instigante e apaixonante, mas ao mesmo tempo difícil para uma parasitologista “as antigas”, ainda que reclamasse muitas vezes por eu estar quase que morando na FAVET/ UFRGS.*

*Ao meu filho **Thiago**, que mesmo não compreendendo minhas lágrimas e minhas ausências, foi o maior estímulo para continuar na luta!!!*

*Aos meus anjos “terrestres”: Professores **Ionara, Gilsane e Carlos Alberto**...*

*Agradeço eternamente à **Professora Dr^a Ionara Rodrigues Siqueira**, pela confiança ao permitir que eu fizesse parte do grupo do Laboratório de Neuropsicofarmacologia e aceitar me orientar no doutorado. Nossa convivência, por vezes não foi muito fácil, devido a minha pressa para vencer esta etapa e por querer abraçar o mundo, mas para sedimentar o conhecimento é preciso tempo e paciência... Com certeza, ao me virar ao avesso, me conduziu a uma catarse que me ajudou muito na caminhada para a maturidade emocional tão necessária no mundo da pesquisa. Além disso, ela me proporcionou muitos novos conhecimentos.*

*Agradeço à **Professora Dr^a Gilsane Lino Von Poser** pela paciência em me ouvir e aconselhar, sendo a grande estimuladora a eu seguir em frente, justamente em um momento muito triste da minha vida, que precisava ser superado, mas hoje ao avaliar o motivo, penso ter acontecido porque Deus sabia a estrada que eu devia percorrer!!!*

*Um agradecimento especial ao Coordenador do PPG da Bioquímica, **Professor Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves**, o mestre “CA”, que aceitou ser meu orientador*

“fictício” no início do curso, pois sem seu apoio eu não poderia estar matriculada e ser aluna do referido PPG.

*Ao médico veterinário e pesquisador **Dr. João Ricardo Souza Martins**, o qual com tanta boa vontade me “doou” os carrapatos sensíveis para o desenvolvimento dessa pesquisa.*

*Agradeço também a cada um dos colegas do LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA (**Claudia Vanzella, Cristiano Spindler, Felipe dos Santos Moyses, Karine Bertoldi, Gisele Lovatel, Viviane Elsner, Arthiese Korb, Eduardo Farina Almeida, Gabriela Sant’Anna, Jéssica Barbosa, Carla Basso e Laura Reck**), “meninos brilhantes”, que foram essenciais neste trabalho, sempre se disponibilizando a me ajudar, com toda paciência, compartilhando seus conhecimentos, interferindo em minhas posturas ou me confortando quando eu reclamava “egoisticamente” ou chorava de tristeza pelas minhas deficiências e erros, mostrando a importância do grupo para se atingir as metas.*

*Agradeço as alunas **Jaqueline Campiol dos Santos** e **Satchie Sakamoto**, bolsistas de Iniciação Científica do LABORATÓRIO DE FARMACOGNOSIA, por dividirem seus dias comigo, pela ajuda em coletas, preparação de extratos, isolamento de componentes da planta em estudo e avaliações laboratoriais do seu potencial carrapaticida, pelos momentos de aprendizado e pela descontração ao som dos mugidos dos terneiros da Faculdade de Veterinária.*

*Aos **professores** dos cursos do **PPG Bioquímica, PPG Farmácia, PPG Fisiologia, PPG Neurociências, PPG em Ciências Médicas, PPG Veterinária e PPG em Biologia Animal** pelos muitos ensinamentos e atualizações que me proporcionaram.*

*A funcionária e bióloga **Bel. MS. Jacqueline Reis Torres** por toda ajuda prestada ao longo do Curso, em que eu vivia me deslocando para o Campus Centro, Campus da Saúde e Campus do Vale/ UFRGS e ela firme na retaguarda do Laboratório de Acarologia e Entomologia da Faculdade de Veterinária.*

*Aos colegas que me auxiliaram e me confortaram em um dos momentos mais tristes da minha vida, **Enéder Oberst, Jane Rubensam, Clóvis Ourique, Maria Inês Mascarenhas Jobim e Rodrigo Costa Mattos!!!** E os que não se manifestaram, mas que me ajudaram psicologicamente a seguir em frente, mostrando a mim que eu sou dura na queda e que os meus dias na terra jamais serão em vão!!! Acredito nos meus sonhos...*

*Aos **Departamentos de Farmacologia do ICBS** (Laboratório de Neuropsicofarmacologia) e de **Matéria Prima da Faculdade de Farmácia** (Laboratório de Farmacognosia, onde vivenciei muito conhecimento e muita parceria.*

*A **UFRGS**, a **FAVET** e ao **PPG-BIOQUÍMICA**, pela imensa satisfação em fazer parte!!!*

“MUITO OBRIGADA”!!!

*“Nas plantas
não há só um
princípio ativo, temos
um fitocomplexo
e o efeito farmacológico
da planta é
conseqüência disto.”*



ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Generalidades	1
1.2 O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	4
1.2.1 Importância	4
1.2.2 Ciclo de Vida de <i>R. microplus</i>	5
1.2.2.1 Fase Parasitária	7
1.2.2.2 Fase de Vida Livre	9
1.2.3 Controle de <i>R. microplus</i>	9
1.2.3.1 Histórico do uso de inseticidas/ acaricidas sintéticos	9
1.2.3.2 Carrapaticidas sintéticos	11
1.3 Pesquisa de Plantas para o controle de <i>R. microplus</i>	23
1.3.1 O gênero <i>Calea</i> e seu potencial farmacológico	26
1.3.2 <i>Calea serrata</i> como carrapaticida	27
1.3.2.1 Estudos de validação de plantas medicinais como carrapaticida	29
1.4 Objetivos	30
1.4.1 Objetivo Geral	30
1.4.2 Objetivos Específicos	30
2. ARTIGOS CIENTÍFICOS	31
Capítulo 1: Artigo 1	31
Capítulo 2: Artigo 2	36
Capítulo 3: Artigo 3	42
3 DISCUSSÃO	57
3.1 Conclusões	64

3.2 Perspectivas	65
Referências	66
ANEXO 1	79

RESUMO:

O extrato *n*-hexano de *Calea serrata* demonstrou atividade acaricida contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *R. sanguineus*. A enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável por hidrolisar a acetilcolina nas sinapses colinérgicas, tem sido alvo de pesticidas e sua inibição pelos organofosforados levam à paralisia e morte de artrópodes. O uso intensivo de acaricidas / inseticidas tem provocado resistência em artrópodes, a qual pode estar relacionada com maior atividade de enzimas de detoxicação, como a glutathione-S-transferase (GST). O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade acaricida do componente isolado do extrato *n*-hexano, o precoceno II, e do óleo essencial de *C. serrata*, assim como, determinar a composição química do referido óleo. Com intuito de compreender o mecanismo de ação acaricida do extrato *n*-hexano de *C. serrata*, foi investigado o efeito deste extrato sobre a atividade *in vitro* da AChE em larvas de *R. microplus* e em estruturas cerebrais de ratos Wistar machos, bem como sobre a modulação da atividade da GST em larvas de *R. microplus*. O óleo essencial e o precoceno II, o composto isolado, mostraram atividade larvicida. O óleo essencial apresentou diferentes sesquiterpenos em sua constituição química, além de precoceno II. O extrato *n*-hexano de *C. serrata* inibiu significativamente a atividade *in vitro* da AChE em larvas de *R. microplus* e em estruturas cerebrais de ratos. O extrato *n*-hexano de *C. serrata* inibiu significativamente a atividade *in vitro* da GST. Compostos do extrato *n*-hexano de *C. serrata* podem ser potenciais inibidores de AChE e de GST, os quais podem contribuir para a sua toxicidade para os carrapatos. Considerando que o aumento da atividade da GST poderia reduzir a eficiência de carrapaticidas, é possível supor que *C. serrata* possa ser usada como um adjuvante no controle de *R. microplus*. Os resultados obtidos também suportam a possibilidade de que a inibição da acetilcolinesterase seja um possível mecanismo de ação do extrato *n*-hexano de *C. serrata*.

ABSTRACT:

It has been demonstrated that the *n*-hexane extract of *Calea serrata* had acaricidal activity against larvae of *R. microplus* and *R. sanguineus*. Acetylcholinesterase (AChE), an enzyme that hydrolyses acetylcholine at cholinergic synapses, is a target for pesticides and its inhibition by organophosphates leads to paralysis and death of arthropods. Extensive uses of acaricides/insecticides have induced resistance in arthropods, which can be related to higher activity of detoxification enzymes, such as glutathione-S-transferase (GST). The aims of the present study were to evaluate the acaricide activity of isolated constituent of *n*-hexane extract, the precocene II, and the essential oil of *C. serrata*, in addition to determine the chemical composition of essential oil. In order to understand the mechanism of the acaricidal action of *C. serrata n*-hexane extract, we investigated the effect of this extract on *in vitro* anticholinesterase activity of larvae from *R. microplus* and in brain structures of male Wistar rats, as well as, we investigated the effect of *C. serrata* on GST activity of larvae from *R. microplus*. The essential oil and the isolated compound, precocene II, showed larvicidal action. Several sesquiterpenes were detected in the essential oil of *C. serrata*. The *n*-hexane extract significantly inhibited *in vitro* acetylcholinesterase activity in *R. microplus* larvae and rat brain structures. The *n*-hexane extract of *C. serrata* inhibited significantly GST activity. Compounds of *n*-hexane extract from *C. serrata* may be potential inhibitors of AChE and GST, which may contribute to its tick toxicity. Considering that higher GST activities would reduce the efficiency of the pesticides, we can also suppose that *C. serrata* may be at least used as an adjuvant in tick control. The results support that inhibition of acetylcholinesterase is a possible mechanism of action of hexane extract at *C. serrata*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ATChI	Iodeto de acetiltiocolina
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação Animal
FAVET	Faculdade de Veterinária
GABA	Acido gama-aminobutírico
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
<i>m</i> -AChR	Receptor muscarínico da acetilcolina
<i>n</i> -AChR	Receptor nicotínico da acetilcolina
OP	Organofosforados
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de Vida de <i>R. microplus</i>	06
Figura 2.	Teleóginas de <i>R. microplus</i> presas na pele de bovino	08
Figura 3.	Esquema da reação de clivagem da acetilcolina pela acetilcolinesterase	15

No artigo 2

Figure 1.	Effect of <i>n</i> -hexane extract (1.5, 3 and 6 mg/mL) of <i>Calea serrata</i> on AChE activity reduction in the larvae of <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	39
Figure 2.	Effect of <i>n</i> -hexane extract (1.5, 3 and 6 mg/mL) of <i>Calea serrata</i> on ACh activity reduction in brain structures of rats: (A) frontal cortex, (B) striatum and (C) hippocampus.....	39

No artigo 3

Figure 1.	Effect of <i>n</i> -hexane extract (0.5; 1.0; 1.5 and 3 mg/mL) of <i>Calea serrata</i> on GST activity in the larvae of <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> after 30 min of incubation.....	56
-----------	--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação dos carrapaticidas pelo sítio de ação primário e suas bases químicas.....	12
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência dos diversos estágios e ínstares parasitários de <i>Rhipicephalus microplus</i> em bovinos.....	08
--	----

No Artigo 1

Table 1. Compounds identified in the essential oil from <i>C. serrata</i>	34
Table 2. Effect of treatments by <i>C. serrata</i> essential oil and precocene II on the larvae of <i>R. microplus</i>	34
Table 3. <i>C serrata</i> essential oil and precocene II lethal concentrations 99.9 and 50 obtained by LIT for <i>R. microplus</i>	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

A pesquisa e o desenvolvimento de novas moléculas representam o primeiro estágio no caminho da produção de acaricidas ou de outros produtos químicos. Em sua maioria, os processos de obtenção destes produtos ocorrem pela síntese de novas substâncias ou pela extração de princípios ativos de fontes naturais.

As plantas medicinais e extratos vegetais representaram, durante séculos, pelas suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, a única fonte de agentes terapêuticos tanto para o homem como para os animais, que pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular. No início do século XIX com o desenvolvimento da química orgânica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos ou produtos químicos, servindo de base para a síntese dos mesmos. Com isso, o arsenal terapêutico foi alterado significativamente, mas os componentes ativos das plantas tiveram um papel significativo para o desenvolvimento da farmacologia como ferramentas para desvendar mecanismos fisiológicos.

Nas décadas de 1950 a 1970, logo após a II Grande Guerra, ocorreu uma explosão no desenvolvimento da síntese orgânica, sendo o uso das plantas medicinais substituído pelos produtos químicos sintéticos. Mesmo assim, parte de alguns destes ainda permanecem sendo obtidos a partir de matérias primas vegetais (FREITAS, 2007).

A flora brasileira é riquíssima em exemplares que são utilizados pela população humana como plantas medicinais, mas muitas vezes sem o devido respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Segundo Farias (2003), a eficácia é dada pela comprovação, por meio de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, conduzidos dentro de padrões éticos e científicos, dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos, sendo que a segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos tanto para os animais como para o homem.

Os compostos quimicamente ativos responsáveis pela ação terapêutica são denominados “princípios ativos”, provenientes principalmente do metabolismo secundário das plantas (MARTINS et al., 2003).

O uso da fitoterapia na área das ciências veterinárias tem sido um processo em expansão, sendo que investigações sobre o uso de extratos de plantas para o controle de parasitos como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil e em outros países se intensificaram principalmente a partir do fim da década passada. Ainda que, um grande número dessas investigações tenha provado a atividade acaricida de alguns extratos de plantas no laboratório, muitos estudos são ainda necessários para permitir o seu uso nos animais, validando-os como uma estratégia de controle. Ao contrário da crença popular, o uso de plantas medicinais não é isento de risco, tendo em vista que além do princípio ativo terapêutico, a mesma planta pode conter outras substâncias tóxicas. Por outro lado, a atividade acaricida demonstrada por algumas plantas tem despertado nos cientistas um interesse em conhecer seus mecanismos de ação.

Como os componentes químicos das plantas, isolados ou interagindo um com os outros, podem determinar o potencial terapêutico ou tóxico, é importante que as pesquisas direcionadas para avaliar sua atividade biológica, integrem várias áreas do conhecimento, tais como a botânica e a química orgânica, a farmacognosia, a farmacologia, a bioquímica e a toxicologia.

Muitas espécies vegetais utilizadas na terapêutica ainda são obtidas principalmente por extrativismo, em virtude da falta de informação e de dificuldades encontradas no cultivo. Por outro lado, com a certificação da eficácia o processo de produção da planta em questão passa a ser associado à sua proteção gerando a construção de alternativas econômicas sustentáveis, as quais evidenciam a interdependência entre a natureza e a cultura. Com isso, contribui-se também com a conservação da biodiversidade.

O uso indiscriminado de acaricidas químicos têm contribuído para o aparecimento da resistência em *R. microplus* a múltiplos produtos, representando um sério problema ao seu controle. Com isso, a pesquisa envolvendo estudos com plantas é importante para que a utilização de seus extratos ou a produção de carrapaticidas, tenha a sua atividade farmacológica comprovada cientificamente e o seu uso norteado para um controle sustentável, ou seja, com menos custos, sem deixar resíduos na carne e no leite e sem causarem danos para o ambiente, devido a característica biodegradável das plantas.

Com o intuito de aprofundar estudos anteriores sobre a atividade acaricida de *Calea serrata* desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO et al., 2008), foi realizado um estudo fitoquímico do extrato *n*-hexano e do óleo essencial de *Calea serrata*, assim como a avaliação de suas atividades acaricidas

em *R. microplus*. Com a finalidade de buscar o mecanismo de ação, foi avaliado o efeito do extrato *n*-hexano sobre a atividade das enzimas acetilcolinesterase e glutathione-S-transferase. Com o sentido de ordenar os assuntos abordados, este trabalho apresenta-se dividido em três partes: I (Resumo, Abstract, Lista de Abreviaturas, Introdução), II: capítulo 1 (Artigo1), capítulo 2 (Artigo 2), capítulo 3 (Artigo 3) e III (Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências).

1.2 O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

1.2.1 Importância

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) é um importante ectoparasito hematófago, que infesta endemicamente os bovinos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, causando severos prejuízos à pecuária de corte e de leite. Estes prejuízos podem alcançar a cifra de dois bilhões de dólares anuais no Brasil (GRISI et al., 2002). Os prejuízos decorrentes do parasitismo dos bovinos tendem a ser mais expressivos em rebanhos com predominância de raças taurinas, as quais são marcadamente mais sensíveis ao carrapato que as raças zebuínas (OLIVEIRA; ALENCAR, 1990; VERÍSSIMO et al., 2002).

Independente da raça, a infestação nos bovinos causa espoliação devido ao seu hábito alimentar, além de que, este carrapato é o único vetor de *Babesia bovis* (Babes, 1888) e *B. bigemina* (Smith; Kilborne, 1893) e um dos principais de *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) (KESSLER e SCHENK, 1998), agentes

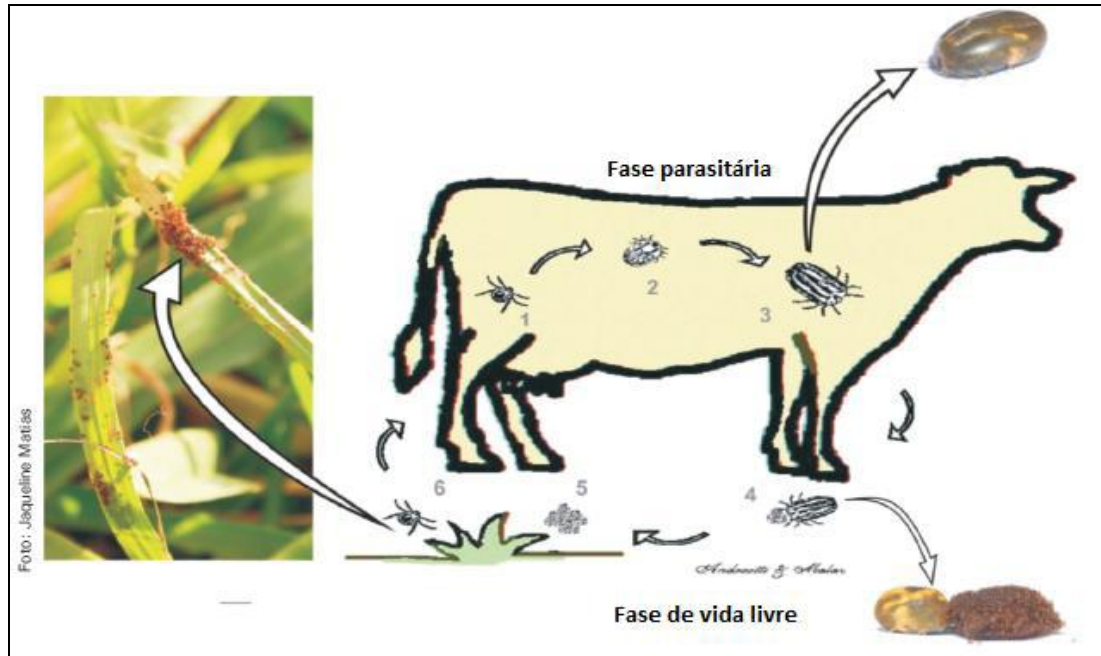
responsáveis respectivamente pela babesiose e anaplasmoze bovinas, doenças que compõem o complexo conhecido como “Tristeza Parasitária Bovina”. O impacto causado pelo parasitismo dos animais por esse carrapato é demonstrado pela redução na produção de leite, aumento da mortalidade, redução da natalidade, perda de peso, alto consumo de carrapaticidas, gastos com a compra de produtos carrapaticidas e com a mão-de-obra para aplicação dos produtos nos animais assim como a perda na qualidade do couro (CATTO, ANDREOTTI e KOLLER, 2010).

1.2.2 Ciclo de Vida de *R. microplus*

O carrapato *R. (B.) microplus* é um parasito monoxeno, isto é, desenvolve todo o seu ciclo biológico em um único hospedeiro (preferentemente os bovinos). Outras espécies animais podem servir como hospedeiros, entre os quais búfalos, jumentos, ovinos, caprinos, cães, gatos, porcos, veados, onças, preguiças, cangurus e coelhos (ARTHUR, 1960). O seu ciclo de vida pode ser subdividido em duas fases: a fase de vida livre ou não parasitária e a fase parasitária.

Conforme ilustrado na Figura 1, o ciclo de vida de *R. microplus* apresenta duas fases que compõem o seu desenvolvimento.

Figura 1 – Ciclo de Vida de *R. microplus*



Fonte: Catto, Andreotti e Koller (2010)

Fase parasitária:

- 1- Larva infestante realizando a fixação no bovino (recebe denominação de larva parasítica ao se fixar);
- 2- Ninfa;
- 3- Fêmea em estágio final de ingurgitamento (teleógina).

Fase de vida livre:

- 4- Teleógina logo após desprendimento, em período de postura no solo;
- 5- Ovos, no solo, em período de incubação;
- 6- Larva, no solo, em período de maturação.

1.2.2.1 Fase Parasitária

A fase parasitária ocorre sobre o hospedeiro, onde o carrapato realiza duas metamorfoses ou mudas. Esta fase inicia-se com a fixação da larva infestante no animal, a qual passa a ser denominada de parasítica (estágio 1, Fig.1). Inicialmente, a larva parasítica alimenta-se de linfa, seu corpo dilata-se, inicia e ocorre a primeira metamorfose e passa a ser chamada de metalarva, que após a ruptura das paredes do idiossoma libera a ninfa (estágio 2, Fig.1). Neste estágio, o parasito já começa a se alimentar de sangue. A ninfa alimenta-se, sofre outra metamorfose como metaninfa e, a partir dessa fase, sofre a diferenciação sexual, liberando os adultos. Os machos jovens são denominados neandros e ao se tornarem adultos, de gonandros. Os machos são menores que as fêmeas e percorrem o corpo do animal, alimentando-se de sangue e fecundando várias fêmeas. A fêmea jovem é denominada de neógina e quando adquire maturidade sexual de partenógina. Após a fecundação, a fêmea continua seu repasto sanguíneo ingurgitando-se totalmente ao fim do período parasitário, quando passa a ser denominada de teleógina (ao redor do 21º dia) (estágio 3, Fig.1). A teleógina cai no solo para iniciar a postura. As teleóginas chegam a ingerir de 2 a 3 mL de sangue durante sua vida parasitária e transformam cerca de 60% de sua massa corporal em ovos, que em média, chegam a 2.000-3.000 unidades. Foi descrito por Gonzales (2003) que um grama de ovos gera em torno de 20.000 larvas.

Na Tabela 1, estão listados os diversos ínstares e o período de tempo em dias em que ocorrem nos bovinos no primeiro dia, no dia em que são mais frequentes e no último dia.

Tabela 1. Ocorrência dos diversos estágios e instares parasitários de *Rhipicephalus microplus* em bovinos.

Estágio	Sexo	Instares	Dia do aparecimento no hospedeiro		
			Primeiro	Modal	Último
Larval	Assexuado	Larva	1	1	3
		Metalarva	4	4	7
Ninfal	Assexuado	Ninfa	5	8	11
		Metaninfa	9	11	16
Adultos	Machos	Neandro	12	14	15
		Gonandro	15	15	39
Adultos	Fêmeas	Neógina	13	15	20
		Partenógina	16	18	34
		Teleógina	18	21/22	35

Fonte: Gonzales et al., 1974.

Na Figura 2, estão mostradas teleóginas agrupadas à pele de bovino.

Figura 2 – Teleóginas de *R. microplus* presas à pele de bovino. Fonte: Catto, Andreotti e Koller (2010), Foto: Renato Andreotti.



1.2.2.2 Fase de Vida Livre

A fase de vida livre inicia-se quando a fêmea ingurgitada de sangue (teleógina) (estágio 4, Fig.1) desprende-se do hospedeiro e cai ao solo. Elas procuram áreas protegidas dos raios solares diretos, com temperatura e umidade favoráveis, para iniciar a postura. Já no solo, inicia-se o período de pré-postura, que dura entre dois e três dias. Ao final desse período, inicia-se o período de postura (estágio 5, Fig.1), que dura cerca de 15 dias, sendo que no quinto dia de postura é que ocorre a maior produção de ovos. Após a postura, as teleóginas morrem. A eclosão das larvas inicia-se ao redor do sétimo dia após o final do período de postura e completa-se em mais sete dias, quando as larvas tornam-se infestantes. Em condições climáticas favoráveis (umidade relativa do ar maior que 70% e temperatura de 27 °C), toda a fase de vida livre pode se realizar num período total mínimo de 32 dias, sendo este o período mais rápido em que se pode concretizar tal fase. A diminuição da temperatura e da umidade dificulta o desenvolvimento, quer seja atrasando o processo, quer seja esterilizando os ovos e provocando a morte da teleógina. No entanto, ainda que a larva possa sobreviver por mais de duzentos dias no meio ambiente, apenas nos primeiros 60 a 90 dias de vida possui força para buscar o animal e se estabelecer no seu corpo. Este fato pode e deve ser utilizado no controle do carrapato, associando-o ao manejo dos campos e dos animais (GONZALES, 2003).

1.2.3 Controle de *R. microplus*

1.2.3.1 Histórico do uso de inseticidas/ acaricidas sintéticos

Nas décadas de 1950 a 1970, logo após a II Grande Guerra, ocorreu uma explosão no desenvolvimento da síntese orgânica, inclusive de produtos com atividade acaricida. Nos anos 70, com os movimentos ecologistas surgiu uma preocupação mundial com a proteção ao meio ambiente, o que gerou um sério questionamento quanto ao uso dos organoclorados e organofosforados que, além de causarem enorme impacto ambiental, induziam resistência. Percebeu-se que a natureza possui enorme capacidade de adaptação, e num processo de seleção natural estava elegendo os *especimens* mais resistentes e, portanto, trazendo certa ineficiência aos produtos utilizados no controle populacional. No mesmo período, o lançamento do livro "*Silent Spring*" de Carson (1962) motivou uma mudança filosófica que se estendeu ao comportamento dos cientistas, que passaram a procurar entender melhor o processo de interação ácaro/ inseto- planta e ácaro/ inseto- animal. O efeito dessa nova filosofia de trabalho refletiu-se nas décadas seguintes, quando novos produtos passaram a ser planejados e sintetizados, buscando maior seletividade aos insetos/ ácaros alvo, procurando preservar os demais animais do mesmo *habitat*, incluindo predadores naturais dos insetos/ ácaros indesejados (VIEIRA, FERNANDES e ANDREI, 2003).

Até então, partia-se do pressuposto que um produto que permanecesse no ambiente por um longo período de tempo seria mais eficaz, na tentativa de afetar várias gerações do inseto/ ácaro- alvo. Com a mudança na concepção de preservação do meio ambiente, passou-se a acreditar que seria mais racional o combate direto aos insetos/ ácaros no período de maior incidência e, assim, minimizar o desenvolvimento de resistência e o impacto sobre o ambiente, inclusive sobre o ser humano. A biodegradabilidade dos produtos passou a ser um requisito

importante, até fundamental, nas novas avaliações e planejamento de produtos com características acaricidas e inseticidas (MARICONI, 1976).

1.2.3.2 Carrapaticidas sintéticos

Atualmente, os carrapaticidas usados no controle de *R. microplus* ou interagem em alvos específicos do sistema nervoso (neurotóxicos) ou no processo bioquímico de síntese de quitina (inibidores do desenvolvimento). No entanto, a maioria dos carrapaticidas disponíveis comercialmente para uso em bovinos tem atuação sobre o sistema nervoso do carrapato, como os pertencentes às classes químicas dos organofosforados (clorpirifós), piretróides (deltametrina, cipermetrina), formamidinas (amitraz), fenilpirazóis (fipronil), lactonas macrocíclicas (avermectinas: ivermectina, doramectina e milbemicinas: oxima milbemicina) e as espinosinas (espinosada), tendo como alvo canais iônicos, receptores de neurotransmissores ou enzimas (DEKEYSER, 2005). Nos carrapatos, o sistema nervoso é composto por uma massa nervosa compacta chamada de singânglio (SONENSHINE, 1991). Nos insetos, há uma variedade de transmissores e moduladores neurais, no entanto nos carrapatos alguns destes não estão com suas funções bem definidas (LEES e BOWMAN, 2007).

No Quadro 1 está descrito a classificação dos carrapaticidas de acordo ao sítio de ação primário, no qual se incluiu as bases químicas e alguns de seus princípios ativos.

Quadro 1. Classificação dos carrapaticidas pelo sítio de ação primário e suas bases químicas.

SÍTIO DE AÇÃO PRIMÁRIO	GRUPO e/ou SUBGRUPO QUÍMICO Exemplo(s) de Ingrediente(s) Ativo(s)
Inibidores de acetilcolinesterase	ORGANOFOSFORADOS (Clorpirifós) CARBAMATOS
Moduladores de canais de sódio	PIRETRÓIDES (Deltametrina, Cipermetrina) PIRETRINAS (Piretrina I, Piretrina II) CLORADOS (DDT)
Agonistas de receptores de octopamina	FORMAMIDINA (Amitraz)
Antagonistas de canais de cloro mediados pelo GABA	FENILPIRAZÓIS (Fipronil)
Ativadores de canais de cloro	LACTONAS MACROCICLICAS: AVERMECTINAS (Ivermectina, Doramectina) MILBEMICINAS (Milbemicina oxima)
Agonistas de receptores nicotínicos da acetilcolina	NICOTINÓIDES (Nicotina) NEONICOTINÓIDES (Imidacloprida)
Ativadores alostéricos de receptores nicotínicos da acetilcolina	ESPINOSINAS (Espinosade)
Inibidores do complexo da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria	ROTENÓIDES (Rotenona)
Compostos com modo de ação desconhecido	AZADIRACTINA
Inibidores da formação de quitina	BENZOILURÉIAS (Fluazuron)

Adaptado do Comitê Brasileiro de Ação a Resistência a Inseticidas

Disponível em www.irac-br.org.br

Sistema Colinérgico:

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor excitatório, sendo considerado como um dos mais importantes do sistema nervoso de insetos. Seus receptores ocorrem pelo menos de duas formas, nicotínicos (*n*-AChR) e muscarínicos (*m*-AChR) (SATTELLE, 1980; VENTER et al., 1988). As junções neuromusculares dos insetos parecem não ser colinérgicas, mas utilizam dois outros

neurotransmissores: L-glutamato (neurotransmissor excitatório) e ácido γ -aminobutírico (GABA) (neurotransmissor inibitório) (LEES e BOWMAN, 2007).

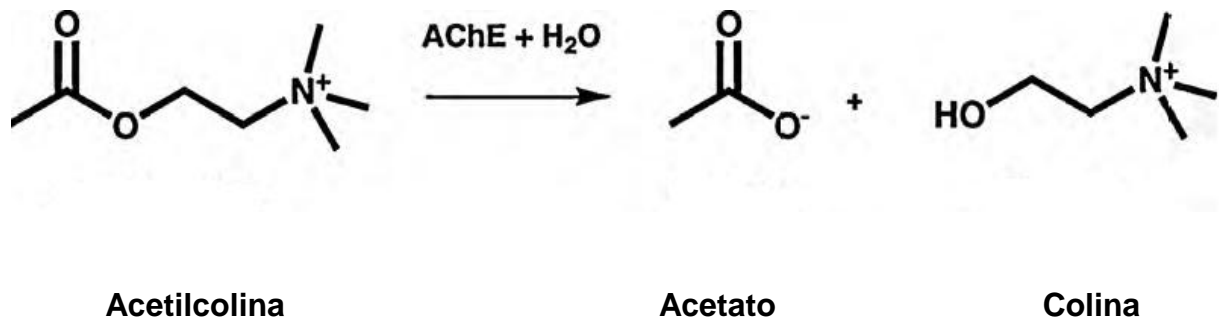
O sistema colinérgico tem sido validado quimicamente nos carrapatos, sendo um alvo acaricida *bona fide*, visto que os organofosforados são potentes agentes químicos de controle dos mesmos. A síntese de ACh pela colina acetilcolinesterase foi demonstrada em larvas e adultos de *R. microplus* (SMALLMAN e RIDDLES, 1977). A presença da ACh no singânglio de carrapatos foi confirmada em adultos de *R. microplus* (SMALLMAN e SCHUNTNER, 1972), assim como a atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi demonstrada em homogenados de larvas (ROULSTON, SCHUNTNER e SCHNITZERLING, 1966) e no singânglio de adultos de *R. microplus* (STONE, 1968). Há evidências também da presença de receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos no singânglio de *R. microplus* (TURBERG et al., 1996). Corroborando com isso, enquanto os AChRs de *R. microplus* não estão clonados, tem-se os trabalhos de Lees, Woods e Bowman (2010) e Bissinger et al. (2011), que descreveram receptores muscarínicos e nicotínicos ao analisar os transcriptomas de singânglios de *Rhipicephalus sanguineus* e *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) respectivamente.

A AChE cliva a ACh em colina e ácido acético (Fig.3), o que ocorre em duas etapas, primeiro através da acilação da enzima, seguida de desacilação envolvendo uma molécula de água. Quando em contato com um inseticida inibidor de AChE, esta se torna fosforilada ficando irreversivelmente inativada. Esse processo acontece no sítio ativo localizado no interior da enzima, denominado tríade catalítica, formado pela serina, histidina e glutamato, sendo covalentemente fosforilada (SOREQ e SEIDMAN, 2001). Os inseticidas organofosforados e

carbamatos se ligam à enzima AChE, impedindo que esta hidrolise a acetilcolina. O acúmulo de acetilcolina nas sinapses provoca uma hiperatividade do sistema nervoso, desencadeando o colapso do mesmo. Até o aparecimento da resistência, os organofosforados foram usados intensamente e com sucesso no controle de *R. microplus* (GEORGE, POUND e DAVEY, 2004; GRAF et al., 2004).

Os neonicotinóides são agonistas da ACh e ligam-se aos receptores nicotínicos desta, localizados nas células pós-sinápticas (SUCHAIL, DEBRAUWER e BELZUNCES, 2003). Na realidade, estes produtos mimetizam a ação da ACh, pois se encaixam nos receptores desta na membrana das células pós-sinápticas, abrindo canais de Na^+ , mas ao contrário da ACh, que é hidrolisada pela acetilcolinesterase, esses compostos não são degradados imediatamente, portanto, os impulsos nervosos são transmitidos de forma contínua, levando à hiperexcitação e posteriormente a um colapso do sistema nervoso. Historicamente, extratos de fumo contendo nicotina foram usados como acaricidas (MEINKE, 2001). Turberg et al. (1996) detectaram uma alta afinidade para nicotina [^3H] em homogenados de larvas de *R. microplus*. A imidacloprida, um neonicotinóide, que possui fraca atividade carrapaticida, apresenta uma baixa afinidade por receptores nicotínicos em homogenados de larvas de *R. microplus*. Mais recentemente, as espinosinas tem mostrado um atividade efetiva em carrapatos, tendo sua ligação em um sítio diferente da imidacloprida (DAVEY, GEORGE e SNYDER, 2001).

Figura 3. Esquema da reação de clivagem da acetilcolina pela acetilcolinesterase.



Sistema Ácido gama-aminobutírico (GABA)

Em artrópodes, GABA é o neurotransmissor inibitório nas junções neuromusculares e sinapses no sistema nervoso. Um dos principais agentes químicos usados no controle de ectoparasitos, especialmente em animais de companhia, é o Fipronil (grupo químico dos fenilpirazóis), um antagonista dos canais de cloro ligados ao GABA (DENNY, 2001; TAYLOR, 2001), demonstrando a validação química deste alvo em carrapatos. Evidências de um papel para GABA no singânglio foi encontrado durante a determinação dos níveis de aminoácidos livres nos tecidos de *Amblyomma hebraeum* (LUCIEN et al., 1995). Recentemente, foi visto que o Fipronil atua no sistema nervoso de insetos em três locais alvos com alta afinidade, inibe receptores de GABA e dois canais de cloro ativados por glutamato (NARAHASHI et al., 2010; ZHAO e SALGADO, 2010).

Sistema Glutamatérgico

As avermectinas atuam em canais de cloro ligados ao glutamato (CULLY et al., 1994; ARENA et al., 1995), abrindo-os irreversivelmente, o que conduz a um influxo dos íons cloro, hiperpolarização e paralisia (Mounsey et al., 2007). Ivermectina, Abamectina, Doramectina e Eprinomectina, alguns dos princípios ativos das avermectinas, são usadas para o controle de *R. microplus* (TAYLOR, 2001; GEORGE, POUND e DAVEY, 2004; CID et al., 2010).

Sistema Octopaminérgico

A monoamina biogênica octopamina age como neurohormônio, neuromodulador e neurotransmissor em várias espécies de invertebrados, porém não tem um papel fisiológico conhecido em vertebrados (ROEDER et al., 1999, ORCHARD, 1982). De acordo com suas características farmacológicas, os receptores são divididos em três grupos: OA1, OA2A e OA2B. A injeção de octopamina em carrapatos preveniu a postura (BOOTH, 1989). Posteriormente, Kempton et al. (1990) providenciaram evidências de um sistema octopaminérgico em homogenados de singânglio de *R. microplus* através da atividade da tiramina- β -hidroxilase, a qual apresenta propriedades semelhantes a dopamina- β -hidroxilase em mamíferos. Esta enzima está envolvida com a síntese da octopamina e outras aminas biogênicas. Receptores de octopamina parecem ser os sítios primários de ação das formamidinas, como o Amitraz, que ao se ligar em tais receptores, causa hiperexcitabilidade neural e morte (NATHANSON, 1985). Atividade da monoamina oxidase também tem sido mostrada em vários tecidos de carrapatos (KAUFMAN e SLOLEY, 1996), inclusive no singânglio (ATKINSON, BINNINGTON e ROULSTON, 1974).

Canais de sódio dependentes de voltagem

Inseticidas, como os piretróides e o DDT, agem como moduladores dos canais de sódio (Na^+) das células nervosas do sistema nervoso dos insetos. Os canais de Na^+ se abrem no momento da transmissão sináptica e se fecham imediatamente após a despolarização da célula nervosa. Estes inseticidas, ao se ligarem à proteína associada ao canal de Na^+ , mantêm os mesmos abertos por um período de tempo mais longo, acarretando em um fluxo maior deste íon para o interior do axônio e alterando, assim, a transmissão do impulso nervoso. Como consequência, o neurônio não consegue voltar à condição de repouso (-70mV) e, portanto, ocorre um bloqueio na transmissão sináptica, gerando o efeito “knock down” ou de paralisia imediata nos insetos. O DDT interfere tanto nos canais de Na^+ abertos como nos fechados; enquanto, os piretróides atuam apenas nos canais de Na^+ abertos (NARAHASHI, 2000; ZLOTKIN, 1999).

Toxicidade dos carrapaticidas na saúde animal e humana

Os mecanismos envolvidos na transmissão sináptica em insetos são muito semelhantes àqueles operantes em mamíferos, aves e peixes. Por isso, a possibilidade de obtenção de seletividade fisiológica com inseticidas neurotóxicos é reduzida, pois muitos destes inseticidas são tóxicos também para organismos não alvos, incluindo os seres humanos (FOERSTER, 2002). Por exemplo, os organofosforados podem ocasionar diversos transtornos neuroquímicos, neurocomportamentais e neuromorfológicos em mamíferos, podendo se refletir em distúrbios neuropsiquiátricos, como alterações locomotoras, ansiedade, depressão,

perda de memória e déficits de aprendizado (EYER, 1995; SLOTKIN, 1999; SILVA, SAMARAWICKREMA e WICKREMASINGHE, 2006).

A toxicidade dos carrapaticidas depende das condições de exposição, tais como: dose/concentração; duração (minuto/ horas) e frequência (aguda, crônica) de exposição; via de exposição; propriedades físico-químicas e suscetibilidade individual (SPINOSA e SCHWARZ, 2008).

Embora os mecanismos de ação tóxica geralmente sejam similares na maioria dos seres vivos, a intensidade e a duração dos efeitos deletérios normalmente variam de acordo com a espécie animal e podem, em parte, ser atribuídos aos fatores toxicocinéticos, que envolvem os processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção de um organismo vivo. Por outro lado, o efeito promovido pelo agente tóxico, em um determinado animal, está basicamente relacionado com a concentração do mesmo na biofase, isto é, no sítio de ação. (FLÓRIO e SOUZA, 2008). Assim, o produto para atuar sobre o sistema nervoso central dos animais e do homem precisa ser absorvido e chegar até a corrente sanguínea, o que requer a sua passagem por várias barreiras tissulares corporais, como a epitelial da pele e a hematoencefálica.

Formas, via de aplicações e o estado físico dos carrapaticidas

As vias utilizadas para aplicação dos carrapaticidas nos animais são a injetável e a por contato (GONZALES, 2003). Na via injetável, em geral, utiliza-se a subcutânea, mas pode-se utilizar a via intramuscular, o que depende da orientação do fabricante; o produto é absorvido totalmente pelo organismo e distribuído pelo

sangue a todos os tecidos. Os carrapatos intoxicam-se através da ingestão do sangue do animal que assim foi tratado. O desejável é que o carrapaticida seja tóxico somente ao carrapato e que assim não prejudique os animais; também que não agrida o ambiente nem o homem que ingere a carne, leite e derivados. Os carrapaticidas aplicados em banhos de aspersão, de imersão ou sob a forma dorsal atuam por contato nos carrapatos; em sua maior parte, também são absorvidos pelos animais. A aplicação dorsal (*pour on*) é anunciada como uma forma de aplicação carrapaticida em que o princípio ativo não é absorvido pelos organismos animais. Nesse caso, se despeja uma pequena porção do carrapaticida, sob a forma de emulsão, no lombo ou no dorso do animal, a partir do que ocorre uma dispersão do líquido e um recobrimento das demais partes do corpo. Nessa forma, a gordura da emulsão carrapaticida combina-se com as gorduras da pele do animal e, assim, recobre todo o corpo em um período de tempo em torno de três a cinco dias (GONZALES, 2003).

Os carrapaticidas utilizáveis em banhos de aspersão ou/e de imersão são apresentados para comercialização no estado físico de concentrado emulsionável, o qual ao ser diluído em água, forma o estado físico chamado de “emulsão” (GONZALES, 2003).

Problemas gerados pelo uso de carrapaticidas sintéticos no controle de *R. microplus*

O controle de *R. microplus* pelo uso de produtos químicos convencionais tem encontrado dois grandes problemas: o desenvolvimento de resistência ao

princípio ativo e a preocupação da população e dos órgãos governamentais com os resíduos deixados nos produtos de origem animal, como a carne e o leite.

Ao longo do tempo, diferentes princípios ativos tem sido utilizados no controle de *R. microplus* (arsenicais, organoclorados, organofosforados, imidinas, piretróides, lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis, benzoilfeniluréias e espinosinas). No entanto, na prática, o uso incorreto e indiscriminado dos acaricidas tem acelerado o processo de seleção de resistência a essas diferentes bases químicas, possibilitando a ocorrência de resistência múltipla ou cruzada (CASIDA, 2009).

A primeira detecção de resistência em *R. microplus* no mundo foi relatada na Austrália em 1937, em seguida na África do Sul em 1938, na Argentina em 1947 e no Uruguai em 1950. No Brasil, o Rio Grande do Sul, em 1953, foi o primeiro estado a relatar casos de resistência deste carrapato aos carrapaticidas arsenicais. Atualmente, no Brasil, já há relatos de resistência a quase todos os grupos químicos de carrapaticidas, exceto a benzoilfeniluréia (fluazuron) (CASTRO- JANER et al., 2010) e espinosinas (JONSSON et al., 2010).

A resistência implica no aumento da dose do produto e/ou aplicação mais frequente dos acaricidas, além do uso de misturas indevidas e a substituição de um produto por outro, por vezes de maior toxicidade (FURLONG, MARTINS e PRATA, 2007).

As bases moleculares da resistência para acaricidas em artrópodes podem ser resumidas em aumento da expressão de genes ou aumento da atividade de enzimas envolvidas em metabolismo de xenobióticos/ detoxificadoras; mutações

em neuroreceptores e em canais de sódio (MARTIN et al., 2003; OAKESHOTT et al., 2003; RUFINGIER et al., 1999).

Resistência de *R. microplus* aos carrapaticidas e as enzimas de detoxicação

Smirle e Winston (1988) afirmam que o desenvolvimento da resistência a pesticidas relacionam-se diretamente com a ação de enzimas de detoxificação, uma vez que os pesticidas induzem a atividade dessas. Dentre as principais enzimas envolvidas na metabolização de pesticidas estão as citocromos P450 monooxigenases, esterases e glutathione-S- transferases (GST) (LI; SCHULER e BERENBAUM, 2007).

As citocromos P450 monooxigenases ligam-se aos compostos tóxicos oxidando-os, tornando-os mais solúveis e, portanto, mais fáceis de excretar (HEMINGWAY; FIELD e VONTAS, 2002). As P450 monooxigenases são responsáveis pela detoxificação de piretróides e organofosforados em artrópodes, inclusive em *R. microplus* (LEE et al., 2002). Em *Drosophila*, foi verificada que a superexpressão de dois genes P450 genes, CYP6G1 e CYP12D1 são responsáveis pela resistência ao DDT, um organoclorado (FESTUCCI- BUSELI et al., 2005).

Mutação no sítio ativo da acetilcolinesterase e a superexpressão de genes de esterases para organofosforados e carbamatos têm sido recentemente relatados, principalmente em moscas domésticas (RANSON et al., 2002) e em outras espécies (CASIDA e QUISTAD, 1998). Existe, ainda, correlação de atividade e expressão de genes de esterases com a resistência a piretróides (DEJERSEY et al., 1985).

Em *R. microplus*, o mecanismo da resistência associado com a detoxicação por meio de esterases vem sendo investigado por vários autores. Baxter and Barker (2002) demonstraram uma relação entre a resistência a organosforados e o aumento da atividade da AChE em linhagens australianas *R. microplus*. Jamroz et al. (2000) mostraram o aumento da atividade da carboxilesterase em uma linhagem mexicana de *R. microplus* resistente a piretróides. Mutações pontuais dos genes de acetilcolinesterase e carboxilesterase foram demonstradas nestes carrapatos (HERNANDEZ et al., 2000; 2002).

As glutathione S-transferases (GSTs) são uma família multifuncional de enzimas presentes ubiquamente em organismos aeróbicos. A GST é responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofílicos à glutathione, reduzindo sua toxicidade e permitindo que o sistema de transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular (ENAYATI; RANSON e HEMINGWAY, 2005), além de outras funções como proteção contra estresse oxidativo e o transporte intracelular de proteínas (LEE et al., 2002; ROSA DE LIMA et al., 2002). Em *B. microplus*, a GST foi isolada de larvas (HE et al., 1999) e de glândula salivar (ROSA DE LIMA et al., 2002). Vaz Jr. et al. (2004) demonstraram o efeito *in vitro* de diferentes acaricidas sobre a atividade de uma GST. Altos níveis de expressão de GST têm sido relacionados à resistência a inseticidas em vários organismos (RUFINGIER et al., 1999), além de estar associada a reações alérgicas mediadas por IgE (O'NEILL; DONOVAN e BALDO, 1994). Entretanto, ainda não foram demonstradas evidências correlacionando a expressão de GST à resistência frente aos acaricidas. Em outros artrópodes, já foi verificado um aumento de expressão e/ou da atividade de GSTs (RUFINGIER et al., 1999; ROSA DE LIMA et al., 2002; ENAYATI, RANSON e HEMINGWAY, 2005), que agem principalmente sobre organoclorados como DDT e

organofosforados, estes últimos por duas vias distintas: O-desalquilação ou O-desarilação (WEI, CLARK e SYVANEN, 2001). Embora não se tenha ainda dados concretos sobre o papel das GSTs na resistência a piretróides (ROSÁRIO- CRUZ, 2009), alguns autores apontam para um papel de sequestro das moléculas do inseticida ou de metabolização de produtos de peroxidação de lipídios causados por inseticidas (VONTAS et al., 2002).

Alguns estudos têm demonstrado que a redução da atividade da enzima GST está relacionada ao aumento da toxicidade de algumas substâncias. Assim, a inibição da GST também pode ser utilizada como uma estratégia para aumentar a eficiência de, por exemplo, substâncias como os pesticidas (EL-DEMERDASH, 2011).

1.3 Pesquisa de Plantas para o controle de *R. microplus*

As plantas, como organismos que co-evoluem com insetos/ ácaros são fontes naturais de substâncias inseticidas/ acaricidas, já que estas substâncias são produzidas e se acumulam no vegetal em resposta a um ataque de herbívoros. Para se protegerem contra a ação de herbívoros, as plantas desenvolveram dois mecanismos de defesa, diretos e indiretos. Os mecanismos diretos envolvem substâncias como a sílica, metabólitos especiais (aleloquímicos), enzimas e proteínas, além de órgãos como tricomas e espinhos que afetam diretamente a performance de ataque do inseto. Já os indiretos se devem a ação de substâncias voláteis, emitidas pela planta, cuja produção é induzida mediante ao ataque de uma praga, atuando na atração de predadores ou parasitóides do inseto fitófago

(BIRKETT et al., 2000, SIMAS et al., 2004) . Essas plantas constituem fonte de compostos secundários, como alcalóides, terpenos, flavonóides e esteróides com propriedades medicinais comprovadas (DI STASI, 1996). De acordo com Martins et al. (1998), as plantas medicinais apresentam alta resistência a doenças e pragas o que facilita o seu cultivo em larga escala. Assim, a exploração de compostos secundários presentes no extrato bruto ou nos óleos essenciais de plantas podem ser eficientes no controle de *R. microplus*.

Pesquisas com plantas para uso no controle de *R. microplus* têm sido desenvolvidas para encontrar extratos ou óleos essenciais com propriedades acaricidas que possam ser usadas em associação ou mesmo como substitutos para os compostos sintéticos. Uma vantagem para o uso destes compostos é que a resistência se desenvolve mais lentamente, visto que em geral as plantas possuem uma mistura de vários agentes ativos com diferentes mecanismos de ação (BALANDRIN et al., 1985; CHAGAS et al., 2003; OLIVO et al., 2009). Além disso, formulações feitas com plantas têm seu uso incentivado na agricultura orgânica ou podem mesmo ser usadas como auxiliar em sistemas de produção convencionais (VIEIRA; CAVALCANTE, 1999; OLIVO et al., 2009).

Na atualidade, as principais plantas das quais foram obtidas substâncias com atividade inseticida pertencem aos gêneros *Nicotiana* (Solanaceae), produtoras de nicotina e nornicotina; *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* e *Mundulea* (Fabaceae), produtoras de rotenóides; *Chrysanthemum* (Asteraceae), produtoras de piretrinas e *Azadirachta* (Meliaceae), produtoras de azadiractina (VIEIRA, FERNANDES e ANDREI, 2003).

A azadiractina é o principal componente ativo, com atividade inseticida, presente em plantas da família Meliaceae. É considerada, a mais recente substância inseticida natural e, a busca de seus análogos em plantas dessa família, ou mesmo por síntese química é um campo bastante promissor ((VIEIRA, FERNANDES e ANDREI, 2003). Segundo Schumutterer (1990), os quatro principais compostos com atividade inseticida presentes nos extratos de folhas e sementes de Neem e Cinamomo, são a azadiractina, a salanina, o meliantriol e nimbim. Destes, o limonóide azadiractina é considerado o mais potente (MARTINEZ, 2002).

No Brasil, nos últimos anos, com o crescimento da agricultura orgânica e agroecológica, muitas plantas com atividade inseticida vêm sendo utilizadas, no controle de insetos na lavoura e em animais, em substituição aos inseticidas sintéticos. Entre as principais plantas que estão sendo utilizadas citam-se: a *Ruta graveolens* (arruda), *Melia azedarach* (cinamomo), *Annona reticulata* (anona), *Piptadenia* spp. (angico), *Allium sativum* (alho), *Derris urucu* (timbó), *Lupinus albus* (tremoço), *Eucalyptus* spp (eucalipto), *Coleus* sp. (boldo), *Prunus persica* (pessegueiro), *Araucaria angustifolia* (pinheiro), *Cymbopogon citratus* (cana-de-cheiro) e *Phytolacca dioica* (umbu) (ABREU Jr., 1998; AVANCINI, 1994; BURG e MAYER, 2001 e GARCIA, 2001), além de outras.

Vários compostos de produtos naturais vêm sendo estudados principalmente em nível laboratorial, visando investigar o potencial efeito inseticida e acaricida dos mesmos (BORGES et al., 2011), mas aguardam estudos mais profundos, para seus usos tanto para o controle de carrapatos como nos animais parasitados por estes.

1. 3.1 O gênero *Calea* e seu potencial farmacológico

O Brasil é um país que possui imensa diversidade biológica, com mais de 10% de todos os organismos descritos na Terra, sendo particularmente rica a sua flora medicinal. Apesar disso, existe ainda um imenso número de plantas brasileiras que permanecem sem quaisquer estudos químicos ou biológicos, apresentando potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (BOLZANI et al., 1999; ALVES et al., 2000) ou que são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Tal potencial serve de incentivo para o estudo com plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, pois o reino vegetal representa, em virtude da pouca quantidade de espécies ainda estudadas, um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas.

Atualmente, várias plantas e seus componentes vêm sendo estudados, entre as quais se destacam as plantas do gênero *Calea* L. Este gênero pertence à tribo Heliantheae, família Asteraceae (=Compositae); constituído por aproximadamente 110 espécies, as quais estão distribuídas no México e em vários países das Américas Central e do Sul (FERREIRA et al., 1980; OBER, URBATSCH e FISCHER, 1986; PRUSKI e URBATSCH, 1988; KARIS e RYDING, 1994; YAMADA et al., 2004; MARCHETTI et al., 2010; WU et al., 2011). Muitas atividades biológicas já foram descritas para extratos preparados com plantas deste gênero, considerando as suas diferentes espécies. A espécie *C. zacatechichi* apresenta atividade antiinflamatória e leishmanicida; *C. glomerata*, vasodilatadora; *C. platylepis*, antimicrobiana; *C. uniflora*, antiparasitária e antifúngica e *C. urticifolia*, citotóxica *in vitro* com indução de apoptose (VENEGAS-FLORES et al., 2002;

NASCIMENTO et al., 2004a,b; YAMADA et al., 2004; NAKAGAWA et al., 2005; WU et al., 2011).

Trabalhos de nosso grupo apontam um grande potencial de *C. serrata* (RIBEIRO et al., 2008) para o controle de carrapatos, como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *R. sanguineus*, ectoparasitos de bovinos e caninos respectivamente. No entanto, não existem trabalhos sobre os seus componentes químicos e como eles atuam sobre os carrapatos e mamíferos.

1.3.2 *Calea serrata* como carrapaticida

A espécie *Calea serrata*, conhecida pelo nome popular de “erva de cobra”, “chá amargo” ou “quebra-tudo”, tem ocorrência natural no sul do Brasil. A planta é usada em rituais religiosos e popularmente com propósitos medicinais, para tratar úlceras e doenças do fígado (SIMÕES et al., 1990, VENDRUSCOLO e MENTZ, 2006).

Estudos fitoquímicos prévios realizados por Steinbeck et al. (1997) revelaram a presença de cromenos (eupatoriocromeno e precoceno II) no extrato hexano de *Calea serrata*. *Hypericum polyanthemum*, pertencente à família Hipericaceae (Guttiferae), também apresenta cromenos (benzopiranos) em sua constituição química. Vários cromenos têm demonstrado ações inseticidas e acaricidas (CORDELL, 1995). Precoceno II pode afetar o sistema endócrino de insetos, agindo como antagonistas do hormônio juvenil (BOWERS et al., 1976; PAMO et al., 2004). A regulação endócrina do ciclo de vida dos insetos é feita através de hormônios como os ecdisteróides (ecdisona e 20-hidroecdisona),

hormônio juvenil e neuropeptídeos. Em carrapatos, os ecdisteróides têm um importante papel na regulação endócrina do seu desenvolvimento e reprodução. No entanto, em carrapatos não está comprovada a ocorrência do hormônio juvenil ou de moléculas que se assemelhem aos mesmos (NEESE et al., 2000). Assim, outros mecanismos de ação devem ser investigados.

Existem várias estratégias para determinar a atividade de produtos naturais e fazer o isolamento das substâncias ativas presentes. Pode-se iniciar com extratos brutos da planta, preparados com solventes como hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água. Posteriormente os extratos ativos são fracionados por cromatografia e as frações obtidas são testadas, repetindo-se o processo até obtenção da(s) substância(s) ativa(s) (VIEIRA, FERNANDES e ANDREI, 2003).

No caso dos óleos voláteis, para se obter os seus constituintes químicos, o método mais usado é o de arraste em vapor de água. Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a água, sendo, por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger para realizar a separação óleo/ água. O óleo volátil obtido, após separar-se da água, deve ser seco com sulfato de sódio anidro, por exemplo. Este procedimento, embora clássico, pode levar à formação de artefatos em função da temperatura empregada. Preferencialmente, este método é utilizado para extrair óleos de plantas frescas (SIMÕES e SPITZER, 2003). Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenos, sendo que estes últimos preponderam (SIMÕES e SPITZER, 2003).

1.3.2.1 Estudos de validação de plantas medicinais com atividade carrapaticida

A etapa de validação de uma planta envolve vários testes que visam confirmar a sua eficácia e determinar a segurança de sua utilização em organismos vivos. Os testes de eficácia podem ser realizados *in vitro* e *in vivo*. Os testes de margem de segurança são normalmente realizados em animais de laboratório e visam determinar os efeitos da administração da planta em organismos animais.

Testes de eficácia *in vitro*

Estes testes servem como uma indicação inicial da atividade que está sendo pesquisada e, quando utilizados no início de uma triagem, permitem selecionar as plantas que apresentam melhores resultados, diminuindo gastos, evitando perda de tempo e uso indiscriminado de animais de experimentação.

Para determinação do potencial carrapaticida de plantas podem ser realizados os testes *in vitro* usando teleóginas, ovos ou larvas. No caso das larvas, dentre os testes *in vitro* para identificar atividade carrapaticida, pode ser realizado o teste de imersão preconizado por Fiedler (1968) e Ribeiro et al. (2008).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

- O objetivo geral deste trabalho é estudar a atividade acaricida de *Calea serrata* utilizando o carrapato *Rhipicephalus microplus* como modelo.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Estudar os componentes químicos do óleo essencial de *Calea serrata*.
- Analisar a atividade larvicida do precoceno II, componente majoritário do extrato *n*-hexano e do óleo essencial de *Calea serrata*.
- Avaliar o efeito *in vitro* do extrato *n*-hexano de *Calea serrata* sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase de larvas de *R. microplus*.
- Avaliar o efeito *in vitro* do extrato *n*-hexano de *C. serrata* sobre a atividade da enzima glutationa-S-transferase de larvas de *R. microplus*.
- Estudar o efeito *in vitro* do extrato *n*-hexano de *C. serrata* sobre a atividade da acetilcolinesterase em estruturas cerebrais de ratos Wistar.

2 ARTIGOS CIENTÍFICOS

CAPÍTULO 1 – Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).

Artigo publicado em **Veterinary Parasitology**, v. 179, n.1, p.195-198, 2011.



Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)

Vera Lucia Sardá Ribeiro^{a,1}, Jaqueline Campiol dos Santos^{b,1}, João Ricardo Martins^c, Jan Schripsema^d, Ionara R. Siqueira^a, Gilsane L. von Poser^b, Miriam A. Apel^{b,*}

^a PPG-Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^b PPG-Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Estrada Municipal do Conde, 6000, 92990-000 Eldorado do Sul, RS, Brazil

^d Grupo Metabólica, Laboratório de Ciências Químicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Av. Alberto Lamego, 2000, 28015-620 Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae)

Vera Lucia Sardá Ribeiro^{a,1}, Jaqueline Campiol dos Santos^{b,1}, João Ricardo Martins^c, Jan Schripsema^d, Ionara R. Siqueira^a, Gilsane L. von Poser^b, Miriam A. Apel^{b,*}

^a PPG-Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^b PPG-Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Estrada Municipal do Conde, 6000, 92990-000 Eldorado do Sul, RS, Brazil

^d Grupo Metabólica, Laboratório de Ciências Químicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Av. Alberto Lamego, 2000, 28015-620 Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2010

Received in revised form 5 February 2011

Accepted 7 February 2011

Keywords:

Acaricide

Calea serrata

Essential oil

Precocene II

Rhipicephalus (*Boophilus*) *microplus*

ABSTRACT

Calea serrata Less. (Asteraceae), an endemic species of south Brazil known as “quebra-tudo”, is used in Afro-Brazilian religious rituals and in folk medicine for treating liver disorders. Phytochemical studies of the *n*-hexane extract of this plant demonstrated the presence of precocene II, a benzopyran derivative known for its insecticidal activity. The aim of this work was to isolate this benzopyran and determine the chemical composition of the essential oil of *C. serrata* and further to evaluate the acaricidal activity of the essential oil and precocene II against the larvae of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. The LC_{99.9} and LC₅₀ values obtained with the oil, which presents precocene II and sesquiterpenes, were 3.94 µL/mL and 0.28 µL/mL, respectively. For precocene II these values were 4.25 mg/mL and 1.78 mg/mL, respectively. The results indicate a synergistic interaction between the components of the oil and precocene II.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887) is a one-host tick that occurs in tropical and subtropical regions of the world and constitutes a major problem for the cattle industry. It causes severe economic losses by blood loss, reduction in weight gain, direct damage to cattle skin by the tick bite, diminishing the value of skins and hides for the manufacture of leather, and also serving as a vector of infectious disease such as bovine babesiosis and anaplasmosis (Jongejan

and Uilenberg, 2004; Castro-Janer et al., 2009; Reck et al., 2009).

Traditional control methods are based on the use of acaricides such as organophosphates, synthetic pyrethroids, amitraz and ivermectin. However, these chemical substances have been only partially successful due to the cost, environmental pollution and development of acaricide resistance (Klafke et al., 2010). Thus, there is an increasing interest in alternative anti-tick products and strategies. Natural products are being investigated for the acaricidal effect. Among them, plant extracts and essential oils have shown activity against diverse stages of some species of ticks such as *Ixodes ricinus* and *R. microplus* (Iori et al., 2005; Apel et al., 2009; Ribeiro et al., 2010; Rosado-Aguilar et al., 2010).

Calea serrata Less. (Asteraceae), an endemic southern Brazilian species, is known by the vernacular names

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33085417; fax: +55 51 33085243.
E-mail address: miriam.apel@gmail.com (M.A. Apel).

¹ These <fn0005>authors have contributed equally to the studies presented in this article.

'erva-de-cobra' ('snake herb'), 'chá-amargo' ('bitter tea') or 'quebra-tudo' ('breaks everything'). The plant is used in Afro-Brazilian religious rituals in southern Brazil and as a tea for treating ulcers and liver diseases (Simões et al., 1990; Marodin and Baptista, 2001; Garlet and Irgang, 2001; Vendruscolo and Mentz, 2006). This plant was previously analyzed showing the presence of chromenes (eupatori-chromene and precocene II) as the main compounds in the lipophilic extract (Steinbeck et al., 1997).

Chromenes are benzopyran derivatives that represent a class of natural products with interesting biological properties. Several experiments have revealed the insecticidal effect of these compounds and some of them also have been shown acaricidal activity (Okunade, 2002; Ribeiro et al., 2007). Compounds from this class were found in the essential oil of *Ageratum houstonianum* (Asteraceae) flowers, which presented acaricidal effect on *Rhipicephalus lunulatus* ticks. The toxicity was attributed to the chromenes or to a synergistic interaction between these components and other constituents of the essential oil (Pamo et al., 2004, 2005). In a previous study, the *n*-hexane extract of *C. serrata* demonstrated activity against engorged females and larvae of *R. microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*, and according to the authors, this effect could be attributed to the chromenes found in the plant (Ribeiro et al., 2008).

Since the essential oil of *C. serrata* was not formerly analyzed, the aim of this work was to determine the chemical composition and to evaluate the acaricidal activity of this essential oil. In order to verify if precocene II, the main component of the *n*-hexane extract, is responsible for the acaricidal activity previously determined, the compound was isolated from the plant, identified by spectroscopic means and tested against the larvae of *R. microplus*.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Aerial parts (leaves and stems) of *C. serrata* were collected in Morro Santana, Porto Alegre, in January 2010. The plant was identified by S. Bordignon (Departamento de Botânica, Unilasalle) and a voucher specimen (ICN 124883) was deposited in the herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

2.2. Essential oil

The essential oil was obtained from 100 g of fresh leaves of the plant by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus, for 4 h. The essential oil was taken up in diethyl ether, dried over sodium sulphate and stored in amber-colored vials at (+4 °C) until analysis.

2.3. Analysis by GC and GC/MS

The oil was analyzed by GC and GC/MS, using a chromatograph (Shimadzu GC-17A) equipped with a fused silica capillary column (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm, coated with DB-5). The temperature was programmed from 60 to 300 °C at 3 °C/min. Injector and detector temperatures were set at 220 and 250 °C, respectively. The GC appara-

tus was equipped with a flame ionization detector, while the GC/MS analysis had a quadrupole MS system (QP 5000) operating at 70 eV and mass range 40–400 amu. The relative composition of the oils was obtained from electronic integration, without taking into account relative response factors. The identification of compounds was based on a comparison of retention indices (determined relative to the retention times of *n*-alkanes homologous series) and mass spectra with those of authentic samples, data from NIST GS-MS library and with the literature (Adams, 2001; Apel et al., 2009).

2.4. Extraction and isolation of precocene II

Air dried and powdered plant material (100 g) was extracted by maceration for three times (48 h) with *n*-hexane. The combined extracts were evaporated to dryness in vacuum at 40 °C, treated with acetone and subsequently filtered, evaporated and gave an extract rich in chromenes and free of epicuticular waxes and other acetone insoluble compounds. Precocene II was isolated from this extract by column chromatography using silica gel 60 (Merck) and *n*-hexane:dichloromethane, in increasing polarities, obtaining some fractions rich in precocene II. The compound was purified by preparative TLC (20 cm × 20 cm plates coated with 0.5 mm layer of silica gel 60 F₂₅₄ Merck) using *n*-hexane: dichloromethane (1:1) and identified by NMR (400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C), in CDCl₃, using the solvent as internal standard.

2.5. Preparation of the samples for acaricidal tests

The acaricidal activity was determined by the larval immersion test (LIT) (Ribeiro et al., 2007). Precocene II and the essential oil of *C. serrata* were dissolved and serially diluted in ethanol (20–0.078 µL/mL for the essential oil and 10–0.078 mg/mL for precocene II).

2.6. Preparation of ticks

The Mozo strain used as susceptible reference strain was provided by IPVDF (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor). Engorged females *R. microplus* were collected from infested animals, washed with water and dried in paper toweling. The average weight of engorging ticks was 0.30 g. These females were incubated at 27–28 °C and 70–80% relative humidity for ca. two weeks until the egg laying. These eggs provided the larvae used for LIT.

2.7. Larval immersion test (LIT)

The LIT was conducted by placing approximately 200 embryonated eggs (0.01 g) into bags made of TNT (tissue-non-tissue) fabric (1.0 cm × 1.5 cm). The bags were incubated at 27–28 °C and 70–80% relative humidity for ca. 14 days, until the eggs started to hatch. After another 14 days the bags containing the larvae ready for testing were immersed for 5 min in 10–20 mL of the test solutions. Ethanol and amitraz (2 µL/mL in water) were used as negative and positive controls, respectively. After ca. 1 h to allow the solvents to evaporate, the bags were incubated

Table 1
Compounds identified in the essential oil from *C. serrata*.

IK	Constituents	%	IK	Constituents	%
1334	δ -Elemene	1.4	1489	<i>trans</i> - β -Guaiene	4.5
1378	α -Copaene	0.8	1504	Not identified	0.9
1400	β -Caryophyllene	5.0	1506	δ -Cadinene	2.1
1435	α -Humulene	1.5	1542	Germacrene B	1.6
1442	Seichelene	0.9	1567	Spathulenol	0.7
1464	Germacrene D	26.4	1575	Globulol	0.7
1466	β -Selinene	10.0	1636	<i>t</i> -Muurolool	3.3
1469	α -Selinene	0.4	1641	α -Muurolool	0.5
1479	Bicyclogermacrene	7.4	1649	α -Cadinol	1.9
1484	α -Muurolole	0.6	1657	Precocene II	29.6

at 27–28 °C and 70–80% relative humidity for 24 h and then larvae (alive and dead) were counted to assess percent mortality. Each treatment was performed in triplicate and the experiment was repeated three times.

2.8. Statistical analyses

ANOVA was performed using SPSS version 1.0 software to evaluate the significance of the data (Tukey test with $p \leq 0.05$). LC_{50} and $LC_{99.9}$ were determined by linear regression.

3. Results

The yield of essential oil was 0.10% (w/v) based on fresh weight. The composition of the oil extracted from *C. serrata* leaves, together with the relative retention index and percentage of the identified compounds, are summarized in Table 1. Eighteen compounds, comprising 99.1% of the oil, were identified. The oil was characterized by the presence of sesquiterpenes and the benzopyran derivative precocene II. No monoterpenes were detected. Precocene II was identified as the major compound, representing 29.6% of the oil, followed by the sesquiterpene hydrocarbons germacrene D (26.4%), β -selinene (10.0%) and bicyclogermacrene (7.4%).

On the LIT, the concentrations of 20.0, 10.0 and 5.0 μ L/mL of the oil killed all larvae (Table 2). The $LC_{99.9}$ and LC_{50} , determined by linear regression analysis, were 3.94 and 0.28 μ L/mL, respectively. On the tests carried out with the isolated compound, precocene II, the calculated values

Table 2
Effect of treatments by *C. serrata* essential oil and precocene II on the larvae of *R. microplus*.

Essential oil		Precocene II	
Dose (μ L/mL)	Mortalities	Dose (mg/mL)	Mortalities
20	100.00 ^a	–	–
10	100.00 ^a	10	100.00 \pm 0.00 ^a
5	100.00 ^a	5	99.33 \pm 0.94 ^a
2.5	95.67 \pm 4.19 ^a	2.5	89.67 \pm 5.91 ^a
1.25	86.00 \pm 8.49 ^a	1.25	43.33 \pm 9.43 ^b
0.625	56.67 \pm 4.71 ^b	0.625	60.00 \pm 8.16 ^b
0.312	60.00 ^b	0.312	2.67 \pm 1.25 ^c
0.156	36.67 \pm 4.71 ^{c,d}	0.156	2.67 \pm 1.25 ^c
0.078	21.67 \pm 6.24 ^d	0.078	1.33 \pm 1.25 ^c

Values represent means \pm standard deviations (SD), and different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$ (Tukey test). Amitraz (2 μ L/mL) % mortality \pm SD was 90.50 \pm 6.50^a.

Table 3
C. serrata essential oil and precocene II lethal concentrations 99.9 and 50 obtained by LIT for *R. microplus*.

Samples	$LC_{99.9}$	(Max–min)	LC_{50}	(Max–min)
Essential oil (μ L/mL)	3.94	4.01–3.82	0.28	0.279–0.278
Precocene II (mg/mL)	4.25	4.40–4.06	1.78	1.87–1.65

of $LC_{99.9}$ and LC_{50} were 4.25 and 1.78 mg/mL, respectively (Table 3). The sensibility of the strain was determined with a solution of amitraz (2 μ L/mL) which presented mortality of 90.50%. Ethanol, used as negative control, was not toxic to the larvae.

4. Discussion

Among the ca. 100 species of the genus *Calea*, only *Calea clematidea* was previously studied for the essential oil content. The leaves of this plant yielded 1.6% of essential oil which presented a high content (ca. 70%) of clemateol, a natural epoxy terpenoid, and minor amounts of other substances. The essential oils of both plants are quite different having in common only the sesquiterpenes germacrene B and spathulenol (Flach et al., 2002).

Once the essential oil was more active than the precocene II, the acaricidal effect of the former could be attributed to a synergistic interaction of its components. In fact, other samples containing the same terpenoids present in the *C. serrata* essential oil have demonstrated activity against *R. microplus* (Birkett et al., 2008) and other Acari such as *Psoroptes cuniculi*, the rabbit ear mite (Macchioni et al., 2006).

Previous work carried out by Ribeiro et al. (2008) showed that the hexane extract of *C. serrata* was less effective against the larvae of *R. microplus* in the LIT when compared to the results of the tests carried out with the isolated precocene II. The hexane extract at the concentration of 1.56 mg/mL did not show any toxic effect to the larvae, while in this work, precocene II killed approximately 50% of the larvae in this concentration, demonstrating to be the active compound of the hexane extract. On the other hand, the essential oil of *C. serrata* containing almost 30% of precocene II was more active in the LIT than the isolated precocene II. Thus, the acaricidal activity of the essential oil can be attributed to a synergistic effect of precocene II and the sesquiterpenes present in the oil. It worthwhile to comment that the doses of 1.25 μ L/mL of the essential oil and 2.5 mg/mL of precocene II did not differ statistically of amitraz used as positive control.

Although the antijvenile hormonal activity of the insects caused by precocenes is well established (Bowers et al., 1976), their acaricidal activity has not been elucidated. Some experiments have demonstrated that precocenes interfere with tick oviposition, development and reproduction (Pound and Oliver, 1979; Connat, 1988; Taylor et al., 1992). Until now it has not been clarified if, like insects, ticks have juvenile hormones. Nevertheless, apart from this question, another mechanism is responsible for the observed action since tick larvae, which are phenologically beyond the action of the molting or juvenile hormone mimics, were used in the experiments.

It is suggested that the mechanism of action of the formamidic acaricides, such as amitraz, is due to effects on motor function in consequence of inhibitory effects on MAO activity, most probably through the increases produced on catecholamine levels within the central nervous system (Florio et al., 1993). Extracts and isolated benzopyrans of *Hypericum polyanthemum* that presented MAO inhibitory activity described (Gnerre et al., 2001) showed acaricidal activity on larvae of *R. microplus* (Ribeiro et al., 2007; Hass, 2010). Thus, this effect observed with the essential oil of *C. serrata* containing precocene II (and the isolated precocene II) could be attributed to a possible MAO inhibitory activity.

In spite of the results obtained in this work, further investigations still need to be carried out on the toxicity of the plant and especially on the precocene, which have been shown to cause hepatotoxicity in rats (Hammond et al., 1995; Okunade, 2002). This is an important factor bearing in mind the human health hazard in field applications of precocene as large-scale acaricidal agents. Besides that, attempts to evaluate penetration and cutaneous absorption of the oil components should be done, mainly considering that the bulk of the cattle breeding is destined to the manufacture of meat and dairy products for human consumption.

5. Conclusion

The essential oil and the isolated precocene II from *C. serrata* demonstrated to be toxic to the larvae of *R. microplus*. Further studies will be conducted in order to determine their mechanism of action. According to these results it can be concluded that the essential oil is more active than precocene II, and this isolated compound is, therefore, not the only active component in the essential oil. Additional studies will be conducted in order to identify the active compounds and their effects on other life stages of ticks.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq, Fapergs and Propesq/UFRGS for their financial support.



References

- Adams, R.P., 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatograph/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing, Carol Stream.
- Apel, M.A., Sardá Ribeiro, V.L., Bordignon, S.A.L., Henriques, A.T., Von Poser, G., 2009. Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol. Res.* 105, 863–868.
- Birkett, M.A., Al Abassi, S., Kröber, T., Chamberlain, K., Hooper, A.M., Guerin, P.M., Pettersson, J.A., Slade, R., Wadhams, L.J., 2008. Antiectoparasitic activity of the gum resin, gum haggard, from the East African plant, *Commiphora holtziana*. *Phytochemistry* 69, 1710–1715.
- Bowers, W.S., Ohta, T., Cleere, J.S., Marsella, P.A., 1976. Discovery of insect anti-juvenile hormone in plants. *Science* 193, 542–547.
- Castro-Janer, E., Rifran, L., Piaggio, J., Gil, A., Miller, R.J., Schumaker, T.T.S., 2009. *In vitro* tests to establish LC₅₀ and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. *Vet. Parasitol.* 162, 120–128.
- Connat, J.-L., 1988. Effects of different anti-juvenile hormone agents on the fecundity of the female cattle tick *Boophilus microplus*. *Pest. Biochem. Physiol.* 30, 28–34.
- Flach, A., Gregel, B., Simionatto, E., da Silva, U.F., Zanatta, N., Morel, A.F., Linares, C.E.B., Alves, S.H., 2002. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. *Planta Med.* 68, 836–838.
- Florio, J.C., Sakate, M., Palermo-Neto, J., 1993. Effects of amitraz on motor function. *Pharmacol. Toxicol.* 73, 109–114.
- Garlet, T.M.B., Irgang, B.E., 2001. Medicinal plants used by rural women workers in 298 Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Plant. Med.* 4, 9–18.
- Gnerre, C., von Poser, G., Ferraz, A., Viana, A., Testa, B., Rates, S.M.K., 2001. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1273–1279.
- Hammond, A.H., Garle, M.J., Fry, J.R., 1995. Mechanism of toxicity of precocene II in rat hepatocyte cultures. *J. Biochem. Toxicol.* 10, 265–273.
- Hass, J.S., 2010. Isolamento e Avaliação Biológica de Compostos Fenólicos de Espécies de *Hypericum* Nativas do Sul do Brasil. Master Dissert. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Iori, A., Grazioli, D., Gentile, E., Marano, G., Salvatore, G., 2005. Acaricidal properties of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree oil) against nymphs of *Ixodes ricinus*. *Vet. Parasitol.* 129, 173–176.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129, S3–S14.
- Klafke, G.M., Albuquerque, T.A., Miller, R.J., Schumaker, T.T.S., 2010. Selection of an ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Vet. Parasitol.* 168, 97–104.
- Macchioni, F., Perrucci, S., Cioni, P., Morelli, I., Castilho, P., Cecchi, F., 2006. Composition and acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* essential oils against *Psoroptes cuniculi*. *J. Essent. Oil Res.* 18, 111–114.
- Marodin, S.M., Baptista, L.R.D.M., 2001. The use of plants for medicinal purposes in the city of Dom Pedro de Alcântara, Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Plant. Med.* 4, 57–68.
- Okunade, A.L., 2002. *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fitoterapia* 73, 1–16.
- Pamo, T.E., Tendongkeng, F., Kana, J.R., Tenekeu, G., Tapondjou, L.A., Khan Payne, V., 2004. The acaricidal effect of the essential oil of *Ageratum houstonianum* Mill. flowers on ticks (*Rhipicephalus lunulatus*) in Cameroon. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34, 244–247.
- Pamo, T.E., Tendongkeng, F., Kana, J.R., Khan Payne, V., Boukila, B., Lemoufouet, J., Miegoue, E., Nanda, A.S., 2005. A study of the acaricidal properties of an essential oil extracted from the leaves of *Ageratum houstonianum*. *Vet. Parasitol.* 128, 319–323.
- Pound, J.M., Oliver, J.H., 1979. Juvenile hormone: evidence of its role in the reproduction of ticks. *Science* 206, 355–357.
- Reck Jr., J., Berger, M., Terra, R.M., Marks, F.S., da Silva Jr., V.I., Guimaraes, J.A., Termignoni, C., 2009. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Res. Vet. Sci.* 86, 56–62.
- Ribeiro, V.L.S., Toigo, E., Bordignon, S.A.L., Gonçalves, K., von Poser, G.L., 2007. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 147, 199–203.
- Ribeiro, V.L.S., Avancini, C., Gonçalves, K., Toigo, E., von Poser, G.L., 2008. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* 151, 351–354.
- Ribeiro, V.L., dos Santos, J.C., Bordignon, S.A., Apel, M.A., Henriques, A.T., von Poser, G.L., 2010. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygus ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Bioresour. Technol.* 101, 2506–2509.
- Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A., Rodriguez-Vivas, R.I., Borges-Argaez, R., Garcia-Vazquez, Z., Mendez-Gonzalez, M., 2010. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 168, 299–303.
- Simões, C.M.O., Mentz, L.A., Schenkel, E.P., Amoros, M., Girre, L., 1990. In Ethnopharmacologie: Sources, Methodes, Objectifs. Actes du 1er Colloque Européen d'Ethnopharmacologie. Metz, Orston, pp. 192–198.
- Steinbeck, C., Spitzer, V., Starosta, M., von Poser, G.L., 1997. Identification of two chromenes from *Calea serrata* by semiautomatic structure elucidation. *J. Nat. Prod.* 60, 627–628.
- Taylor, D., Chinzai, Y., Miura, K., Ando, K., 1992. Effects of precocenes on vitellogenesis in the adult female tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Exp. Appl. Acarol.* 14, 123–136.
- Vendruscolo, G.S., Mentz, L.A., 2006. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio. Grande do sul, Brasil. *Iheringia, Sér. Bot.* 61, 83–103.

CAPÍTULO 2 – Effect of *Calea serrata* Less. *n*-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain Wistar rats.

Artigo publicado em **Veterinary Parasitology**, v. 189, n., p.322-326, 2012.

Veterinary Parasitology 189 (2012) 322–326

 <p>ELSEVIER</p>	<p>Contents lists available at SciVerse ScienceDirect</p> <p>Veterinary Parasitology</p> <p>journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar</p>	
---	---	---

Effect of *Calea serrata* Less. *n*-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain Wistar rats

Vera Lucia Sardá Ribeiro^a, Cláudia Vanzella^a, Felipe dos Santos Moysés^b,
Jaqueline Campiol dos Santos^c, João Ricardo Souza Martins^d, Gilsane Lino von Poser^c,
Ionara Rodrigues Siqueira^{a,b,*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Produção de Matéria Prima, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Avenida Ipiranga, 2752 sala 505A, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratório de Parasitologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio, Estrada Municipal do Conde, 6000, 92990-000 Eldorado do Sul, RS, Brazil



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Effect of *Calea serrata* Less. *n*-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain Wistar rats

Vera Lucia Sardá Ribeiro^a, Cláudia Vanzella^a, Felipe dos Santos Moysés^b,
Jaqueline Campiol dos Santos^c, João Ricardo Souza Martins^d, Gilsane Lino von Poser^c,
Ionara Rodrigues Siqueira^{a,b,*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Produção de Matéria Prima, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Avenida Ipiranga, 2752 sala 505A, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratório de Parasitologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio, Estrada Municipal do Conde, 6000, 92990-000 Eldorado do Sul, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 December 2011

Received in revised form 20 March 2012

Accepted 23 April 2012

Keywords:

Acetylcholinesterase

*Calea serrata**n*-Hexane extract*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Rats

ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE), an enzyme that hydrolyses acetylcholine (ACh) at cholinergic synapses, is a target for pesticides and its inhibition by organophosphates leads to paralysis and death of arthropods. It has been demonstrated that the *n*-hexane extract of *Calea serrata* had acaricidal activity against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. The aim of the present study was to understand the mechanism of the acaricidal action of *C. serrata n*-hexane extract are specifically to investigate the *in vitro* anticholinesterase activity on larvae of *R. microplus* and in brain structures of male Wistar rats. The *n*-hexane extract significantly inhibited *in vitro* acetylcholinesterase activity in *R. microplus* larvae and rat brain structures. The results confirm that inhibition of acetylcholinesterase is a possible mechanism of action of hexane extract at *C. serrata*.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) is a hematophagous parasite that constitutes a major barrier to economic production of beef and dairy cattle. This tick is the vector of several diseases, such as bovine babesiosis and anaplasmosis. These diseases potentially cause morbidity in cattle, leading to economic losses in tropical and subtropical countries. This tick

species is responsible for annual losses of 2 billion dollars in Brazil (Grisi et al., 2002).

Traditional control methods, using chemical acaricides such as organophosphates, formamidines, pyrethroids and phenylpyrazoles, have been only partially successful due to resistance problems (Castro-Janer et al., 2010), use of chemicals lead to residues in animal products (meat and milk) and environmental pollution. However, alternative acaricides and strategies have been investigated, including secondary metabolites found in plants as potential sources for arthropod control products (Isman, 2006).

Recently, we demonstrated the acaricidal activity of *Calea serrata* Less. (Asteraceae) (Ribeiro et al., 2008, 2011). This plant species, known in Southern Brazil as “grass snake”, “bitter tea” or “breaks everything”, is used in Afro-Brazilian religious rituals and in folk medicine to treat

* Corresponding author at: Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala 202, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 3121; fax: +55 51 3308 3121.

E-mail addresses: ionara@ufrgs.br, 00016431@ufrgs.br (I.R. Siqueira).

ulcers and liver diseases (Simões et al., 1990; Vendruscolo and Mentz, 2006). The *n*-hexane extract of *C. serrata* demonstrated activity against larvae of *R. microplus* and *Rhipicephalus sanguineus* (Ribeiro et al., 2008). However, it is important to understand the mechanism of the acaricidal action of this extract.

Previous phytochemical studies carried out by Steinbeck et al. (1997) revealed the presence of chromenes (eupatoriocromene and precocene II) in the *n*-hexane extract of this plant. Several chromenes are known to have insecticidal and acaricidal actions (Addor, 1994). Precocene II can affect the endocrine system of insects, acting as antagonists of juvenile hormone (Bowers et al., 1976; Pamo et al., 2004). The endocrine regulation of the life cycle of insects is based on ecdysteroids (ecdysone and 20-hydroxyecdysone), juvenile hormone, and a myriad of neurosecretory peptide hormones. The ecdysteroids have an important role in endocrine regulation of development and reproduction in ticks (Rees, 2004; Seixas et al., 2010), although the occurrence of juvenile hormone or juvenile hormone-like molecules nowadays is not clear in tick species (Neese et al., 2000).

Esterases, a group of multifunctional enzymes, are related to several physiological activities, such as regulation of juvenile hormone levels, digestive processes, reproductive behavior and nervous system functions (Galego et al., 2006). Carbamate and organophosphate compounds have the same mechanism of action, based on the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) in the nervous system. Their inhibitory action on insect AChE function prolongs the neural excitation caused by the neurotransmitter acetylcholine leading to neuromuscular paralysis (Lees and Bowman, 2007) and death (Tan et al., 2011). AChE activity has been demonstrated in homogenates from *R. microplus* larvae (Roulston et al., 1966). Baffi et al. (2007) described different expression patterns of esterases in the development stages of *R. microplus*. Three enzymes, called EST-1, EST-2 and EST-5, occurred in larvae and were classified as AChEs based on assays with inhibitors.

The aim of this study was to determine the effect of the *n*-hexane extract of *C. serrata* on AChE activity in larvae *R. microplus* as well as in the brain structures, frontal cortex, striatum and hippocampus of Wistar rats.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and preparation of the *n*-hexane extract

Plant material of *C. serrata* (leaves and stems) was collected in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, in December 2009 and January 2010. The plant was identified by Sérgio Bordignon (Departamento de Botânica, Centro Universitário La Salle). The voucher specimen (ICN 124883) was deposited in the Herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Air dried and powdered plant material (200 g) was processed by maceration with *n*-hexane [1:10 (w/v)]. Solvent exchanges were performed until the material become colorless. The extract was then evaporated to dryness under reduced pressure, treated with acetone and

subsequently filtered and evaporated, resulting an extract rich in chromenes and free of epicuticular waxes and other undesirable compounds. The *n*-hexane extract of *C. serrata* was thoroughly solubilized in ethanol (90%) and final concentrations of 1.5, 3 and 6 mg/mL were obtained. Previous studies demonstrated that ethanol at the final concentration employed did not induce lethality in the larvae of *R. microplus* (Gonçalves et al., 2007).

2.2. Ticks

R. microplus ticks of a susceptible reference strain (Mozzo strain) were provided by Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor. Engorged females of *R. microplus* were collected from infested cattle, washed with water and dried in paper towel. These females were incubated at 27 °C and 70–80% relative humidity for 14 days to obtain eggs. For assays, 10-day-old larval ticks were used.

2.3. *In vitro* AChE activity from larvae of ticks

Pools of 100 mg of *R. microplus* larvae were homogenized in 10 volumes (1:10) of ice-cold 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.5% Triton-X 100, and homogenate was centrifuged at 2500 × *g* for 10 min at 4 °C. The resulting supernatants were used as the enzyme source. AChE activity was determined by slight modifications of the colorimetric method described by Ellman et al. (1961) and Baxter et al. (1999) using acetylthiocholine iodide (ATChI, 1 mM) as substrate. The *n*-hexane extract of *C. serrata* (final concentrations 1.5, 3 and 6 mg/mL) was incubated at 25 °C for 60 min with the enzyme source. Absorbance was measured at 412 nm, and AChE activity was estimated through differences in dA/min. Each sample was assayed in triplicate.

2.4. Rats

Male Wistar rats at 3–4 months of age were obtained from Reproduction and Experimental Animal Center (CREAL, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS) and maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at 22 ± 2 °C), with food and water *ad libitum*, in Biotério Setorial of the Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and Local Ethics Committee approved all handling and experimental conditions. In addition, all efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals needed in this work. We used the brain structures of the same animals in all tested concentrations in an attempt to maximize the data obtained from an individual animal in compliance with ethical principles.

2.5. *In vitro* AChE activity from brain structures of rats

Rats were decapitated and the brain was quickly removed, placed on an ice-cold plate and washed with

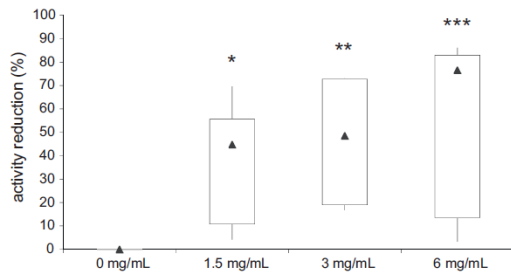


Fig. 1. Effect of *n*-hexane extract (1.5, 3 and 6 mg/mL) of *Calea serrata* on AChE activity reduction in the larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. AChE activity reduction (as percentage of the control group) after 60 min of incubation. The results were expressed as median, 25th percentile, 75th percentile, minimum and maximum values. Kruskal–Wallis followed by Dunn test; *values significantly different from corresponding control group; $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

iced buffer (0.5 M sodium phosphate, pH 7.5). The frontal cortex, hippocampus and striatum were rapidly removed, homogenized in 10, 10 and 100 volumes of buffer, respectively, and centrifuged at $900 \times g$ for 10 min. The resulting supernatants were used as the enzyme source. All steps were carried out at 4 °C. AChE activity was determined by slight modifications of the colorimetric method described by Ellman et al. (1961). The *n*-hexane extract of *C. serrata* (final concentrations 1.5, 3 and 6 mg/mL) was incubated at 25 °C for 60 min with the enzyme source, 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) and ATChI in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0. Absorbance was measured at 412 nm, and AChE activity was estimated through differences in dA/min. Each sample was assayed in triplicate.

2.6. Statistical analysis

The results were expressed as median (25th/75th of percentiles) values. The pattern of distribution was assessed before statistical testing. Kruskal–Wallis followed by Dunn's multiple comparison test was employed. Significance was assumed as $P < 0.05$.

3. Results

The effect of *C. serrata* *n*-hexane extract on AChE activity is shown in Figs. 1 and 2. The results revealed that this extract significantly reduced AChE activity. The inhibition was significant at 1.5, 3 and 6 mg/mL to larvae *R. microplus* when compared to control group (Fig. 1; $H(4) = 20.870$, $P = 0.0001$; Kruskal–Wallis test followed by Dunn's *post hoc*). In addition, 3 and 6 mg/mL *C. serrata* *n*-hexane extract significantly reduced AChE activity in homogenated brain areas of Wistar rats, namely frontal cortex, striatum and hippocampus (Fig. 2A, $H(3) = 18.250$, $P < 0.001$; Fig. 2B, $H(3) = 14.150$, $P = 0.0027$; Fig. 2C, $H(3) = 15.009$, $P = 0.002$, respectively; Kruskal–Wallis test followed by Dunn's *post hoc*). Although 1.5 mg/mL *C. serrata* *n*-hexane extract did not significantly inhibit AChE activity in brain areas, differently from *R. microplus* larvae, a similar profile was observed.

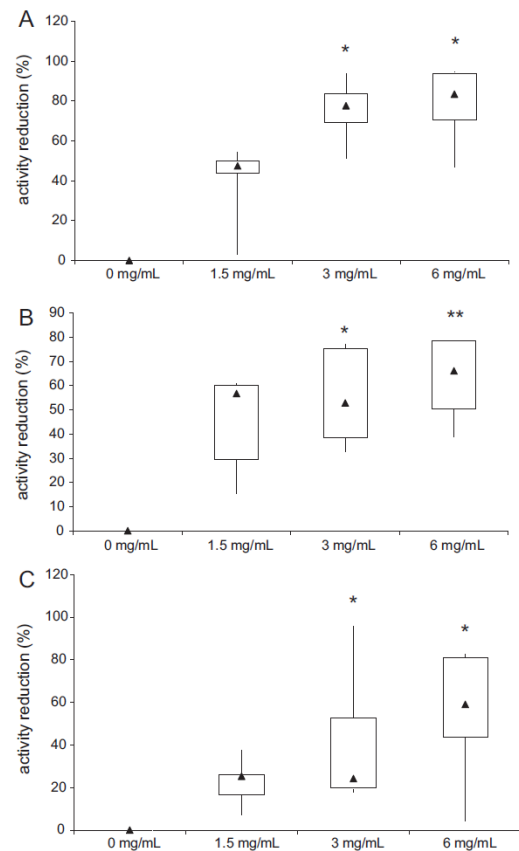


Fig. 2. Effect of *n*-hexane extract (1.5, 3 and 6 mg/mL) of *Calea serrata* in brain structures of rats: (A) frontal cortex, (B) striatum and (C) hippocampus. AChE activity reduction (as percentage of the control group) after 60 min of incubation. The results were expressed as median, 25th percentile, 75th percentile, minimum and maximum values. Kruskal–Wallis followed by Dunn test; *values significantly different from corresponding control group; $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

4. Discussion

Our results indicated that the *n*-hexane extract of *C. serrata* possess inhibitory activities against AChE. The cholinergic system has been recognized as a target for acaricides since organophosphates are potent tick control agents (Lees and Bowman, 2007). Our data suggest that the *n*-hexane extract of *C. serrata* acts as an AChE inhibitor.

The AChE inhibition in the larvae of this tick was significant at all three concentrations tested (1.5, 3 and 6 mg/mL). The data obtained in this work could explain, at least in part, results obtained by Ribeiro et al. (2008), where the acaricidal activity on larvae of *R. microplus* was tested in similar concentrations. The *n*-hexane extract of *C. serrata* induced 80% and 100% of lethality of *R. microplus* at concentrations of 3.12 and 6.25 mg/mL, respectively, in the larval immersion test (LIT), while 1.56 mg/mL did not exhibit any activity (Ribeiro et al., 2008). Although *in vitro* AChE

inhibition occurred at the concentration of 1.5 mg/mL, such concentration could not be sufficient to kill *R. microplus* larvae in *in vivo* bioassay. The authors hypothesized that the extract toxicity was associated with the presence of precocene II, the major component of the extract, this was revealed first in *C. serrata* lipophilic extract by Steinbeck et al. (1997). In the LIT carried out with the isolated precocene II, this compound killed approximately 50% of the larvae at the concentration of 1.56 mg/mL (Ribeiro et al., 2011). On the other hand, the essential oil of *C. serrata* containing approximately 30% precocene II, which was more active in the LIT than the purified precocene II. Thus, the acaricidal activity of the essential oil may be a result of a synergistic effect of precocene II and other compounds, such as the sesquiterpenes, that are present in the oil (Ribeiro et al., 2011).

Sesquiterpene hydrocarbons were detected in this essential oil, including germacrene D (26.4%), β -selinene (10.0%) and bicyclogermacrene (7.4%) (Ribeiro et al., 2011). Previous studies have shown that monoterpenes and sesquiterpenes can act as cholinesterase inhibitors (Loizzo et al., 2008, 2010).

Savelev et al. (2003) described a complex interaction between terpenoid constituents of *Salvia lavandulaefolia*, which can be either synergistic or antagonistic interactions when tested against on AChE activity. The authors suggested that these interactions differ depending on absolute concentrations as well as ratios between the agents. It is important to note that germacrene D has demonstrated larvicidal activity against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* (Kiran et al., 2006). Besides, Bruce et al. (2005) observed that germacrene at the levels found within the oil of *Hemizygia petiolata* inhibited the aphid alarm pheromone activity in both *Acyrtosiphon pisum* and *Myzus persicae*. In addition, the essential oil of *Salvia chionantha* demonstrated mild acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity (Tel et al., 2010) and germacrene D was found to be the major compound in the essential oil of this plant species (Bagci and Koçak, 2008).

Interestingly, cholinesterase inhibition is a mechanism of action of organophosphorus compounds, these can lead to intoxication characterized by physical and neurobehavioral symptoms, such as depression, anxiety, and cognitive impairments (Salvi et al., 2003). Organophosphorus compounds irreversibly central and peripherally inhibit AChE activity resulting in stimulation of cholinergic synapses (Carr et al., 2001). Considering that *C. serrata* *n*-hexane extract inhibited *in vitro* AChE of all tested brain areas from Wistar rats, we can suggest cholinergic side-effects of this extract and its consequently toxicity in mammals. Although *in vivo* studies of *C. serrata* *n*-hexane extract or their individual compounds are necessary in order to confirm the mammal toxicity, since processes of absorption may interfere on xenobiotic effects. On the other hand, inhibition of AChE is an important approach in the management for Alzheimer's disease, senile dementia, ataxia, myasthenia gravis and Parkinson's disease (Brenner, 2000; Rahman and Choudhary, 2001). Accordingly, the discovery of new molecules from plants can be a potential therapeutic strategy for the prevention and treatment of AD.

To the best of our knowledge, we herein report the first findings on cholinesterase inhibitory activity of *C. serrata*. The *n*-hexane extract of *C. serrata* inhibited AChE activity on the larvae of *R. microplus* and in brain structures of rats. We can suppose that this effect may be related to its ticks toxicity. Moreover, the chemistry is not exhausted at this point and it is important to find out what or which substances are responsible for inhibitory AChE properties of *n*-hexane extract from *C. serrata*. Additionally, *in vivo* studies, using both ticks and mammals, must be performed.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Dr. I.R. Siqueira, 2010; Dr. G.L.V. Poser, 2010; C. Vanzella, 2010; J.C. Santos); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (F. Moysés, 2010).

References

- Addor, R.W., 1994. Insecticides. In: Godfrey, C.R.A. (Ed.), *Agrochemicals from Natural Products*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1–62.
- Baffi, M.A., Pereira, C.D., Souza, G.R.L., Ceron, C.R., Bonetti, C.R., 2007. Esterase profile in the postembryonic development of *Rhipicephalus microplus*. *Pesq. Agropec. Bras.* 42, 1183–1188.
- Bagci, E., Koçak, A., 2008. Essential oil composition of the aerial parts of two *Salvia* L. (*S. multicaulis* Vahl. Enum and *S. tricochlada* Benth.) species from East Anatolian Region (Turkey). *Int. J. Sci. Technol.* 3, 13–18.
- Baxter, G.D., Green, P., Stuttgen, M., Barker, S.C., 1999. Detecting resistance to organophosphates and carbamates in the cattle tick *Boophilus microplus*, with a propoxur-based biochemical test. *Exp. Appl. Acarol.* 23, 907–914.
- Bowers, W.S., Ohta, T., Cleere, J.S., Marsella, P.A., 1976. Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants: plants yield a potential fourth-generation insecticide. *Science* 193, 542–547.
- Brenner, G.M., 2000. *Pharmacology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Bruce, T.J.A., Birkett, M.A., Blande, J., Hooper, A.M., Martin, J.L., Khamba, B.P.S.B.P.S., Prosser, I., Smart, L.E., Wadhams, L.J., 2005. Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Manage. Sci.* 61, 1115–1121.
- Carr, R.L., Chambers, H.W., Guarisco, J.A., Richardson, J.R., Tang, J., Chambers, J.E., 2001. Effects of repeated oral postnatal exposure to chlorpyrifos on open-field behavior in juvenile rats. *Toxicol. Sci.* 59, 260–267.
- Castro-Janer, E., Martins, J.R., Mendes, M.C., Namindome, A., Klafke, G.M., Schumaker, T.T.S., 2010. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*) using *in vitro* larval bioassays. *Vet. Parasitol.* 173, 300–306.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andre, V., Featherston, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Galego, L.G.C., Ceron, C.R., Carareto, C.M.A., 2006. Characterization of esterases in a Brazilian population of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). *Genetica* 126, 89–99.
- Gonçalves, K., Toigo, E., Ascoli, B., Poser, G.V., Ribeiro, V.L.S., 2007. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. *Parasitol. Res.* 100, 1267–1270.
- Grisi, L.L., Massard, C.L., Moya-Borja, G.E., Pereira, G.B., 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet.* 21, 8–10.
- Isman, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 45–66.
- Kiran, S.R., Bhavani, K., Devi, P.S., Rao, B.R.R., Reddy, K.J., 2006. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresour. Technol.* 97, 2481–2484.
- Lees, K., Bowman, A.S., 2007. Tick neurobiology: recent advances and the post-genomic era. *Invertebr. Neurosci.* 7, 183–198.

- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Menichini, F., 2008. Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. *Curr. Med. Chem.* 15, 1209–1228.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Conforti, F., Menichini, F., Bonesi, M., Nadjaf, F., Frega, N.G., Menichini, F., 2010. *Salvia lerifolia* Benth (Lamiaceae) extract demonstrates *in vitro* antioxidant properties and cholinesterase inhibitory activity. *Nutr. Res.* 30, 823–830.
- Neese, P.A., Sonenshine, D., Kallapur, V.L., Apperson, C.S., Roe, R.M., 2000. Absence of insect juvenile hormones in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae), and in *Ornithodoros parkeri* Cooley (Acari: Argasidae). *J. Insect Physiol.* 46, 477–490.
- Pamo, T.E., Tendongkeng, F., Kana, J.R., Tenekeu, G., Tapondjou, A., Khan Payne, V., 2004. The acaricidal effect of the essential oil of *Ageratum houstonianum* Mill. Flowers on ticks (*Rhipicephalus lunulatus*) in Cameroon. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34, 244–247.
- Rahman, A., Choudhary, M.I., 2001. Bioactive natural products as a potential source of new pharmacophores. A theory of memory. *Pure Appl. Chem.* 73, 555–560.
- Rees, H.H., 2004. Hormonal control of tick development and reproduction. *Parasitology* 129, 127–143.
- Ribeiro, V.L.S., Avancini, C., Gonçalves, K., Toigo, E., Poser, G.V., 2008. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* 151, 351–354.
- Ribeiro, V.L.S., Santos, J.C., Martins, J.R., Schripsema, J., Siqueira, I.R., Poser, G.L.V., Apel, M.A., 2011. Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 179, 195–198.
- Roulston, W.J., Schuntner, C.A., Schnitzerling, H.J., 1966. Metabolism of coumaphos in larvae of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust. J. Biol. Sci.* 19, 619–633.
- Salvi, R.S., Lara, D.R., Ghisol, E.S., Portela, L.V., Dias, R.D., Souza, D.O., 2003. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate. *Pest. Toxicol. Sci.* 72, 267–271.
- Savelev, S., Okello, E., Perry, N.S., Wilkins, R.M., Perry, E.K., 2003. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 661–668.
- Seixas, A., Oldiges, D.P., Vaz, I.S., Termignoni, C., 2010. Endocrinologia e controle da vitelogenese em carrapatos. *Acta Sci. Vet.* 38, 95–111.
- Simões, C.M.O., Mentz, L.A., Schenkel, E.P., Amoros, M., Girre, L., 1990. Ethnopharmacologie: sources, methodes, objectifs. Actes du 1er Colloque Européen d'Ethnopharmacologie. Mets, Orston, 192–198.
- Steinbeck, C., Spitzer, V., Starosta, M., Poser, G.V., 1997. Identification of two chromenes from *Calea serrata* by semiautomatic structure elucidation. *J. Nat. Prod.* 60, 627–628.
- Tan, F., Wang, L., Wang, J., Wu, X., Zhu, H., Jiang, L., Tao, S., Zhao, K., Yang, Y., Tang, X., 2011. Enhanced pesticide sensitivity of novel housefly acetylcholinesterases: a new tool for the detection of residual pesticide contamination. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34, 305–314.
- Tel, G., Öztürk, M., Duru, M.E., Harmandar, M., Topçu, G., 2010. Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food Chem. Toxicol.* 48, 3189–3193.
- Vendruscolo, G.S., Mentz, L.A., 2006. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia: Série Botânica* 61, 83–103.

CAPÍTULO 3 – Effect of *Calea serrata* on Glutathione S- transferase activity of larvae from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Artigo submetido à revista **Veterinary Parasitology**, segundo normas em anexo (ANEXO I).

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary Parasitology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Effect of *Calea serrata* on Glutathione-S-transferase activity of larvae from *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

Article Type: Short Communication

Keywords: Glutathione-S-transferase; *Calea serrata*; n-hexane extract; *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*; larvae.

Corresponding Author: Dr. Ionara Rodrigues Siqueira,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Vera Lucia S Ribeiro

Order of Authors: Vera Lucia S Ribeiro; Karine Bertoldi; Felipe S Moysés; Christiano Spindler; João Ricardo S Martins; Gilsane L von Poser; Ionara Rodrigues Siqueira

Cover Letter

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Porto Alegre, April 23th 2012.

To Editor - Veterinary Parasitology

Dear Editor,

We are submitting our paper "Effect of *Calea serrata* on Glutathione-S-transferase activity of larvae from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*" by Ribeiro et al. to Veterinary Parasitology. All authors inform that any conflict of interest exist.

Sincerely,

Ionara Rodrigues Siqueira

Manuscript

1

1 Veterinary Parasitology

2

3 **Effect of *Calea serrata* on Glutathione-S-transferase activity of larvae from**4 ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

5

6 Vera Lucia Sardá Ribeiro^a, Karine Bertoldi^b, Felipe dos Santos Moysés^b, Christiano7 Spindler^b, João Ricardo Souza Martins^c, Gilsane Lino von Poser^d, Ionara Rodrigues8 Siqueira^{a,b*}

9

10 ^aPPG Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos,

11 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

12 ^bPPG Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500,

13 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

14 ^cLaboratório de Parasitologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor,

15 Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do Estado do Rio Grande do Sul,

16 Estrada Municipal do Conde, 6000, 92990-000, Eldorado do Sul, RS, Brazil

17 ^dDepartamento de Produção de Matéria Prima, Universidade Federal do Rio Grande do

18 Sul, Porto Alegre, Avenida Ipiranga, 2752 sala 505A, 90610-000, Porto Alegre, RS,

19 Brazil

20

21

22 * Corresponding Author: Ionara Rodrigues Siqueira, Departamento de Farmacologia,

23 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202, 90050-

24 170, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 3308 3121; E-mail: ionara@ufrgs.br

25 **Abstract**

26 Extensive use of acaricide has induced resistance in *Rhipicephalus (Boophilus)*
27 *microplus*, which can be related to higher activity of detoxification enzymes, such as
28 glutathione-S-transferase (GST). Natural products have been poorly explored for GST
29 inhibition property. Hexane extract of *Calea serrata* Less. (Asteraceae) has acaricidal
30 properties on larvae of *R. microplus*, which it was related to its acetylcholinesterase
31 inhibition activity. Our aim was to investigate the effect of *C. serrata* on GST activity
32 of larvae from *R. microplus*. Different concentrations of extract *C. serrata* (0; 0.5; 1.0;
33 1.5 and 3.0 mg/ml) were incubated with homogenized larvae. The effect of this extract
34 on GST enzyme activity was determined, using 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) as
35 substrate. The *n*-hexane extract of *C. serrata* (3.0 mg/mL) inhibited significantly GST
36 activity when compared with the control. Compounds of *n*- hexane extract from *C.*
37 *serrata* may be potential inhibitors of glutathione-S-transferase, which may contribute
38 to its tick toxicity. Considering that higher GST activities would reduce the efficiency
39 of the pesticides, we can also suppose that *C. serrata* may be at least used as an
40 adjuvant in tick control.

41

42

43

44

45

46

47

48 **Keywords:** Glutathione-S-transferase, *Calea serrata*, *n*-hexane extract, *Rhipicephalus*
49 (*Boophilus*) *microplus*, larvae.

50 1. Introduction

51 The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) is a
52 hematophagous parasite that constitutes a major barrier to economic production of beef
53 and dairy cattle. This tick species is responsible for annual losses of 2 billion dollars in
54 Brazil (Grisi et al., 2002). A great body of evidences has demonstrated resistance in
55 several tick populations, including in *R. microplus*, to all currently used
56 organophosphates (Villarino et al., 2002). Pyrethroid resistance has been detected in a
57 Brazilian strain of *R. microplus* (Baffi et al., 2005).

58 The molecular basis of insect resistance to chemical insecticides/acaricides has been
59 widely studied. Pesticide resistance is a dynamic process resulting from multiple
60 mechanisms, including mutations, gene amplification, and post-translational
61 modifications, which contribute to the overexpression and enhanced activity of
62 detoxifying enzymes, such as glutathione S-transferases (GSTs). Resistance mediated
63 by complex multi-gene enzyme systems, such as esterases, cytochrome P450s and
64 GSTs, has been elucidated (Enayati et al., 2010). GSTs are enzymes involved in the
65 metabolic detoxification of a wide range of xenobiotics and endogenous electrophilic
66 compounds. GSTs catalyze the conjugation of glutathione (GSH) to xenobiotics,
67 including acaricides, producing water-soluble metabolites more easily excreted (Vontas
68 et al., 2001). Interestingly, this enzyme is considered as a candidate target for an anti-
69 parasite vaccine (Parizi et al., 2011), since its action on acaricide/insecticide
70 detoxification in arthropods is widely described (Wei et al., 2001). It has been
71 considered relevant to identify potential new acaricide compounds that can increase the
72 sensitivity of the ticks.

73 Recently, we demonstrated the acaricidal activity of n-hexane extract of *Calea serrata*
74 Less. (Asteraceae) (Ribeiro et al., 2008; Ribeiro et al., 2011). The cholinergic system

75 has been recognized as a target for acaricides and this extract possesses inhibitory
76 activities against AChE. Then, it has been suggested that acaricide properties can be
77 related at least in part to inhibition of acetylcholinesterase induced by hexane extract of
78 *C. serrata* (Ribeiro et al., submitted). Our aim was to investigate the effect of *Calea*
79 *serrata* on GST activity of larvae from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

80

81 2. Materials and methods

82 2.1. Plant material and Preparation of the n-hexane extract

83 Plant material of *C. serrata* (leaves and stems) was collected in Porto Alegre, Rio
84 Grande do Sul, Brazil. The plant was identified by Sérgio Bordignon (Departamento de
85 Botânica, Centro Universitário La Salle). The voucher specimen (ICN 124883) was
86 deposited in the Herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Air dried
87 and powdered plant material (200 g) was processed by maceration with n-hexane [1:10
88 (w/v)]. The n-hexane extract of *C. serrata* was thoroughly solubilized in ethanol (90%).
89 Previous studies demonstrated that ethanol at the final concentration employed did not
90 induce lethality in the larvae of *R. microplus* (Goncalves et al., 2007).

91

92 2.2. Ticks

93 *R. microplus* ticks of a susceptible reference strain (Mozzo strain) were provided by
94 Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor. Females were incubated at 27°C
95 and 70–80% relative humidity for 14 days to obtain eggs. For assays, 10-day-old larval
96 ticks were used.

97

98 2.3. Determination of GST activity

99 Pools of 100 mg of *R. microplus* larvae were homogenized (1:10) in ice-cold 100 mM
100 Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.5% Triton-X 100 and the homogenate was
101 centrifuged for 5 min at 4°C. Different concentrations of extract *C. serrata* (0; 0.5; 1.0;
102 1.5 and 3.0 mg/mL) were incubated with supernatant for 30 min at 25° C, and GST
103 enzyme activity was determined using 1-choro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) as
104 substrate, according to the method of Habig *et al.* (1974) .

105

106 2.4. Statistics

107 Data was expressed as median (25th/75th percentiles). The data distribution pattern was
108 evaluated by the test of normality (Kolmogorov-Smirnov). The Kruskal-Wallis followed
109 by Dunn's test was employed considering data distribution. Differences were considered
110 as significant at $p < 0.05$.

111

112 3. Results and Discussion

113 The effect of n-hexane extract *Calea serrata* on GST activity is shown in Fig 1. This
114 extract at 3.0 mg/mL significantly reduced GST activity when compared with the
115 control (0 mg/mL) (KW=12.45, $p=0.0143$).

116 We can suppose that compounds with GST activity inhibition property on *R. microplus*
117 larvae may cause an insufficient conjugation of electrophiles and detoxication of
118 acaricides increasing the time of the active compounds on site of action. Recently, it has
119 been suggested that enzyme acetylcholinesterase inhibition may be related to acaricide
120 activity from n-hexane extract of *C. serrata* (Ribeiro *et al.*, submitted). It is interestingly
121 to note that the use of plants on ticks control develops slowly resistance because there is
122 usually a mixture of different active agents with different mechanisms of action (Olivo
123 *et al.*, 2008).

124 Although the involvement of GSTs in acaricide resistance in ticks has been reported in
125 *R. appendiculatus* (da Silva Vaz Jnr et al., 2004). He and colleagues (1999) did not find
126 differences in cDNA sequences and GST mRNA levels between untreated tick larvae
127 from the susceptible and the acaricide resistant strains of our tick species.

128 Additionally, up regulated expression of GSTs have been associated with insect
129 resistance to insecticides particularly, the organophosphorus compounds (Hemingway et
130 al., 2004), it is possible that this extract can also contribute as a strategy to increase the
131 efficiency of insecticides products (El-Demerdash, 2011), especially in situations of
132 resistance. In the most highly resistant population, GST activity was >5 times higher
133 than in the susceptible strain. GSTs are involved in detoxification of different
134 xenobiotics including insecticides in many insects including *Musca domestica*,
135 *Anopheles* spp. and *Aedes aegypti* (Enayati et al., 2005). However, further studies are
136 needed to explore its potential interaction with insecticides.

137 The information on GST in the order Acari is very limited, comparison of the amino
138 acid sequence of the tick GST with mammalian or insect GSTs from the Genbank
139 database shows that the tick GST is most closely related to the mammalian mu class and
140 most divergent from the insect GSTs which are closely related to the theta class
141 (Shahein et al., 2008). It is interesting to note that the substrate CDNB is not class
142 specific and can interact with alpha, mu, pi and sigma GSTs (Takamatsu and Inaba,
143 1994) but not to class theta GST (Meyer et al., 1991).

144 On the other hand, inhibition of GSTs is an important approach in the management on
145 resistance of tumor cells against chemotherapeutic agents (Hansson et al., 1991). It has
146 been postulated that increased GST expression and therefore enhanced GST-mediated
147 conjugation of anticancer drugs have been suggested as mechanism of drug resistance

148 (Hansson et al., 1991; Horton et al., 1999). Accordingly, the discovery of new
149 molecules can be a potential adjuvant strategy for the use in cancer chemomodulation.
150 Present findings suggest that compounds of hexane extract from *C. serrata* may be
151 inhibitor of glutathione-S-transferase. Our result suggests that *C. serrata* compounds
152 may contain GST inhibitors, being a potential strategy in management to resistance
153 insecticides/acaricides and may be an adjuvant in tick control.

154

155 **Conflict of interest**

156 The authors declare that there are no conflicts of interest.

157

158 **References**

- 159 Baffi, M.A., Pereira, C.D., Souza, G.R.L., Bonetti, A.M., Ceron, C.R., Gourlart, L.R.,
160 2005. Esterase profile in a pyrethroid-resistant Brazilian strain of the cattle tick
161 *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae). *Genet. Mol. Biol.* 28, 749-753.
- 162 da Silva Vaz Jr, I., Imamura, S., Ohashi, K., Onuma, M., 2004. Cloning, expression
163 and partial characterization of a *Haemaphysalis longicornis* and a *Rhipicephalus*
164 *appendiculatus* glutathione S-transferase. *Insect. Mol. Biol.* 13, 329-335.
- 165 El-Demerdash, F.M., 2011. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase
166 in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food*
167 *Chem. Toxicol.* 49, 1346-1352.
- 168 Enayati, A., Asgarian, F., Amouei, A., Sharif, M., Mortazavi, H., Boujhmehrani, H.,
169 Hemingway, J., 2010. Pyrethroid insecticide resistance in *Rhipicephalus bursa*
170 (Acari, Ixodidae). *Pestici. Biochem. Phys.* 97, 243-248.

- 171 Enayati, A., Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Insect glutathione transferases and
172 insecticide resistance. *Insect. Mol. Biol.* 14, 3-8.
- 173 Goncalves, K., Toigo, E., Ascoli, B., von Poser, G., Ribeiro, V.L., 2007. Effects of
174 solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus*
175 *microplus*. *Parasitol. Res.* 100, 1267-1270.
- 176 Grisi, L., L., M.C., Moya-Borja, G.E., Pereira, J.B., 2002. Impacto econômico das
177 principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet.* 21, 8-10.
- 178 Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first
179 enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- 180 Hansson, J., Berhane, K., Castro, V.M., Jungnelius, U., Mannervik, B., Ringborg, U.,
181 1991. Sensitization of human melanoma cells to the cytotoxic effect of
182 melphalan by the glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid. *Cancer Res.*
183 51, 94-98.
- 184 He, H., C Chen, A., B Davey, R., Wayne Ivie, G., George, J.E., 1999. Characterization
185 and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick,
186 *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Molec.* 29, 737-743.
- 187 Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of
188 insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Molec.* 34, 653-665.
- 189 Horton, J.K., Roy, G., Piper, J.T., Van Houten, B., Awasthi, Y.C., Mitra, S., Alaoui-
190 Jamali, M.A., Boldogh, I., Singhal, S.S., 1999. Characterization of a
191 chlorambucil-resistant human ovarian carcinoma cell line overexpressing
192 glutathione S-transferase mu. *Biochem. Pharmacol.* 58, 693-702.
- 193 Meyer, D.J., Coles, B., Pemble, S.E., Gilmore, K.S., Fraser, G.M., Ketterer, B., 1991.
194 Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man.
195 *Biochem. J.* 274, 409.

- 196 Olivo, C.J., Carvalho, N.M., Silva, J.H.S., Vogel, F.F., Massariol, P., Meinerz, G.,
197 Agnolin, C., Morel, A.F., Viau, L.V., 2008. Citronella oil on the control of cattle
198 ticks. *Cienc. Rural* 38, 406-410.
- 199 Parizi, L.F., Utiumi, K.U., Imamura, S., Onuma, M., Ohashi, K., Masuda, A., 2011.
200 Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase
201 reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Exp.*
202 *Parasitol.* 127, 113-118.
- 203 Ribeiro, V.L.S., Avancini, C., Gonçalves, K., Toigo, E., von Poser, G., 2008. Acaricidal
204 activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and
205 *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* 151, 351-354.
- 206 Ribeiro, V.L.S., dos Santos, J.C., Martins, J.R., Schripsema, J., Siqueira, I.R., von Poser,
207 G.L., Apel, M.A., 2011. Acaricidal properties of the essential oil and precocene
208 II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus*
209 (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 179, 195-198.
- 210 Ribeiro, V.L.S., Vanzella, C., Moysés, F.S., Santos, J.C., Martins, J.R.S., von Poser,
211 G.L., Siqueira, I.R., submitted. Effect of *Calea serrata* Less. n-hexane extract on
212 acetylcholinesterase of larvae ticks and brain Wistar rats. *Vet. Parasitol.*
- 213 Shahein, Y.E., El-Hakim, A.E.S., Abouelella, A.M.K., Hamed, R.R., Allam, S.A.M.,
214 Farid, N.M., 2008. Molecular cloning, expression and characterization of a
215 functional GSTmu class from the cattle tick *Boophilus annulatus*. *Vet. Parasitol.*
216 152, 116-126.
- 217 Takamatsu, Y., Inaba, T., 1994. Inter-individual variability of human hepatic glutathione
218 S-transferase isozymes assessed by inhibitory capacity. *Toxicology* 88, 191-200.

- 219 Villarino, M.A., Gale Wagner, G., George, J.E., 2002. In vitro detection of acaricide
220 resistance in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 28, 265-
221 271.
- 222 Vontas, J.G., Small, G.J., Hemingway, J., 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant
223 defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.*
224 357, 65.
- 225 Wei, S., Clark, A., Syvanen, M., 2001. Identification and cloning of a key insecticide-
226 metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-
227 resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem. Molec.* 31,
228 1145-1153.
- 229
- 230
- 231

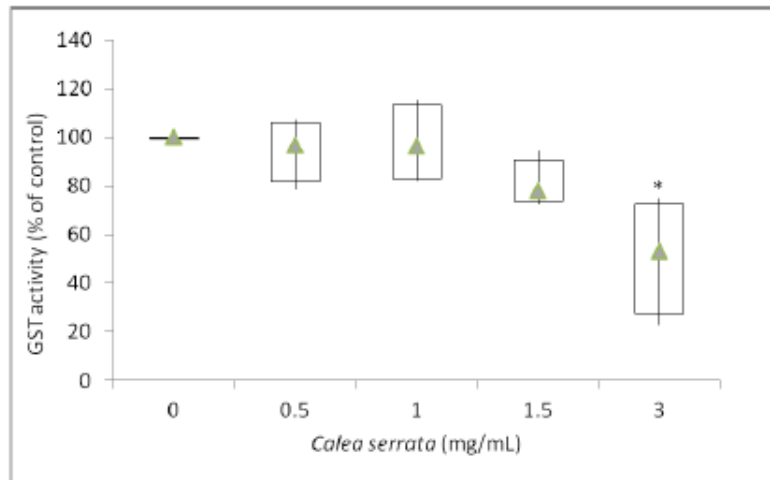
232 **Figure captions:**

233

234 Figure 1. Effect of *n*-hexane extract (0.5; 1.0; 1.5 and 3 mg/mL) of *Calea serrata* on
235 GST activity in the larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* after 30 min of
236 incubation. The GST activities are expressed as percentage of the control group. Data
237 are expressed as median (25th/75th percentiles) and analyzed by Kruskal–Wallis
238 followed by Dunn test; * = values significantly different from corresponding control
239 group, * $p = 0.0143$.

240

Figure



3 DISCUSSÃO

Do ponto de vista econômico, no Brasil o carrapato *R. microplus* é sem contestação o principal parasito dos bovinos, já que os danos decorrentes de seu parasitismo se refletem nos índices produtivos desses animais, causando prejuízos econômicos que são estimados em 2 bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2002). O método mais usado para o controle desse carrapato é a aplicação de produtos químicos nos animais durante a fase parasitária, porém, o controle baseado exclusivamente em produtos químicos, torna-se cada vez mais difícil, devido à capacidade dos mesmos de selecionar populações de carrapatos resistentes. A partir da década de 1950, com o surgimento de problemas relativos à resistência aos produtos arsenicais, uma sucessão de produtos com bases acaricidas diferentes foram surgindo no mercado mundial para fazer frente aos problemas da resistência (GONZALES, 2003). Isto obriga os pesquisadores a buscarem continuamente métodos alternativos de controle e aplicá-los de forma integrada no combate ao *R. microplus*. Contudo, a toxicidade de uma substância química em carrapatos não a qualifica necessariamente como um carrapaticida. Diversas propriedades devem estar associadas à atividade, tais como eficácia mesmo em baixas concentrações, ausência de toxicidade frente a mamíferos e animais superiores, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não ser cumulativa no tecido adiposo humano e de animais domésticos (CORDOVÉS, 1996). Fica evidente que as características citadas referem-se àquele carrapaticida tido como ideal.

Cabe destacar que formulações parasiticidas de origem vegetal permitem a expansão de sistemas produtivos orgânicos, podendo ser usadas também como um complemento terapêutico em sistemas produtivos convencionais (VIEIRA;

CAVALCANTE, 1999; OLIVO et al., 2009). O óleo emulsionável de Neem, em concentração a 2%, demonstrou significativo potencial adjuvante no controle do carrapato bovino, pois, além de ocasionar a mortalidade das fêmeas ingurgitadas, nos primeiros dias após o tratamento, interfere na sua reprodução, mostrando ser uma alternativa aos carrapaticidas normalmente utilizados (FORTI BROGIO-MICHELLETTI et al., 2010). Como as plantas possuem vários compostos ativos, com diferentes mecanismos de ação, agindo sinergicamente, sugere-se que os extratos brutos de plantas poderiam induzir menor resistência (BALANDRIN et al., 1985; CHAGAS et al., 2003; OLIVO et al., 2009).

Nosso trabalho corrobora a hipótese de que as plantas podem ser importantes fontes de compostos carrapaticidas. Recentemente, demonstramos que o extrato *n*-hexano de *C. serrata* possui atividade larvicida em *R. microplus* (RIBEIRO et al., 2008). Neste caso, a referida atividade foi atribuída à presença de cromenos (eupatoriocromeno e precoceno II), mostrados anteriormente como os seus principais componentes através de análise fitoquímica em extratos lipofílicos (STEINBECK et al., 1997). Corroborando com esta hipótese, podemos citar os estudos efetuados por Pamo et al. (2004; 2005), os quais verificaram um efeito carrapaticida do óleo essencial obtido de flores de *Ageratum houstonianum* sobre *R. lunulatus*, atribuindo tal toxicidade aos cromenos ou a uma ação sinérgica entre estes compostos e outros constituintes do óleo essencial.

É interessante destacar que o óleo essencial de *C. serrata* apresentou atividade larvicida em *R. microplus*, sendo mais ativo do que o extrato *n*-hexano e que o precoceno II isolado de *C. serrata*. Assim, podemos sugerir um efeito sinérgico entre o precoceno II e os demais componentes do óleo. Os óleos essenciais são

originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (GONÇALVES et al., 2003; SILVA et al., 2003). Viegas Jr. (2003), destaca alguns compostos naturais bioativos com atividade inseticida/ acaricida, a citar o piretro, nicotina, rotenona e azadiractina, isolados a partir das espécies, respectivamente, *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Trev.) Vis., *Nicotiana tabacum* L., *Derris* sp. e *Azadirachta indica* A. Juss., o que reforça a importância do estudo fitoquímico de plantas bioativas.

No óleo essencial de *C. serrata*, além do precoceno II, 18 outros compostos foram identificados, sendo a maioria do grupo dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Após o precoceno II (29,6%), os principais compostos identificados foram germacreno D (26,4%), β -selineno (10%) e biciclogermacreno (7,4%). Dentre os constituintes identificados neste óleo, o germacreno D já demonstrou atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* (KIRAN et al., 2006) e inibição da atividade do ferormônio de alarme em afídeos (BRUCE et al., 2005).

Em insetos, o precoceno II pode afetar o sistema endócrino, agindo como antagonistas do hormônio juvenil (BOWERS et al., 1976; PAMO et al., 2004), porém em carrapatos, não está comprovada a ocorrência deste hormônio ou molécula com efeito semelhante (NEESE et al., 2000). Na busca do mecanismo de ação, verificamos a modulação do extrato *n*-hexano de *C. serrata* sobre a atividade da AChE de larvas de *R. microplus*, visto que a ACh parece ser um importante neurotransmissor do sistema nervoso dos carrapatos e a AChE é um dos principais alvos dos acaricidas OFs. O extrato *n*-hexano de *C. serrata* inibiu a AChE de larvas de *R. microplus*, demonstrando produzir um efeito dose-dependente nas

concentrações testadas. Estudos prévios têm mostrado que tanto hidrocarbonetos monoterpênicos como os sesquiterpênicos podem apresentar um efeito inibitório sobre AChE (LOIZZO et al., 2008; 2010). Além disso, Savelev et al. (2003) descreveram uma complexa interação entre os constituintes terpenóides de *Salvia lavandulaefolia*, sendo que tais componentes podem produzir tanto efeitos sinergistas como antagonistas sobre a atividade da AChE, dependendo da concentração e da proporção entre eles. Assim, além da avaliação de cada fração isolada, há necessidade de se verificar quais componentes podem ainda atuar como sinergistas do precoceno II.

Os inseticidas/ acaricidas organofosforados são conhecidos por causar efeitos tóxicos diretos nos seres humanos e em outros mamíferos, o qual ocorre pela inibição da atividade da AChE provocando o acúmulo de ACh na fenda sináptica do sistema nervoso autônomo, no sistema nervoso central e na junção neuromuscular, induzindo efeitos periféricos e centrais, decorrente da estimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos. A inibição da atividade da AChE em mais de 30-50% geralmente produz os sinais clássicos e bem-estabelecidos da crise colinérgica aguda (ECOBICHON, 2001), os quais podem progredir e ocasionar paralisia respiratória periférica e central, responsáveis pelas mortes associadas a intoxicação pelos organofosforados.

A maioria dos compostos organofosforados é altamente solúvel em lípidos, sendo facilmente absorvidos a partir da pele, mucosas orais, conjuntiva, sistema gastrintestinal e respiratório. O início, a gravidade e duração da intoxicação são determinados pela dose, via de exposição, propriedades físico-químicas destes compostos, taxa de biotransformação e se o envelhecimento da AChE fosforilada ocorre rapidamente (KARALLIEDDE; EDWARDS e MARS, 2003). Estudos recentes

revelaram que o estresse oxidativo pode ser um componente importante do mecanismo de intoxicação dos organofosforados (ALTUNTAS et al., 2004; DANDAPANI et al., 2003; BÜYÜKOKUROĞLU et al., 2008a,b). Compostos organofosforados podem causar estresse oxidativo levando a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e alterações no sistema antioxidante e na sua eliminação (MILATOVIC, GUPTA e ASCHNER, 2006).

O sistema colinérgico é uma das mais importantes vias de modulação do SNC, estando envolvido em várias funções vitais como aprendizado, memória, motivação, recompensa, fluxo sanguíneo cerebral e processamento sensorial e motor (MESULAM et al., 2002; SOFUOGLU e MOONEY, 2009). Salvi et al. (2003) realizaram avaliações clínicas, neuropsiquiátricas e laboratoriais em fumicultores e evidenciaram que a exposição crônica a baixos níveis de organofosforados pode produzir sintomas neuropsiquiátricos, mesmo em níveis normais de atividade da enzima acetilcolinesterase.

O extrato *n*-hexano de *C. serrata* nas concentrações testadas também inibiu a atividade *in vitro* da AChE em estruturas cerebrais (córtex frontal, estriado e hipocampo) de ratos Wistar, apresentando diferença significativa em relação ao controle nas concentrações de 3,0 e 1,5 mg/mL. Com isso podemos sugerir que o extrato *n*-hexano de *C. serrata* possa causar efeitos colaterais colinérgicos e em consequência ser tóxico para os mamíferos, contudo ensaios *in vivo* devem ser realizados. Com isso, estudos *in vivo* com o extrato *n*-hexano de *C. serrata* e seus compostos individuais são necessários para confirmar a sua toxicidade para os mamíferos, pois dependendo de alguns fatores, como por exemplo, da via de

absorção, os acaricidas inibidores da AChE podem interferir no metabolismo e excreção e em consequência na toxicidade do extrato.

Por outro lado, a hipofunção colinérgica tem sido associada a prejuízos cognitivos característicos de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer. Assim o tratamento com inibidores da AChE, que aumenta os níveis de ACh, é a principal estratégia no manejo da Doença de Alzheimer (BALLARD et al., 2005).

A AChE é um alvo efetivo para os acaricidas organofosforados e carbamatos. Alterações estruturais na AChE, resultando na insensibilidade da enzima é um importante mecanismo para o desenvolvimento de resistência (FOURNIER e MUTÉRO, 1994). Além da insensibilidade da enzima alvo, enzimas de detoxicação também colaboram para a tolerância aos acaricidas. A detoxicação de xenobióticos se dá normalmente em duas fases. A fase I consiste em reações de oxidação, redução ou hidrólise, e os produtos formados são em geral mais reativos que os iniciais. A fase II consiste na conjugação destas substâncias reativas, provenientes da fase I, a fim de serem eliminadas do organismo como substâncias inertes (SIROKÁ e DRASTICHOVÁ, 2004). O citocromo P450 (CYP450) representa a principal via metabólica de biotransformação da Fase I, através de suas mais de 500 isoenzimas e fazem parte do sistema de oxidases de função múltipla (LIN e LU, 1998).

A glutatona S-transferase (GST) é uma enzima essencial para a proteção aos danos de compostos potencialmente reativos, conjugando-os para posteriormente serem eliminados do organismo (GEORGE, 1993; MARIONNET, DESCHAUX e REYNAUD, 2006). A GST catalisa a conjugação da glutatona

reduzida (GSH) a uma gama de substratos hidrofóbicos eletrofílicos, durante a fase II da biotransformação. Diversas GSTs foram caracterizadas, associadas à metabolização de compostos xenobióticos e toxinas. Além de participarem em processos de desintoxicação por formação de conjugados com a GSH, as GSTs possuem papel importante no metabolismo de produtos secundários, incluindo a estabilização de flavonóides; atuam com a peroxidase na redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcool durante o estresse oxidativo (DIXON e LAPHORN, 2002).

As GSTs são codificadas por uma superfamília de genes, cada uma produzindo isoenzimas com ampla especificidade de substratos. Apesar de catalisarem reações similares, as GSTs possuem pouca identidade de seqüência de aminoácidos, e estão presentes no citosol de muitas células catalisando a conjugação do tripeptídeo glutationa em uma variedade de compostos (RIOL et al., 2001). A atividade aumentada de GSTs possibilita que os xenobióticos e toxinas sejam mais rapidamente metabolizados e excretados, sendo sugerido em insetos como uma forma de resistência contra várias classes de inseticidas.

Neste trabalho, o extrato hexano de *C. serrata* inibiu *in vitro* significativamente a GST na concentração de 3,0 mg/mL nas larvas de *R. microplus*. Interessante destacar que a inibição da GST pode comprometer o processo de detoxicação do (s) composto(s) e assim aumentar os níveis intracelulares dos mesmos. No caso, também se verificou inibição da AChE nesta concentração. Assim, a inibição da AChE combinada com redução do processo de detoxicação do extrato *n*-hexano de *C. serrata* podem ser responsáveis pela sua toxicidade. Além disso, como extrato hexano de *C. serrata* inibiu a atividade da GST, é possível que este extrato também possa contribuir como uma estratégia para aumentar a

eficiência de outros produtos carrapaticidas (EL-DEMERDASH, 2011), especialmente em situações de resistência. No entanto, para permitir o uso deste extrato com os produtos convencionais, outros estudos serão necessários para explorar o seu potencial de interação com tais produtos e delinear os mecanismos de ação subjacentes.

3.1 Conclusões

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

1- O precoceno II isolado do extrato *n*-hexano demonstrou ser tóxico para as larvas de *R. microplus*;

2- O óleo essencial de *C. serrata* demonstrou ser tóxico para as larvas de *R. microplus*;

3- A maior toxicidade apresentada pelo óleo essencial sobre o precoceno II, isolado a partir do extrato *n*-hexano de *C. serrata*, em larvas de *R. microplus*, pode ser resultante de um efeito sinérgico do precoceno II com componentes sesquiterpênicos presentes no óleo essencial;

4- O extrato *n*-hexano de *C. serrata* inibiu a atividade da AChE de larvas de *R. microplus*, o que pode estar vinculado à atividade carrapaticida observada.

5- O extrato *n*-hexano de *C. serrata* inibiu a atividade da AChE de estruturas cerebrais de ratos Wistar, podendo induzir efeitos colaterais colinérgicos e sua consequente toxicidade em mamíferos.

6- O extrato *n*-hexano de *C. serrata* inibiu a atividade de GSTs em larvas de *R. microplus*, o que pode estar associado à toxicidade observada; podemos sugerir também que compostos deste extrato podem ser adjuvantes para aumentar a eficiência de outros produtos inseticidas/ carrapaticidas, especialmente em situações de resistência.

3.2 Perspectivas

A etapa seguinte deste trabalho consistirá na determinação da atividade acaricida dos constituintes do óleo essencial e associações, além da modulação das atividades da AChE e da GST por diferentes frações do extrato *n*-hexano. Estudos *in vivo* com o extrato *n*-hexano de *C. serrata* e seus compostos individuais poderão ser realizados aguda e cronicamente em ratos Wistar. Outros mecanismos de ação poderão ser investigados, destacamos estudos histopatológicos.

Referências

- ABREU JÚNIOR, R.; NIOR, H. **Práticas alternativas de controle de pragas e doenças na agricultura: coletânea de receitas**. Campinas: EMOPI, 1998. 115p.
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n.3, p.367-373, 2000.
- ALTUNTAS, I.; KILINC, I.; ORHAN, H.; DEMIREL, R.; KOYLU, H.; DELIBAS, N. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes *in vitro*. **Human and Experimental Toxicology**, v.23, n.1, p.9-13, 2004.
- ARENA, J.P.; LIU, K.K.; PARESS, P.S.; FRAZIER, E.G.; CULLY, D.F.; MROZIK, H.; SCHSAEFFER, J.M. The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. **Journal of Parasitology**, v.81, n.2, p.286-294, 1995.
- ARTHUR, D.R. **Ticks: A monograph of the Ixodoidea. On the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma*, *Boophilus* and *Margaropus***. London: Cambridge University Press, 1960. 250p.
- ATKINSON, P.W.; BINNINGTON, K.C.; ROULSTON, W.J. High monoamine oxidase activity in the tick *Boophilus microplus* and inhibition by chlordimeform and related pesticides. **Journal of the Australian Entomological Society**, v.13, n.3, p.207-210, 1974.
- AVANCINI, C.A.M. **Sanidade Animal na Agroecologia – Atitudes Ecológicas de Sanidade Animal e Plantas Medicinais em Medicina Veterinária**. Porto Alegre: Fundação Gaia, 1994. 46 p.
- BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER, W. H. Natural plant chemical: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v.228, n.4704, p.154-160, 1985.
- BALLARD, C.G.; GREIG, N.H.; GUILLOZET- BONGAARTS, A.L.; ENZ, A.; DARVESH, S. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. **Current Alzheimer Research**, v.2, n.3, p. 307-318, 2005.
- BAXTER, G.D.; BARKER, S.C. Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and resistant cattle ticks. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, n.7, p.815-820, 2002.
- BIRKETT, M.A.; CAMPBELL, C.A.M.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A.J.; MARTIN, J.L.; MATTHES, M.; NAPIER, J.A.; PETTERSSON, J.; PICKETTI, J.A.; POPPY, G.M.; POW, E.M.; PYE, B.J.; SMART, L.E.; WADHAMS, G.H.;

WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** (PNAS), v.97, n.16, p.9329-9334, 2000.

BISSINGER, B. W.; DONOHUE, K. V.; KHALIL, S. M. S.; GROZINGER, C. M.; SONENSHINE, D.E.; ZHU, J.; ROE, R.M. Synganglion transcriptome and developmental global gene expression in adult females of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Insect Molecular Biology**, v.20, n.4, p.465-491, 2011.

BOLZANI, V.S., YOUNG, M.C.M., FURLAN, M., CAVALHEIRO, A.J., ARAÚJO, A.R., SILVA, D.H., LOPES, M.N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v.71, n.2, p.181-187, 1999.

BOOTH, T.F. Effects of biogenic-amines and adrenergic drugs on oviposition in the cattle tick *Boophilus* - evidence for octopaminergic innervation of the oviduct. **Experimental and Applied Acarology**, v.7, n.4, p.259-266, 1989.

BORGES, L.M.F.; SOUSA, L.A.D.; BARBOSA, C.S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.2, p.89-96, 2011.

BOWERS, W.S.; OHTA, T.; CLEERE, J.S.; MARSELLA, P.A. Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants: plants yield a potential fourth-generation insecticide. **Science**, v.193, n.4253, p.542-547, 1976.

BRUCE, T.J.A.; BIRKETT, M.A.; BLANDE, J.; HOOPER, A.M.; MARTIN, J.L.; KHAMBAY, B.P.S; PROSSER, I.; SMART, L.E.; WADHAMS, L.J. Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. **Pest Management Science**, v.61, n.11, p.1115-1121, 2005.

BURG, I. C.; MAYER, P.H. **Alternativas ecológicas para prevenção e controle de pragas e doenças**. 17.ed. Francisco Beltrão, PR.: Grafit Gráfica e Editora Ltda., 2001. 153p.

BÜYÜKOKUROĞLU, M.E.; CEMEK, M.; TOSUN, M.; YÜRUMEZ, Y.; BAS, O.; YAVUZ, Y. Dantrolene may prevent organophosphate- induced oxidative stress and muscle injury. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.92, n.3, p.156-163, 2008a.

BÜYÜKOKUROĞLU, M.E.; CEMEK, M.; YÜRUMEZ, Y.; YAVUZ, Y. ; ASLAN, A. Antioxidative role of melatonin in organophosphate toxicity in rats. **Cell Biology and Toxicology**, v.24, n.2, p.151-158, 2008b.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa**. São Paulo: Ed. Melhoramentos, 1962. 305p.
CASIDA, J.E. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. **Chemical Research in Toxicology**, v.22, n.4, p.609-619, 2009.

CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Golden age of insecticide: Past, Present, or Future? **Annual Review of Entomology**, v. 43, p.1-16, 1998.

CASTRO-JANER, E.; MARTINS, J.R.; MENDES, M.C.; NAMINDOME, A., KLAFKE, G.M., SCHUMAKER, T.T.S. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using *in vitro* larval bioassays. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3-4, p.300-306, 2010.

CATTO, J.B; ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W. **Atualização sobre o controle estratégico do carrapato-do-boi**. Campo Grande: EMBRAPA- CNPGC, 2010. 6 p. (Comunicado Técnico, 123).

CHAGAS, A. C. S.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; PRATES, H.T.; PASSOS, W.M. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p.109-114, 2003.

CID, Y.P.; MAGALHÃES, V.S.; SILVA, D.D.; LAMBERT, M.M.; SCOTT, F.B. Eficácia *in vitro* de lactonas macrocíclicas sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.32, s.1, p.7-10, 2010.

CORDELL, G.A.Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v.40, n.6, p.1585-1612, 1995.

CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle e erradicação**. Alegrete: Gralha, 1996. 130p.

CULLY, D. F.; VASSILATIS, D. K.; LIU, K. K.; PARESS, P. S.; VAN DER PLOEG, L. H. T.; SCHAEFFER, J. M.; ARENA, J. P. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channels from *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v.371, n.6499, p.707–711, 1994.

DANDAPANI, M.; ZACHARIAH, A.; KAVITHA, M.R.; JEYASEELAN, L.; OOMMEN, A. Oxidative damage in intermediate syndrome of acute organophosphorous poisoning. **Indian Journal of Medical Research**, v.117, p.253-259, 2003.

DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E.; SNYDER, D.E. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle **Veterinary Parasitology**, v.99, n.1, p.41–52, 2001.

DEJERSEY, J., NOLAN, J., DAVE, P.A.; RICCLES, P.W. Separation and characterization of the pyrethroid-hydrolyzing esterases of cattle tick *Boophilus microplus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.23, n.3, p.349-357, 1985.

DEKEYSER, M.A. Acaricide: mode of action. **Pest Management Science**, v.61, n.2, p.103–110, 2005.

DENNY, D.J.B. Efficacy of fipronil against ticks. **Veterinary Record**, v.148, n.4, p.124, 2001.

DI STASI, L.C.; BRITO, A.R.M.S.; BACCHI, E.M.; MING, L.C.; FURLAN, M.R.; SAVASTANO, M.A.P.; AMOROZO, M.C.; REIS, M.S.; FERRI, P.H. **Plantas medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. 345p.

DIXON, D.P.; LAPHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, v.3, n.3, p.1-10, 2002.

ECOBICHON, D.J. Toxic Effects of Pesticides. In: KLAASSEN, C.D. (ed.) **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 6.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. Cap. 22, p.763-810.

EL-DEMERDASH, F.M. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.6, p.1346-1352, 2011.

ENAYATI, A.A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, v.14, n.1, p.3-8, 2005.

EYER, P. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds- a review. **Human and Experimental Toxicology**, v.14, n.11, p.857-864, 1995.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O .; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.; MNTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003. Cap.12, p.263-288.

FERREIRA, Z.S.; ROQUE, N.F.; GOTTLIEB, O.R.; OLIVEIRA, F. Compostas medicinais do Brasil. Estudo químico de *Calea pinatifida*. **Ciência e Cultura**, v.32, s., p.83-85, 1980.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CARVALHO-DIAS, A.S.; DE OLIVEIRA-ANDRADE, M.; CAIXETA-NUNES, C.; LI, H.M.; STUART, J.J.; MUIR, W.; SCHARF, M.E.; PITTENDRIGH, B.R. Expression of Cyp6g1 and Cyp12d1 in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. **Insect Molecular Biology**, v.14, n.1, p. 69-77, 2005.

FIEDLER, O. G H. A new biological method for evaluating the efficacy of acaricides against ticks. **Journal of the South African Veterinary Medical Association**, v.39, p.84-87, 1968.

FLÓRIO, J.C.; SOUSA, A.B. Toxicocinética e toxicodinâmica. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. seq.1, cap. 1, p. 15-39.

FOERSTER, L.A. Seletividade de Inseticidas a Predadores e Parasitóides. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA- FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S.

Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores. São Paulo: Manole, 2002. p.95-114.

FORTI BROGLIO-MICHELETTI, S.M.; DIAS, N.S; VALENTE, E.C.N.; SOUZA, L.A.; LOPES, D.O.P.; SANTOS, J.M. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidade) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.1, p.44-48, 2010.

FOURNIER, D.; MUTÉRO, A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology**, v.108, n.1, p. 19-31, 1994.

FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira.** Ministério da Saúde - Núcleo Nacional de Economia da Saúde, Brasília, 2007. 15p.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v.27, n.159, p.26-32, 2007.

GARCIA, J.P.O.; LUNARDI, J.J. **Práticas alternativas de prevenção e controle das doenças dos bovinos.** Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2001. 46p.

GEORGE, J.E.; POUND, J.M., DAVEY, R.B Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, v.129, p.S353–S366, 2004.

GEORGE, S.G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic - conjugating enzymes in fish. In: MALINS, C.D., OSTRANDER, G.R. (Eds) **Aquatic Toxicology: Molecular Biochemical and Cellular Perspective.** Boca Ranton, London, 1993. p.37-85.

GONÇALVES, L.A.; BARBOSA, L.C.A.; AZEVEDO, A.A.; CASALI, V.W.D.; NASCIMENTO, E.A. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.1, p.8-14, 2003.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi.** 3 ed. Passo Fundo: UPF, 2003. 129p.

GONZALES, J.C.; SILVA, N.R.; WAGNER, E.M. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* (Can 1887) em bovinos estabelecidos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.2, n.1, p.25-34, 1974.

GRAF, J.F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G.A.; MOLENTO, M.B.; BORDIN, E.L.; ARANTES, G.J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v.129, p.S427–S442, 2004.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.8-10, 2002.

HE, H.; CHEN, A.C.; DAVEY, R.B.; IVIE, G.W.; GEORGE, J.E. Characterization and molecular cloning of glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Insect and Biochemistry and Molecular Biology**, v.29, n.8, p.737-743, 1999.

HEMINGWAY, J.; FIELD L.; VONTAS, J. An overview of insecticide resistance. **Science**, v.298, n.5591, p.96-97, 2002.

HERNANDEZ, R.; HE, H.; CHEN, A.C.; IVIE, G.W.; WAGHELA, S.D.; GEORGE, J.E.; WAGNER, G.G. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, n.10, p.969-977, 2000.

HERNANDEZ, R.; GUERRERO, F.D.; GEORGE, J.E.; WAGNER, G.G. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, n.9, p.1009-1016, 2002.

JAMROZ, R.C.; GUERRERO, F.D.; PRUETT, J.H.; OEHLER, D.D.; MILLER, R.J. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of southern cattle tick. **Journal of Insect Physiology**, v.46, n.5, p.685-695, 2000.

JONSSON, N. N, MILLER, R.J., KEMP, D. H., KNOWLES, A., ARDILA, A.E., VERRALL, R.G., ROTHWELL, J.T. Rotation of treatments between spinosad and amitraz for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations with amitraz resistance. **Veterinary Parasitology**, v.169, n.1-2, p.157-164, 2010.

KARALLIEDDE, L.D.; EDWARDS, P.; MARS, T.C. Variables influencing the toxicity of organophosphates in humans. **Food Chemical Toxicology**, v.41, n.1, p.1-13, 2003.

KARIS, P.O.; RYDING, O. Tribe Heliantheae. In: BREMER, K. **Asteraceae: cladistics and classification**. Portland: Timber Press Inc., 1994. p.559-624.

KAUFMAN, R.; SLOLEY, D. Catabolism of dopamine and 5-hydroxytryptamine by monoamine oxidase in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n.1, p.101-109, 1996.

KEMPTON, L.R.C.; WILLIS, R.J., PILLMOOR J.B., ISAAC, R.E. Tyramine-B-hydroxylase activity in the synganglion of the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). In: BORKOVEC, A.B.; MASLER, E.P. (eds) **Insect Neurochemistry and Neurophysiology**. New Jersey: The Humana Press, 1990. p.281-284.

KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos bovinos**. 2.ed. Campo Grande: EMBRAPA - CNPGC, 1998.

KIRAN, S.R.; BHAVANI, K.; DEVI, P.S.; RAO, B.R.R.; REDDY, K.J. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Bioresource Technology**, v.97, n.18, p. 2481–2484, 2006.

LEE, A.J.; HUNTLEY, J.; VAN DEN BROEK, A.; COATES, D.; ISAAC, R.E. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. **Veterinary Parasitology**, v.105, n.1, p.49-63, 2002.

LEES, K.; BOWMAN, A.S. Neurobiology: recent advances and the post-genomic era. **Invertebrate Neuroscience**, v.7, n.4, p.183-198, 2007.

LEES, K.; WOODS, D.J.; BOWMAN, A.S Transcriptome analysis of the synganglion from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Insect of Molecular Biology**, v.19, n.3, p.273–282, 2010.

LI, X.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p.231-253, 2007.

LIN, JH; LU, A.Y.H. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. **Clinical Pharmacokinetics**, v.35, n.5, p.361-390, 1998.

LOIZZO, M.R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; MENICHINI, F. Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v.15, n.12, p.1209-1228, 2008.

LOIZZO, M.R.; TUNDIS, R.; CONFORTI, F.; MENICHINI, F.; BONESI, M.; NADJAF, F.; FREGA, N.G.; MENICHINI, F. *Salvia leriifolia* Benth (Lamiaceae) extract demonstrates in vitro antioxidant properties and cholinesterase inhibitory activity. **Nutrition Research**, v.30, n.12, p.823-30, 2010.

LUCIEN, J.; REIFFENSTEIN, R.; ZBITNEW, G.; KAUFMAN, W.R. Gammabutyric acid (GABA) and other amino acids in tissues of the tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) throughout feeding and reproductive periods. **Experimental and Applied Acarology**, v.19, n.11, p.617–631, 1995.

MARCHETTI, G.; SILVA, K.; RUIZ, A.; SOUSA, I.; TINTI, S.; CARVALHO, J.; FOGGIO, M. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of arucanolide isolated from *Calea pinnatifida*. **Planta Medica**, v.76, n.12, p.1233-1234, 2010.

MARICONI, F.A.M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1976. 305 p.

MARIONNET, D., DESCHAUX, P., REYNAUD, S. Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.21, n.1, p.80-91, 2006.

MARTIN, T.; OCHOU, O. G.; VAISSAYRE, M.; FOURNIER, D. Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hubner) to triazophos in West Africa. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n.9, p. 883-887, 2003.

MARTINEZ, S. S. **O NIM – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Instituto Agrônômico do Paraná. Londrina: IAPAR, 2002. 142p.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, F.E **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2003. 220 p.

MARTINS, J.E.C. **Plantas Medicinais de uso na Amazônia**. Belém: Centro de Estudos Jurídicos do Pará, 1998. 92p.

MEINKE, P.T. Perspectives in animal health: old targets and new opportunities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n.5, p.641-659, 2001.

MESULAM M.M.; GUILLOZET, M.A; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSEN, E.G.; LOCKRIDGEET, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627-639, 2002.

MILATOVIC, D.; GUPTA, R.C; ASCHNER, M. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. **Science World Journal**, v.6, p.295–310, 2006.

MOUNSEY, K.E., DENT, J.A., HOLT, D.C., MCCARTHY, J., CURRIE, B.J., WALTON, S.F. Molecular characterisation of a pH-gated chloride channel from *Sarcoptes scabiei*. **Invertebrate Neuroscience**, v.7, n.3, p.149-156, 2007.

NAKAGAWA, Y.; IINUMA, M.; MATSUURA, N.; YI, K.; NAOI, M.; NAKAYAMA, T.; NOZAWA, Y.; AKAO, Y. A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpene lactone, arucanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.97, n.2, p. 242-252, 2005.

NARAHASHI, T. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.294, n.1, p.1-26, 2000.

NARAHASHI, T.; ZHAO, X.; IKEDA, T.; SALGADO, V.L.; YEH, J.Z. Glutamate-activated chloride channels: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n.2, p.149–152, 2010.

NASCIMENTO, A.M.; SALVADOR, M.J.; CANDIDO, R.C.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVEIRA, D.C.R. Trypanocidal and antifungal activities of p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea uniflora* (Heliantheae, Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.56, n.5, p.663-669, 2004a.

NASCIMENTO, A.M.; SALVADOR, M.J.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y.; OLIVEIRA, D.C.R. Antimicrobial activity of extracts and some compounds from *Calea platylepis*. **Fitoterapia**, v.75, n.5, p.514–519, 2004b.

NATHANSON, J.A. Characterisation of octopamine-sensitive adenylyl cyclase: elucidation of a class of potent and selective octopamine-2 receptor agonists with toxic effects in insects. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v.82, n.2, p.599–603, 1985.

NEESE, P.A.; SONENSHINE, D.; KALLAPUR, V.L.; APPERSON, C.S.; ROE, R.M. Absence of insect juvenile hormones in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae), and in *Ornithodoros parkeri* Cooley (Acari: Argasidae). **Journal of Insect Physiology**, v.46, n.4, p.477-490, 2000.

OAKESHOTT, J. G.; HOME, I.; SUTHERLAND, T.D.; RUSSELL, R. J. The genomics of insecticide resistance. **Genome Biology**, v.4, n.1, p. 1-4, 2003.

OBER, A.G.; URBATSCH, L.E.; FISCHER, N.H. Sesquiterpene lactones from *Calea leptoccephala*. **Phytochemistry**, v.25, n.2, p.467–470, 1986.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia hominis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.42, n.2, p.127-135, 1990.

OLIVO, C. J.; HEIMERDINGER, A.; ZIECH, M.F.; AGNOLIN, C.A.; MEINERZ, G.R.; BOTH, F.; CHARÃO, P.S Extrato aquoso de fumo em corda no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1131-1135, 2009.

O'NEILL, G.M.; DONOVAN, G.R.; BALDO, B.A. Cloning and characterization of a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1219, n.2, p.521-528, 1994.

ORCHARD, I. Octopamine in insects - neurotransmitter, neurohormone and neuromodulator. **Canadian Journal of Zoology**, v.60, n.4, p.659-669, 1982.

PAMO, T.E.; TENDONKENG, F.; KANA, J.R.; TENEKEU, G.; TAPONDJOU, A.; KHAN PAYNE, V. The acaricidal effect of the essential oil of *Ageratum houstonianum* Mill. Flowers on ticks (*Rhipicephalus lunulatus*) in Cameroon. **South African Journal of Animal Science**, v.34, s.1, p.244-247, 2004.

PAMO, T.E.; TENDONKENG, F.; KANA, J.R.; KHAN PAYNE, V.; BOUKILA, B.; LEMOUFOUET, J.; MIEGOUE, E.; NANDA, A.S. A study of the acaricidal properties of an essential oil extracted from the leaves of *Ageratum houstonianum*. **Veterinary Parasitology**, v.128, n.3-4, p.319-323, 2005.

PRUSKI, J.F.; URBATSCH, L.E. Five new species of *Calea* (Compositae: Heliantheae) from Planaltine Brazil. **Brittonia**, v.40, n.4, p.341-356, 1988.

RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M.V.; UNGER, M.F.; COLLINS, F.H.; FEYEREISEN, R. Evolution of

supergene families associated with insecticide resistance. **Science**, v.298, n.5591, p.179-181, 2002.

RIBEIRO, V.L.S.; AVANCINI, C.; GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; POSER, G. V. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v.151, n.2-4, p.351-354, 2008.

RIOL, M.J.M.; VALIÑAS, M.C.N.; FERNÁNDEZ, M.A.G.; LÓPEZ, M.P. Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.128, n.2, p.227-235, 2001.

ROEDER, T. Octopamine in invertebrates. **Progress in Neurobiology**, v.59, n.5, p.533-559, 1999.

ROSA DE LIMA, M.F.; SANCHEZ FERREIRA, C.A.; FREITAS, D.R.J.; VALENZUELA, J.G.; MASUDA, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, n.7, p.747-754, 2002.

ROSARIO-CRUZ, R.; GUERRERO, F.D.; MILLER, R. J.; RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; TIJERINA, M.; DOMINGUES-GARCIA, D.I.; HERNANDEZ-ORTIZ, R.; CORNEL, A. J.; MCABEE, R.D.; ALONSO-DIAZ, M.A. Molecular survey of pyrethroid resistance mechanisms in Mexican field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research**, v.105, n.4, p.1145–1153, 2009.

ROULSTON, W.J.; SCHUNTNER, C.A.; SCHNITZERLING, H.J. Metabolism of coumaphos in larvae of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Australian Journal of Biological Science**, v.19, n.4, p.619–633, 1966.

RUFINGIER, C.; PASTEUR, N.; LAGNEL, J.; MARTIN, C.; NAVAJAS, M. Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera: Aphididae) from France. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.29, n.4, p.385-391, 1999.

SALVI, R.M., LARA, D.R.; GHISOLFI, E.S.; PORTELA, L.V.; DIAS, R.D., SOUZA, D.O. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate. **Toxicological Sciences**, v.72, n.2, p.267-271, 2003.

SATTELLE, D.B. Acetylcholine receptors of insects. **Advances in Insect Physiology**, v.15, p.213-215, 1980.

SAVELEV, S., OKELLO, E., PERRY, N.S., WILKINS, R.M., PERRY, E.K. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.75, n.3, p.661-668, 2003.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, v.35, p.271-297, 1990.

SILVA, A.F.; BARBOSA, L.C.A.; SILVA, E.A.M.; CASALI, V.W.D.; NASCIMENTO, E.A. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.1, p.1-7, 2003.

SILVA, H.J.; SAMARAWICKREMA, N.A.; WICKREMASINGHE, A.R. Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.100, n.9, p.803-806, 2006.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; OLIVEIRA FILHO, A.M.; LAGE, C.L.S. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Quimica Nova**, v.27, n.1, p.46-49, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; E.P. SCHENKEL, E.P.; AMOROS, M.; GIRRE, L. ETHNOPHARMACOLOGIE: SOURCES, METHODES, OBJECTIFS. Actes du 1^{er} Colloque Européen d’Etnopharmacologie. Mets, Orston, (1990), pp. 192-198.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. . In: SIMÕES, C. M. O .; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.; MNTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia**. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003. Cap. 18, p. 467-495.

SIROKÁ, Z.; DRASTICHOVÁ, J. Biochemical markers of aquatic environment contamination: cytochrome P450 in fish. A review. **Acta Veterinaria Brno**, v.73, n.1, p.123-132, 2004.

SLOTKIN, T.A. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. **Environmental Health Perspectives**, v.107, s.1, p.71-80, 1999.

SMALLMAN, B.N.; RIDDLES, P.W. Choline transferase in organophosphate-resistant and susceptible strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.7, n.4, p.355–359, 1977.

SMALLMAN, B.N.; SCHUNTNER, C.A. Authentication of the cholinergic system in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry**, v.2, n.5, p.67–77, 1972.

SMIRLE, M.J.; WINSTON, M.L. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems. **Canadian Journal of Zoology**, v.66, n.9, p.1938-1942, 1988.

SOFUOGLU, M.; MOONEY, M. Cholinergic functioning in stimulant addiction: implications for medications development. **CNS Drugs**, v.23, n.11, p.939-952, 2009.

SONENSHINE, D.E. **Biology of ticks**. Oxford: Oxford University Press, 1991. v.1, 447p.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v.2, n.4, p.294-302, 2001.

SPINOSA, H.S.; SCHWARZ, A. Introdução á toxicologia veterinária. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. seq.1, cap. 1, p. 3-13.

STEINBECK, C.; SPITZER, V.; STAROSTA, M.; POSER, G. V. Identification of two chromenes from *Calea serrata* by semiautomatic structure elucidation. **Journal of Natural Products**, v. 60, n.6, p.627-628, 1997.

STONE, B.F. Brain cholinesterase activity and its inheritance in cattle tick (*Boophilus microplus*) strains resistant and susceptible to organophosphorus acaricides. **Australian Journal of Biological Science**, v.21, n.2, p.321-330, 1968.

SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L.P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, v.60, n.3, p.291-296, 2003.

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

TURBERG, A.; SCHRODER, I.; WEGENER, S.; LONDERSHAUSEN, M. Presence of muscarinic acetylcholine receptors in the cattle tick *Boophilus microplus* and in epithelial tissue culture cells of *Chironomus tentans*. **Pesticide Science**, v.48, n.4, p.389-398, 1996.

VAZ JÚNIOR., I. S.; LERMEN, T.; MICHELON, A.; SANCHEZ FERREIRA, C.A.; JOAQUIM DE FREITAS, D.R.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. **Veterinary Parasitology**, v.119, n.2-3, p.237-245, 2004.

VENDRUSCOLO, G.S.; MENTZ, L.A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia: Série Botânica**, v.61, n.1-2, p.83-103, 2006.

VENEGAS-FLORES, H.; SEGURA-COBOS, D.; VAZQUEZ-CRUZ, B. Antiinflammatory activity of the aqueous extract of *Calea zacatechichi*. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v.45, p.110-111, 2002.

VENTER, J.C.D.; DI PORTIO, U.; ROBISON, A.D.; SHREEVE, S.M.; LAI, J.; KERLAVAGE, A.R.; FRACEK JR., LENTES, K.U.; FRASER, C.M. Evolution of neurotransmitter receptor systems. **Progress in Neurobiology**, v.30, n.2-3, p.105-169, 1988.

VERÍSSIMO, C.J. ; OTZUK, I.P.; DEODATO, A.P.; LARA, M.A.C.; BECHARA, G.H. Infestação por carrapatos *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em vacas Gir, Holandesa e mestiça sob pastejo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, Supl., p.87-89, 2002.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v.26, n.3, p.390-400, 2003.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3-4, p. 99-103, 1999.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; ANDREI, C.C. Plantas Inseticidas. . In: SIMÕES, C. M. O .; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.; MNTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed.Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. cap.35, p..903-918.

VONTAS, J.G.; SMALL, G.J.; NIKOU, D.C.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Biochemistry Journal**, v.362, p.329-337, 2002.

WEI, S.H.; CLARK, A.G.; SYVANEN, M. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, n.12, p.1145-1153, 2001.

WU, H.; FRONCZEK, F.R.; BURANDT Jr., C.L.; ZJAWIONY, J.K. Antileishmanial germacranolides from *Calea zacatechichi*. **Planta Medica**, v.77, n.7, p.749-753, 2011.

ZHAO, X.; SALGADO, V.L. The role of GABA and glutamate receptors in susceptibility and resistance to chloride channel blocker insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.97, n.2, p.153–160, 2010.

ZLOTKIN, E. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. **Annual Reviews of Entomology**, v.44, p.429–455, 1999.

YAMADA, M.; MATSUURA, N.; SUZUKI, H.; KUROSAKA, C.; HASEGAWA, N.; UBUKATA, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M. Germacranolides from *Calea urticifolia*. **Phytochemistry**, v.56, n.23, p.3107–3111, 2004.

ANEXO I

NORMAS DA REVISTA PARA PUBLICAÇÃO

ANEXO I



Veterinary Parasitology

An international scientific journal and the Official Organ of the [American Association of Veterinary Parasitologists \(AAVP\)](#), the [European Veterinary Parasitology College \(EVPC\)](#) and the [World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology \(WAAVP\)](#).

Guide for Authors

Veterinary Parasitology

Types of contributions

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Rapid Communications
4. Short Communications
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

Rapid Communications should contain information of high 'news'/scientific value worthy of very rapid publication. Rapid Communications should be submitted to the journal as such (i.e. clearly labelled as a RC) and should, in general, not exceed 2000 words in length. Upon receipt, they will be subject to rapid assessment and if accepted, published with priority.

Short Communications should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is

hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English. Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Book reviews will be solicited by the Book Review Editor.

Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Dr W. Pomroy
Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences
Massey University
Private Bag 11 222
Palmerston North 4442
New Zealand
w.pomroy@massey.ac.nz

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Parasitology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetpar>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Parasitology*.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. Authors should also be aware that *The Lucidus Consultancy* edit@lucidusconsultancy.com offers a bespoke service to putative contributors to *Veterinary Parasitology* who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction
 Material studied, area descriptions, methods, techniques
 Results
 Discussion
 Conclusion
 Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.
 References
 Tables
 Figure captions
 Tables (separate file(s))
 Figures (separate file(s)).

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.

5. Each table should have a brief and self-explanatory title.

6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.

2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.

3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.

7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. *Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.*
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
 - a. *For periodicals*
Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.
 - b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical*
Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruysse, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.
 - c. *For books*
Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.
 - d. *For multi-author books*
Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.
6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained.

However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .

6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O .

7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.

2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are requested to follow the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299–326).

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113, authorsupport@elsevier.com.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's [homepage http://www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar). For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

***Veterinary Parasitology* has no page charges**