

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÍVEL MESTRADO

ALANA DOS SANTOS CARDOSO

ATIVIDADE ACARICIDA E INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE POR
TERPENOS EM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

São Luís – MA

2019

ALANA DOS SANTOS CARDOSO

ATIVIDADE ACARICIDA E INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE POR
TERPENOS EM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alexandra Martins dos S. Soares

São Luís – MA

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a). Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Cardoso, Alana dos Santos.

ATIVIDADE ACARICIDA E INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE
POR TERPENOS EM *Rhipicephalus Boophilus microplus* / Alana
dos Santos Cardoso. - 2019.

57 f.

Orientador(a): Alexandra Martins Dos Santos Soares
Soares.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
Universidade Federal do Maranhão, 2019.

1. Acetilcolinesterase. 2. *Rhipicephalus microplus*.
3. Terpenos. I. Soares, Alexandra Martins Dos Santos
Soares. II. Título.

ALANA DOS SANTOS CARDOSO

ATIVIDADE ACARICIDA E INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE POR
TERPENOS EM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Alexandra Martins Dos Santos Soares Doutorado em Biotecnologia -
Orientadora

Prof^ª. Dra. Cláudia Quintino da Rocha

Prof. Dr. Claudener Souza Texeira

Prof. Dr. Francisco Borges Costa

“Leve na sua memória para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo”.

Chico Xavier

AGRADECIMENTO

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Alexandra Martins dos Santos Soares.

Aluno de iniciação científica Everton Guimarães.

Agradeço de coração todo o apoio das pessoas sinceras.

Aos membros e estruturas dos Laboratórios de Bioquímica Vegetal e Laboratório de Controle Parasitológico da Universidade Federal do Maranhão.

Universidade Federal do Maranhão.

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 CARRAPATO <i>Rhipicephalus (boophilus) microplus</i>	14
2.2 CICLO BIOLÓGICO	16
2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E SAÚDE DO HOSPEDEIRO	17
2.4 CONTROLE COM COMPOSTOS DE ORIGEM SINTÉTICA E CONSEQUÊNCIAS	18
2.5 RESISTÊNCIA	19
2.6 PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL COMO ALTERNATIVA CARRAPATICIDA	20
3. OBJETIVO	23
3.1 GERAL	23
3.2 ESPECÍFICOS	23
4. RESULTADOS	24
ABSTRACT	26
1. INTRODUCTION	27
2. MATERIALS AND METHODS	28
3. RESULTS	31
4. DISCUSSION	32
REFERENCES	35
5. CONSIDERAÇÃO FINAL	45
6. REFERÊNCIAS	46
7. CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
OPs	Organophosphates
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
BSA	Bovine serum albumin
CL/LC	Concentração letal/ Lethal concentration
CI/IC	Concentração de Inibitória/ Inhibitory Concentration
V	Volume
Abs	Absorbância
LIT	Larval Immersion Test
RH	Relative humidity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> adulto. (A) Fêmea. (B) Macho. (C) Teleóginas de <i>R. microplus</i> realizando ovipostura.	14
Figura 2	Destacado em preto, distribuição global do carrapato do boi <i>Rhipicephalus microplus</i> . (Barré; Uilenberg, 2010).	15
Figura 3	Ciclo de vida do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> .	17
Figure 1	Effect of terpenes on larvae and on the activity acetylcholinesterase of <i>R. microplus</i> . The assays were performed with Porto Alegre (susceptible) and Jaguar (resistant) strains. (A) Results of the larval immersion test (LIT) shown as LC ₅₀ (concentration at which 50% of the larvae died) and (B) results of the inhibition test shown as IC ₅₀ (the concentration to inhibit 50% of acetylcholinesterase activity) are expressed in mg.mL ⁻¹ . (*) LC ₅₀ for the resistant strain previously published by Lima et al. (2018).	41
Supplementary figure 1	Results of inhibition test of thymol, carvacrol, eucalyptol, citral and R-(-)-carvone on acetylcholinesterase enzyme activity. (A) Porto Alegre strain (susceptible) and (B) Jaguar strain (resistant). Each point represents the average and standard deviation of values obtained by two independent experiments performed in triplicate.	42
Supplementary figure 2	Results of larval immersion test (LIT) of carvacrol, thymol, citral, α-terpinene, γ-terpinene, p-cymene on <i>R. microplus</i> larvae. (A) Porto Alegre strain (susceptible) and (B) Jaguar strain (resistant). Each point represents the average and standard deviation of values obtained by experiment performed in quadruplicate.	43
Supplementary figure 3	Terpenes chemical structures containing various functional groups.	44

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o ectoparasita hematófago de maior impacto na bovinocultura brasileira. Seu controle é, em geral, feito com compostos químicos sintéticos. Entretanto, o manejo inadequado e utilização indiscriminada dos carrapaticidas vêm acelerando a seleção de carrapatos resistentes aos princípios ativos disponíveis comercialmente. Terpenos têm se tornado uma alternativa promissora ao uso de compostos sintéticos para o controle de *R. microplus*, mas o mecanismo de ação destes compostos ainda é controverso. A inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) é um mecanismo de ação já conhecido de diversos carrapaticidas. Entretanto pouco se tem explorado sobre a ação de terpenos em AChEs. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação carrapaticida de terpenos, assim como seu potencial inibitório em AChE, utilizando-se cepa resistente e sensível de *R. microplus*. Larvas de *R. microplus* foram submetidas a maceração em tampão fosfato de sódio 100 mM; pH 7,0; 0,5% v/v de triton X-100; contendo inibidores de proteases. Após trinta minutos, a suspensão foi centrifugada à 15000 x g, 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi denominado extrato enzimático e usado como fonte de AChE. Verificou-se a atividade AChE no extrato enzimático assim como a inibição da referida enzima por terpenos. Adicionalmente, avaliou-se a ação carrapaticida de terpenos sobre larvas de *R. microplus*. Entre os terpenos utilizados o p-cimeno, timol, carvacrol e citral apresentaram atividade carrapaticida com CL₅₀ de 1,75, 1,54, 1,41 e 0,38 mg.mL⁻¹ para a cepa suscetível e CL₅₀ de 1,40, 1,81, 1,10 e 1,13 mg.mL⁻¹ para a cepa resistente, respectivamente. O timol e o carvacrol inibiram a AChE das larvas de cepa suscetíveis com IC₅₀ de 0,93 e 0,04 mg.mL⁻¹, respectivamente. A IC₅₀ exibida por eucaliptol, carvacrol e timol para AChE das larvas de linhagens resistentes foi de 0,36, 0,28 e 0,13 mg.mL⁻¹, respectivamente. Este foi o primeiro estudo a investigar a ação dos terpenos na AChE de *R. microplus* suscetível e resistente. Para alguns terpenos, a correlação positiva entre atividade carrapaticida e inibição da AChE sugere a inibição desta enzima como mecanismo de ação. Esse estudo contribui com o entendimento do mecanismo de ação de terpenos, dando suporte para estudos subsequentes sobre o uso destes produtos como carrapaticidas.

Palavras-chave: *Rhipicephalus microplus*; Acetilcolinesterase; Terpenos

ABSTRACT

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is the most impacting hematophagous ectoparasite in Brazilian cattle. Their control is generally made with synthetic chemical compounds. However, inadequate handling and indiscriminate use of acaricides has accelerated the selection of ticks resistant to commercially available active ingredients. Terpenes have become a promising alternative to the use of synthetic compounds to control *R. microplus*, but the mechanism of action of these compounds is still controversial. Inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) is a known mechanism of action of several acaricides. However little has been explored about the action of terpenes in AChEs. The objective of this work was to evaluate the acaricides action of terpenes, as well as their inhibitory potential in AChE, using resistant and sensitive strain of *R. microplus*. *R. microplus* larvae were macerated in 100 mM sodium phosphate buffer; pH 7.0; 0.5% v / v triton X-100; containing protease inhibitors. After thirty minutes, the suspension was centrifuged at 15000x g, 4 °C for 30 minutes. The supernatant was called enzyme extract and used as a source of AChE. AChE activity in the enzyme extract was verified as well as the inhibition of said enzyme by terpenes. Additionally, the acaricides action of terpenes on *R. microplus* larvae was evaluated. Among the terpenes used, p-cymene, thymol, carvacrol and citral presented acaricide activity with LC₅₀ of 1.75, 1.54, 1.41 and 0.38 mg.mL⁻¹ for susceptible strain and LC₅₀ of 1.40, 1.81, 1.10 and 1.13 mg.mL⁻¹ for the resistant strain, respectively. Thymol and carvacrol inhibited AChE of susceptible strain larvae with IC₅₀ of 0.93 and 0.04 mg.mL⁻¹, respectively. The IC₅₀ exhibited by eucalyptol, carvacrol and thymol for AChE of resistant strain larvae were 0.36, 0.28 and 0.13 mg.mL⁻¹, respectively. This was the first study to investigate the action of terpenes on susceptible and resistant *R. microplus* AChE. For some terpenes, the positive correlation between acaricide activity and AChE inhibition suggests inhibition of this enzyme as a mechanism of action. This study contributes to the understanding of the mechanism of action of terpenes, supporting subsequent studies on the use of these products as acaricides.

Keywords: *Rhipicephalus microplus*; Acetylcholinesterase; Terpenes.

1. INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) conhecido popularmente como carrapato bovino é o ectoparasito hematófago de maior impacto na bovinocultura brasileira, devido à queda na produção de leite, mortalidade, danos na pele, morbidade, custo de controle e efeitos de hemoparasitos transmitidos por *R. microplus* para os bovinos (*Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*). Conjuntamente tais doenças são causadoras da tristeza parasitária bovina, que se manifesta, clinicamente, por febre, anemia, hemoglobinúria, icterícia, falta de apetite e prostração, determinando alta mortalidade em rebanhos sensíveis (KESSLER; SCHENK, 1998; GRISI et al., 2014; DOMINGUES et al., 2014). As perdas anuais de infestação por *R. microplus* no Brasil e no México foram estimadas em US \$ 3,24 bilhões (GRISI et al., 2014; GALL et al., 2018).

A utilização de produtos químicos sintéticos representa o principal meio para o controle de carrapatos (SILVA, 2014; FURLANI et al., 2015) como organofosforados e carbamatos (SILVA, 2014). O mecanismo de ação destes carrapaticidas é inibição da enzima acetilcolinesterase (BAXTER et al., 1999; ANDERSON; COATS, 2012). Estes compostos sintéticos se ligam e inibem a enzima, provocando hiperexcitabilidade dos neurônios que acarreta morte do carrapato por paralisia (ANDERSON; COATS, 2012), fato dar-se-á pela inibição reversível ou irreversível da AChE (YU, 2008).

No entanto o uso indiscriminado dos produtos, leva à redução de sua eficácia (VALENTE et al., 2017; RECK et al., 2014) e possibilita a seleção de populações resistentes aos produtos utilizados (KLAFKE et al., 2006; GOMES et al., 2011). O aumento progressivo do número de cepas resistentes aos principais acaricidas comerciais, caracteriza-se por um aumento na frequência da aplicação dos mesmos (FURLONG; MARTINS, 2007; RAYNAL et al., 2015). Além dos problemas supracitados, estes produtos por serem residuais, contaminam o meio ambiente e induzem toxicidade no hospedeiro vertebrado (FREITAS et al., 2005; RECK et al., 2014).

Devido aos problemas que acometem os organismos parasitados, o homem e o ambiente por causa da toxicidade das substâncias sintéticas

(CHAGAS et al., 2003) há uma tendência mundial em reduzir a utilização desses acaricidas e inseticidas (FARIAS et al., 2009), e buscar soluções alternativas para o controle de carrapatos (PARIZI et al., 2009). Nessa perspectiva, produtos naturais surgem como alternativa de controle em potencial (COSTA-JÚNIOR et al., 2016).

Um exemplo de produtos naturais são os óleos essenciais, ricos em compostos bioativos derivados do metabolismo secundário das plantas (SILVA et al., 2018; NAZZARO et al., 2013). São uma mistura complexa de substâncias de diversas famílias químicas entre elas os terpenos (SILVA et al., 2018; AAZZA et al., 2011).

Alguns óleos essenciais e terpenos podem ser utilizados no controle de *R. microplus*, reduzindo assim a utilização de produtos organossintéticos (ANDERSON; COATS, 2012), proporcionam um aumento do nível de segurança para o gado, quando comparados aos acaricidas sintéticos convencionais (GROSS et al., 2017). Alguns óleos essenciais também apresentam propriedade bactericida, fungicida, moluscicida e inseticida (SANTOS et al., 2015). Essas atividades são geralmente atribuídas aos seus componentes terpenos (BOTELHO et al., 2007).

Óleos essenciais e terpenos isolados foram também investigados por sua capacidade de inibição da AChE (DOHI et al., 2009; DANDLEN et al., 2011). Entretanto, pouco se tem na literatura sobre a ação inibitória de terpenos sobre a AChE de *R. microplus* e não se tem conhecimento da ação em AChE oriunda de carrapatos resistentes e sensíveis.

Desta forma, o presente trabalho buscou avaliar a ação de terpenos sobre atividade da acetilcolinesterase, como possível mecanismo de ação, em larvas de cepa sensível e resistente de *R. microplus*, e correlacionar a relação da inibição enzimática com a atividade carrapaticida dos terpenos. Visando contribuir com pesquisas e estudos para a elucidação dos mecanismos de ação carrapaticidas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARRAPATO *Rhipicephalus (boophilus) microplus*

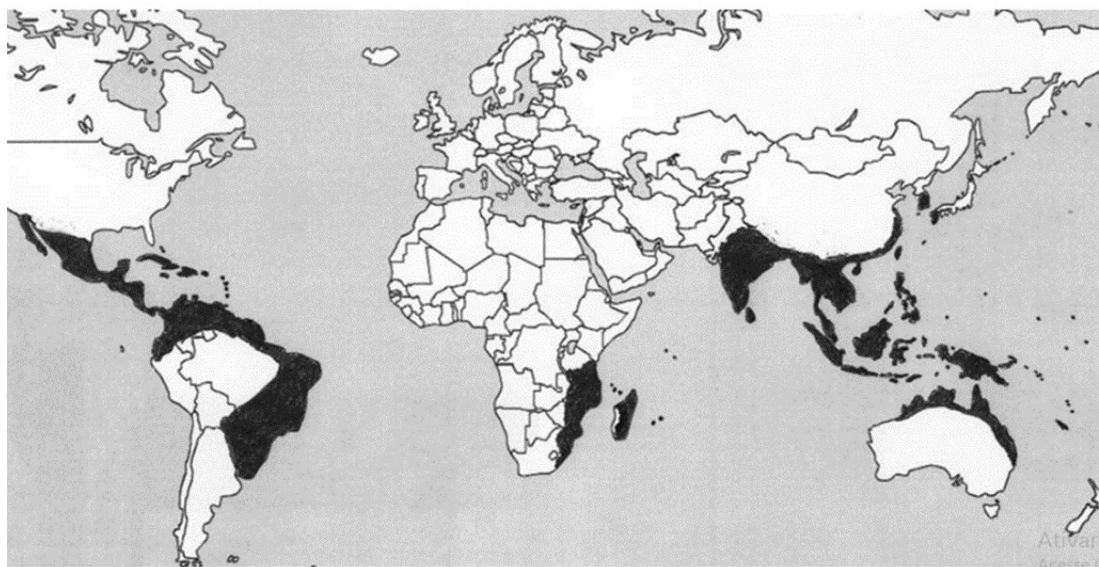
Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Figura 1) conhecido popularmente no Brasil como carrapato bovino. É um ectoparasito hematófago que pertence ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida, família Ixodidae, subfamília Rhipicephalinae, gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*, espécie *Rhipicephalus microplus*. Alguns estudos utilizando metodologias taxonômicas moleculares, demonstraram a proximidade filogenética do gênero *Boophilus* com o *Rhipicephalus*, propondo-se então uma nova classificação para a espécie, que mudaria de *Boophilus microplus* para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL et al., 2000; BEATI; KEIRANS, 2001; MURREL; BARKER, 2003).



Figura 1. Carrapato *Rhipicephalus microplus* adulto. (A) Fêmea. (B) Macho. (C) Teleóginas de *R. microplus* realizando ovipostura.

Atual distribuição geográfica de *R. microplus* e a sua grande expansão ao longo dos últimos 150 anos podem ser explicadas principalmente pela introdução de gado europeu (*Bos taurus*) para áreas tropicais (LÉGER et al., 2013). Outros fatores podem ter restringido a distribuição geográfica de *R. microplus*, a competição com outras espécies de carrapatos (TØNNESEN et al., 2004; ZEMAN; LYNEN, 2010) e / ou variáveis climáticas, como já foi descrito para outros carrapatos (ESTRADA-PEÑA et al., 2005; CUMMING; VAN VUUREN, 2006; OLWOCH et al., 2007).

R. microplus é distribuído nos rebanhos bovinos das Américas Central e do Sul, África, Ásia e Oceania (Figura 2), sendo um dos principais parasitos que afetam a pecuária destas áreas (JONSSON et al., 2000; BARRÉ; UILENBERG, 2010). Na América Latina, o *R. microplus* encontra-se amplamente distribuído pelo Brasil, norte da Argentina, Paraguai, Uruguai, leste da Bolívia, Colômbia e Venezuela. No Brasil, destacam-se as regiões Centro-Oeste e Sudeste, locais com intensa atividade pecuária e que, além do hospedeiro, possuem condições ideais de temperatura e umidade para o desenvolvimento do parasito (ESTRADA-PEÑA, 1999; ESTRADA-PEÑA et al., 2006).



Fonte: BARRÉ; UILENBERG (2010)

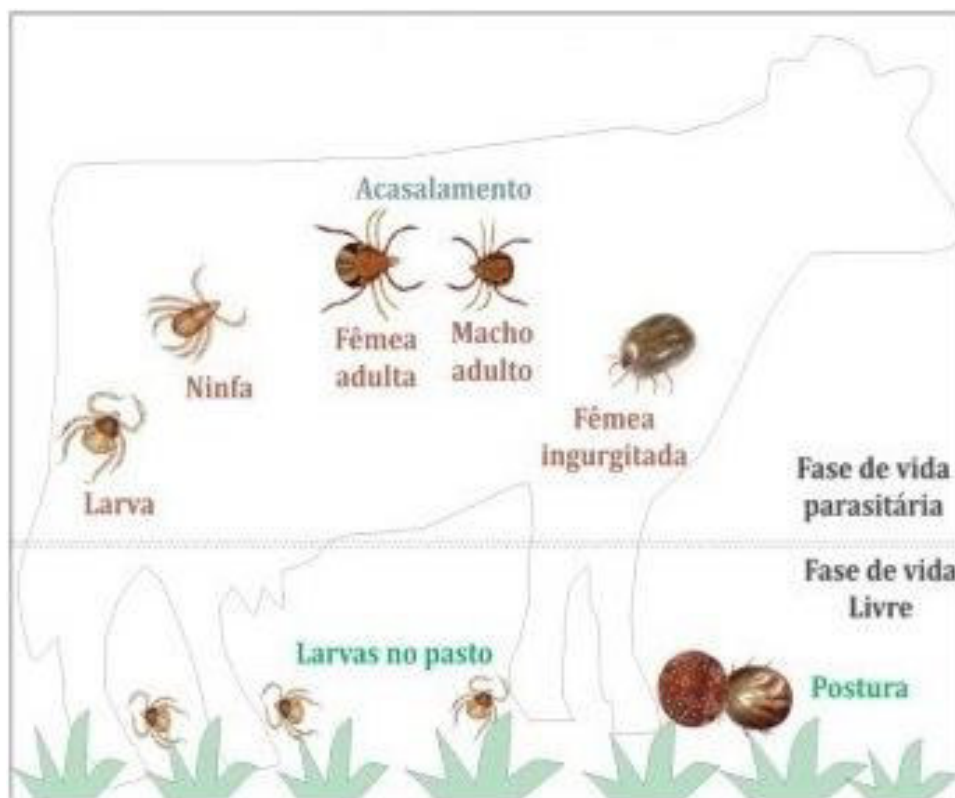
Figura 2. Destacado em preto, distribuição global do carrapato do boi *R. microplus*. (Barré; Uilenberg, 2010).

2.2 CICLO BIOLÓGICO

R. microplus é um carrapato monoxeno, isto é, todo o seu ciclo biológico se desenvolve em um único hospedeiro, preferencialmente nos bovinos (FURLONG, 2005). O seu ciclo de vida apresenta duas fases, a fase não parasitária, que tem início com o desprendimento da teleógena do hospedeiro e sua queda ao solo para oviposição e a fase parasitária, que começa quando a larva se fixa no hospedeiro (FURLONG, 2005).

A fase não parasitária é o período em que o carrapato, permanece no ambiente para efetuar a postura e o período que ocorre a incubação, eclosão e maturação das larvas (VERISSIMO, 2013). Após a eclosão, as larvas permanecem por cerca de sete dias na base da vegetação, período de enrijecimento da cutícula. Após esse período, elas estão prontas para subir nas pastagens por geotropismo negativo e aguardarem a passagem do hospedeiro, que é localizado pelo odor, pelas vibrações, pelo sombreamento, pelo estímulo visual e pela concentração de CO₂ (SONENSHINE, 1993).

Na fase parasitária, as larvas infestantes quando entram em contato com o hospedeiro, e buscam fixarem-se em regiões do corpo que favorecem seu desenvolvimento, como: úbere, mamas, regiões do períneo, vulva e entre as pernas. Com a fixação das larvas infestantes no hospedeiro bovino, começam alimentando-se de linfa e, em torno do oitavo dia após a fixação, sofrem a primeira muda passando a serem ninfas, a partir dessa nova muda começa a diferenciação sexual (PEREIRA, 2008). Os machos com 15 dias após sua fixação se tornam adultos; são menores que as fêmeas e andam por toda a extensão do corpo do hospedeiro, ingerindo sangue e fertilizando várias fêmeas. A fêmea quando apresenta maturidade sexual, é fecundada, continua se alimentando de sangue até ficarem totalmente ingurgitadas, quando passa a ser denominada teleógena, se desprendem do hospedeiro no 21º dia, caindo ao solo para iniciar a postura, reiniciando assim o ciclo de vida (NICARETTA, 2018) (Figura 3).



Fonte: HealthyRumis (2014)

Figura 3. Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E SAÚDE DO HOSPEDEIRO

R. microplus é um dos maiores causadores de problemas parasitários na pecuária bovina. Responsável por prejuízos econômicos aos produtores de leite, carne e couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação (ANDREOTTI, 2010). Com isso traz gastos elevados com produtos carrapaticidas e equipamentos para o seu controle, trazendo diversos prejuízos produtivos a bovinocultura brasileira (DA SILVA et al., 2013). Com perdas econômicas no Brasil e no México de US \$ 573,61 milhões por ano (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2017) respectivamente.

Jonsson (2006) calculou que cada fêmea ingurgitada de *R. microplus* é responsável por uma redução de aproximadamente 1,37g de peso dos bovinos, além de causar anemia, supressão do apetite e alteração no metabolismo dos animais infestados. A picada de *R. microplus* pode provocar irritação e predispõe o animal a ataques de moscas e posteriormente aparecimento de miíases, em

que a pele irritada serve de via de acesso para infecções secundárias (BORGES et al., 2011).

Além disso, é responsável pela transmissão de agentes infecciosos como *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp., que juntos causam a tristeza Parasitária Bovina (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2018). Juntos esses fatores refletem em grandes perdas na produção de leite e carne (SUTHERST et al., 1983; SOUSA, 2008) e danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato (SEIFERT et al., 1968). Estudos demonstram que os carrapatos provocam efeitos imunossupressores no hospedeiro, o que pode facilitar a transmissão ou a gravidade nos casos de babesioses e anaplasmoses (KASHINO et al., 2005; JONSSON, 2006).

2.4 CONTROLE COM COMPOSTOS DE ORIGEM SINTÉTICA E CONSEQUÊNCIAS

É complexo o controle de *R. microplus* em virtude da influência e interação de vários fatores como: raça do bovino, época do ano, condições ambientais e manejo. Esse controle pode ser através da rotação de pastagens, cruzamentos com raças bovinas resistentes, controle biológico com alguns tipos de fungos e extratos vegetais (CAMPOS et al., 2012). Contudo, a utilização dos compostos químicos sintéticos representa o principal meio para o controle de carrapatos, incluindo organofosforados e seus principais representantes, Ethion, Clorpirifós, Clorfenvinfós e Cumafós. (LOPES, 2015).

O mecanismo de ação dos organofosforados está relacionado à inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas (BAXTER et al., 1999; ANDERSON e COATS, 2012). Essa inibição causada pelos organofosforados, eleva o número de ACh livre até níveis tóxicos para os carrapatos, devido a competição dos organofosforados com a acetilcolina pela interação com o sítio ativo da AChE. Quando um ligante diferente da acetilcolina está no sítio da acetilcolinesterase, esta se encontra fosforilada, causando um aumento dos níveis de acetilcolina na fenda sináptica e como consequência a

transmissão contínua e desordenada de impulsos nervosos hiperativando fibras musculares, que pode ocasionar paralisia e morte (ESPINOZA et al., 1991).

Acredita-se que a insensibilidade a acetilcolinesterase tem relação com a resistência a estes compostos (FOIL et al., 2004; TEMEYER et al., 2010). O aumento do metabolismo das esterases localizadas no intertegumento de fêmeas ingurgitadas resistentes e com a super expressão dessas enzimas em larvas, relacionada a um gene semi-dominante (VILLARINO; WAGHELA; WAGNER, 2001; FOIL et al., 2004). Em *R. microplus* este mecanismo primário de resistência a organofosforados (TEMEYER et al., 2010) apresenta-se também em várias linhagens resistentes a outros acaricidas sintéticos (JANADAREE BANDARA et al., 2017).

Habitualmente centenas de litros de solução residual de carrapaticida são gerados e muitas vezes descartados indiscriminadamente (MARTHE et al., 2010). Além disso, esses produtos contaminam o meio ambiente com resíduos prejudiciais aos hospedeiros e também humanos (FREITAS et al., 2005) e alguns produtos induzem toxicidade para o hospedeiro vertebrado (RECK et al., 2014). Em virtude do efeito inibidor das colinesterases, os pesticidas organofosforados podem ocasionar, em mamíferos, lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios (ECOBICHON; JOY 1991).

2.5 RESISTÊNCIA

No Brasil, a resistência das populações de carrapatos aos carrapaticidas é generalizada (GRAF et al., 2004; HIGA et al., 2016). O aumento progressivo do número de cepas de carrapatos resistentes aos principais acaricidas comerciais caracteriza-se por um aumento na frequência da aplicação dos mesmos (FURLONG et al., 2007; RECK et al., 2014). A suspensão do uso de um produto por um determinado período de tempo para uma população que tenha exibido resistência não o habilitará a um novo uso eficaz (GONZÁLES, 1975).

Segundo a FAO (2004) populações de carrapatos, que ao serem expostas aos acaricidas, tiverem seu potencial de sobrevivência e reprodução preservados, podem ser consideradas resistentes. Em alguns casos, *R.*

microplus apresenta resistência antes de entrar em contato com determinado produto. Isso ocorre porque já existiam alguns indivíduos naturalmente resistentes, ou então, como é mais comum, o uso frequente do produto causou alterações (mutações) em alguns indivíduos da população tornando-os menos suscetíveis (CAMPOS et al., 2012).

A continuidade do uso dos compostos sintéticos faz aumentar o número de indivíduos com resistência. Isso ocorre, uma vez que morre a maioria dos indivíduos sensíveis e os resistentes acasalam entre si, produzindo descendentes cada vez mais resistentes e em maior número na população (FURLONG, 2000). Segundo KOCAN (1995) *R. microplus* pode desenvolver resistência mais rapidamente que outros carrapatos, por possuir um curto período de tempo entre as gerações.

A resistência aos princípios ativos pelo *R. microplus* vem sendo relatada em alguns estudos. Nos últimos anos se observam um aumento considerável nos relatos científicos sobre o desenvolvimento de resistência de grande parte dos princípios ativos químicos disponíveis comercialmente (FURLONG et al., 1999; CAMILO et al., 2009; RAYNAL et al., 2013). No Brasil, Farias (1999) relatou casos de resistência a organofosforados e piretróides sintéticos, que foi relacionado à insensibilidade da acetilcolinesterase a estes compostos (FOIL et al., 2004; TEMEYER et al., 2010). Esse mecanismo de resistência também foi relatado em linhagens resistentes de *R. microplus* a outros acaricidas sintéticos (JANADAREE BANDARA et al., 2017).

2.6 PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL COMO ALTERNATIVA CARRAPATICIDA

Devido aos problemas que acometem os organismos parasitados por causa da toxicidade das substâncias sintéticas (CHAGAS et al., 2003), há uma necessidade em reduzir a utilização desses acaricidas e inseticidas tanto quanto possível (FARIAS et al., 2009), e buscar soluções alternativas para o controle dos carrapatos (PARIZI et al., 2009).

Nessa perspectiva, produtos naturais surgem como alternativa de controle em potencial. O desenvolvimento lento da resistência pelos insetos (MACIEL et al., 2010), baixo impacto ambiental e redução de resíduos nos produtos de

origem animal (DIETRICH et al., 2011), são vantagens que os produtos naturais possuem sobre os compostos sintéticos. Além disso, compostos naturais proporcionam um aumento do nível de segurança para o gado, quando comparados aos acaricidas sintéticos convencionais (GROSS et al., 2017).

Os óleos essenciais são exemplos de produto natural. Eles são produtos adquiridos por destilação a vapor, ricos em compostos bioativos, derivados do metabolismo secundário das plantas (SILVA et al., 2018; NAZZARO et al., 2013). Apresentam-se como misturas complexas de compostos orgânicos voláteis de baixo peso molecular, formados principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Podem constituir ainda os óleos essenciais os álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis e éteres de fenol (BIZZO et al., 2009; CAMPOS et al., 2012).

Diversos estudos comprovaram experimentalmente que os óleos essenciais têm efetividade inseticida, acaricida, fungicida, bactericida e repelente (ANDERSON; COATS, 2012; FARIAS et al., 2009; DOLAN et al., 2009). Além disso, têm sido empregados nas indústrias farmacêuticas, alimentares, agrícolas e de cosméticos (BAKKALI et al., 2008).

Os terpenos também chamados de terpenoides ou isoprenoides, (CHANG et al., 2010), representam um dos maiores grupos de metabólitos vegetais e são os principais constituintes dos óleos essenciais (RATTAN, 2010). O crescente interesse destes compostos é atribuído à gama de propriedades biológicas, tais como efeito antitumoral, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, anti-hiperglicêmico, analgésico, anti-inflamatório e atividades antiparasitárias (PADUCH et al., 2007).

Alguns trabalhos já demonstraram que terpenos tem atividade carrapaticida e mostram resultados satisfatórios (MONTEIRO et al., 2009; CHAGAS et al., 2012; CRUZ et al., 2013; ASSIS-LAGE et al., 2015; PEIXOTO et al., 2015).

Além disso, óleos essenciais e terpenos isolados foram também investigados por sua capacidade de inibição da AChE (DOHI et al., 2009; DANDLEN et al., 2011). O alvo da atuação de terpenos em artrópodes são os receptores da enzima acetilcolinesterase. A toxicidade dos terpenos em

artrópodes é comumente mediada por alterações nos mecanismos nervosos, atuando principalmente nos receptores de acetilcolinesterase, ácido gama-aminobutírico, octopamina e tiromina (BLENAU et al., 2012; LOPES, 2015).

3. OBJETIVO

3.1 GERAL

Avaliar a ação dos terpenos na atividade acaricida e inibição da acetilcolinesterase em cepas resistente e sensível de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito inibitório dos terpenos citral, timol, R-(-)-carvona, S-(+)-carvona, p-cimeno, α -terpineno, γ -terpineno, carvacrol, eucaliptol, R-(+)-limoneno e S-(-)-limoneno sobre acetilcolinesterase de *R. microplus* sensível e resistente;
- Verificar a atividade carrapaticida dos terpenos, por teste de imersão larvar em cepa resistente e sensível;
- Correlacionar a relação da inibição enzimática com a atividade carrapaticida dos terpenos.

4. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho estão apresentados sob forma de artigo, intitulado “Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition by terpenes on *Rhipicephalus microplus*”

**Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition by terpenes on
*Rhipicephalus microplus***

Alana dos Santos Cardoso^a, Everton Gomes Guimarães dos Santos^a, Aldilene da Silva Lima^b, Kevin B. Temeyer^c, Adalberto A. Pérez de León^c, Livio Martins Costa-Junior^{b*} and Alexandra Martins dos Santos Soares^{a*}

^a Laboratory of Plant Biochemistry, Federal University of Maranhão, Sao Luís, MA, Brazil

^b Laboratory of Parasite Control, Federal University of Maranhão, Sao Luís, MA, Brazil

^c Knippling-Bushland U.S.Livestock Insects Research Laboratory, Kerrville, TX, United States of America

* Authors for correspondence
Tel .: +55 98 32729547
E-mail address: livioslz@yahoo.com
Tel .: +55 98 32729255
E-mail address: alexandra.ufma@gmail.com

ABSTRACT

The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick is the main ectoparasite of cattle in tropical and subtropical regions worldwide. Resistance to chemical acaricides has become widespread affirming the need for new drugs to tick control. Terpenes have become a promising alternative for cattle tick control, however the mechanism of action of these compounds is still controversial. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) is a well established mechanism of action of organophosphate and carbamate acaricides, but the possible action of terpenes on tick AChEs has not hardly been studied in resistant and sensitive strains of *R. microplus*. The aim of the present study was to evaluate terpene inhibition of AChE from resistant and sensitive strains of *R. microplus* correlating with their acaricidal activity. Among the terpenes used in the present study, p-cymene, thymol, carvacrol, and citral displayed acaricidal activity with LC₅₀ of 1.75, 1.54, 1.41, and 0.38 mg.mL⁻¹ for the susceptible strain, and LC₅₀ of 1.40, 1.81, 1.10, and 1.13 mg.mL⁻¹ for the resistant strain. Thymol and carvacrol inhibited the AChE of the susceptible strain larvae with IC₅₀ of 0.93 and 0.04 mg.mL⁻¹, respectively. The IC₅₀ exhibited by eucalyptol, carvacrol and thymol for AChE of the resistant strain larvae were 0.36, 0.28, and 0.13 mg.mL⁻¹, respectively. This was the first study to investigate the action of terpenes on AChE from susceptible and resistant *R. microplus*. As some terpenes with acaricidal activity showed AChE inhibition and others do not, the participation of AChE in the acaricidal activity of terpenes needs further investigation.

Keywords: Tick, Natural compound, Terpenes.

1. INTRODUCTION

Rhipicephalus (Boophilus) microplus is one of the most important ectoparasites afflicting cattle in tropical and subtropical regions worldwide (Conceicao et al., 2017; Rodriguez-Vivas et al., 2018). The effectiveness of synthetic chemical acaricides, used as the main control strategy against *R. microplus* (Furlani et al., 2015) has been decreased, as a consequence of the suboptimal dosages applied and misuse of antiparasitic drugs (Reck et al., 2014; Valente et al., 2017). As a result, tick populations resistant to several commercial acaricides have been detected worldwide (Klafke et al., 2006; Gomes et al., 2011).

Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) is reported as one of the main actions of organophosphates (OPs) and carbamates (Anderson and Coats, 2012; Temeyer et al., 2013), leading to a rapid twitching of muscles, convulsions, and insect death (Anderson and Coats, 2012; Sharifi et al., 2017). The phenomenon of resistance has been associated with the insensitivity of AChE to these compounds (Foil et al., 2004; Temeyer et al., 2010). For instance, this is the primary mechanism of resistance of *R. microplus* to OP (Temeyer et al., 2010) and it is also present in several resistant strains to other synthetic acaricides (Janadaree Bandara and Parakrama Karunaratne, 2017). Three AChEs (rBmAChE 1, rBmAChE 2, and rBmAChE 3) have been described in *R. microplus*. The enzymes display different biochemical properties and are present in different tissues, where they probably perform different *in vivo* functions (Temeyer et al., 2010; Temeyer et al., 2013).

Essential oils, a complex mixture of organic compounds, mainly terpenes, have been considered as a tick control alternative with some advantages over synthetic compounds (Aazza et al., 2011; Gross et al., 2017; Lima et al., 2018). Several studies have shown the acaricidal and/or repellent activity of essential oils of *Lippia alba*, *Mesosphaerum suaveolens*, *Ocimum gratissimum* and *Alpinia zerumbet* (Cruz et al., 2013; Peixoto et al., 2015; Costa-Junior et al., 2016; Castro et al., 2018).

Taking into consideration that (i) different terpenes of essential oils display acaricidal activity (Dolan et al., 2009; Gross et al., 2017); (ii) several essential oils and isolated terpenes have inhibitory activity on AChE (Dohi et al.,

2009; Dandlen et al., 2011), and that (iii) to the best of our knowledge the inhibitory action of terpenes on resistant and susceptible *R. microplus* AChE has not been reported, the current study aimed to assess the activity of terpenes against *R. microplus* and the inhibitory activity on tick's AChE. We expected to contribute new data for the elucidation of the mechanisms of acaricide action, and to further evaluate the use of these compounds as new alternative control products against *R. microplus*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Tick collection and maintenance

Fully engorged females of *R. microplus* susceptible (Porto Alegre strain) and resistant to six classes of acaricides (Jaguar strain) (Reck et al., 2014) were maintained by artificial infestations of cattle, which were not recently exposed to acaricide. The ticks were manually collected, washed with distilled water, dried on filter paper, weighed and separated into groups containing ten specimens each (maximum weight difference was ± 0.5 g) and maintained at 27 °C and $\geq 80\%$ relative humidity until oviposition was completed. Eggs were collected and incubated in an oxygen demand biochemical incubator for hatching. Randomly selected larvae aged 14–21 days were used in larval immersion tests. (Lima et al., 2018). The experimental procedures were approved by the animal research ethics committee of the Federal University of Maranhão - UFMA under protocol number 23115.008186 / 2017-18.

2.2. AChE extraction

In order to extract the multiple AChEs present in the larval extracts, *R. microplus* larvae of susceptible and resistant strain were macerated using a mortar and pestle for 5 min in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 5 mM EDTA, 0.5% (v/v) Triton X-100, and 5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ protease Inhibitor mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), at a 1:25 ratio (larva weight/buffer volume). The extract was left standing for 25 min at 4 °C and centrifuged at 4 °C

for 30 min at 15.000 x g. The supernatant (enzyme extract) was recovered, stored at 4 °C, and used as a source of AChEs.

2.3. Protein quantification

Protein concentration of the enzyme extract was determined using bovine serum albumin (BSA) as standard (Bradford, 1976). Results were expressed in milligrams of proteins per milliliter (mg.mL⁻¹).

2.4. Determination of AChE activity

The AChE activity of the enzyme extracts was determined according to Ellman (1961), modified as described by Li et al. (2005). The reaction mixture consisted of 10 µL of the enzyme extract (1.5 mg protein mL⁻¹ final concentration), 100 µL 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, and 100 µL of the reaction solution. The reaction solution contained 0.24 mM acetylthiocholine iodide (Sigma-Aldrich) and 0.64 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma-Aldrich) prepared in the above sodium phosphate buffer. In the blank sample, the enzyme extract aliquot was replaced by the buffer. Blanks were carried out with ethanol to prove that this alcohol was not inhibiting the enzyme. Reaction was conducted in a 96 well microplate for 30 min and monitored every 5 min by recording the absorbance (Abs) at 405 nm (Microplate Reader, Biochrom). Activity was calculated using the equation: Activity (abs/mL/min) = [(T₃₀-T₀)/30] x 100, where T₀ and T₃₀ = sample absorbance - blank absorbance measured at zero and 30 min reaction. Only linear reactions throughout the monitoring period were considered.

2.5. Inhibition of AChE activity

Citral, thymol, R-(-)-carvone, S-(+)-carvone, p-cymene, α-terpinene, γ-terpinene, carvacrol, eucalyptol, R-(+)-limonene and S-(-)-limonene were commercially purchased (Sigma-Aldrich) and individually diluted in ethanol to 20 mg.mL⁻¹ (stock solution). From the stock solution, a terpene solution at 2 mg.mL⁻¹

¹ was prepared in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5. The final terpene concentrations tested were 0.002, 0.003, 0.005, 0.008, 0.012, 0.017, 0.026, 0.039, 0.058, 0.088, 0.13, 0.20, 0.30, 0.44, 0.67 and 1.00 mg.mL⁻¹. The AChE inhibitory activity was evaluated by mixing 10 µL of the enzyme extract with 100 µL of the terpene and 100 µL of the reaction solution described above. Propoxur (Sigma-Aldrich) was used as a positive control. It was similarly prepared as the terpenes, but at 0.25, 0.05, 0.025, 0.005, 0.0025 and 0.0005 mM final concentrations (Prado-Ochoa et al., 2014). In the negative control, terpenes or propoxur was replaced by the phosphate buffer and ethanol. Reactions were conducted in a 96 well microplate for 30 min and monitored every 5 min by recording the absorbance (Abs) at 405 nm (Microplate Reader, Biochrom). The percentage of enzyme inhibition was calculated by comparison with the negative control as follows: AChE inhibition (%) = 100 - [(As / Ac) x 100], where: As = AChE activity for each concentration; Ac = Negative control (AChE activity without terpene). Only linear reactions throughout the monitoring period were considered.

2.6. Larval Immersion Test

The action of terpenes on *R. microplus* was evaluated with the Larval Immersion Test (LIT) according to the bioassay previously described (Klafke et al., 2006). Briefly, terpenes were diluted in a solution containing 1.0% (v/v) ethanol and 0.02% (v/v) Triton X-100. The final terpene concentrations tested were 0.08, 0.21, 0.41, 0.51, 1.28, 1.71, 2.45, 3.5, and 5.0 mg.mL⁻¹. The control group was treated with 1.0% (v/v) ethanol + 0.02% (v/v) Triton X-100 solution. Approximately 500 larvae were immersed for 10 min with constant inversion at 25 °C in each test solution and then they were transferred to a paper filter to dry. Next, approximately 100 larvae were transferred to a clean dry filter paper (8.5 × 7.5 cm) that was folded and closed with clips. The packets were incubated at 27 ± 1 °C with relative humidity (RH) ≥ 80% for 24 h. After incubation, dead and alive larvae were counted. Larvae not moving were recorded as dead. The experiment was performed with three replicates for each treatment.

2.7. Statistical analyses

The data were initially transformed to Log(X), normalized and the nonlinear regression (GraphPad Prism 7.0 software, GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) used to calculate IC₅₀ (Concentration to inhibit 50% of the acetylcholinesterase activity) and LC₅₀ (Concentration at which 50% of the larvae died) of susceptible and resistant *R. microplus* strains. Statistical comparisons of IC₅₀ and LC₅₀ were performed using the F test (P < 0.0001).

3. RESULTS

Among the eleven terpenes used in this study, p-cymene, thymol, carvacrol, and citral are noteworthy due to their relatively low LC₅₀ values in the *R. microplus* larvae immersion test, respectively: 1.75, 1.54, 1.41, and 0.38 mg.mL⁻¹ for the susceptible strain, and 1.40, 1.81, 1.10, 1.13 mg.mL⁻¹ for the resistant strain (Figure 1A). The resistant strain showed IC₅₀ AChE higher than the susceptible strain in the propoxur test (IC₅₀ = 0.0041 mg.mL⁻¹ and 0.00008 mg.mL⁻¹ for the resistant and susceptible strain, respectively). The terpenes eucalyptol, R-(-)-carvone, S-(+)-carvone, R-(+)-limonene and S-(-)-limonene, showed low toxicity against *R. microplus* larvae (LC₅₀ > 5 mg.mL⁻¹).

Five terpenes showed inhibitory activity against *R. microplus* AChE under the experimental conditions and concentrations tested: thymol, carvacrol, eucalyptol, citral, and R-(-)-carvone (Figure 1B). Carvacrol and thymol showed the highest AChE inhibition. While carvacrol showed a higher percentage of AChE inhibition for the susceptible strain (IC₅₀ = 0.04 mg.mL⁻¹), thymol (IC₅₀ = 0.13 mg.mL⁻¹) exerted greater AChE inhibitory activity for the resistant *R. microplus* strain. R-(-)-carvone showed low toxicity to *R. microplus* (LC₅₀ > 5 mg.mL⁻¹) and a low percentage of AChE inhibition (52.14% and 47.78% at 1 mg.mL⁻¹ (Supplementary Figure S1), for the susceptible and resistant strain, respectively). On the other hand, p-cymene had no AChE inhibitory activity under the experimental conditions used, despite displaying a significant acaricidal activity (LC₅₀ = 1.40 mg.mL⁻¹ and 1.75 mg.mL⁻¹ for the resistant and susceptible strains, respectively).

4. DISCUSSION

The terpenes used in this study were selected because they are present in essential oils with demonstrated acaricidal activity (Gross et al., 2017; Lima et al., 2017; Lima et al., 2018). Additionally, these terpenes have been shown to have acaricidal activity against strains with different acaricide susceptibilities (Monteiro et al., 2010; Cruz et al., 2013; Peixoto et al., 2015; Costa-Junior et al., 2016; Tabari et al., 2017; Lima et al., 2018). However, this is the first study attempting to correlate the acaricidal activity of these terpenes with acetylcholinesterase inhibition.

Propoxur is an insecticidal compound of the carbamate family. It is structurally similar to organophosphates, but acts by reversibly inhibiting acetylcholinesterase in the tick nervous system (Prado-Ochoa et al., 2014; Silberman and Taylor, 2019). The altered AChE providing resistance to carbamates may exhibit low enzymatic activity (Janadaree Bandara and Parakrama Karunaratne, 2017). Thus, it is possible to differentiate resistant strains from susceptible strains based on the propoxur tests (Baxter et al., 1999; Prado-Ochoa et al., 2014). The resistant strain used in our work proved its insensitivity to carbamates by presenting a 51.2-fold net higher IC_{50} for AChE (for the combined AChEs present in the larval extract) in the propoxur test than for the susceptible strain.

Our results (Figure 1A) are in agreement with previous studies. The acaricidal activity of the isomers carvacrol and thymol has previously been described against *R. microplus*. Carvacrol is more effective than thymol and also more toxic to resistant strains than to susceptible strains (Costa-Junior et al., 2016). Studies with *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) showed that carvacrol and thymol were more effective than commercial synthetic compounds such as permethrin (Tabari et al., 2017). Thymol at 2.0% presented deleterious action in the different stages of *R. microplus* and displayed an inhibitory efficiency of 99% on hatching, suggesting that the action of terpenes is not restricted only to larvae and adults (Monteiro et al., 2010). Previous studies on AChE from *Electrophorus electricus* (electric eel) showed that carvacrol exerts a 11.75-fold stronger inhibitory effect (IC_{50} of 0.063 mg.mL⁻¹) than thymol (IC_{50} of 0.74 mg.mL⁻¹) (Jukic et al., 2007). In our study, carvacrol showed higher inhibition of AChE from the susceptible strain (Figure 1B).

The acaricide inefficiency of eucalyptol presented in our paper, has been previously reported by Hue et al. (2015) on larvae of *R. microplus* resistant to deltamethrin and susceptible to amitraz. A previous study by Abdelgaleil et al. (2009) reported that 10 mM eucalyptol produced 64.9% inhibition of AChE from *Tribolium castaneum* beetles, in substantial agreement with our study, where 6.5 mM eucalyptol showed approximately 40-60% inhibitory activity on *R. microplus* AChE (Supplementary Figure S2). The non-correlation between inhibition of AChE and its toxicity suggests that eucalyptol is not being absorbed by *R. microplus* larvae, either because of its hydrophobicity (Castro et al., 2018), or possibly because of a physical phenomenon called apassivation, where the product is initially absorbed, but then forms a film, barring the passage of the compound (Chagas et al., 2002).

The acaricidal activity of citral was previously reported (Peixoto et al., 2015) on *R. microplus* larvae (resistant to amidines and synthetic pyrethroids, but susceptible to organophosphates) in agreement with data presented in this work (Figure 1A). However, citral has low AChE inhibitory activity (Figure 1B), suggesting that its acaricidal efficiency is likely exerted through other mechanisms of action.

The results of this work suggest that there is a positive correlation between the presence of oxygenated functions of the terpenes (Supplementary Figure S3) and the AChE inhibition. The terpenes with ketone function, R-(-)-carvone and S-(+)-carvone, showed low or no inhibition of AChE. However, the presence of hydroxyl group resulted in a greater AChE inhibitory activity as demonstrated by carvacrol and thymol. The p-cymene, structurally similar to carvacrol and thymol but without the hydroxyl group (Games et al., 2016), did not display any AChE inhibitory activity. This characteristic of p-cymene was also responsible for the absence of repellent activity against *Amblyomma americanum* in contrast to carvacrol and thymol (Carroll et al., 2017).

The position of the hydroxyl group in the structures of carvacrol and thymol is crucial for the inhibitory activity on AChE (Dandlen et al., 2011; Lopes, 2015). The OH in thymol is positioned in a way that decreases the available area of interaction within the active site of AChEs (Lopes, 2015). However, for the resistant strain, we showed that thymol is more active than carvacrol as AChE inhibitor (Figure 1B). Probably, this can be explained because a series of

common shared point mutations in the enzyme AChE appear to be responsible for conferring resistance to organophosphorus and carbamate insecticides in most arthropod pests. These mutations are associated with changes in protein structure and reduced sensitivity (Foil et al., 2004; Russell et al., 2004; Lee et al., 2015; Guo et al., 2017). In this work, carvacrol did inhibit AChE from the susceptible strain more than that from the resistant strain (Figure 1B), substantiating the hypothesis that the altered AChE in the resistant strain is less sensitive to carvacrol, suggesting that carvacrol does indeed interact with AChE affecting its catalytic function.

The relationship between AChE inhibition and pesticidal activity associated with terpenes remains unclear, possibly reflecting different biological activities, different effects on multiple AChEs present in some species, including ticks (Temeyer, 2018), and possibly different targets for the different terpenes in different arthropod species. For example, carvacrol presented significant inhibitory action on AChE of German cockroaches (*Blattella germanica*), associating the toxicity of carvacrol with its AChE inhibitory capacity (Yeom et al., 2012). In other arthropods such as *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), a negative correlation between toxicity and AChE inhibition was found in tests with thymol and carvacrol (Hieu et al., 2012).

Many resistant strains of *R. microplus* have altered AChE activity as a mechanism of resistance (Temeyer et al., 2013; Prado-Ochoa et al., 2014; Janadaree Bandara and Parakrama Karunaratne, 2017). Various terpenes may present new modes of insecticidal or acaricidal action, or they may exhibit activities suggesting specific mitigation of existing resistance mechanisms. Nevertheless, studies on the mechanisms of action of terpenes should be further explored since these are strong acaricidal candidates, potentially effecting different metabolic targets.

Among the terpenes tested, citral, carvacrol, thymol, p-cymene, α -terpinene and γ -terpinene showed acaricidal activity to larvae of *R. microplus*. However, only carvacrol, thymol, eucalyptol, citral, and R-(-)-carvone inhibited AChE. The results of this study suggest that the acetylcholinesterase inhibition may be the main mechanism by which carvacrol acts on *R. microplus*.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the FAPEMA (Maranhão State Research Foundation) for financial support under process UNIVERSAL-00739/17 and for awarding a fellowship to E.G.G Santos. We thank the FINEP (Funding Authority for Studies and Projects) and FAPEMA for supporting the IECT (Science and Technology Institute of Maranhão) Biotechnology. We thank the CAPES (Higher Education Personnel Improvement Coordination) for awarding a fellowship to A.S Cardoso and CNPq (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development) for awarding a fellowship to L.M. Costa-Junior. We also thank Dr. José Tadeu A. Oliveira (Federal University of Ceará) and Dr. Paul Michels (The University of Edinburgh) for his valuable suggestions, assistance and critical review of this manuscript.

REFERENCES

- Aazza, S., Lyoussi, B., Miguel, M.G., 2011. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules* 16, 7672-7690.
- Abdelgaleil, S.A., Mohamed, M.I., Badawy, M.E., El-arami, S.A., 2009. Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *J. Chem. Ecol.* 35, 518-525.
- Anderson, J.A., Coats, J.R., 2012. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. *Pestic. Biochem. Phys.* 102, 124-128.
- 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.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Carroll, J.F., Demirci, B., Kramer, M., Bernier, U.R., Agramonte, N.M., Baser, K.H.C., Tabanca, N., 2017. Repellency of the *Origanum onites* L. essential oil and constituents to the lone star tick and yellow fever mosquito. *Nat. Prod. Res.* 31, 2192-2197.
- Castro, K.N.C., Canuto, K.M., Brito, E.S., Costa-Junior, L.M., Andrade, I.M., Magalhaes, J.A., Barros, D.M.A., 2018. In vitro efficacy of essential oils with different concentrations of 1,8-cineole against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 27, 203-210.
- Chagas, A.C.S., Passos, W.M., Prates, H.T., Leite, R.C., Furlong, J., Fortes, I.C.P., 2002. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* 39, 247-253.
- Conceicao, R.S., A.C.M.M., Alves Reis, I.M., Branco, A., Curcino Vieira, I.J., Braz-Filho, R., Botura, M.B., 2017. In vitro acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. *Ticks Tick-Borne Dis.* 8, 275-282.
- Costa-Junior, L.M., Miller, R.J., Alves, P.B., Blank, A.F., Li, A.Y., Perez de Leon, A.A., 2016. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 228, 60-64.
- Cruz, E.M., Costa, L.M., Jr., Pinto, J.A., Santos, D.A., Araujo, S.A., Arrigoni-Blank, M.F., Bacci, L., Alves, P.B., Cavalcanti, S.C., Blank, A.F., 2013. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 195, 198-202.
- Dandlen, S.A., Miguel, M.G., Duarte, J., Faleiro, M.L., Sousa, M.J., Lima, A.S., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., 2011. Acetylcholinesterase Inhibition Activity of Portuguese Thymus Species Essential Oils. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 14, 140-150.

- Dohi, S., Terasaki, M., Makino, M., 2009. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4313-4318.
- Dolan, M.C., Jordan, R.A., Schulze, T.L., Schulze, C.J., Manning, M.C., Ruffolo, D., Schmidt, J.P., Piesman, J., Karchesy, J.J., 2009. Ability of two natural products, nootkatone and carvacrol, to suppress *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in a Lyme disease endemic area of New Jersey. *J. Econ. Entomol.* 102, 2316-2324.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Foil, L.D., Coleman, P., Eisler, M., Fragoso-Sanchez, H., Garcia-Vazquez, Z., Guerrero, F.D., Jonsson, N.N., Langstaff, I.G., Li, A.Y., Machila, N., Miller, R.J., Morton, J., Pruett, J.H., Torr, S., 2004. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Vet. Parasitol.* 125, 163-181.
- Furlani, R.P.Z., Dias, F.F.G., Nogueira, P.M., Gomes, F.M.L., Tfouni, S.A.V., Camargo, M.C.R., 2015. Occurrence of macrocyclic lactones in milk and yogurt from Brazilian market. *Food Control.* 48, 43-47.
- Games, E., Guerreiro, M., Santana, F.R., Pinheiro, N.M., Oliveira, E.A., Lopes, F.D., Olivo, C.R., Tiberio, I.F., Martins, M.A., Lago, J.H., Prado, C.M., 2016. Structurally Related Monoterpenes p-Cymene, Carvacrol and Thymol Isolated from Essential Oil from Leaves of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) Protect Mice against Elastase-Induced Emphysema. *Molecules.* 21.
- Gomes, A., Koller, W.W., Barros, A.T.M., 2011. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cienc. Rural.* 41, 1447-1452.
- Gross, A.D., Temeyer, K.B., Day, T.A., Perez de Leon, A.A., Kimber, M.J., Coats, J.R., 2017. Interaction of plant essential oil terpenoids with the southern cattle tick tyramine receptor: A potential biopesticide target. *Chem. Biol. Interact.* 263, 1-6.
- Guo, D., Luo, J., Zhou, Y., Xiao, H., He, K., Yin, C., Xu, J., Li, F., 2017. ACE: an efficient and sensitive tool to detect insecticide resistance-associated

- mutations in insect acetylcholinesterase from RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*. 18, 330.
- Hieu, T.T., Kim, S.I., Ahn, Y.J., 2012. Toxicity of *Zanthoxylum piperitum* and *Zanthoxylum armatum* oil constituents and related compounds to *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.* 49, 1084-1091.
- Hue, T., Cauquil, L., Fokou, J.B., Dongmo, P.M., Bakarnga-Via, I., Menut, C., 2015. Acaricidal activity of five essential oils of *Ocimum* species on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. *Parasitol. Res.* 114, 91-99.
- Janadaree Bandara, K.M.U., Parakrama Karunaratne, S.H.P., 2017. Mechanisms of acaricide resistance in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Sri Lanka. *Pestic. Biochem. Physiol.* 139, 68-72.
- Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M., Milos, M., 2007. In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytother. Res.* 21, 259-261.
- Klafke, G.M., Sabatini, G.A., Albuquerque, T.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miller, R.J., Schumaker, T.T., 2006. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 142, 386-390.
- Lee, S.H., Kim, Y.H., Kwon, D.H., Cha, D.J., Kim, J.H., 2015. Mutation and duplication of arthropod acetylcholinesterase: Implications for pesticide resistance and tolerance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 120, 118-124.
- Li, A.Y., Pruetz, J.H., Davey, R.B., George, J.E., 2005. Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 81, 145-153.
- Lima, A.S., Maciel, A.P., Mendonça, C.J.S., Costa Junior, L.M., 2017. Use of encapsulated carvacrol with yeast cell walls to control resistant strains of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Ind. Crop. Prod.* 108, 190-194.
- Lima, A.S., Milhomem, M.N., Santos Monteiro, O., Arruda, A.C.P., Castro, J.A.M., Fernandes, Y.M.L., Maia, J.G.S., Costa-Junior, L.M., 2018. Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 117, 59-65.

- Lopes, A.J.O., 2015. Estudo computacional da interação de terpenos com acetilcolinesterase de *Rhipicephalus microplus* e potenciais novos candidatos a carrapaticidas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, Maranhão.
- Monteiro, C.M.O., Daemon, E., Silva, A.M., Maturano, R., Amaral, C., 2010. Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 106, 615-619.
- Peixoto, M.G., Costa-Junior, L.M., Blank, A.F., Lima, A.S., Menezes, T.S., Santos, D.A., Alves, P.B., Cavalcanti, S.C., Bacci, L., Arrigoni-Blank M, F., 2015. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* 210, 118-122.
- Prado-Ochoa, M.G., Ramirez-Noguera, P., Diaz-Torres, R., Garrido-Farina, G.I., Vazquez-Valadez, V.H., Velazquez-Sanchez, A.M., Munoz-Guzman, M.A., Angeles, E., Alba-Hurtado, F., 2014. The action of two ethyl carbamates on acetylcholinesterase and reproductive organs of *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* 199, 215-224.
- Reck, J., Klafke, G.M., Webster, A., Dall'Agnol, B., Scheffer, R., Souza, U.A., Corassini, V.B., Vargas, R., Santos, J.S., Martins, J.R., 2014. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet. Parasitol.* 201, 128-136.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Jonsson, N.N., Bhushan, C., 2018. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitol. Res.* 117, 3-29.
- Russell, R.J., Claudianos, C., Campbell, P.M., Horne, I., Sutherland, T.D., Oakeshott, J.G., 2004. Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 79, 84-93.
- Sharifi, M., Ghadamyari, M., Gholivand, K., Valmoozi, A.A.E., Sajedi, R.H., 2017. Characterization of acetylcholinesterase from elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* and QSAR of temephos derivatives against its activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 136, 12-22.

- Silberman, J., Taylor, A., 2019. Carbamate Toxicity. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482183/>.
- Tabari, M.A., Youssefi, M.R., Maggi, F., Benelli, G., 2017. Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 245, 86-91.
- Temeyer, K.B., 2018. Molecular biology of tick acetylcholinesterases. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 23, 1320-1337.
- Temeyer, K.B., Pruetz, J.H., Olafson, P.U., 2010. Baculovirus expression, biochemical characterization and organophosphate sensitivity of rBmAChE1, rBmAChE2, and rBmAChE3 of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 172, 114-121.
- Temeyer, K.B., Tuckow, A.P., Brake, D.K., Li, A.Y., Perez de Leon, A.A., 2013. Acetylcholinesterases of blood-feeding flies and ticks. *Chem. Biol. Interact.* 203, 319-322.
- Valente, P.P., Moreira, G.H., Serafini, M.F., Facury-Filho, E.J., Carvalho, A.U., Faraco, A.A., Castilho, R.O., Ribeiro, M.F., 2017. In vivo efficacy of a biotherapeutic and eugenol formulation against *Rhipicephalus microplus*. *Parasitol. Res.* 116, 929-938.
- Yeom, H.J., Kang, J.S., Kim, G.H., Park, I.K., 2012. Insecticidal and acetylcholine esterase inhibition activity of Apiaceae plant essential oils and their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*). *J. Agric. Food Chem.* 60, 7194-7203.

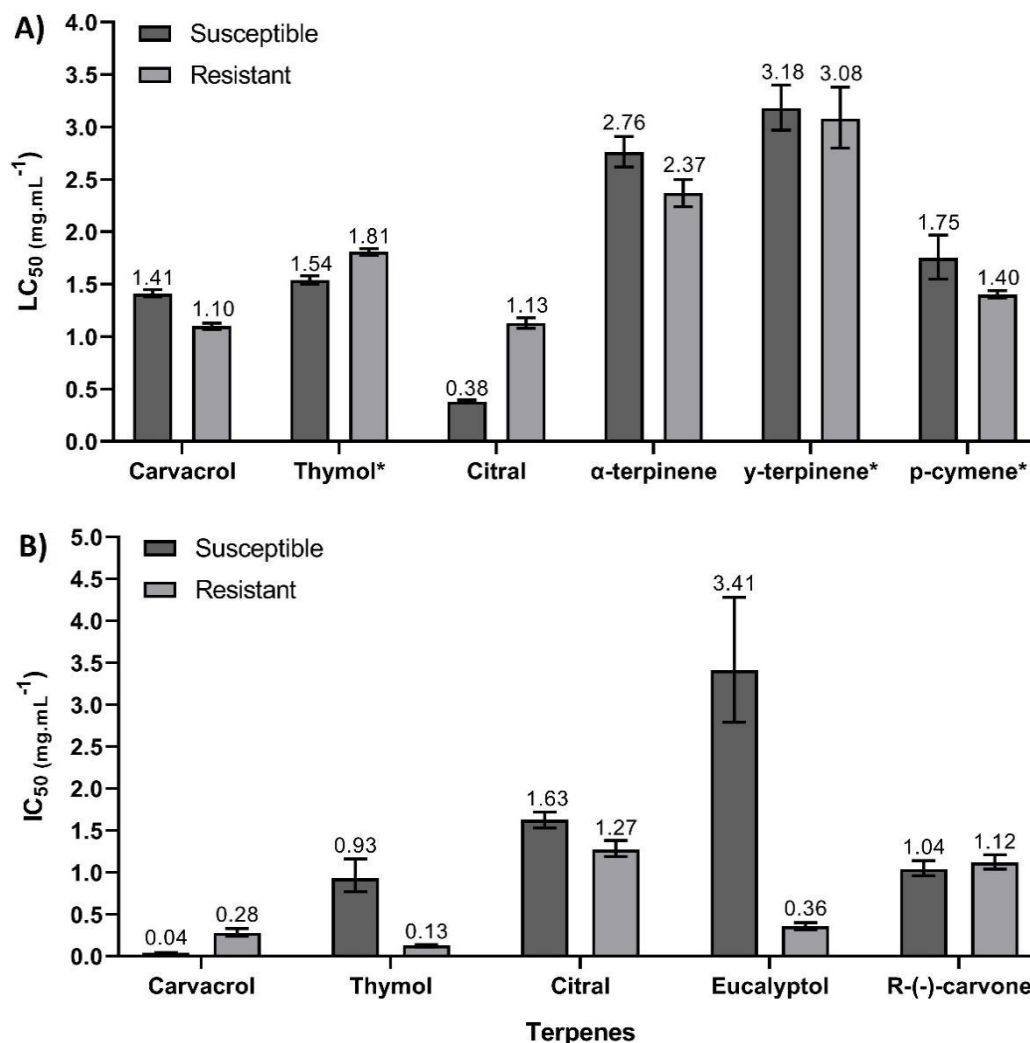
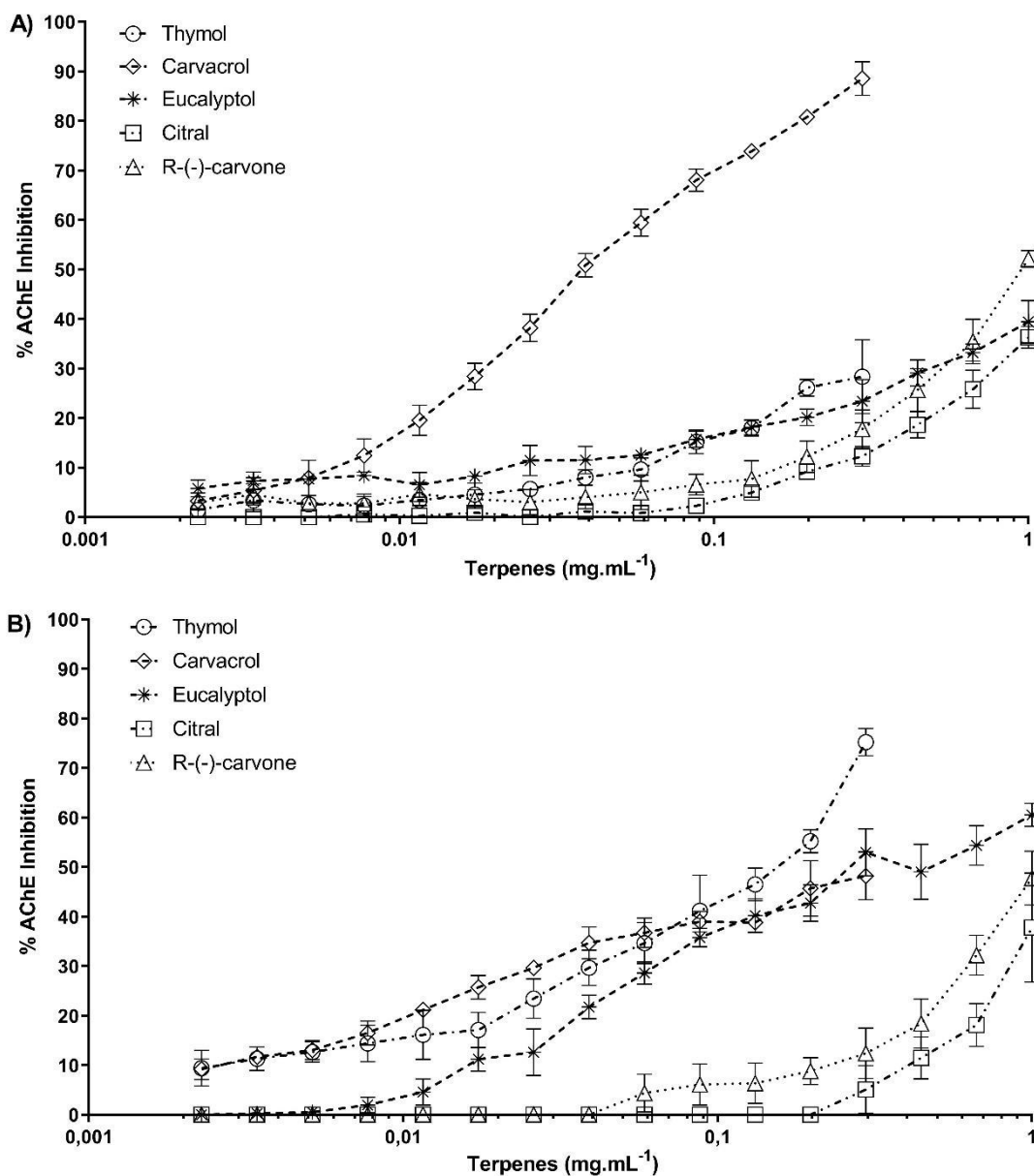


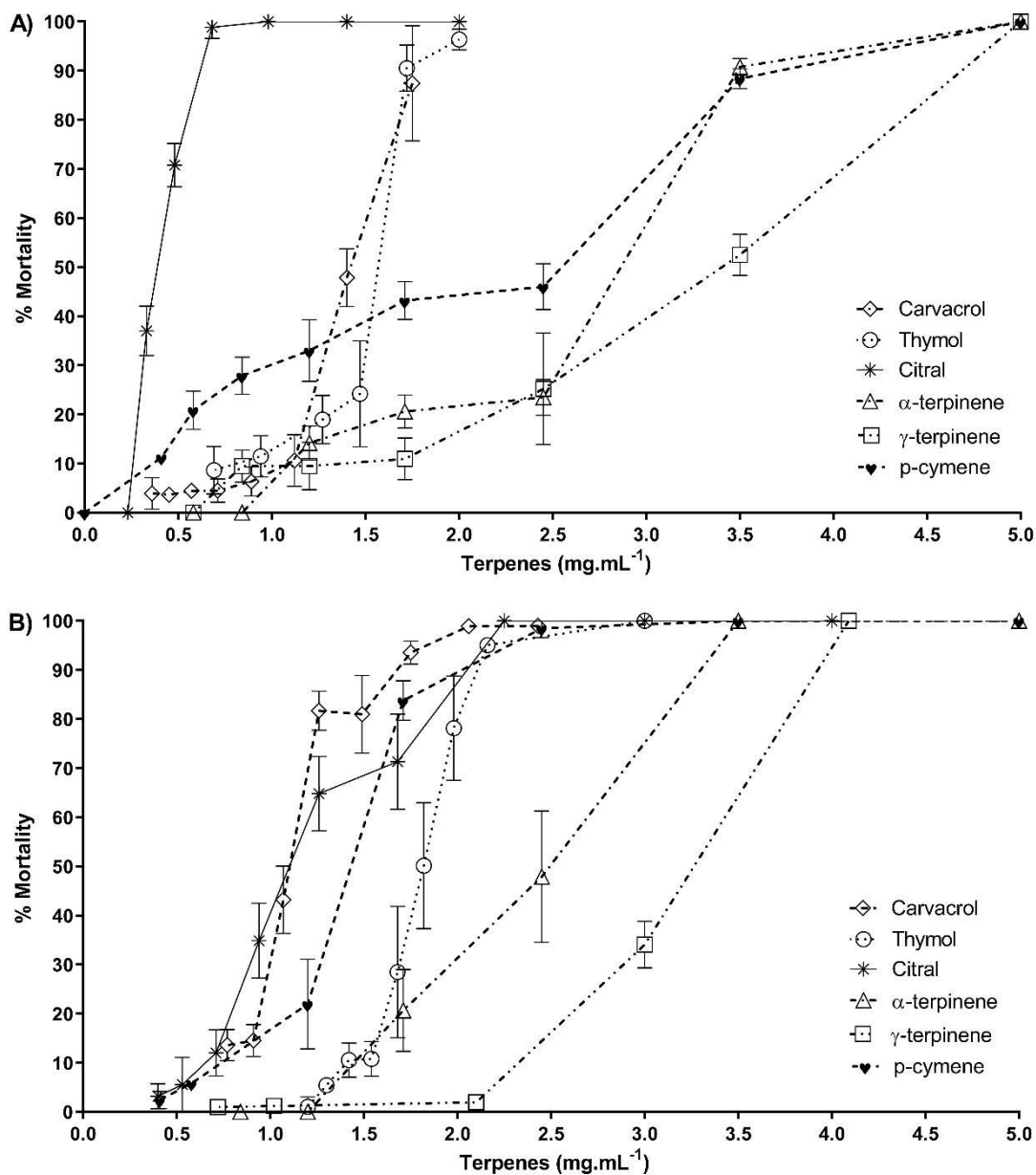
Figure 1: Effect of terpenes on larvae and on the activity acetylcholinesterase of *R. microplus*. The assays were performed with Porto Alegre (susceptible) and Jaguar (resistant) strains. **(A)** Results of the larval immersion test (LIT) shown as LC₅₀ (concentration at which 50% of the larvae died) and **(B)** results of the inhibition test shown as IC₅₀ (the concentration to inhibit 50% of acetylcholinesterase activity) are expressed in mg.mL⁻¹. (*) LC₅₀ for the resistant strain previously published by Lima et al. (2018).

Supplementary data

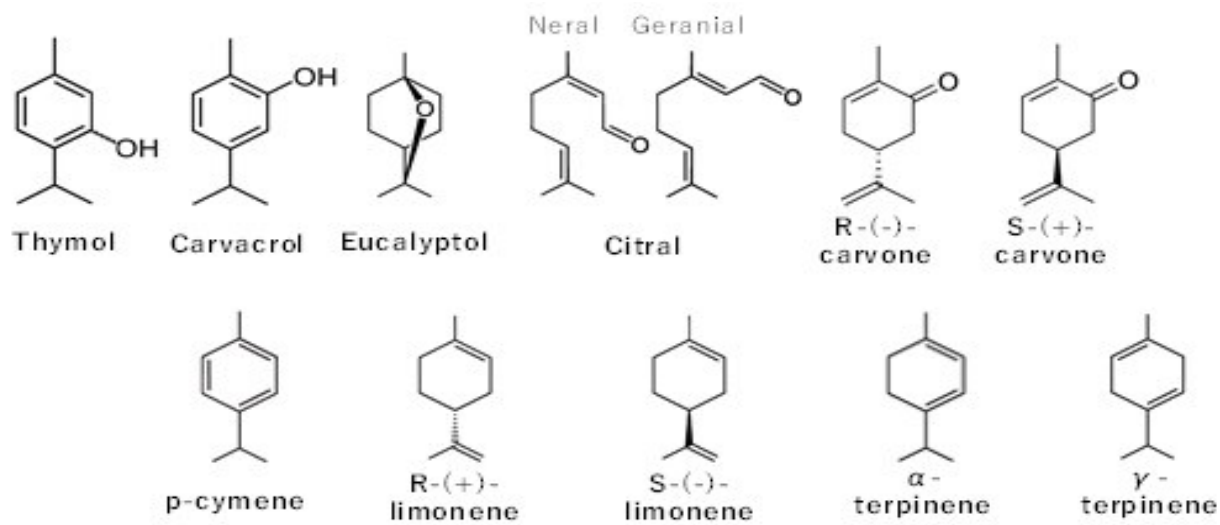
Supplementary figure 1: Results of inhibition test of thymol, carvacrol, eucalyptol, citral and R-(-)-carvone on acetylcholinesterase enzyme activity. **(A)** Porto Alegre strain (susceptible) and **(B)** Jaguar strain (resistant). Each point represents the average and standard deviation of values obtained by two independent experiments performed in triplicate.



Supplementary figure 2: Results of larval immersion test (LIT) of carvacrol, thymol, citral, α -terpinene, γ -terpinene, p-cymene on *R. microplus* larvae. **(A)** Porto Alegre strain (susceptible) and **(B)** Jaguar strain (resistant). Each point represents the average and standard deviation of values obtained by experiment performed in quadruplicate.



Supplementary figure 3: Terpenes chemical structures containing various functional groups.



5. CONSIDERAÇÃO FINAL

A inibição da acetilcolinesterase (AChE) é um mecanismo de ação bem estabelecido dos acaricidas. P-cimeno, timol, carvacrol e citral apresentaram atividade acaricida para a cepa suscetível e resistente. Timol, carvacrol, citral, eucaliptol e R - (-) - carvona inibiram a AChE. A inibição da acetilcolinesterase pode ser o principal mecanismo pelo qual o carvacrol atua em *R. microplus*.

6. REFERÊNCIAS

AAZZA S, LYOUSSI B, MIGUEL MG. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, 16: 7672-90; 2011.

ALBERTO JORGE OLIVEIRA LOPES. Estudo computacional da interação de terpenos com a acetilcolinesterase de *Rhipicephalus microplus* e potenciais novos candidatos a carrapaticidas. Dissertação de mestrado; 2015.

ANDERSON JA, COATS JR. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102: 124-128; 2012.

ANDREOTTI R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte; 2010.

BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D AND IDAOMAR M. Biological effects of essential oils. A review. *Food Chem Toxicol*, 26: 446-475; 2008.

BARRÉ N, UILENBERG G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 29: 149-160; 2010.

BAXTER GD, GREEN P, STUTTGEN M, BARKER SC. Detecting resistance to organophosphates and carbamates in the cattle tick *Boophilus microplus*, with a propoxur-based biochemical test. *Experimental e Applied Acarology*, 23: 907-14; 1999.

BEATI L, KEIRANS JE. Analysis of the systematic relationships among ticks genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*, 87: 32-48; 2001.

BIZZO HR, HOVELL AMC, REZENDE CM. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quim Nova*, 32: 588-594; 2009.

BLENAU W, RADEMACHER E, BAUMANN A. Plant essential oils and formamidines as insecticides/ acaricides: what are the molecular targets? *Apidologie*, Paris, 43: 334–347; 2012.

BORGESI LMF, SOUSAI LAD, BARBOSAI CS. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20: 89–96; 2011.

BOTELHO MA, NOGUEIRA NAP, BASTOS GM, FONSECA SGC, LEMOS LG, MATOS FJA, MONTENEGRO D, HEUKELBACH J, RAOVS, BRITO GAC. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and tymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, 40: 349–356; 2007.

CAMILLO G, VOGELI FF, SANGIONI LA, CADOREI GC, FERRARI R. Eficiência in vitro de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, 39: 490-495; 2009.

CAMPOS RNS, BACCI L, ARAÚJO APA, BLANK AF, ARRIGONI-BLANK MF, SANTOS GRA, RONEI MNB. Essential oils of medicinal and aromatic plants in the control of tick *Rhipicephalus microplus*. *Archivos de Zootecnia*, 61: 67-78; 2012.

CHAGAS ACS, BARROS LD, COTINGUIBA F, FURLAN M, GIGLIOTTI R, OLIVEIRA MCS, BIZZO HR. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, Berlin, 110: 295–303; 2012.

CHAGAS ACS, LEITE RC, FURLONG J, PRATES HT, PASSOS WM. Sensibilidade do Carrapato *Boophilus microplus* a Solventes. *Ciência Rural*, 33:109-114; 2003.

CHANG TH, HSIEH FL, KO TP, TENG KH, LIANG PH, WANG AHJ. Structure of a Heterotetrameric Geranyl Pyrophosphate Synthase from Mint

(*Mentha piperita*) Reveals Intersubunit Regulation. *The Plant Cell Online*, 22: 454–467; 2010.

COSTA-JÚNIOR LM, MILLER RJ, ALVES PB, BLANK AF, LI AY, PÉREZ DELÉON AA. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 228: 60–64; 2016.

CRUZ EM, COSTA–JUNIOR LM, PINTO JÁ, SANTOS DD, ARAUJO AS, ARRIGONI–BLANK MD, BACCI L, ALVES PB, CAVALCANTI SC, BLANK AF. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, 195: 198– 202; 2013.

CUMMING GS, VAN VUUREN DP. Will climate change affect ectoparasite species ranges? *Global Ecol Biogeogr*, 15:486–497; 2006.

DA SILVA JB, RANGEL CP, BAÊTA BA, FONSECA AH. Influence of the physiological state on infestation by *Rhipicephalus microplus* in dairy cows. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4: 52-6; 2013.

DANDLEN AS, MIGUEL MG, DUARTE J, FALEIRO ML, SOUSA M J, LIMA AS, FIGUEIREDO AC, BARROSO JG, Pedro LG. Acetylcholinesterase inhibition activity of Portuguese *Thymus* species essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14: 140-150; 2011.

DE ASSIS LAGE TC, MONTANARI RM, FERNANDES SA, DE OLIVEIRA MONTEIRO CM, DE OLIVEIRA SOUZA SENRA T, ZERINGOTA V, DA SILVA MATOS R, DAEMON E. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, 148: 24–29; 2015.

DIETRICH F, STROHSCHOEN AAG, SCHULTZ G, SEBBEN AD, REMPEL C. Utilização de inseticidas botânicos na agricultura orgânica de Arroio do Meio/RS. *Revista Brasileira de Agrociência*, 17: 251-255; 2011.

DOHI S, TERASAKI M, MAKINO M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4313-8; 2009.

DOLAN MC, JORDAN RA, SCHULZE TL, SCHULZE CJ, MANNING MC, RUFFOLO D, SCHMIDT JP, PIESMAN J, KARCHESY JJ. Ability of two natural products, nootkatone and carvacrol, to suppress *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in a Lyme disease endemic area of New Jersey. *Journal of Economic Entomology*, 102: 2316-24; 2009.

DOMINGUES R, WOHLRES-VIANA S, REIS DR, TEIXEIRA HC, FERREIRA AP, GUIMARÃES SE, PRATA MC, FURLONG J, VERMEQUE RS, MACHADO MA. Expression of immune response genes in peripheral blood of cattle infested with *Rhipicephalus microplus*. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, 13: 4013-4021; 2014.

ECOBICHON DJ, JOY RM. Pesticides and neurological diseases. In: CASARETT LJ, DOULL J. *Toxicology the basic science of poisons*. Boca Raton: CRC Press, 565- 622; 1991.

ESPIÑOZA B, TARRAB-HAZDAI R, HIMMELOCH S, ARNON R. Acetylcholinesterase from *Schistosoma mansoni*: immunological characterization. *Immunol Lett*, 28: 167–174; 1991.

ESTRADA-PEÑA A, BOUATTOUR A, CAMICAS JL, GUGLIELMONE A, HORAK I, JONGEJAN F, LATIF A, PEGRAM R, WALKER AR. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental e Applied Acarology*, 38: 219–235; 2006.

ESTRADA-PEÑA A, SÁNCHEZ-ACEDO C, QUILEZ J, DEL CACHO E. A retrospective study of climatic suitability for the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in the Americas. *Global Ecol Biogeogr*, 14:565–573; 2005.

ESTRADA-PEÑA, A. Geostatistic and remote sensing using NOAAVHRR satellite imagery as predictive tools in tick distribution and habitat suitability estimations for *R. (B.) microplus* (Acari: Ixodidae) in South America. *Veterinary Parasitology*, 81: 73-82; 1999.

FAO. Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines. 2004.

FARIAS MPO, SOUSA DP, ARRUDA AC, WANDERLEY AG, TEIXEIRA WC, ALVES LC, FAUSTINO MAG. Potencial acaricida do óleo de andiroba *Carapa guianensis* Aubl. sobre fêmeas adultas ingurgitadas de *Anocentor nitens* Neumann, 1897 e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 61: 877-882; 2009.

FARIAS NAR. Situación de la resistència de la garrapata *Boophilus microplus* em la región sur de Rio Grande Del Sur, Brazil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL. Puerto Vallarta, México. Anais. Jalisco, p.25-30; 1999.

FOIL LD, COLEMAN P, EISLER M, FRAGOSO-SANCHEZ H, GARCIA-VAZQUEZ Z, GUERRERO FD, JONSSON NN, LANGSTAFF IG, LI AY, MACHILA N, MILLER RJ, MORTON J, PRUETT JH, TORR S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Veterinary Parasitology*, 125:163-81; 2004.

FREITAS DRJ, POHL PC, VAZ IS. Caracterização da resistència aos acaricidas em *Boophilus microplus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33: 109-117; 2005.

FURLANI RPZ, DIAS FFG, NOGUEIRA PM, GOMES FML, TFOUNI SAV, CAMARGO MCR. Occurrence of macrocyclic lactones in milk and yogurt from Brazilian market. *Food Control*, 48: 43-47; 2015.

FURLONG J, MARTINS JRS, LEITE RC. Diagnóstico "in vitro" da sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus*. Projeto de pesquisa. Juiz de Fora: EMBRAPA- CNPGL, 1999.

FURLONG J. Carrapato: problemas e soluções. 1º ed. Furlong J, organizador. Juiz de Fora: Embrapa, 2005.

FURLONG J. Controle estratégico de endo e ectoparasitos em bovinos de leite na região do Brasil-Central. In: Bressan, M., Martins, C.E., Vilela, D. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora. Minas Gerais, 65-174; 2000.

FURLONG JJR, MARTINS MCA. Prata, O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *A Hora Veterinária*, 27: 1-7; 2007.

GALL VLL, KLAFE GM, TORRES TT. Detoxification mechanisms involved in ivermectin resistance in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Scientific Reports*, 8:1240; 2018.

GOMES A, KOLLER WW, BARROS ATM. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, 41: 1447–1452; 2011.

GONZALES JC. O controle do carrapato bovino. Editora Sulina. Porto Alegre, 104; 1975.

GRAF JF, GOGOLEWSK N, LEACH-BING GA, SABATINI MB, MOLENTO EL, ARANTES GJ. Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, 129: 427-442; 2004.

GRISI L, LEITE RC, MARTINS JRS, BARROS ATM, ANDREOTTI R, CANÇADO PH D, LEÓN AAP, PEREIRA JB, VILLELA HS. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Carlos, 23: 150-156; 2014.

GROSS AD, TEMEYER KB, DAY TA, PÉREZ DE LEÓN AA, KIMBER MJ, COATS JR. Interaction of plant essential oil terpenoids with the southern cattle tick tyramine receptor: A potential biopesticide target. *Chemico-Biological Interactions*, 263:1-6; 2017.

Healthy Rumis. Disponível: <https://healthyrumis.wordpress.com/ectoparasitas/>. Acessado em 24 de julho de 2019.

HIGA LOS, GARCIA MV, BARROS JC, KOLLER WW, RENATO ANDREOTTI. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. *Rev. Bras. Parasitol. Vet*, 25: 2; 2016.

JANADAREE BANDARA KMU, PARAKRAMA KARUNARATNE SHP. Parakrama Karunaratne, Mechanisms of acaricide resistance in the cattle tick

Rhipicephalus (Boophilus) microplus in Sri Lanka. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 139:68-72; 2017.

JONSSON NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, 137: 1-10; 2006.

JONSSON NN1, MAYER DG, GREEN PE. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Veterinary Parasitology*, 88: 79-92; 2000.

KASHINO SS, RESENDE J, SACCO MAS, ROCHA C, PROENÇA L, CARVALHO WA, FIRMINO AA, QUEIROZ R, BENAVIDES M, GERSHWIN LJ, DE MIRANDA-SANTOS IKF. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Experimental Parasitology*, 110:12-21; 2005.

KESSLER RH, SCHENK MAM. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1998.

KLAFKE GM, SABATINI GA, DE ALBUQUERQUE TA, MARTINS JR, KEMP DH, MILLER RJ, SCHUMAKER TT. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 142: 386-90; 2006.

KOCAN KM. Targeting ticks for controls of select haemoparasitic diseases of cattle. *Veterinary Parasitology*, 57:21-151; 1995.

LÉGER E, VOUREC'H G, VIAL L, CHEVILLON C, MCCOY KD. Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Experimental and Applied Acarology*, 59: 219–244; 2013.

MACIEL MV, MORAIS SM, BEVILAQUA CML, AMORA SSA. Plant extracts used in the control of dipteran vectors of zoonosis. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12: 105-112; 2010.

MARTHE EDB, BITTENCOURTE LM, QUEIROZ MELR. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretróides em manteiga. *Quím Nova*, 33: 1389-1393; 2010.

MONTEIRO CM, DAEMON E, CLEMENTE M.E, ROSA LS, MATURANO R. Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, Berlin, 105: 1093–1097; 2009.

MURREL A, BARKER SC. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56: 169-172; 2003.

MURREL A, CAMPBELL NJH, BARKER SC. Phylogenetic analyses of Rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16: 1-7; 2000.

NAZZARO F, FRATIANNI F, MARTINO L, COPPOLA R, FEO V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6: 1451-74; 2013.

NICARETTA JE. DINÂMICA POPULACIONAL DE *Rhipicephalus microplus* EM UMA REGIÃO DE CLIMA TROPICAL SEMIÚMIDO. Dissertação, 2018.

OLWOCH JM, VAN JAARVELD AS, SCHOLTZ CH, HORAK IG. Climate change and the genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae) in Africa. *Onderstepoort J Vet Res*, 74:45–72; 2007.

PADUCH R, SZERSZEŃ MK, TRYTEK M, FIEDUREK J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55: 315–327; 2007.

PARIZI LF, POHL PC, MASUDA A, VAZ IDA S JR. New approaches toward anti-*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick vaccine. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18:1-7; 2009.

PEIXOTO MG, COSTA-JÚNIOR LM, BLANK AF, LIMA ADA S, MENEZES TS, SANTOS DDE A, ALVES PB, CAVALCANTI SC, BACCI L, ARRIGONI-BLANK MDE F. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes

and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 210: 118–122; 2015.

PEREIRA MC, LABRUNA MB, SZABÓ MPJ, KLAFKE GM. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência. *Med Vet*, 21-25; 2008.

RATTAN RS. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29: 913–920; 2010.

RAYNAL JT, SILVA AA, SOUSA TDE J, BAHIENSE TC, MEYER R, PORTELA RW. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22: 71-7; 2013.

RAYNAL JT, SOUZA BC, SILVA AB, BAHIENSE TC, SILVA HCS, MEYER R, PORTELA RW. Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a acaricidas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 110: 23-29; 2015.

RECK J, KLAFKE GM, WEBSTER A, DALL'AGNOL B, SCHEFFER R, SOUZA UA, CORASSINI VB, VARGAS R, SANTOS JS, MARTINS JRS. First report of Fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology*, 201:128-136, 2014.

RODRIGUEZ-VIVAS RI, JONSSON NN, BHUSHAN C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research*, 117:3-29; 2017.

RODRIGUEZ-VIVAS RI, JONSSON NN, BHUSHAN C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research*, 117:3-29; 2018.

SANTOS CP, PINTO JAO, SANTOS CA, CRUZ EMO, ARRIGONI-BLANK MF, ANDRADE TM, SANTOS DA, ALVES PB, BLANK AF. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Industrial and Crops Products*, 79: 205–210; 2015.

SEIFERT GW, SPRINGELL PH, TATCHEL LRJ. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*, 58: 415-430; 1968.

SILVA LIMA A, MILHOMEM MN, SANTOS MONTEIRO O, ARRUDA ACP, DE CASTRO JAM, FERNANDES YML, MAIA JGS, COSTA-JUNIOR LM. Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 117: 59-65; 2018.

SILVA SS. Perspectivas atuais e futuras do controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e dos agentes por eles transmitidos na bovinocultura, in Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas; 2014.

SONENSHINE DE. *Biologic of Ticks*. New York: Oxford University Press, 316; 1993.

SOUSA LAD. Concentrado emulsionavel de *Melia azedarach* (meliaceae) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae). Dissertação de Mestrado em Ciência Animal – Universidade Federal de Goiás, 2008.

SUTHERST RW, MAYWALD GF, KERR JD, SIEGEMAN DA. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34: 317-327; 1983.

TEMEYER KB, PRUETT JH, OLAFSON PU. Baculovirus expression, biochemical characterization and organophosphate sensitivity of rBmAChE1, rBmAChE2, and rBmAChE3 of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 172:114-21; 2010.

TØNNESEN MH, PENZHORN BL, BRYNS NR, STOLTSZ WH, MASIBIGIRI T. Displacement of *Boophilus decoloratus* by *Boophilus microplus* in the Soutpansberg region, Limpopo Province, South Africa. *Exp Appl Acarol*, 32: 199–209; 2004.

VALENTE PP, MOREIRA GHFA, SERAFINI MF, FACURY-FILHO EJ, CARVALHO AÚ, FARACO AAG, CASTILHO RO, RIBEIRO MFB. In vivo efficacy of a biotherapeutic and eugenol formulation against *Rhipicephalus microplus*. *Parasitol Res*, 116: 929-938; 2017.


VERISSIMO CJ. Biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Brazil. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária do CRMV-SP*, 11:14–23; 2013.

VILLARINO MA, WAGHELA SD, WAGNER GG. Histochemical localizations on esterases in integument of the female *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Tick. *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, 38: 780–782; 2001.

YU, S. J. *The toxicology and biochemistry of insecticides*. Taylor and Francis Inc., Philadelphia, 2008.

ZEMAN P, LYNEN G. Conditions for stable parapatric coexistence between *Boophilus decoloratus* and *B. microplus* ticks: a simulation study using the competitive Lotka-Volterra model. *Exp Appl Acarol*, 52: 409–426; 2010.

7. CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

 VETPAR <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Ter, 29/10/2019 23:28
Você

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Alana Cardoso,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Veterinary Parasitology
Title: Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition by terpenes on Rhipicephalus microplus
Corresponding Author: Livio Costa-Junior
Co-Authors: Alana S Cardoso, B.Sc.; Everton G Santos; Aldilene S Lima, PhD; Kevin B Temeyer, PhD; Adalberto A Perez de León, Phd; Alexandra M Soares, Phd

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/vetpar/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Alana&lname=Cardoso&email=ealana@hotmail.com>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/vetpar/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=ealana@hotmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at livioslz@yahoo.com; livio.martins@ufma.br.

Thank you,

Veterinary Parasitology

Ativar o V
Acesse Conf