



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE



Produtos naturais inibidores da enzima glutathione S-transferase como estratégia biotecnológica para o controle de *Rhipicephalus microplus* e *R. decoloratus*

Wallyson André dos Santos Bezerra

São Luís - MA

2025

Wallyson André dos Santos Bezerra

Produtos naturais inibidores da enzima glutational S-transferase como estratégia biotecnológica para o controle de *Rhipicephalus microplus* e *R. decoloratus*

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de doutor.

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

São Luís - MA

2025

Wallyson Bezerra

Produtos naturais inibidores da enzima glutathione S-transferase como estratégia biotecnológica para o controle de *Rhipicephalus microplus* e *R. decoloratus*. São Luís, MA, 2025.

116 f.: il.

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

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Maranhão. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, 2025.

Wallyson André dos Santos Bezerra


Produtos naturais inibidores da enzima glutathione S-transferase como estratégia biotecnológica para o controle de *Rhipicephalus microplus* e *R. decoloratus*

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de doutor.


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

Aprovada em: 28/ 11 / 2025


Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 **ALEXANDRA MARTINS DOS SANTOS SOARES**
Data: 28/01/2026 10:00:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof^a. Dr^a. Alexandra Martins dos Santos Soares (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente
 **ALANA LISLEA DE SOUSA**
Data: 27/01/2026 14:40:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof.^a Dr^a. Alana Lisleia de Sousa
Universidade Estadual do Maranhão

Documento assinado digitalmente
 **CAIO PAVAO TAVARES**
Data: 26/01/2026 12:13:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Caio Pavão Tavares
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente
 **FRANCISCO BORGES COSTA**
Data: 28/01/2026 09:17:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco Borges Costa
Universidade Estadual do Maranhão


Documento assinado digitalmente
 **RAFAEL CARDOSO CARVALHO**
Data: 26/01/2026 17:56:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Universidade Federal do Maranhão

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, Wallyson André dos Santos Bezerra (X) autorizo () não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “Produtos naturais inibidores da enzima glutathione S-transferase como estratégia biotecnológica para o controle de *Rhipicephalus microplus* e *R. decoloratus*” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

São Luís - MA, 28 / 11/ 2025

Documento assinado digitalmente
 **WALLYSON ANDRE DOS SANTOS BEZERRA**
Data: 28/01/2026 15:30:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Wallyson André dos Santos Bezerra

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me dado a vida e por iluminar meu caminho em todos os momentos dando-me coragem e força de vontade para enfrentar todas as problemáticas.

Agradeço à minha Família por estar sempre ao meu lado, me apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus amigos, por estarem sempre presente em minha vida, alegrando meus momentos difíceis e participando das minhas vitórias.

À minha Orientadora, Dr^a. Alexandra Martins dos Santos Soares. Muito obrigado pela confiança que me foi depositada, pelo respeito com que sempre me tratou e pela amizade tão agradável.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica Vegetal, pelo imprescindível suporte. À toda equipe do Laboratório de Controle de Parasitos (LCP) na pessoa do Dr. Livio Martins Costa Júnior, e colaborações envolvidas. Agradeço aos professores Caio P. Tavares, Cláudia Q. Rocha, Itabajara S. Vaz Junior, Paul A. M. Michels e Walter F. Azevedo Junior.

À CAPES, FAPEMA e UFMA/BIONORTE pelo suporte estrutural e financeiro indispensável para a realização deste trabalho.

"A sabedoria entrará no seu coração, e o conhecimento será agradável à sua alma."

Provérbios 2:10

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Objetivo Geral.....	17
1.2 Objetivo Específicos	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> : Aspectos biológicos, relevância e controle	18
2.2 <i>Rhipicephalus decoloratus</i> : Características e medidas de controle	22
2.3 Glutathione S-transferases (GSTs) como alvos terapêuticos.....	25
3 CAPÍTULOS.....	32
3.1 CAPÍTULO 1. Anonaina de <i>Annona crassiflora</i> inibe a glutathione S-transferase e melhora a atividade da cipermetrina em <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1887).....	32
3.2 CAPÍTULO 2. Avaliação <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> de flavonoides diméricos (braquidinas) na glutathione S-transferase de <i>Rhipicephalus microplus</i>	58
3.3 CAPÍTULO 3. Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> de compostos vegetais como inibidores da glutathione s-transferase em <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>R. decoloratus</i>	78
4 DISCUSSÃO INTEGRADORA	105
5 CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	106

BEZERRA, Wallyson André dos Santos. **Produtos naturais inibidores da enzima glutathione S-transferase como estratégia biotecnológica para o controle de *Rhipicephalus microplus* e *R. decoloratus***. 2025. 116 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2025.

RESUMO

Carrapatos do gênero *Rhipicephalus* constituem uma das principais limitações à produção pecuária em regiões tropicais e subtropicais, devido às expressivas perdas econômicas associadas às infestações e ao aumento da resistência aos carrapaticidas sintéticos atualmente disponíveis. Diante desse contexto, a glutathione S-transferase (GST) destaca-se como um alvo molecular estratégico, uma vez que desempenha papel central nos processos de desintoxicação e nos mecanismos de resistência desses ectoparasitos. Nesse sentido, esse estudo teve como objetivo identificar, caracterizar e avaliar o potencial de compostos naturais como inibidores das GSTs de *R. microplus* e *R. decoloratus*, empregando abordagens integradas *in silico* e *in vitro*. Inicialmente, análises de modelagem estrutural e docagem molecular foram conduzidas para investigar a interação de diferentes compostos naturais com as GSTs dos carrapatos, incluindo o alcaloide anonaina, as braquidinas G, I, J e K, bem como os compostos 3 β -estearioxi-olean-12-eno, diosgenina, quercitrina, naringenina, ácido elágico, rutina e quercetina, permitindo a predição da afinidade e do modo de ligação dessas moléculas aos sítios das enzimas. De forma complementar, propriedades farmacocinéticas e toxicológicas foram avaliadas *in silico* com o objetivo de apoiar a seleção dos candidatos mais promissores. Em seguida, os compostos selecionados foram avaliados quanto à capacidade de inibição das GSTs recombinantes, bem como quanto aos efeitos biológicos associados, incluindo atividade carrapaticida, associação com carrapaticidas comerciais e citotoxicidade sobre eritrócitos bovinos. Os resultados evidenciaram que a anonaina, alcaloide isolado de *Annona crassiflora*, apresentou maior afinidade, em análises *in silico*, pela GST de *R. microplus* em comparação à GST humana, utilizada como modelo estrutural tridimensional de mamíferos. Além disso, o referido alcaloide inibiu a atividade da GST recombinante em até 37,5%, de maneira dose-dependente. A anonaina potencializou significativamente a ação da cipermetrina, promovendo redução da CL₅₀ larval de 44 para 22 μ g/mL. Adicionalmente, as braquidinas G, I, J e K exibiram potente atividade inibitória sobre a GST de *R. microplus*, com valores de IC₅₀ variando entre 0,058 e 0,079 mg/mL, associados a interações moleculares estáveis em análises de docagem e baixo efeito hemolítico. Outros compostos naturais pertencentes às classes de triterpenos, flavonoides e polifenóis demonstraram atividade inibitória sobre as GSTs de *R.*

microplus e *R. decoloratus*. Destacaram-se o triterpeno 3 β -estearioxi-olean-12-eno e o flavonoide naringenina frente à GST de *R. microplus* (IC₅₀ = 148,2 μ M e 160,7 μ M, respectivamente), bem como a quercitrina, que apresentou atividade inibitória contra a GST de *R. decoloratus* (IC₅₀ = 37,7 μ M). Esses resultados indicam que compostos naturais podem atuar como inibidores seletivos das GSTs de *R. microplus* e *R. decoloratus*, sugerindo a viabilidade dessa estratégia biotecnológica no desenvolvimento de carrapaticidas sustentáveis e mais eficazes.

Palavras-chave: *Rhipicephalus*; glutathione S-transferase; compostos naturais; docagem molecular; resistência a carrapaticidas.

BEZERRA, Wallyson André dos Santos. **Natural products that inhibit the enzyme glutathione S-transferase as a biotechnological strategy for the control of *Rhipicephalus microplus* e *R. decoloratus***. 2025. 116 f. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) – Federal University of Maranhão, São Luís, 2025.

ABSTRACT

Ticks of the genus *Rhipicephalus* constitute one of the main limitations to livestock production in tropical and subtropical regions, due to the significant economic losses associated with infestations and the increasing resistance to currently available synthetic acaricides. In this scenario, glutathione S-transferase (GST) stands out as a strategic molecular target, since it plays a central role in detoxification processes and resistance mechanisms of these ectoparasites. Thus, this study aimed to identify, characterize, and evaluate the potential of natural compounds as inhibitors of GSTs from *R. microplus* and *R. decoloratus*, employing integrated *in silico* and *in vitro* approaches. Initially, structural modeling and molecular docking analyses were conducted to investigate the interaction of different natural compounds with tick GSTs, including the alkaloid anonaine, the bradydins G, I, J, and K, as well as the compounds 3 β -stearoxy-olean-12-ene, diosgenin, quercitrin, naringenin, ellagic acid, rutin, and quercetin, allowing the prediction of the affinity and binding mode of these molecules to the enzyme sites. In parallel, pharmacokinetic and toxicological properties were evaluated *in silico* to support the selection of the most promising candidates. Subsequently, the selected compounds were evaluated for their ability to inhibit recombinant GSTs, as well as for associated biological effects, including carrapaticidal activity, association with commercial acaricides, and cytotoxicity on bovine erythrocytes. The results showed that anonaine, an alkaloid isolated from *Annona crassiflora*, exhibited higher affinity, *in silico*, for *R. microplus* GST compared with human GST, used as a three-dimensional structural model for mammals. Furthermore, this alkaloid inhibited recombinant GST activity by up to 37.5% in a dose-dependent manner. Anonaine significantly enhanced the efficacy of cypermethrin, resulting in a reduction of the larval LC₅₀ from 44 to 22 μ g/mL. Additionally, the bradydins G, I, J, and K exhibited potent inhibitory activity on *R. microplus* GST, with IC₅₀ values ranging from 0.058 to 0.079 mg/mL, associated with stable molecular interactions in docking analyses and low hemolytic effect. Additionally, natural compounds belonging to the triterpene, flavonoid, and polyphenol classes demonstrated inhibitory activity against the GSTs of *R. microplus* and *R. decoloratus*. Among these, the triterpene 3 β -stearoxy-olean-12-ene and the flavonoid naringenin exhibited activity against the GST of *R. microplus* (IC₅₀ = 148.2 μ M and 160.7 μ M, respectively), while quercitrin

showed inhibitory activity against the GST of *R. decoloratus* ($IC_{50} = 37.7 \mu M$). These results indicate that natural compounds can act as selective inhibitors of the GSTs of *R. microplus* and *R. decoloratus*, suggesting the potential of this biotechnological approach in the development of sustainable and more effective acaricides.

Keywords: *Rhipicephalus*; glutathione S-transferase; natural compounds; molecular docking; acaricide resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> observado sob microscopia óptica (ampliação de 40×).....	16
Figura 2. Representação esquemática da reação catalisada pela glutathione S-transferase (GST), mostrando a conjugação da glutathione (GSH) a um xenobiótico genérico (X), resultando na formação do conjugado glutathione-S. Fonte: Autor, 2025.....	21
Figura 3. Representação esquemática da reação catalisada pela glutathione S-transferase (GST), mostrando a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com o substrato sintético 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), resultando na formação do conjugado glutathione-S-DNB e liberação de íon cloreto (Cl ⁻). Fonte: Autor, 2025.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRAs	- Braquidinas
CDNB	- 1- cloro -2,4-dinitrobenzeno
GSH	- Glutathiona
GST	- Glutathiona S-transferase
IC ₅₀	- Concentração necessária para reduzir 50% da atividade de um alvo biológico
RmGST	- GST de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
RdGST	- GST de <i>Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus</i>

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos pertencentes à ordem Ixodida (KLOMPEN et al., 1996) e estão amplamente distribuídos em todo o mundo. Esses organismos representam um dos principais vetores de patógenos que afetam a pecuária, limitando a produtividade e gerando sérios prejuízos econômicos (DJEIR et al., 2019). Estimativas indicam que mais de 80% do rebanho bovino global é acometido por algum nível de infestação por esses parasitos (RODRIGUES et al., 2015; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2018; GERARDI et al., 2019). Esse conjunto de evidências indica que a infestação por carrapatos constitui um problema crônico nos sistemas produtivos, com impactos diretos sobre o desempenho zootécnico e indiretos sobre a sustentabilidade econômica da atividade pecuária.

Dentre os carrapatos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado um dos mais prejudiciais à pecuária nas regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (COSTA et al., 2023). As perdas econômicas causadas por *R. microplus* resultam de diversos fatores, como a queda na produção de leite, a redução no ganho de peso dos animais, o aumento na taxa de mortalidade e na incidência de doenças, além da transmissão de patógenos, como *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* (RODRÍGUEZ-VIVAS et al., 2017). No Brasil, calcula-se que a infestação por *R. microplus* cause perdas anuais que chegam a US\$ 3,24 bilhões (GRISI et al., 2014), resultando também em perdas globais estimadas entre US\$ 22 e 30 bilhões na indústria pecuária (PEREZ-MARTINEZ et al., 2023).

Além de *R. microplus*, o carrapato *R. decoloratus* também exerce impacto negativo sobre a pecuária, sendo vetor de *Babesia bigemina* durante o processo de alimentação nos bovinos (VAN DALEN et al., 2024). Infestações por *R. decoloratus* acarretam perdas produtivas, redução na produção de leite, diminuição no ganho de peso, lesões cutâneas e maior suscetibilidade a doenças. Somam-se a esses fatores relatos de resistência a carrapaticidas para essa espécie, o que complica o controle químico e eleva os custos de manejo nas áreas afetadas (YAWA et al., 2022).

O controle de carrapatos baseia-se quase totalmente no uso de carrapaticidas aplicados em bovinos e outros animais. Contudo, o uso excessivo e repetido desses produtos, associado à elevada frequência de tratamentos, à aplicação em doses inferiores às recomendadas e à utilização contínua de um mesmo grupo químico, contribui significativamente para a seleção de resistência em diferentes espécies de carrapatos (ABBAS et al., 2014; SELLES et al., 2021). Como consequência desse processo seletivo, os carrapatos passam a tolerar doses que, em

condições normais, seriam letais à maioria dos indivíduos (STONE, 1972; SANGSTER, 2001). Esse panorama reforça a necessidade urgente de novas abordagens de controle que sejam eficazes, seguras e ambientalmente sustentáveis.

Nesse contexto, os produtos naturais têm despertado crescente interesse como fontes promissoras de moléculas bioativas, uma vez que apresentam elevada diversidade estrutural, ampla variedade de mecanismos de ação e, em muitos casos, menor toxicidade para organismos não alvo e menor impacto ambiental (GUNEIDY et al., 2014; SELLES et al., 2021). Além disso, compostos naturais podem atuar sobre alvos moleculares específicos, reduzindo a pressão seletiva exercida pelos carrapaticidas sintéticos tradicionais e, consequentemente, o risco de desenvolvimento de resistência. Dessa maneira, a prospecção racional de produtos naturais representa uma estratégia alinhada aos princípios da sustentabilidade e da inovação no controle de ectoparasitos (OBAID et al., 2022; LIAO et al., 2023).

Nesse sentido, a prospecção de compostos capazes de inibir enzimas essenciais ao metabolismo e à sobrevivência dos carrapatos, como a glutational S-transferase (GST), configura-se como uma estratégia inovadora. As GSTs atuam em vias centrais de desintoxicação celular, metabolismo redox e resposta ao estresse químico, sendo consideradas elementos-chave nos mecanismos de tolerância e resistência a carrapaticidas. A interferência nessas vias pode reduzir o potencial de seleção de resistência cruzada e ampliar as perspectivas para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes e sustentáveis de controle (GUNEIDY et al., 2021; BEZERRA et al., 2022). Nesse sentido, a identificação de inibidores de GST surge como uma alternativa promissora frente às limitações observadas nos métodos tradicionais de controle.

As GSTs são enzimas multifuncionais que desempenham papel fundamental na detoxificação de xenobióticos e na proteção celular contra o estresse oxidativo (MANNERVIK et al., 1988). Sua principal função consiste em catalisar reações de conjugação que facilitam a eliminação celular de compostos tóxicos (ALLOCATI et al., 2018). Encontradas em praticamente todos os organismos e presentes em uma ampla variedade de tecidos, as GSTs catalisam a conjugação de diversos compostos eletrofílicos reativos ao átomo de enxofre nucleofílico do grupamento tiol da glutational reduzida (GSH) (PARIZI et al., 2011). Esse processo torna os compostos mais hidrossolúveis, favorecendo sua excreção celular. Assim, a inibição da GST compromete a capacidade de desintoxicação da célula, potencializando os efeitos tóxicos dos compostos envolvidos, inclusive aqueles com atividade carrapaticida,

inseticida ou outros efeitos biológicos associados (OAKLEY, 2011; ALLOCATI et al., 2012; PERNER et al., 2018). Esse princípio fundamenta o uso da GST como alvo estratégico no desenvolvimento de novas abordagens de controle de carrapatos.

Diversos estudos têm relatado a atividade *in vitro* de inibidores, incluindo produtos naturais, sobre GSTs de diferentes organismos. O ácido elágico, por exemplo, demonstrou inibir a GST de *Schistosoma japonicum* com um IC₅₀ de 2,4 µM (AKUMADU et al., 2020). Da mesma forma, o flavonoide taxifolina inibiu a GST de *Leptinotarsa decemlineata* com um IC₅₀ de 4,2 µg/mL (WANG et al., 2014). Outro exemplo é a antrona de knifolona, que apresentou IC₅₀ de 3,5 µM contra a GST de *Anopheles gambiae* (MULEYA et al., 2008). No contexto dos carrapatos, compostos pertencentes a diferentes classes químicas, como chalconas, diarilidenocetonas, flavonas, tiazóis, tiouréias, esteróides, tiadiazinas, indazóis e hidrazinas, apresentaram IC₅₀ variando entre 7 e 50 µM frente à GST de *R. microplus* (OZELAME et al., 2022). Nesse mesmo estudo, os compostos ID_794 e ID_1258 foram capazes de inibir 24% e 100% da atividade da rRaGST a 100 µM, respectivamente.

Considerando o papel essencial da GST nos mecanismos de desintoxicação e resistência dos carrapatos, aliado ao potencial dos compostos naturais como fontes de novos compostos bioativos, esta tese insere-se no contexto da biotecnologia aplicada ao controle de ectoparasitos. O objetivo é identificar e caracterizar inibidores seletivos de GST em *R. microplus* e *R. decoloratus*, por meio de abordagens integradas *in silico*, incluindo modelagem estrutural e simulações de docagem molecular, e *in vitro*, com ensaios de atividade e inibição enzimática, bioensaios larvais e em adultos, além de análises de citotoxicidade em células de mamíferos, visando fornecer subsídios ao desenvolvimento de estratégias inovadoras, eficazes e sustentáveis para o controle biotecnológico de carrapatos.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial biotecnológico de compostos naturais como inibidores da glutathione S-transferase (GST) em *Rhipicephalus microplus* e *R. decoloratus*, visando o desenvolvimento de estratégias inovadoras para o controle de carrapatos.

1.2 Objetivo Específicos

- Estimar, *in silico*, a afinidade de ligação entre compostos naturais e as GSTs de *R. microplus* e *R. decoloratus*.

- Verificar o efeito inibitório dos compostos sobre as GSTs de *R. microplus* e *R. decoloratus*, *in vitro*.
- Avaliar *in vitro* a atividade carrapaticida dos compostos sobre *R. microplus*.
- Analisar efeito citotóxico de compostos bioativos sobre eritrócitos bovinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Rhipicephalus microplus*: Aspectos biológicos, relevância e controle

Parasitos e seus hospedeiros fazem parte de comunidades ecológicas, onde ambos são impactados pelo ambiente ao seu redor, criando sistemas complexos e dinâmicos em constante transformação. Essas interações provocam alterações nos ecossistemas, afetando tanto a saúde humana quanto os recursos naturais (GUPTA et al., 2020). Os parasitos, como ectoparasitos, dependem de seus hospedeiros para sobreviver e crescer, com diferentes níveis de dependência. Doenças infecciosas e parasitárias afetam negativamente a pecuária de forma geral, comprometendo a conversão de fatores de produção em produtos animais. Isso resulta em perdas financeiras, afetando o desempenho produtivo e reprodutivo, e causando mortes e descarte de animais, além de reduzir o ganho de peso e a produção de leite (STOTZER et al., 2014).

O aumento na ocorrência e na disseminação de patógenos transmitidos por ectoparasitos, por exemplo carrapatos, tem grande importância tanto para a saúde humana quanto para a saúde animal. Esses agentes patogênicos podem ser vírus, bactérias ou protozoários (JONGEJAN e UILENBERG, 2004). O impacto econômico dessas enfermidades é significativo e vem crescendo a cada ano. Um estudo que analisou 42.743 casos reportados ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) em 2017 estimou que o custo anual dessas doenças ultrapassa 500 milhões de dólares (ROCHLIN e TOLEDO, 2020).

Os carrapatos do gênero *Rhipicephalus* destacam-se como um dos ectoparasitos de maior impacto negativo sobre a bovinocultura. Segundo o *National Center for Biotechnology Information* (EUA), a classificação taxonômica do *R. (B.) microplus* (Figura 1) é: Reino – Metazoa; Filo – Arthropoda; Classe – Arachnida; Subclasse – Acari; Superordem – Parasitiformes; Ordem – Ixodida; Superfamília – Ixodoidea; Família – Ixodidae; Subfamília – Rhipicephalinae; Gênero – *Rhipicephalus*; Subgênero – *Boophilus*; Espécie – *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SCHOCH et al., 2020). Este parasito teve o nome da espécie alterado, de *Bophilus microplus* para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, devido a estudos utilizando

metodologias taxonômicas moleculares, que demonstraram a proximidade filogenética do gênero *Boophilus* com o *Rhipicephalus* (BEATI e KEIRANS, 2001; SILVEIRA et al., 2014).



Figura 1. Fêmeas adultas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* observadas sob microscopia óptica (ampliação de 40×). Fonte: Autor, 2025.

O carrapato adulto *R. microplus* apresenta corpo ovalado, dorsoventralmente achatado, com dimorfismo sexual bem definido. As fêmeas, especialmente quando ingurgitadas, exibem acentuada expansão do idiossoma, adquirindo coloração variável entre castanho-claro e castanho-escuro, enquanto os machos permanecem menores e menos distendidos. O escudo dorsal é ornamentado, cobrindo toda a superfície dorsal nos machos e apenas a região anterior nas fêmeas, permitindo a distensão do corpo durante o repasto sanguíneo (WALKER, 2003; BOWMAN, 2010).

O aparelho bucal é do tipo perfurante-sugador, composto por quelíceras afiadas e hipostômio provido de dentes retrógrados, o que favorece a fixação prolongada ao hospedeiro durante a hematofagia. As pernas são bem desenvolvidas, distribuídas em quatro pares, cada uma terminando em garras e pulvilos que auxiliam na locomoção e aderência à pele do animal. Essas características morfológicas estão diretamente relacionadas à elevada capacidade de parasitismo, adaptação ao hospedeiro e eficiência reprodutiva de *R. microplus*, fatores que explicam sua ampla distribuição e importância sanitária na pecuária bovina (BOWMAN, 2010; SONENSHINE; ROE, 2014).

R. microplus distingue-se de outras espécies do gênero por sua elevada adaptação ao gado bovino, alta eficiência reprodutiva e ampla distribuição geográfica em regiões tropicais e subtropicais, características que favorecem infestações persistentes e elevadas cargas parasitárias. Essa espécie apresenta alta capacidade de desenvolver resistência a múltiplas classes de carrapaticidas, incluindo organofosforados, piretroides, amidinas e lactonas macrocíclicas, sendo considerada uma das espécies de carrapatos com maior histórico de resistência química no mundo (RODRÍGUEZ-VIVAS et al., 2018; SELLES et al., 2021; KLAFKE et al., 2024). Além disso, *R. microplus* é amplamente estudado como modelo experimental, o que resultou em maior conhecimento sobre seus mecanismos moleculares de detoxificação, incluindo a superexpressão de enzimas como glutathione S-transferases (GSTs), citocromos P450 e esterases, diretamente associadas à tolerância a carrapaticidas (GUNEIDY et al., 2021; BEZERRA et al., 2022). Essas características tornam *R. microplus* uma espécie-chave para o desenvolvimento e validação de novas estratégias de controle biotecnológico.

As mudanças climáticas globais, acompanhadas de alterações graduais nos ecossistemas, destacam a importância de realizar novos estudos sobre os ciclos biológicos de parasitos de relevância econômica. Fatores como temperatura, umidade e precipitação são reconhecidos por impactar diretamente o número de gerações anuais de *Rhipicephalus microplus*, especialmente durante sua fase não parasitária. Isso indica que variáveis climáticas podem influenciar significativamente a dinâmica epidemiológica desse carrapato (PFÄFFLE et al., 2013; CRUZ et al., 2020; PEREZ-MARTINEZ et al., 2023).

Esse carrapato possui um ciclo de vida, dividido em duas fases distintas: parasitária e não parasitária. Na fase parasitária, os estágios de larva, ninfa e adultos se alimentam, passam por mudas (larvas e ninfas) e acasalam (adultos), tudo no mesmo hospedeiro. Após o ingurgitamento, as fêmeas deixam o hospedeiro para realizar a oviposição no ambiente. Já a fase não parasitária inclui o desenvolvimento pré-oviposicional, a deposição de ovos pelas fêmeas ingurgitadas, a incubação dos ovos e a busca pelas larvas por novos hospedeiros. Enquanto a duração da fase parasitária é relativamente estável, com uma média de aproximadamente 21 dias (NUÑEZ et al., 1982), a fase não parasitária é altamente influenciada por fatores ambientais, como clima e vegetação. Essa etapa é determinante para o número de gerações anuais e para a abundância populacional do carrapato (NUÑEZ et al., 1982; MASTROPAOLO et al., 2017).

Desde a implementação de programas extensivos para controle de vetores, houve uma redução significativa nas doenças transmitidas por esses agentes ao longo do século passado. Contudo, nos últimos anos, tem-se observado o surgimento e o ressurgimento de doenças vetoriais. Esse fenômeno pode ser atribuído a novas tendências globais, como mudanças nos sistemas de criação animal, urbanização acelerada, transporte internacional de animais e processos de globalização. Nesse contexto, diferentes estratégias de controle de carrapatos são aplicadas globalmente, considerando a legislação local, as condições ambientais, os custos e as características geográficas (OGDEN e LINDSAY, 2016; TABOR et al., 2017).

Entre essas estratégias, o uso de carrapaticidas (pesticidas sintéticos) é o método mais amplamente adotado. No entanto, essa abordagem apresenta diversas limitações, como a seleção de carrapatos mais resistentes, impactos ambientais, resíduos químicos em produtos de origem animal, altos custos para o desenvolvimento de novos carrapaticidas e a dificuldade em criar gado resistente a carrapatos sem comprometer características produtivas desejáveis (WILLADSEN, 2004; ABBAS et al., 2014). As vacinas anticarrapatos surgem como uma alternativa aos carrapaticidas. No entanto, ainda apresentam limitações, sobretudo na proteção contra múltiplas espécies de carrapatos em diferentes regiões do mundo (SCHETTERS et al., 2016; PEREIRA et al., 2022).

As espécies que utilizam um único hospedeiro tendem a sofrer um processo de seleção mais rápido, pois permanecem expostas ao carrapaticida aplicado no gado durante quase três semanas, o que intensifica a pressão seletiva (JONGEJAN et al., 2024). A resistência a carrapaticida é uma característica hereditária específica presente em populações de carrapatos, desenvolvida como consequência da exposição contínua ao carrapaticida. Esse processo seletivo resulta em um aumento substancial na proporção de indivíduos da população que conseguem sobreviver a uma determinada concentração do produto químico (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2018).

As estratégias mais eficazes para retardar esse processo de resistência a carrapaticidas incluem a redução da frequência de aplicação, ajustes na dosagem ou concentração, uso de combinações de produtos, alternância entre classes de carrapaticidas com diferentes modos de ação, preservação de áreas não tratadas como refúgios e a implementação de protocolos de biossegurança para evitar a introdução de carrapatos resistentes. Além disso, é fundamental identificar as espécies de carrapatos presentes e avaliar seu status de resistência antes de

selecionar o carrapaticida mais adequado (RODRÍGUEZ-VIVAS et al., 2014; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2018).

Além disso, o uso de metabólitos secundários, como alcaloides e flavonoides, destaca as boas perspectivas dos pesticidas botânicos (bioprodutos) como alternativa viável aos pesticidas sintéticos. Isso se deve a propriedades positivas, como baixa toxicidade para organismos não-alvo, incluindo humanos, rápida biodegradação de resíduos e prevenção do desenvolvimento de resistência, geralmente atribuída a misturas com ação sinérgica e múltiplos mecanismos de atuação (BENELLI et al., 2016).

Estudos indicam que frações ricas em alcaloides possuem atividade carrapaticida. *Prosopis juliflora* apresentou CL_{50} de 13,8 mg/mL contra larvas de *R. microplus* (LIMA et al., 2020), enquanto *Calpurnia aurea* mostrou CL_{50} de 16,6 mg/mL contra *Amblyomma variegatum* (AMANTE et al., 2019). Uma fração de alcaloides de *Leucas indica* também demonstrou atividade carrapaticida, com mortalidade de 66,67% e inibição da fecundidade de 55,16% em testes com *R. annulatus* a uma concentração de 50 mg/mL (DIVYA et al., 2014). Além disso, os alcaloides berberina e piperina apresentaram eficácia larvicida superior a 95% contra *R. microplus* na concentração de 24 mM (SILVA et al., 2021).

Diante disso, *R. microplus* é um ectoparasito com impacto significativo na saúde animal e na economia, devido a perdas produtivas e aos custos de controle. Assim, alternativas como produtos naturais, especialmente compostos derivados de plantas, têm ganhado destaque como estratégias promissoras para um controle mais sustentável e com menor risco ambiental. Esses produtos tendem a ser biodegradáveis, reduzindo a contaminação do solo e da água. Além disso, podem apresentar menor toxicidade para animais, e essas abordagens contribuem para mitigar os efeitos negativos dos métodos convencionais, promovendo o equilíbrio ambiental e a eficiência na pecuária.

2.2 *Rhipicephalus decoloratus*: Características e medidas de controle

O carrapato-azul-africano, *Rhipicephalus decoloratus*, é uma espécie endêmica das regiões tropicais e subtropicais da África. Está estreitamente relacionado ao *R. microplus* e apresenta ciclo de vida de hospedeiro único, tendo o gado como principal hospedeiro. Apesar de sua ampla distribuição, ainda há poucos estudos de campo detalhando os mecanismos e a extensão da resistência carrapaticida desenvolvida por populações de *R. decoloratus*, o que evidencia a necessidade de pesquisas mais aprofundadas sobre o tema (HORAK et al., 2018; VAN DALEN et al., 2023).

Do ponto de vista biológico, *R. decoloratus* compartilha a condição monoxênica (um hospedeiro) semelhante a *R. microplus*: larvas, ninfas e adultos completam o ciclo parasitando o mesmo bovino. Essa característica aumenta a exposição a carrapaticidas ao longo do ciclo e pode acelerar a seleção de resistência. Em condições favoráveis, o ciclo pode ser relativamente rápido, com múltiplas gerações anuais em regiões tropicais/subtropicais, favorecendo altas cargas parasitárias. O ciclo de vida inclui fases de ovo (no ambiente e/ou hospedeiro), larva (infestante), ninfa e adultos, todas hematófagas. Após a eclosão, as larvas se fixam a um hospedeiro, alimentam-se e fazem as mudas até a fase adulta no mesmo animal. A duração do ciclo varia com temperatura e umidade (WALKER, 2003; YAWA et al., 2021).

O carrapato adulto *R. decoloratus* apresenta corpo ovalado e dorsoventralmente achatado, com dimorfismo sexual evidente, semelhante a outras espécies. As fêmeas adultas, quando ingurgitadas, apresentam acentuada expansão do idiossoma, adquirindo coloração castanho-acinzentada a azulada, característica que originou o epíteto específico *decoloratus*. O escudo dorsal é liso e não ornamentado, ocupando toda a superfície dorsal nos machos e restringindo-se à região anterior nas fêmeas (WALKER, 2003; ESTRADA-PEÑA et al., 2018).

Em *R. decoloratus*, o aparelho bucal é especializado para a hematofagia, sendo constituído por quelíceras adaptadas ao rompimento do tegumento do hospedeiro e por um hipostômio fortemente denticulado, o que garante elevada estabilidade durante o repasto sanguíneo prolongado. O idiossoma apresenta cutícula espessa e resistente, frequentemente associada a uma coloração acinzentada a azulada nas fêmeas ingurgitadas, característica marcante dessa espécie. Os apêndices locomotores são robustos e bem articulados, com quatro pares de pernas dotadas de estruturas de fixação que favorecem a permanência do ectoparasito sobre o hospedeiro, mesmo sob condições de movimentação intensa. Em conjunto, esses atributos morfológicos contribuem para a elevada capacidade de parasitismo de *R. decoloratus* e para sua eficiência como vetor de patógenos, como *Babesia bigemina*, reforçando sua relevância sanitária nos sistemas de produção bovina (BOWMAN, 2010; SONENSHINE; ROE, 2014).

Embora *R. decoloratus* compartilhe com *R. microplus* o ciclo de vida monoxênico e a preferência por bovinos como hospedeiros, essas espécies apresentam diferenças marcantes quanto à distribuição geográfica, histórico evolutivo e nível de investigação científica. Esse carrapato é predominantemente restrito ao continente africano, com menor dispersão global e número significativamente reduzido de estudos sobre resistência a carrapaticidas e mecanismos

moleculares de detoxificação, quando comparado a *R. microplus* (YAWA et al., 2021; VAN DALEN et al., 2023). Essa lacuna de conhecimento inclui informações limitadas sobre o papel de enzimas como GSTs na tolerância química dessa espécie, o que dificulta o desenvolvimento de estratégias de controle específicas e eficazes. Além disso, diferenças morfológicas, como a coloração azulada característica das fêmeas ingurgitadas e o escudo dorsal não ornamentado, refletem adaptações ecológicas distintas, reforçando a necessidade de abordagens direcionadas para *R. decoloratus*, especialmente no contexto do uso de compostos naturais e alvos moleculares pouco explorados (ESTRADA-PENÑA et al., 2018; YAWA et al., 2022).

O uso de carrapaticidas químicos continua sendo uma das principais estratégias de controle de carrapatos. Contudo, sua eficácia é frequentemente parcial e acompanhada de limitações importantes, como a presença de resíduos tóxicos em carne e leite, além do surgimento de populações resistentes aos princípios ativos empregados. Assim, o conhecimento do ciclo biológico torna-se essencial para otimizar a escolha do produto, o momento e a frequência de aplicação, garantindo maior eficiência e reduzindo impactos ambientais e sanitários (Emmanuel et al., 2011; Van Wyk et al., 2016; Van Dalen et al., 2023).

Alguns estudos têm demonstrado o potencial carrapaticida de extratos vegetais e compostos naturais sobre *R. decoloratus*. Extratos metanólicos de *Calpurnia aurea*, *Croton macrostachyus* e *Vernonia amygdalina*, testados nas concentrações de 25 a 100 mg/mL, causaram a mortalidade variando de 60 % a 90 % em larvas de *R. decoloratus* (Kemal et al., 2020). De forma semelhante, o extrato de acetona das folhas de *Momordica edulis*, na concentração de 100 mg/mL, causou a mortalidade de 97 % em larvas de *R. decoloratus* (Nyahangare et al., 2019). Além disso, o extrato bruto das folhas de *Schinus molle* apresentou elevada atividade carrapaticida *in vitro* contra larvas de *R. decoloratus*, alcançando 96,7 % de mortalidade na concentração de 4 % após 24 h de exposição (Feyera; Abdisa, 2016). Esses achados reforçam o potencial de produtos naturais como alternativas sustentáveis e complementares no manejo integrado de carrapatos.

Devido à escassez de dados na literatura acerca da inibição de *R. decoloratus*, observa-se a necessidade de estudos voltados à avaliação de compostos naturais com potencial carrapaticida. Embora extratos vegetais apresentem resultados promissores contra diferentes espécies de carrapatos, ainda são raros os trabalhos que abordam a ação de metabólitos isolados sobre essa espécie. A investigação de compostos purificados de origem vegetal representa uma estratégia promissora para identificar moléculas bioativas com alta especificidade e menor

impacto ambiental, contribuindo para o desenvolvimento de alternativas sustentáveis de controle de *R. decoloratus*.

2.3 Glutathione S-transferases (GSTs) como alvos terapêuticos

As GSTs são classificadas em várias classes, tradicionalmente identificadas por letras gregas, com base em sua origem biológica, sequência primária, especificidade de substrato, localizações imunológicas ou cromossômicas, e pela presença de diferentes isoformas (MASHIYAMA et al., 2014). As GSTs são classificadas em três tipos principais: GSTs citosólicas solúveis (incluindo as classes alfa, mu, pi, ômega, teta, delta, sigma e zeta), GSTs mitocondriais (alfa, mu, pi e kappa) e GSTs microssomais ligadas à membrana (ZHUGE et al., 2020).

Uma característica distinta das GSTs, por exemplo citosólicas, é que elas formam homômeros ou heterodímeros, possuindo dois locais específicos de ligação ao substrato: o local G, altamente conservado e específico para GSH (glutathione), e o local H, uma região hidrofóbica que acomoda substratos eletrofílicos (LALLEMENT et al., 2014; MASOUD et al., 2023). Nas espécies de carrapatos, a GST pode exercer uma função crucial na resistência aos carrapaticidas ao longo de seu ciclo de vida (GUNEIDY et al., 2021).

Produtos químicos exógenos ou medicamentos apolares conseguem atravessar facilmente a membrana celular devido às suas propriedades hidrofóbicas e eletrofílicas. Uma vez dentro das células, essas substâncias interagem com as regiões hidrofóbicas de macromoléculas por meio de suas frações hidrofóbicas e desencadeiam reações eletrofílicas. A desintoxicação de compostos tóxicos pelos organismos ocorre em três etapas: modificação, conjugação e excreção. Na Fase II (conjugação), os compostos previamente modificados são conjugados com moléculas polares adicionais, como o tripeptídeo glutathione (Glu-Cys-Gly ou GSH). As reações de conjugação são catalisadas por enzimas transferases, como as glutathione S-transferases (GSTs). Essas enzimas desempenham um papel essencial na detoxificação de xenobióticos ao unir a glutathione aos grupos sulfidríla presentes nas regiões eletrofílicas de seus sítios hidrofóbicos (Figura 2) (ARMSTRONG, 1991; XU et al., 2005; MATHEW et al., 2006).

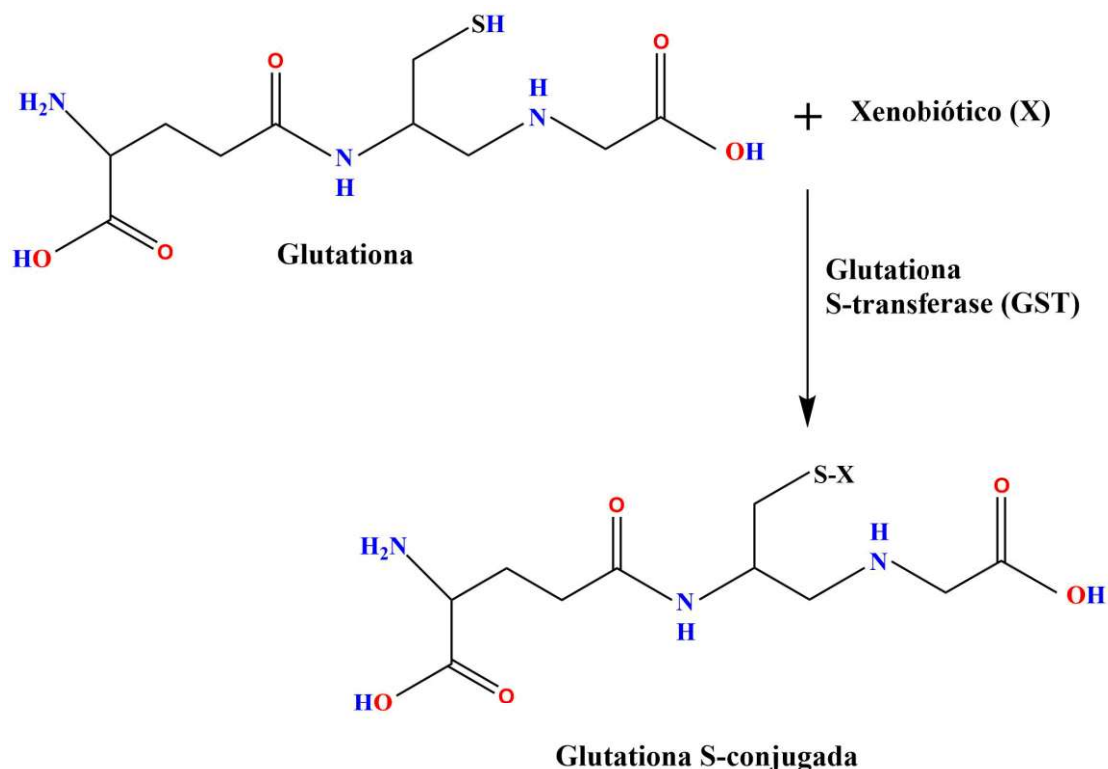


Figura 2. Representação esquemática da reação catalisada pela glutathione S-transferase (GST), mostrando a conjugação da glutathione (GSH) a um xenobiótico genérico (X), resultando na formação do conjugado glutathione-S. Fonte: Autor, 2025.

Xenobióticos, ou compostos exógenos ao organismo, podem ser liberados por diversas atividades humanas e acumulam-se em diversos ecossistemas. Entre os contaminantes ambientais, destacam-se os compostos nitroaromáticos, ricos em nitrogênio, que são originados de processos industriais e amplamente aplicados na fabricação de explosivos, pesticidas, corantes, além de serem utilizados na síntese de polímeros e produtos farmacêuticos. Esses compostos podem intensificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células, causando estresse oxidativo quando a quantidade de ROS supera as defesas antioxidantes do organismo. Nesse contexto, as glutathione-S-transferases (GSTs) atuam como enzimas essenciais, auxiliando na detoxificação de xenobióticos contendo nitrogênio, como o substrato sintético 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), ao conjugar glutathione a centros eletrofílicos, tornando esses compostos mais solúveis em água e menos tóxicos (YE et al., 2004; KAPKAÇ et al., 2021).

Como mencionado anteriormente, as enzimas GST desempenham papel crucial na desintoxicação de compostos xenobióticos ao integrar glutathione a grupos sulfidríla presentes em regiões eletrofílicas de seus sítios hidrofóbicos. Para catalisar essa reação, as GSTs possuem

dois sítios específicos de ligação ao substrato: o sítio G, que se liga exclusivamente ao GSH, e o sítio H, que interage apenas com xenobióticos. O CDNB, um composto nitroaromático pertencente à classe dos monoclórobenzenos, é frequentemente utilizado em ensaios de atividade de GST. Nessas reações, as GSTs neutralizam a natureza eletrofílica do CDNB através da substituição nucleofílica de seu grupo cloreto epitópico por glutatona. Consequentemente, o CDNB é empregado como um agente depletor de GSH em experimentos, por exemplo, com culturas celulares (HABIG et al., 1974; MEISTER e ANDERSON, 1983; MATHEW et al., 2006; SIMIC et al., 2009; KAPKAÇ et al., 2021).

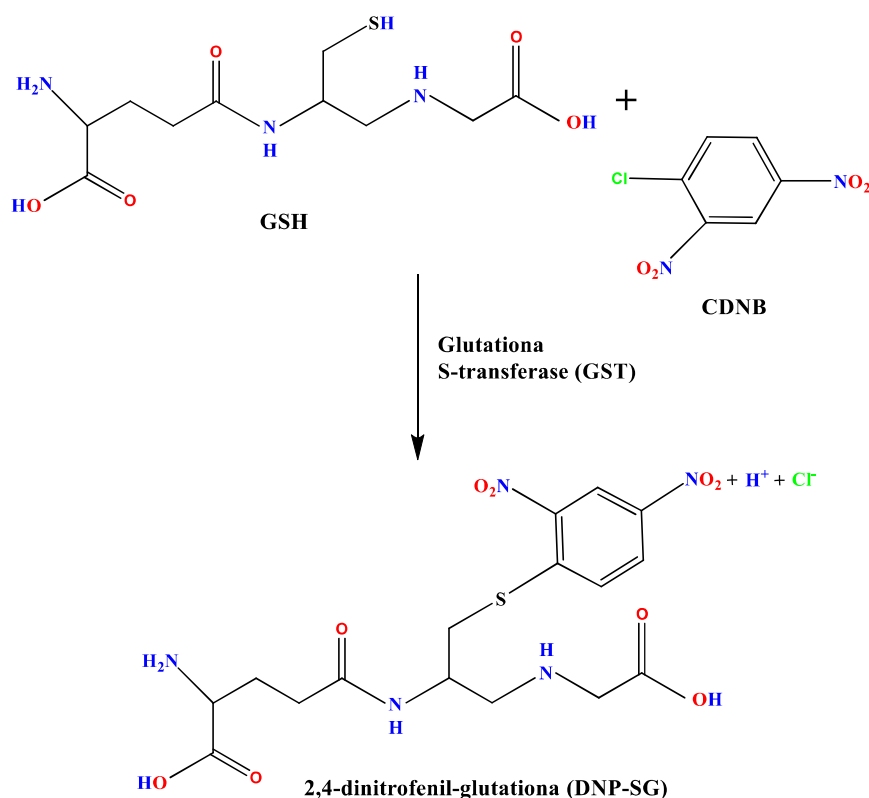


Figura 3. Representação esquemática da reação catalisada pela glutatona S-transferase (GST), mostrando a conjugação da glutatona reduzida (GSH) com o substrato sintético 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), resultando na formação do conjugado glutatona-S-DNB e liberação de íon cloreto (Cl⁻). Fonte: Autor, 2025.

Estudos demonstram a relevância das GSTs na detoxificação de carrapaticida e inseticidas em artrópodes (VONTAS et al., 2000; WEI et al., 2001), bem como os efeitos de diferentes carrapaticida sobre a atividade da GST recombinante de *R. microplus* (VAZ

JUNIOR et al., 2004). Esses achados reforçam o potencial das GSTs como alvos promissores para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de pragas.

As GSTs são enzimas versáteis que desempenham um papel essencial na proteção celular contra a toxicidade química e o estresse oxidativo, contribuindo significativamente para a detoxificação de carrapaticida (GÜLÇİN et al., 2016; HERNANDEZ et al., 2018; HERNANDEZ et al., 2020). A GST de *R. microplus* (RmGST) foi identificada como pertencente à classe mu (μ) citosólica e mitocondrial (HE et al., 1999; SHAHEIN et al., 2013; LE GALL et al., 2018).

As GSTs não atuam apenas como enzimas de conjugação de xenobióticos, mas também desempenham papel essencial na proteção antioxidante celular. Além de catalisar a conjugação de glutathione a compostos eletrofílicos, várias classes de GSTs podem contribuir indiretamente para a eliminação de produtos secundários gerados durante o estresse oxidativo, como peróxidos de lipídio, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e protegendo biomoléculas vitais (STOIAN et al., 2025). Essa versatilidade funcional amplia o papel das GSTs para além do metabolismo de xenobióticos, englobando mecanismos que preservam a homeostase redox em condições de estresse fisiológico e ambiental.

Diferentes isoformas de GSTs também participam da modulação de metabólitos tóxicos formados durante o estresse oxidativo, como os aldeídos reativos derivados da peroxidação lipídica. A conjugação desses produtos com glutathione facilita sua remoção e reduz o dano oxidativo a proteínas, lipídios e DNA, funcionando como uma importante linha de defesa antioxidante intracelular. Em modelos experimentais, a atividade aumentada de GST está associada à diminuição de níveis de espécies reativas e à manutenção do equilíbrio redox, sugerindo sua importância em respostas adaptativas ao estresse químico e oxidativo (ALÖKE et al., 2024).

Em organismos expostos a estressores ambientais e químicos, a atividade de GST tem sido correlacionada com a defesa contra estresse oxidativo aumentado, atuando em conjunto com outras enzimas antioxidantes como catalase e peroxidases. Esse papel é particularmente evidente em estudos de biomarcadores, onde a elevação da atividade de GST é utilizada como indicador de respostas antioxidantes ativadas para neutralizar ROS e compostos tóxicos derivados de xenobióticos (Limón-Pacheco et al., 2009; Jemec et al., 2010; Hellou et al., 2012).

As GSTs funcionalmente ativas existem como dímeros formados por subunidades idênticas ou estruturalmente similares. Cada subunidade, designada como cadeia A e cadeia B, possui dois domínios estruturais: o domínio I (N-terminal) e o domínio II (C-terminal). O

domínio N-terminal é altamente conservado entre as GSTs, enquanto o domínio C-terminal apresenta maior variabilidade estrutural. Cada cadeia contém dois sítios ativos: o sítio G, que é altamente conservado e responsável pela ligação ao GSH, e o sítio H, mais diversificado, responsável pela ligação aos co-substratos hidrofóbicos ou inibidores como o 6-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)sulfanyl]hexan-1-ol (N11). Essa variabilidade nos sítios H entre as diferentes famílias de GST reflete a ampla gama de co-substratos que essas enzimas podem processar (DEPONTE, 2013; RANGUBPIT et al., 2023).

A RmGST, composta por 223 aminoácidos, está associada à classe mu de GSTs presentes em mamíferos. A forma ativa de RmGST é um dímero. Cada monômero contém oito hélices (α 1 – α 8) e quatro fitas beta (β 1 – β 4). O domínio N-terminal dessa enzima apresenta uma maior conservação de sequência em comparação ao C-terminal, uma característica típica das diversas famílias de GSTs (SINNING et al., 1993; HE et al., 1999; SHAHEIN et al., 2013; RANGUBPIT et al., 2022).

De maneira semelhante, a GST de *R. decoloratus* (RdGST) é composta por 223 aminoácidos (UniProt: A0A5J6DXU1) e pertence à classe mu das GSTs. Essa enzima apresenta massa molecular aproximada de 25 kDa e sua forma funcional ocorre como um dímero, característica comum entre as GSTs citosólicas (Ndawula et al., 2019). Cada monômero é constituído por oito hélices α (α 1– α 8) e quatro fitas β (β 1– β 4). O domínio N-terminal contém o sítio de ligação à glutationa (Sitio G) e apresenta maior conservação de sequência em relação ao C-terminal, onde se localiza o sítio de ligação hidrofóbico (sitio H). Essa organização estrutural reflete o padrão típico observado para GSTs de outras espécies de *Rhipicephalus* (SHEEHAN et al., 2001; HAYES et al., 2005; OZELAME et al., 2022).

A RdGST desempenha papel fundamental nos processos de detoxificação celular e na resistência a carrapaticidas, atuando na conjugação da GSH a xenobióticos e metabólitos reativos, facilitando sua excreção. Estudos indicam que a expressão dessa enzima é induzida após exposição a piretróides e organofosforados, sugerindo um envolvimento direto nos mecanismos de tolerância química (NDAWULA et al., 2019; YAWA et al., 2022). Além disso, análises comparativas entre RdGST e RmGST demonstram alta identidade de sequência e conservação estrutural na região catalítica. Em função dessa conservação, a RdGST tem sido proposta como alvo molecular potencial para o desenvolvimento de inibidores seletivos e formulações carrapaticidas mais seguras, baseadas em compostos naturais com afinidade pelo sítio ativo da enzima (HAYES et al., 2005; OZELAME et al., 2022; Bezerra et al., 2024).

Nesse contexto, vários tipos de inibidores de GST são conhecidos com base em seu sítio de ligação e seu mecanismo de inibição, e geralmente análogos e miméticos de GSH, competem com GSH e substratos hidrofóbicos ocupando tanto o sítio G como o sítio H da enzima (ADANG et al., 1991; MUKANGANYAMA et al., 2011).

Com o avanço no entendimento da estrutura e função das GSTs, estratégias de design racional e inibidores baseados em mecanismos têm sido exploradas de forma bem-sucedida (MAHAJAN e ATKINS, 2005). Além da já conhecida atividade de conjugação de GSH, algumas GSTs citosólicas desempenham um papel na modulação da captação e distribuição de compostos aromáticos planares com grupos funcionais aniônicos. Inibidores da atividade catalítica de GSTs continuam sendo uma ferramenta terapêutica promissora no combate à resistência de células cancerígenas a fármacos, por exemplo, uma vez que isoenzimas específicas estão superexpressas em diversos tipos de tumores e podem estar envolvidas na etiologia de algumas doenças (KETLEY et al., 1975; TEW, 1994; MAPP et al., 2002; MATHEW et al., 2006).

Em parasitos, as GSTs são alvos atrativos devido ao seu papel essencial nos sistemas de desintoxicação, como nos casos de esquistossomose, helmintíases, parasitos filariais, helmintos do sangue e carrapatos (SRIVASTAVA et al., 1999; NATHAN et al., 2005; BEZERRA et al., 2022; OTARIGHO e FALADE, 2023; KOTEPUI et al., 2023). Por exemplo, estudos *in vitro* demonstraram que o composto natural trans-anetol reduziu 72,4 % a atividade da GST em carrapatos *R. microplus* a 10 µL/mL, e *in silico* com MolDock Score de -80.66 (REIS et al., 2025). Outro estudo relatou que os compostos colchicina e papaverina apresentaram afinidade *in silico* com -38,09 kcal/mol e -36,09 kcal/mol, respectivamente, sobre RmGST, e a colchicina atingiu até 81,7 % de inibição da atividade enzimática, enquanto papaverina alcançou 27,8 %, ambas em concentração de 0,5 mg/mL (Cerqueira et al., 2025).

Além disso, os compostos identificados como ID_794 e ID_1258 inibiram, respectivamente, 24 % e 100 % da atividade da GST de *R. decoloratus* na concentração de 100 µM (OZELAME et al., 2022). Devido à escassez de dados na literatura sobre a inibição da RdGST, resultado da ausência de estudos específicos envolvendo essa espécie, torna-se evidente a necessidade de investigações adicionais, considerando a relevância biológica e fisiológica dessa enzima nos processos de desintoxicação e resistência a carrapaticidas.

Diante disso, a GST desempenha um papel crucial na desintoxicação celular e na resposta ao estresse oxidativo, sendo amplamente reconhecida como um alvo terapêutico

promissor. Sua relevância abrange desde a superexpressão em tumores, até seu envolvimento em processos de resistência a pesticidas, herbicidas e medicamentos antiparasitários. Além disso, a especificidade do sítio H entre isoformas permite o desenvolvimento de inibidores direcionados, ampliando as possibilidades terapêuticas para doenças humanas, agrícolas e veterinárias.

3 CAPÍTULOS

3.1 CAPÍTULO 1. Anonaina de *Annona crassiflora* inibe a glutathione S-transferase e melhora a atividade da cipermetrina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887).

Experimental Parasitology. 2022 Dec; 243:108398. doi: 10.1016/j.exppara.2022.108398.

Anonaina de *Annona crassiflora* inibe a glutational S-transferase e melhora a atividade da cipermetrina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887).

Wallyson André dos Santos Bezerra^a, Caio Pavão Tavares^b, Cláudia Quintino da Rocha^c, Itabajara da Silva Vaz Junior^d, Paul A. M. Michels^e, Livio Martins Costa Junior^b, Alexandra Martins dos Santos Soares^a

^aLaboratório de Bioquímica Vegetal, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

^bLaboratório de Controle de Parasitos, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

^cLaboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

^dFaculdade de Veterinária e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^eCentre for Immunity, Infection and Evolution and Centre for Translational and Chemical Biology, School of Biological Sciences, The University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom.

Resumo

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) é um dos ectoparasitos mais importantes do gado, causando graves perdas econômicas em regiões tropicais e subtropicais do mundo. A seleção de resistência aos carrapaticidas comerciais mais comumente usados tem estimulado a busca por novos produtos para o controle de carrapatos. A identificação e o desenvolvimento de fármacos que inibem enzimas-chave do carrapato, como a glutational S-transferase (GST), é uma abordagem racional que já foi aplicada a outros parasitos além dos carrapatos. Nesse contexto, alcaloides como a anonaina apresentam diversas atividades biológicas, incluindo efeito carrapaticida. Este estudo teve como objetivo avaliar a inibição específica da GST de *R. microplus* pela anonaina e analisar o efeito em carrapatos quando a anonaina é combinada com cipermetrina. Para esse propósito, uma análise de docking molecular foi realizada usando um modelo de estrutura tridimensional de GST de *R. microplus* com anonaina e comparada com um complexo GST-anonaina humano. As propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade da anonaina também foram previstas. Em seguida, para análises *in vitro*, a anonaina foi isolada das folhas de *Annona crassiflora* (Martius, 1841). A inibição da GST recombinante purificada de *R. microplus* (rRmGST) pela anonaina e o efeito deste alcaloide na eficácia da cipermetrina contra *R. microplus* foram avaliados. A anonaina tem maior afinidade pela enzima do carrapato do que pela enzima humana *in silico* e apresenta toxicidade moderada, sendo capaz de inibir, *in vitro*, a rRmGST em até 37,5% de maneira dose-dependente. Embora a anonaina sozinha não tenha atividade contra *R. microplus*, ela aumentou o efeito da cipermetrina sobre as larvas, reduzindo

a CL₅₀ de 44 para 22 µg/mL. Em conclusão, a anonaina é um composto natural que pode aumentar o efeito da cipermetrina contra *R. microplus*.

Palavras-chave: Carrapato, alcaloide vegetal, inibição de GST, piretróide.

1. Introdução

O carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) representa uma grave ameaça econômica aos produtores pecuários por meio de efeitos físicos nos animais infestados e de doenças causadas pela transmissão de protistas parasitas (Kumar et al., 2013). Estima-se que *R. microplus* cause perdas anuais no rebanho bovino brasileiro de até US\$ 3,2 bilhões (Grisi et al., 2014).

O controle de carrapatos geralmente é realizado por meio do uso repetido de carrapaticidas químicos, como os piretróides sintéticos (Kumar et al., 2013), o que tem levado ao aumento da seleção de resistência a carrapaticidas entre as populações de carrapatos, além de promover a contaminação do meio ambiente e de produtos alimentícios (Kaewmongkol et al., 2015).

As plantas se defendem contra pragas produzindo diversos fitoquímicos que têm sido considerados alternativas potenciais para o controle de carrapatos (Guneidy et al., 2014). Por exemplo, a anonaina, um alcaloide aporfino (isoquinolina) presente nas plantas *Annona crassiflora* (Martius, 1841) (Annonaceae), uma árvore nativa do cerrado brasileiro popularmente conhecida como “araticum”, é um composto bioativo que apresenta diversas propriedades biológicas, incluindo atividade antiparasitária (Li et al., 2013).

Vários inibidores de enzimas têm sido estudados para desenvolver métodos de controle contra parasitos (Olivares-Illana et al., 2006; Braz et al., 2019; Cuevas-Hernández et al., 2020), com base na identificação de moléculas que induzem a inibição seletiva do parasito sobre enzimas do hospedeiro (Ahmad et al., 2008; Moraes et al., 2011; Ozelame et al., 2022). Com base nesses resultados anteriores, a enzima glutatona S-transferase (GST) pode ser considerada um alvo para o desenvolvimento de medicamentos antiparasitários. Cada uma das subunidades da GST tem seu sítio ativo que é composto por um sítio de ligação à glutatona (GSH) (sítio G) e um sítio de ligação ao substrato eletrofílico (sítio H) (Prade et al., 1997). As GSTs desempenham um papel essencial na desintoxicação de xenobióticos (Mannervik, 1985; Mannervik et al., 1988; Hamza e Dailey, 2012). Compostos capazes de inibir a atividade da GST no carrapato, interrompendo seu sistema de desintoxicação, poderiam fornecer uma forma alternativa de controle (Guneidy et al., 2014; Ozelame et al., 2022). Como os alcaloides estão entre os produtos naturais capazes de inibir a GST (Mangoyi et al., 2010; Azeez et al., 2012;

Divya et al., 2014; Behera e Bhatnagar, 2019), a anonaina é uma candidata potencial para o controle de *R. microplus* por meio da inibição dessa enzima.

Recentemente, técnicas *in silico* facilitaram a descoberta de novos candidatos a fármacos (Alvarez, 2004; Choubey e Jeyaraman, 2016; Ganesan, 2016; Roche e Bertrand, 2016; Saramago et al., 2018). Por exemplo, por meio do docking molecular, candidatos a fármacos podem ser reconhecidos e o potencial para sua otimização pode ser explorado, à medida que as interações moleculares entre ligantes e moléculas-alvo podem ser analisadas e modeladas (Wadood et al., 2013).

Dada a importância científica e econômica do desenvolvimento de novos produtos carrapaticidas contra carrapatos e considerando que a GST é uma enzima-alvo, essencial para a fisiologia dos carrapatos, este estudo utilizou avaliações *in silico* e *in vitro* para analisar o potencial de uso da anonaina como um inibidor específico da GST em carrapatos. Ao diminuir a atividade dessa enzima e, assim, interferir na detoxificação da cipermetrina, a eficácia desse piretroide sintético pode ser aumentada.

2. Metodologia

2.1 Construção e validação do modelo da glutathione S-transferase (GST)

A sequência GST de *R. microplus* (número do GenBank AAL99403.1) foi utilizada como sequência de consulta no servidor Phyre 2 (Kelley et al., 2015), com modo de modelagem normal. O modelo criado foi então validado utilizando o servidor PROCHECK 3.0 (Laskowski et al., 1993).

2.2 Estrutura da anonaina e características do ADMET

A estrutura da anonaina foi obtida do banco de dados PubChem (CID: 160597) no formato mol2 e otimizada no programa Avogadro (Hanwell et al., 2012). As propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) da anonaina foram analisadas utilizando o software PreADMET (Kwang, 2005). As análises de ADMET foram realizadas de acordo com as classificações e parâmetros específicos (Van De Waterbeemd e Gifford, 2003; Tong et al., 2021).

2.3 Docagem molecular de GST de *R. microplus* e humana com anonaina

Para analisar a potencial atividade inibitória da anonaina sobre a enzima de *R. microplus*, a docagem molecular foi realizada no sítio H de uma GST humana e de carrapato, utilizando o

software Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD). A estrutura da GST humana complexada com o inibidor N11 (6-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)sulfanil]hexan-1-ol) foi obtida do Protein Data Bank (www.rcsb.org) com resolução de 1,8 Å (PDB ID: 3IE3 – cadeia A).

A estrutura da GST humana foi empregada para simulações de re-docking, ajustando o N11 à enzima utilizando 32 protocolos de docagem. Para tanto, foram utilizadas análises estatísticas dos resultados de docagem e funções de pontuação (SAnDReS) (Xavier et al., 2016). Os algoritmos eram válidos se os resultados do redocking apresentassem um desvio médio quadrático (RMSD) inferior a 2 Å em relação à estrutura original (Yusuf et al., 2008). O resultado do protocolo de re-docking com o menor RMSD foi selecionado para simulações de docagem molecular.

As estruturas da anonaina e da GST humana foram importadas para o ambiente de trabalho do MVD no formato "mol2". As estruturas da GST foram preparadas (sempre atribuindo ligações, ordens de ligação e hibridização, cargas e tipos de átomos triplos; sempre criando hidrogênios explícitos e sempre detectando torções flexíveis em ligantes) usando os utilitários fornecidos no MVD. A docagem molecular foi realizada dentro de uma esfera de docagem virtual com raio de 15 Å e as seguintes coordenadas centrais: X: 6,06; Y: 3,61; Z: 28,00 Å. Dez execuções independentes foram conduzidas e os resultados foram expressos em pontuação MolDock. Quanto mais negativo o número, melhor a ligação (Hall Jr e Ji, 2020). Os mesmos parâmetros foram utilizados para realizar o encaixe molecular da anonaina na GST de *R. microplus*. Vale ressaltar que, após a sobreposição das estruturas das GSTs humanas e de carrapato utilizadas neste estudo, obteve-se um RMSD de 1.1 Å, enquanto suas sequências apresentaram identidade de aminoácidos de 28,8%.

A melhor pose de ambas as GSTs com a anonaina foi visualizada e analisada utilizando o programa PyMOL Molecular Graphics System v1.3 (<http://www.pymol.org/>), e os resíduos das GSTs que interagem com a anonaina foram analisados utilizando o software Discovery Studio Visualizer.

As sequências das GSTs de *R. microplus* e *Homo sapiens* (Linnaeus, 1758) foram alinhadas utilizando o software Clustal Omega (Sievers et al., 2011), e os resíduos que interagem com a anonaina (retirados dos resultados de docagem com ambas as GSTs) foram destacados no alinhamento.

2.4 Extração e purificação da anonaina

O procedimento de extração e purificação seguiu uma metodologia adaptada de Chen et al. (2001). Folhas de *Annona crassiflora* foram coletadas no Parque Nacional da Chapada das Mesas (07°07'47,1" S, 4°25'36,8" W), Carolina, Maranhão, Brasil, em abril de 2018. Um espécime (número de exsicata MG 222438) foi depositado no Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), localizado em Belém, Pará, Brasil.

As folhas foram secas em estufa de circulação de ar a 50 °C, moídas (300 g) e submetidas à extração a frio utilizando inicialmente éter de petróleo e, em seguida, metanol (3 x 1 L, cada), resultando em 15,54 g de Extrato Etéreo e 35,45 g de Extrato Metanólico, respectivamente. A análise por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando o reagente de Dragendorff, indicou a presença de alcaloides no extrato metanólico. Portanto, cerca de 10 g do extrato metanólico foram submetidos ao tratamento ácido-base convencional, obtendo-se a fração enriquecida em alcaloides (m: 0,57 g).

Uma parte da fração (0,4 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel previamente tratada com solução de NaHCO₃ a 5% e eluída com gradientes de éter de petróleo: CH₂Cl₂, seguidos por gradientes de CH₂Cl₂:EtOAc e, finalmente, gradientes de EtOAc: CH₃OH, resultando em 50 frações de 25 mL cada. As frações obtidas foram analisadas por CCD em diferentes sistemas de solventes e agrupadas em 7 grupos. O Grupo 3 (40,5 mg) foi submetido à TLC usando CH₂Cl₂:MeOH (8,0:2,0, v/v) como eluente, e um único ponto foi encontrado na placa. A identificação da anonaina foi feita por comparação com padrões e análise do espectro de massas.

2.5 Expressão e purificação da glutathione S-transferase de *Rhipicephalus microplus* (rRmGST)

Um fragmento de DNA contendo a sequência codificadora completa de uma GST de *R. microplus* foi clonado em estudos anteriores (Vaz et al., 2004; Ndawula et al., 2019). Em seguida, a GST recombinante (rRmGST) foi expressa e purificada conforme descrito anteriormente (Ndawula et al., 2019). Resumidamente, *Escherichia coli* (Migula 1895) BL21(DE3) foi transformada com plasmídeo e a expressão de rRmGST (em meio SOB) foi induzida por 1 mM de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) por 6 ou 18 h a 37 °C. A cultura foi centrifugada a 16.000 x g por 10 min a 4 °C e o pellet foi lavado com PBS 7.2 e lisado usando um homogeneizador ultrassônico com 5 ciclos de 30 pulsos por 30 s (Pulse Sonics Vibra-cell VCX 500-700, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, EUA).

O sobrenadante foi carregado em uma coluna de cromatografia de afinidade de GSTrap 4B (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA), previamente equilibrada com tampão de ligação (PBS pH 7,4). Após a lavagem com o mesmo tampão, a rRmGST foi eluído com 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 contendo 10 mM de glutathione reduzida (GSH). A expressão e purificação de rRmGST foram monitoradas por SDS-PAGE e western blotting usando soro de coelho anti-rRmGST (Ndawula et al., 2019).

2.6 Atividade enzimática da GST e inibição pela anonaina

A atividade enzimática da GST recombinante purificada foi determinada usando o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e 3,4-dicloronitrobenzeno (DCNB) (Sigma-Aldrich) a 25 °C com um leitor de microplacas VersaMax™. As leituras foram realizadas a 340 nm por 30 min em intervalos de 15 s, conforme descrito anteriormente (Vaz et al., 2004; Habig et al., 1974). Os substratos CDBN 3 mM e DCNB 1 mM foram diluídos em metanol e adicionados à mistura de reação contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6.5, 1 mM de EDTA e 3 mM de GSH. Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços com 10 µL (0,7 µg) de proteína recombinante em um volume total de 100 µL. O branco da atividade, obtido a partir da reação contendo apenas tampão, GSH e CDBN (na ausência da enzima), foi subtraído dos dados experimentais.

Para os testes de inibição, a anonaina foi diluída em DMSO a 1% a 10 mg/mL (solução estoque). A inibição da GST pela anonaina foi realizada em concentrações na faixa de 0,075 a 0,5 mg/mL. Os testes de inibição foram realizados com 10 µL de proteína recombinante em 100 µL de volume total. O ensaio em que a anonaina foi substituída por PBS apresentou 100% de atividade enzimática. Como controle negativo, foram utilizados GST, CDBN, GSH e DMSO (0,1%). Os ensaios foram realizados em dois ensaios independentes, cada um em duplicata.

2.7 Carrapatos

Carrapatos da cepa Santa Rita foram coletados de bovinos Girolando naturalmente infestados em uma fazenda localizada no município de Santa Rita (03°08'37"S, 44°19'33"W), MA, Brasil, e mantidos por infestação artificial em bezerros na Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMA, Brasil, sob o protocolo número 23115.004153/2022-58.

2.8 Teste de imersão larval

O teste de imersão larval foi realizado de acordo com Klafke et al. (2006), em triplicata. A partir da solução estoque de anonaina (10 mg/mL), foram testadas soluções nas concentrações finais de 0,5 e 0,1 mg/mL, em etanol a 1% e Triton X-100 a 0,02%. A cipermetrina foi preparada a 20 mg/mL (solução estoque) em etanol a 1% e Triton X-100 a 0,02% e testada a 3,0, 1,2, 0,48, 0,19, 0,07, 0,03, 0,0123, 0,004, 0,002 e 0,0008 mg/mL. A cipermetrina foi combinada com anonaina (mesmas concentrações descritas acima) nos testes em larvas de carrapatos. O grupo controle foi tratado com uma solução de etanol a 1% e Triton X-100 a 0,02%.

Aproximadamente 500 larvas foram imersas por 10 min em uma mistura de anonaina e cipermetrina e transferidas para uma base de papel de filtro. Em seguida, aproximadamente 100 larvas foram transferidas para uma embalagem de papel de filtro limpo (8,5 × 7,5 cm) fechada com cliques plásticos. As embalagens foram incubadas por 24 h a 27 ± 1 °C com umidade relativa $\geq 80\%$. Os carrapatos foram observados por 5 min. As larvas mortas (sem movimento) e vivas foram contadas manualmente. Os testes foram realizados em triplicata.

2.9 Teste de imersão em adultos (TIA)

Para o teste de imersão em adultos (TIA) (Drummond et al., 1973), anonaina (nas concentrações finais de 0,5 e 0,1 mg/mL) e cipermetrina (concentração final de 3,7 mg/mL) foram preparadas conforme descrito anteriormente e misturadas em uma solução. Os testes foram realizados em triplicata.

Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* com massa corporal homogênea ($n = 180$) foram divididas em seis grupos ($n = 10$) da seguinte forma: 1) Controle: 1% de etanol e 0,02% de solução de Triton X-100 (v/v); 2) 3,7 mg/mL de cipermetrina; 3) 3,7 mg/mL de cipermetrina e 0,1 mg/mL de anonaina; 4) 3,7 mg/mL de cipermetrina e 0,5 mg/mL de anonaina; 5) 0,1 mg/mL de anonaina; 6) 0,5 mg/mL de anonaina. A concentração de cipermetrina utilizada na TIA foi determinada por Ghosh et al. (2017). Os carrapatos de cada grupo foram imersos em suas respectivas soluções por cinco minutos, lavados e secos em papel absorvente.

As fêmeas ingurgitadas de cada grupo foram incubadas a 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, por 15 dias. Após a pesagem dos ovos coletados e sua incubação por 25 dias nas mesmas temperaturas e umidade, foram avaliadas as porcentagens de redução tanto na oviposição quanto na eclosão (Bennett, 1974; Lopes et al., 2013; Drummond et al., 1973).

2.10 Análise estatística

Para os testes de inibição enzimática, imersão de larvas e adultos, todas as médias obtidas foram analisadas estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Os resultados foram inicialmente transformados para log (X) e a porcentagem de mortalidade foi normalizada; posteriormente, foi realizada regressão não linear para obter os valores de CL_{50} (concentração letal de 50%) utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA). A significância de cada concentração nos testes foi determinada quando os intervalos de confiança calculados não se sobrepõem (Roditakis et al., 2005).

3. Resultados

3.1 Modelagem da estrutura tridimensional (3D) da GST de *R. microplus*

O melhor modelo identificado para preparar um modelo estrutural tridimensional confiável da GST de *R. microplus* (Figura Suplementar 1) usando o servidor web Phyre2 foi uma GST de *Gallus gallus* (Cadeia A, PDB:1C72), com 37,21% de identidade e 98% de cobertura. As dimensões do modelo foram X: 51.117, Y: 42.329, Z: 55.806 Å, com 100% de confiança de modelagem. A estereoquímica do modelo proteico refinado revelou que, dos 220 resíduos de aminoácidos da GST de *R. microplus*, 91% estavam situados na região mais favorável do gráfico de Ramachandran (Figura Suplementar 2).

3.2 Re-Docking e Docagem molecular

O protocolo de re-docking número 23 (Xavier et al., 2016), que utiliza plants score como função de pontuação e iterated simplex (Ant Colony Optimization) como algoritmo de busca, resultou em um RMSD de 1.9 Å (valor de RMSD de docagem para GST humana, PDB: 3IE3, com inibidor N11) e foi selecionado para simulações de docagem molecular neste estudo.

Como resultado das simulações de docagem molecular, a anonaina apresentou maior afinidade pela GST de *R. microplus*, com menor energia de ligação (-91,355) para esta enzima, em comparação com a energia de ligação para a GST humana (-85,249). As interações previstas com os aminoácidos de cada uma das GSTs (a partir da melhor pose para cada GST) com a anonaina são destacadas no alinhamento das duas sequências de GST (Figura 1). Foi descoberto que a anonaina interage com os aminoácidos: Thr 10, Thr 11, Ala 12, Tyr 35, Glu 36, Phe 37, Gly 38, Pro 39, Ala 40, Tyr 43, Pro 209, Met 211, Ala 212, Pro 213 de *R. microplus* GST (Figura 1 e Tabela Suplementar 1).

A atividade inibitória da anonaina sobre a rRmGST foi determinada em concentrações fixas de CDNB (3 mM) e GSH (3 mM). Observou-se que a GST de *R. microplus* foi inibida pela anonaina de forma dependente da concentração (Figura 4).

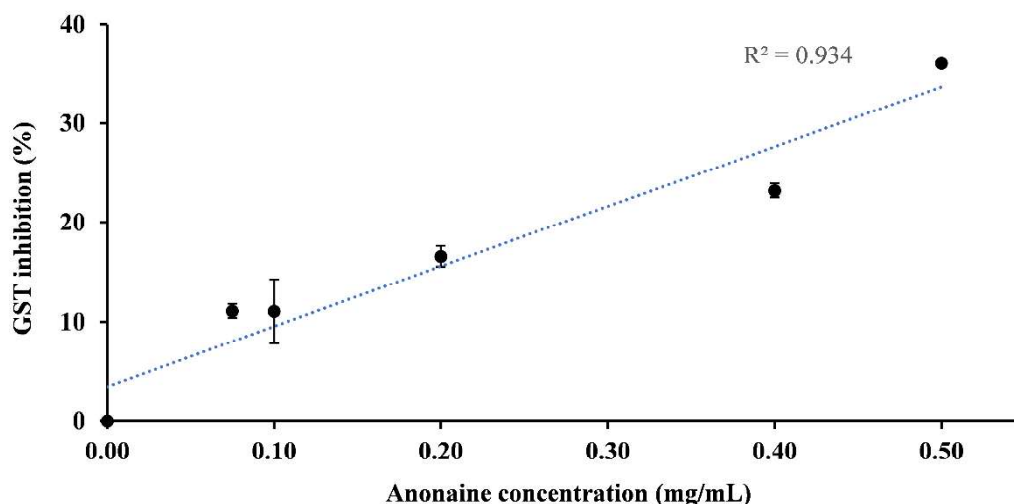


Figura 4. Curva de inibição da anonaina em rRmGST. Eixo Y: porcentagem de inibição de GST; Eixo X: concentração de anonaina em mg/mL.

3.6 Efeito da anonaina e da cipermetrina em larvas e adultos de *Rhipicephalus microplus*

A adição de anonaina aumentou o efeito da cipermetrina em larvas; na concentração de 0,5 mg/mL, resultando em uma redução na CL₅₀ da cipermetrina de 44 para 22 µg/mL, embora a anonaina em si não tenha demonstrado atividade contra larvas de *R. microplus* nas concentrações testadas (Tabela 1). A anonaina teve um efeito de $6,24 \pm 8,74\%$ e $14,26 \pm 25,82\%$ em fêmeas ingurgitadas nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg/mL, respectivamente, e não alterou o efeito da cipermetrina em adultos de *R. microplus*.

Tabela 1. Efeito da anonaina, cipermetrina e sua combinação em larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

Tratamento	Teste de imersão larval			Teste de imersão adulto		
	CL ₅₀ (mg/mL)	IC 95%	R ²	% Rovip	%Rhatch	C%
Anonaina (0,1 mg/mL)*	-	-	-	3,73±9,90 ^a	-	6,24±8,74 ^a
Anonaina (0,5 mg/mL)*	-	-	-	17,69±24,10 ^a	37,4±7,1 ^a	14,26±25,82 ^a
Cipermetrina (CYP)	0,044 ^a	0,038 - 0,050	0,96	62,25±6,76 ^b	96,85±0,60 ^b	98,85±0,30 ^b
CYP + anonaina (0,1 mg/mL)	0,057 ^b	0,054 – 0,061	0,99	52,42±15,39 ^b	98,65±6,97 ^b	99,44±0,28 ^b
CYP + anonaina (0,5 mg/mL)	0,022 ^c	0,016 - 0,029	0,93	61,25±2,68 ^b	94,27±6,97 ^b	97,79±2,60 ^b

* Anonaina não teve efeito sobre larvas; CL₅₀: Concentração letal (mg/mL) para 50% dos indivíduos; IC: intervalo de confiança de 95%; R₂: Coeficiente de correlação de regressão. % Rovip: Porcentagem de redução na oviposição; % Rhatch: Porcentagem de redução na eclosão; C%: Porcentagem de controle. Média ± desvio padrão. A mesma letra sobrescrita na mesma coluna indica que a média não difere significativamente em $p < 0.05$.

4. Discussão

A busca por alternativas para o controle de *R. microplus* é um dos maiores desafios para a produção bovina, conforme ilustrado por diversos relatos sobre o surgimento de populações de carrapatos multirresistentes (Tavares et al., 2022). Este estudo apresenta evidências *in silico* e *in vitro* da inibição da GST de *R. microplus* pelo alcaloide vegetal purificado anonaina, que potencializou o efeito larvicida *in vitro* da cipermetrina.

Primeiramente, o potencial da anonaina para inibir a GST de *R. microplus* foi avaliado *in silico* após a construção e validação de um modelo estrutural da GST de *R. microplus* (Figura

Suplementar 2). O gráfico de Ramachandran da estrutura modelada da GST do carrapato mostrou 91% dos resíduos nas regiões mais favoráveis (Figura Suplementar 2). Este resultado foi adequado, visto que uma porcentagem de resíduos CORE superior a 90% indica que o modelo possui boa resolução (Laskowski et al., 2013).

Para identificar o melhor protocolo de docagem, um experimento de re-docking foi realizado com o GST humano e o inibidor N11, e um RMSD de 1.9 Å foi obtido. Os algoritmos são válidos se os resultados de re-docking tiverem um RMSD menor que 2 Å da estrutura original (Hecht e Fogel, 2009). Após a sobreposição das estruturas do carrapato e do GST humano, o RMSD obtido foi de 1.1 Å. A porcentagem de identidade de aminoácidos entre as duas sequências de proteínas é de apenas 28,8%, mas o baixo valor de RMSD indica alta similaridade estrutural entre as duas estruturas. Além disso, os protocolos para docagem molecular consideram que as estruturas 3D de duas sequências de proteínas com uma identidade maior que 25% são suficientemente semelhantes para estudos de docagem comparativos (Shen et al., 2013). Com base nesses resultados, o mesmo protocolo de docagem foi usado para ambas as estruturas de GST neste estudo. De acordo com os resultados da docagem molecular, a anonaina teria uma afinidade maior pela GST de *R. microplus* do que pela GST humana (Figura 1 e Figura Suplementar 1).

Os resíduos da GST humana interagindo com a anonaina não foram os mesmos que os resíduos da GST interagindo com de *R. microplus* (Figura Suplementar 1 e Tabela Suplementar 1), sugerindo um modo diferente de ligação da anonaina com o parasito e com as enzimas de mamíferos. Isso poderia, portanto, ser útil para o desenvolvimento de fármacos seletivos (Ahmad et al., 2008, Moraes et al., 2011).

As propriedades ADMET previstas da anonaina com diferentes parâmetros analisados pela ferramenta PreADMET, mostradas na Tabela Suplementar 2, sugerem que a anonaina apresenta toxicidade moderada e nenhum potencial carcinogênico. Todos os valores obtidos com a anonaina foram comparados aos valores padrões relatados na literatura (Ames et al., 1972; Yee, 1997; Van De Waterbeemd e Gifford, 2003; Alliance, 2016; Wadapurkar et al., 2018; Ferreira et al., 2020; Pereira, 2021; Tong et al., 2021). Além disso, sugere-se que o alcaloide natural anonaina seja menos tóxico para mamíferos do que a cipermetrina. No entanto, estudos adicionais para elucidar o mecanismo de ação, a farmacologia, a toxicidade e a farmacocinética da anonaina são necessários para explorar as possibilidades de sua otimização e a aplicação clínica de produtos derivados.

Alcaloides apresentam múltiplas atividades biológicas e já existem diversos fármacos comercialmente disponíveis derivados de alcaloides naturais de plantas (Debnath et al., 2018). Neste estudo, a anonaina foi isolada de folhas de *Annona crassiflora* em quantidade e qualidade adequadas para a realização dos testes de imersão (Figura 2).

A inibição da atividade da rRmGST aumentou com o aumento da concentração de anonaina (Figura 4), revelando a capacidade de um alcaloide em inibir a GST do carrapato. Resultado semelhante foi relatado para alcaloides isolados da planta *Rauvolfia tetraphylla* (Linnaeus, 1753), que inibiram a atividade da GST de *Setaria cervi* em até 64% a 1 mg/mL (Behera e Bhatnagar, 2019).

A descoberta mais importante foi que a combinação de anonaina (0,5 mg/mL) com cipermetrina aumentou a toxicidade do piretróide em 2 vezes contra larvas de *R. microplus* (Tabela 1). Foi demonstrado que alcaloides vegetais possuem atividade carrapaticida contra *R. microplus* e *R. annulatus* (Divya et al., 2014; Silva et al., 2021). Por exemplo, alcaloides e glicosídeos detectados no extrato de *Datura metel* tiveram efeitos inibitórios sinérgicos contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (Ghosh et al., 2015). Além disso, uma fração rica em alcaloides de *Prosopis juliflora* (Sargent 1902) foi responsável pela atividade contra fêmeas adultas de *R. microplus* (Lima et al., 2020). Nesse contexto, essa fração rica em alcaloides foi mais ativa em larvas do que em adultos. No entanto, muitas abordagens, incluindo modificações químicas e de formulação, podem ser utilizadas para melhorar as propriedades do fármaco e aumentar o efeito biológico contra carrapatos adultos. A diferente suscetibilidade entre larvas e adultos de *R. microplus* aos alcaloides pode ser explicada pelo fato de as larvas possuírem cutícula mais fina que os adultos (Conceição et al., 2017; Cruz et al., 2016). Neste estudo, a anonaina isoladamente foi ineficaz contra larvas de *R. microplus*. Nossos resultados sugerem que este alcaloide, ao inibir a GST de *R. microplus*, interfere negativamente no sistema de desintoxicação da cipermetrina do carrapato, potencializando o efeito larvicida do piretróide.

Embora a fase larval seja amplamente utilizada para avaliar a atividade carrapaticida de compostos derivados de plantas *in vitro*, a eficácia dos compostos pode variar de acordo com a fase de desenvolvimento do carrapato (Rosado-Aguilar et al., 2017). Por exemplo, a camada de cera é mais espessa em adultos do que em larvas, aumentando o sequestro de compostos na cera e reduzindo sua eficácia (Adenubi et al., 2018). Este estudo demonstrou o aumento da atividade antilarval da cipermetrina pela anonaina. Apesar dos efeitos protetores contra larvas,

a combinação cipermetrina-anonaina precisa ser aprimorada para aumentar a atividade contra todos os estágios da vida do carrapato.

5. Conclusão

Este estudo demonstra, *in silico* e *in vitro*, a capacidade da anonaina de inibir a atividade da rRmGST. Os testes de imersão revelaram que a anonaina pode aumentar a atividade tóxica da cipermetrina contra larvas de *R. microplus*.

Material Suplementar

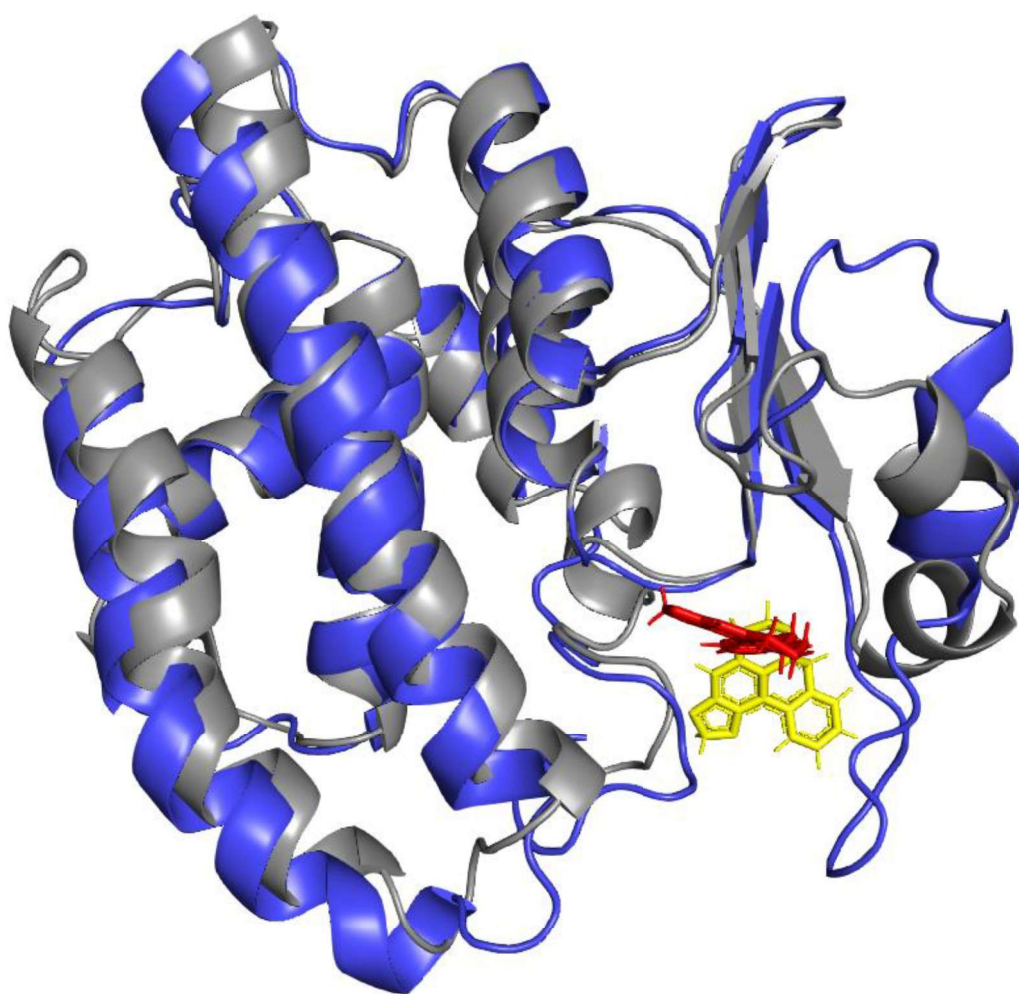


Figura Suplementar 1. A) Representação esquemática das estruturas da glutathione S-transferase (GST) de *Rhipicephalus microplus* (em azul) e humana (PDB: 3IE3 - em cinza) com anonaina (melhor pose após a docagem molecular) colorida em amarelo e vermelho, respectivamente.

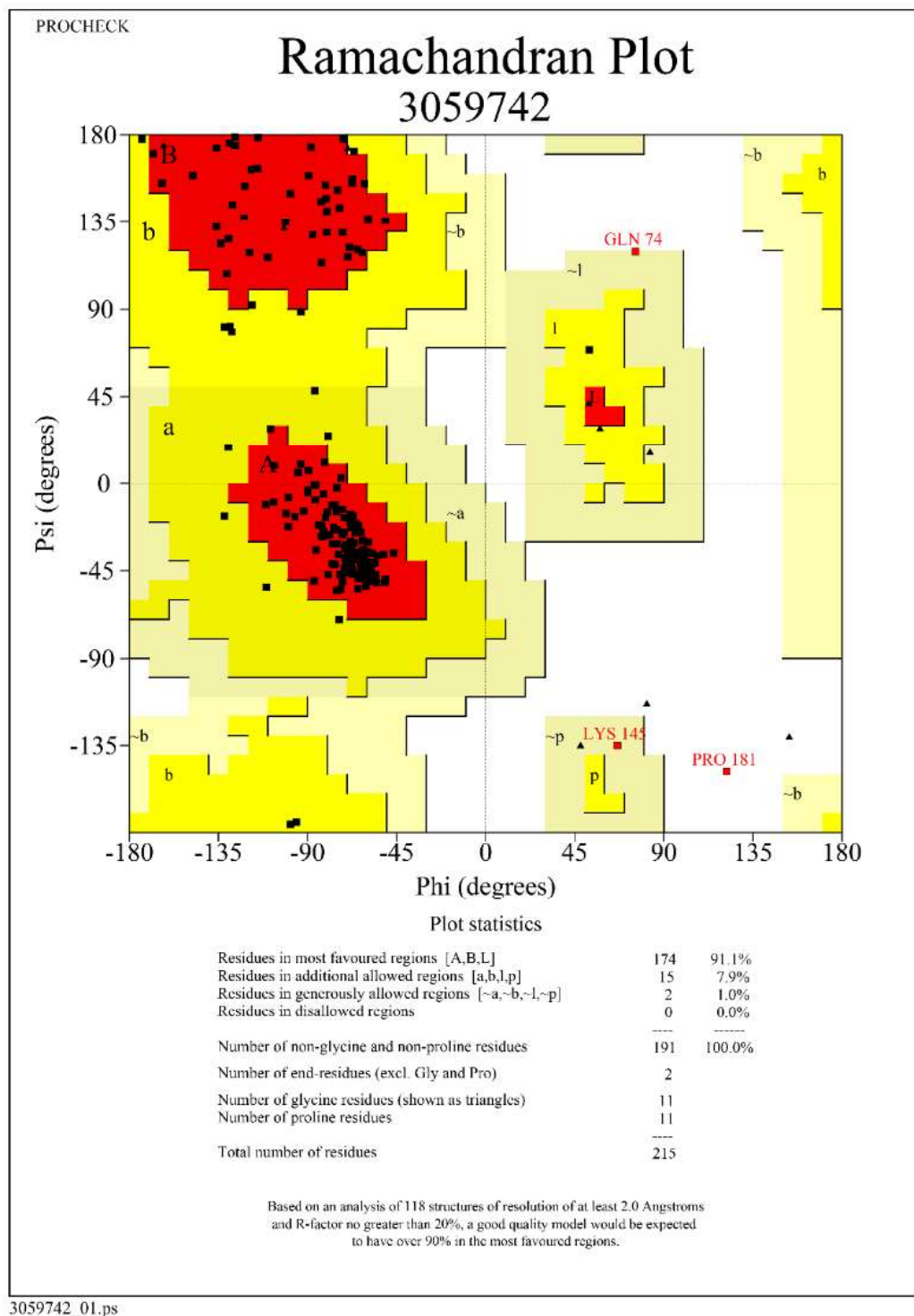


Figura Suplementar 2. Gráfico de Ramachandran da estrutura prevista da glutationa S-transferase (GST) de *Rhipicephalus microplus* (as regiões em vermelho, amarelo escuro e amarelo claro representam as regiões mais favoráveis, permitidas e generosamente permitidas).

Tabela Suplementar 1. Comparação dos aminoácidos da GST de *R. microplus* e da GST humana que interagem com a anonaina, conforme determinado por docagem molecular.

Ligante	Aminoácidos	
	GST - <i>R. microplus</i>	GST - Humana
Anonaina	Thr 10, Thr 11, Ala 12, Tyr 35,	Tyr 7, Phe 8, Pro 9, Val 10, Val 33,
	Glu 36, Phe 37, Gly 38, Pro 39,	Thr 34, Val 35, Trp 38, Tyr 108,
	Ala 40, Tyr 43, Pro 209, Met 211,	Pro 202, Gly 205
	Ala 212, Pro 213	

Thr = Treonina; Ala = Alanina; Tyr = Tirosina; Glu = Ácido glutâmico; Phe = Fenilalanina; Gly = Glicina; Pro = Prolina; Met = Metionina; Val = Valina; Trp = Triptofano são resíduos que interagem com a anonaina, obtidos das estruturas da GST humana e de *R. microplus*.

Tabela suplementar 2. Propriedades ADMET previstas para a anonaina.

ID	Anonaina
Absorção	
Caco2	47.681
HIA	96.493
MDCK	177.096
Pgp_inh	Non
PPB	65.565
PWS (mg/L)	57.025
Skin_Permeability	-4.113
Distribuição	
BBB	0.9849
Metabolismo	

CYP2C19_inh	Non
CYP2C9_inh	Non
CYP2D6_inh	Inhibitor
CYP2D6_sub	Substrate
CYP3A4_inh	Non
CYP3A4_sub	Weak substr.

Toxicidade

algae_at	0.055948
Ames_test	Mutagen
Carcino_Mo	Negative
Carcino_Rat	Negative
daphnia_at	0.147588
hERG_inh	Medium_risk
medaka_at	0.0328064
minnow_at	0.0519424

BBB - Barreira Hematoencefálica (C.cérebro/C.sangue); Caco-2 - Modelo de células Caco-2; HIA - Modelo de Absorção Intestinal Humana (HIA, %); MDCK - Rim Canino de Madin-Darby (nm/s); PGP_inh - Inibidor da glicoproteína P; PPB – Ligação a Proteínas Plasmáticas (%); PWS – Solubilidade em água pura (mg/L); Permeabilidade Cutânea - Permeabilidade cutânea em cm/hora; Algas at - Teste com algas (mg/L); Teste de Ames - Teste de Ames com Salmonella; CYP - Citocromo P450; Carcino M - Teste de carcinogênese em camundongos; Carcino R - Teste de carcinogênese em ratos; Daphnia at - Teste com o crustáceo dáfnia; hERG Inhib. - Inibição do canal de potássio controlado por hERG; Medaka_at - Teste com o peixe medaka; Minnow_at - Teste com pequenos peixes de água doce.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado em parte pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) - INFRA-03170/18 e FAPEMA IECT Biotecnologia / Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) processo 2677/17. Também foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (CAPES, Código Financeiro 001). Os autores agradecem ao Dr. Walter F. de Azevedo Jr. (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) pela sua assistência.

Referências

- Adenubi, O.T., Ahmed, A.S., Fasina, F.O., McGaw, L.J., Eloff, J.N., Naidoo, V., 2018. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis. *Industrial Crops Products*. 123, 779-806.
- Ahmad, R., Srivastava, A.K., Walter, R.D., 2008. Purification and biochemical characterization of cytosolic glutathione-S-transferase from filarial worms *Setaria cervi*. *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry Molecular Biology* 151, 237-245.
- Alliance, D., 2016. Estudo químico, predições *in silico* das propriedades ADME/TOX e atividade larvica do óleo essencial da raiz *Philodendron deflexum* Poepp. Ex Schott sobre *Aedes aegypti* Linneu e *Anopheles albirtasis* sl, Department of Graduation Graduation Program in Health Sciences - Ppgcs. Federal University Of Amapa., Macapá - Ap. Brazil., pp. 1-53.
- Alvarez, J.C., 2004. High-throughput docking as a source of novel drug leads. *Current opinion in chemical biology* 8, 365-370.
- Ames, B.N., Gurney, E., Miller, J.A., Bartsch, H., 1972. Carcinogens as frameshift mutagens: metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69, 3128-3132.
- Azeez, S., Babu, R.O., Aykkal, R., Narayanan, R., 2012. Virtual screening and *in vitro* assay of potential drug like inhibitors from spices against glutathione-S-transferase of filarial nematodes. *Journal of molecular modelling* 18, 151-163.
- Behera, D.R., Bhatnagar, S., 2019. *In-vitro* and *in silico* efficacy of isolated alkaloid compounds from *Rauvolfia tetraphylla* L. against bovine filarial parasite *Setaria cervi*: a drug discovery approach. *Journal of Parasitic Diseases* 43, 103-112.
- Bennett, G., 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini)(Acarida: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia* 16, 52-61.
- Braz, V., Gomes, H., Galina, A., Saramago, L., Braz, G., da Silva Vaz Jr, I., Logullo, C., da Fonseca, R.N., Campos, E., Moraes, J., 2019. Inhibition of energy metabolism by 3-bromopyruvate in the hard tick *Rhipicephalus microplus*. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*. 218, 55-61.

Chen, C.-Y., Chang, F.-R., Pan, W.-B., Wu, Y.-C., 2001. Four alkaloids from *Annona cherimola*. *Phytochemistry* 56, 753-757.

Choubey, S.K., Jeyaraman, J., 2016. A mechanistic approach to explore novel HDAC1 inhibitor using pharmacophore modelling, 3D-QSAR analysis, molecular docking, density functional and molecular dynamics simulation study. *Journal of Molecular Graphics Modelling* 70, 54-69.

Conceicao, R.S., Carneiro, M.M.A.d.A., Reis, I.M.A., Branco, A., Vieira, I.J.C., 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 diseases*. 8, 275-282.

Cruz, P.B., Barbosa, A.F., Zeringóta, V., Melo, D., Novato, T., Fidelis, Q.C., Fabri, R.L., de Carvalho, M.G., Sabaa-Srur, A.U.O., Daemon, E., 2016. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L.(Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 228, 137-143.

Cuevas-Hernández, R.I., Girard, R.M., Martínez-Cerón, S., Santos da Silva, M., Elias, M.C., Crispim, M., Trujillo-Ferrara, J.G., Silber, A.M., 2020. A fluorinated phenylbenzothiazole arrests the *Trypanosoma cruzi* cell cycle and diminishes the infection of mammalian host cells. *Antimicrobial agents chemotherapy* 64, 1-16.

Debnath, B., Singh, W.S., Das, M., Goswami, S., Singh, M.K., Maiti, D., Manna, K., 2018. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials today chemistry* 9, 56-72.

Divya, T., Soorya, V., Amithamol, K., Juliet, S., Ravindran, R., Nair, S., Ajithkumar, K., 2014. Acaricidal activity of alkaloid fractions of *Leucas indica* Spreng against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* tick. *Tropical biomedicine* 31, 46-53.

Drummond, R., et al., Ernst, S., Trevino, J., Gladney, W., Graham, O., 1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *Journal of economic entomology* 66, 130-133.

Ferreira, G.G., do Nascimento Brandão, D.L., Dolabela, M.F., 2020. Predição do comportamento farmacocinético, toxicidade e de atividades biológicas de alcaloides isolados de *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers. *Research, Society Development* 9, 1-23.

- Ganesan, A., 2016. Multitarget drugs: an epigenetic epiphany. *ChemMedChem* 11, 1227-1241.
- Ghosh, S., Gupta, S., Kumar, K.A., Sharma, A.K., Kumar, S., Nagar, G., Kumar, R., Paul, S., Fular, A., Chigure, G., 2017. Characterization and establishment of a reference deltamethrin and cypermethrin resistant tick line (IVRI-IV) of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Pesticide biochemistry physiology* 138, 66-70.
- Ghosh, S., Tiwari, S.S., Kumar, B., Srivastava, S., Sharma, A.K., Kumar, S., Bandyopadhyay, A., Julliet, S., Kumar, R., Rawat, A., 2015. Identification of potential plant extracts for anti-tick activity against acaricide resistant cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Applied Acarology* 66, 159-171.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.d.S., Barros, A.T.M.d., Andreotti, R., Cançado, P.H.D., León, A.A.P.d., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 23, 150-156.
- Guneidy, R.A., Shahein, Y.E., Aboulella, A.M., Zaki, E.R., Hamed, R., 2014. Inhibition of the recombinant cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* glutathione S-transferase. *Ticks and Tick-borne Diseases* 5, 528-536.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I.M., Jakoby, W.B., 1974. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71, 3879-3882.
- Hall Jr, D.C., Ji, H.-F., 2020. A search for medications to treat COVID-19 via *in silico* molecular docking models of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein and 3CL protease. *Travel medicine infectious disease*. 35, 1-13.
- Hamza, I., Dailey, H.A., 2012. One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research* 1823, 1617-1632.
- Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G.R., 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics* 4, 1-17.
- Hecht, D., Fogel, G.B., 2009. A novel *in silico* approach to drug discovery via computational intelligence. *Journal of chemical information modelling* 49, 1105-1121.

- Kaewmongkol, S., Kaewmongkol, G., Inthong, N., Lakkitjaroen, N., Sirinarumitr, T., Berry, C., Jonsson, N., Stich, R., Jittapalapong, S., 2015. Variation among Bm86 sequences in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks collected from cattle across Thailand. *Experimental Applied Acarology* 66, 247-256.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J., 2015. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction and analysis. *Nature protocols* 10, 845-858.
- Klafke, G.M., Sabatini, G.A., Thais, 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. *Veterinary parasitology* 142, 386-390.
- Kumar, R., Nagar, G., Sharma, A.K., Kumar, S., Ray, D., Chaudhuri, P., Ghosh, S., 2013. Survey of pyrethroids resistance in Indian isolates of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: identification of C190A mutation in the domain II of the para-sodium channel gene. *Acta tropica* 125, 237-245.
- Kwang, L.S., 2005. *In silico* high-throughput screening for ADME/Tox properties: PreADMET program, *Abstr Conf Comb Chem Jpn* 21, 22-28.
- Laskowski, R.A., Furnham, N., Thornton, J.M., 2013. The Ramachandran plot and protein structure validation, *Biomolecular Forms and Functions: A Celebration of 50 Years of the Ramachandran Map*. World Scientific, 1, 62-75.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography* 26, 283-291.
- Li, H.-T., Wu, H.-M., Chen, H.-L., Liu, C.-M., Chen, C.-Y., 2013. The pharmacological activities of (–)-anonaine. *Molecules* 18, 8257-8263.
- Lima, H.G.d., Santos, F.O., Santos, A.C.V., Silva, G.D.d., Santos, R.J.d., Carneiro, K.d.O., Reis, I.M.A., Estrela, I.d.O., Freitas, H.F.d., Bahiense, T.C., 2020. Anti-tick effect and cholinesterase inhibition caused by *Prosopis juliflora* alkaloids: *in vitro* and *in silico* studies. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 29, 1-15.
- Lopes, W.D.Z., Teixeira, W.F.P., de Matos, L.V.S., Felippelli, G., Cruz, B.C., Maciel, W.G., Buzzulini, C., Fávero, F.C., Soares, V.E., de Oliveira, G.P., 2013. Effects of macrocyclic

lactones on the reproductive parameters of engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females detached from experimentally infested cattle. *Experimental Parasitology* 135, 72-78.

Mangoyi, R., Hayeshi, R., Ngadjui, B., Ngandeu, F., Bezabih, M., Abegaz, B., Razafimahefa, S., Rasoanaivo, P., Mukanganyama, S., 2010. Glutathione transferase from *Plasmodium falciparum*—Interaction with malagashanine and selected plant natural products. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry* 25, 854-862.

Mannervik, B., 1985. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 57, 357-417.

Mannervik, B., Helena Danielson, U., Ketterer, B., 1988. Glutathione transferases—structure and catalytic activit. *Critical Reviews in Biochemistry* 23, 283-337.

Ndawula Jr, C., Sabadin, G.A., Parizi, L.F., Vaz Jr, I. S, 2019. Constituting a glutathione S-transferase-cocktail vaccine against tick infestation. *Vaccine* 37, 1918-1927.

Olivares-Illana, V., Perez-Montfort, R., López-Calahorra, F., Costas, M., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez Puyou, A., 2006. Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitrypanosomatid inhibitor. *Biochemistry* 45, 2556-2560.

Ozelame, K.P.C., Mattia, M.M.C., Silva L.A.D., Randall, L.M., Corvo I., Saporiti, T., Seixas, A., da Silva Vaz, I Jr, Alvarez, G., 2022. Novel tick glutathione transferase inhibitors as promising acaricidal compounds. *Ticks and Tick-borne Diseases* 13, 1-7.

Pereira, G., Bruno., 2021. *In silico* pharmacology studies of phenolic esters designed to obtain tyrosine kinase inhibitors, Chemistry department. Federal Technological University of Paraná, Campo Mourão- PR., pp. 1-67.

Prade, L., Huber, R., Manoharan, T.H., Fahl, W.E., Reuter, W., 1997. Structures of class pi glutathione S-transferase from human placenta in complex with substrate, transition-state analogue and inhibitor. *Structure* 5, 1287-1295.

Roche, J., Bertrand, P., 2016. Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* 121, 451-483.

Roditakis, E., Roditakis, N.E., Tsagkarakou, A., 2005. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science* 61, 577-582.

- Rosado-Aguilar, J., Arjona-Cambranes, K., Torres-Acosta, J., Rodríguez-Vivas, R., Bolio-González, M., Ortega-Pacheco, A., Alzina-López, A., Gutiérrez-Ruiz, E., Gutiérrez-Blanco, E., Aguilar-Caballero, A., 2017. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. *Veterinary Parasitology* 238, 66-76.
- Saramago, L., Gomes, H., Aguilera, E., Cerecetto, H., González, M., Cabrera, M., Alzugaray, M.F., Vaz Junior, I. S., Nunes da Fonseca, R., Aguirre-López, B., 2018. Novel and selective *Rhipicephalus microplus* triosephosphate isomerase inhibitors with acaricidal activity. *Veterinary sciences* 5, 1-19.
- Shen, W. J. Zhang, H. Fang, R. Perkins, W. Tong, H. Hong., 2013. Homology modelling, molecular docking, and molecular dynamics simulations elucidated α -fetoprotein binding modes, *BMC Bioinformatics* 14, 1–14.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7, 1-6.
- Silva, G.D., de Lima, H.G., de Freitas, H.F., da Rocha Pita, S.S., dos Santos Luz, Y., de Figueiredo, M.P., Uzeda, R.S., Branco, A., Costa, S.L., Batatinha, M.J.M., 2021. *In vitro* and *in silico* studies of the larvicidal and anticholinesterase activities of berberine and piperine alkaloids on *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick-borne Diseases* 12, 1-6.
- Tavares, C.P., Sousa, I.C., Gomes, M.N., Miró, V., Virkel, G., Lifschitz, A., Costa-Junior, L.M., 2022. Combination of cypermethrin and thymol for control of *Rhipicephalus microplus*: Efficacy evaluation and description of an action mechanism. *Ticks Tick-borne Diseases* 13, 1-8.
- Tong, J.-B., Luo, D., Bian, S., Zhang, X., 2021. Structural investigation of tetrahydropteridin analogues as selective PLK1 inhibitors for treating cancer through combined QSAR techniques, molecular docking, and molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Liquids* 335, 1-17.
- Van De Waterbeemd, H., Gifford, E., 2003. ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? *Nature reviews Drug discovery* 2, 192-204.
- Vaz Jr, I.S., Lermen, T.T., Michelon, A., Ferreira, C.A.S., de Freitas, D.R.J., Termignoni, C., Masuda, A., 2004. Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. *Veterinary parasitology* 119, 237-245.

Wadapurkar, R.M., Shilpa, M., Katti, A.K.S., Sulochana, M., 2018. *In silico* drug design for *Staphylococcus aureus* and development of host-pathogen interaction network. Informatics in Medicine Unlocked 10, 58-70.

Wadood, A., Ahmed, N., Shah, L., Ahmad, A., Hassan, H., Shams, S., 2013. *In-silico* drug design: An approach which revolutionarised the drug discovery process. OA Drug Des Deliv 1, 1-4.

Xavier, M., Sehnem Heck, G., Boff de Avila, M., Maria Bernhardt Levin, N., Oliveira Pinto, V., Lemes Carvalho, N., Filgueira de Azevedo, W., 2016. SAnDReS a computational tool for statistical analysis of docking results and development of scoring functions. Combinatorial chemistry high throughput screening. 19, 801-812.

Yee, S., 1997. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. Pharmaceutical research 14, 763-766.

Yusuf, D., Davis, A.M., Kleywegt, G.J., Schmitt, S., 2008. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. Journal of chemical information modelling 48, 1411-1422.

3.2 CAPÍTULO 2. Avaliação *in silico* e *in vitro* de flavonoides diméricos (braquidinas) na glutathione S-transferase de *Rhipicephalus microplus*.

Medicinal Chemistry. 2024; 20(9):912-919. doi: 10.2174/0115734064298481240517072216.

Avaliação *in silico* e *in vitro* de flavonoides diméricos (braquidinas) na glutathione S-transferase de *Rhipicephalus microplus*.

Wallyson André dos Santos Bezerra¹, Caio Pavão Tavares², Victor Antônio Silva Lima³, Cláudia Quintino da Rocha³, Itabajara da Silva Vaz Junior⁴, Paul A.M. Michels⁵, Livio Martins Costa Junior³ and Alexandra Martins dos Santos Soares^{1,6}

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia - Bionorte, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil; ²Laboratório de Controle de Parasitos, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil; ³Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil; ⁴Faculdade de Veterinária, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁵School of Biological Sciences, The University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom; ⁶Laboratório de Bioquímica Vegetal, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil

Resumo

Introdução: *Rhipicephalus microplus*, um importante ectoparasita bovino, é responsável por um impacto negativo substancial na economia devido à perda de produtividade. O surgimento de resistência a carrapaticidas comerciais amplamente utilizados tem estimulado esforços para explorar produtos alternativos para o controle de carrapatos. **Métodos:** Para enfrentar esse desafio, soluções inovadoras que visam enzimas essenciais para carrapatos, como a glutathione S-transferase (GST), têm ganhado atenção. Flavonoides diméricos, particularmente braquidinas (BRAs), demonstraram diversas atividades biológicas, incluindo efeitos antiparasitários. Os objetivos deste estudo foram isolar quatro flavonóides diméricos de raízes de *Fridericia platyphylla* e avaliar seu potencial como inibidores de GST de *R. microplus*. **Resultados:** Ensaios *in vitro* confirmaram a inibição de *R. microplus* GST por BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K com valores de IC₅₀ de 0,075, 0,079, 0,075 e 0,058 mg/mL, respectivamente, com efeitos hemolíticos mínimos. A docagem molecular de BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K em um modelo tridimensional de GST de *R. microplus* revelou interações previstas com MolDock scores de -142,537, -126,831, -108,571 e -123,041, respectivamente. As análises *in silico* e *in vitro* mostram que as braquidinas são potenciais inibidores de GST de *R. microplus*. **Conclusão:** Os resultados deste estudo aprofundam nossa compreensão da inibição de GST em carrapatos, afirmando sua viabilidade como alvo de drogas. Este conhecimento contribui para o avanço de modalidades e estratégias de tratamento para o controle aprimorado de carrapatos.

Palavras-chave: Carrapato, flavonoides diméricos, inibição de GST, *Fridericia platyphylla*, *Rhipicephalus microplus*.

1. INTRODUÇÃO

O carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) representa uma importante ameaça econômica à produção pecuária devido ao seu papel como vetor de diversos patógenos, resultando em doenças no gado [1]. A eficácia dos carrapaticidas sintéticos no controle de populações de *R. microplus* tem sido comprometida pelo desenvolvimento e subsequente disseminação de resistência [2, 3]. Diversos compostos químicos têm sido investigados quanto ao seu potencial uso em estratégias de controle de parasitos, especificamente para identificar moléculas que visam seletivamente enzimas parasitárias para combater infecções [4-7]. A glutathione S-transferase (GST) surgiu como um alvo promissor para o desenvolvimento de medicamentos antiparasitários, dado seu papel fundamental na desintoxicação de substâncias nocivas [8]. Inibidores capazes de interromper a atividade da GST em carrapatos, interferindo assim em seu sistema de desintoxicação, representam uma alternativa promissora e inovadora para o controle de parasitos [5].

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra pragas por meio da produção de uma ampla gama de fitoquímicos, que estão atualmente sob investigação como potenciais alternativas para o controle de carrapatos [9, 10]. Produtos vegetais são particularmente estudados devido à sua baixa toxicidade, à escassa permanência ambiental e à química complexa que dificulta o desenvolvimento de resistências. São considerados alternativas potenciais até mesmo para o manejo de carrapatos que apresentam resistência aos carrapaticidas tradicionais [11].

Notavelmente, os flavonoides demonstraram atividade contra carrapatos [12, 13]. Além disso, os flavonoides são bem reconhecidos entre os compostos naturais por sua capacidade de inibir a GST [5, 14, 15]. Nesse contexto, os flavonoides diméricos conhecidos como braquidinas, isolados das raízes da espécie vegetal *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann (sin: Arrabidaea brachypoda Bureau, Bignoniaceae), emergiram como compostos bioativos com diversas propriedades biológicas, incluindo atividade contra os protistas endoparasitários humanos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* [16, 17]. Considerando esse contexto, as braquidinas representam candidatos promissores para o controle de *R. microplus*, visando sua GST.

Recentemente, técnicas computacionais facilitaram a descoberta de novos candidatos a fármacos [18-21]. Por exemplo, o emprego da docagem molecular, no qual a posição de ligação favorecida de um ligante candidato em um modelo estrutural de um alvo macromolecular é prevista, permite a identificação de potenciais candidatos a fármacos.

Dada a importância científica e econômica do desenvolvimento de novos compostos eficazes contra *R. microplus*, e considerando a escassez de estudos sobre as atividades biológicas e/ou antiparasitárias das braquidinas BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K, este estudo utilizou avaliações *in silico* e *in vitro* para investigar o potencial dessas braquidinas como inibidores de GSTs de carrapatos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Extração e isolamento de braquidinas G, I, J e K

Braquidinas (BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K) foram isoladas e suas estruturas foram definidas conforme descrito anteriormente [22]. Resumidamente, um extrato bruto de etanol preparado a partir de raízes de *F. platyphylla* foi evaporado até a secar. Além disso, após extrações líquido/líquido, uma fração diclorometano (CH₂Cl₂) e uma fração hidrometanólica foram obtidos e secos. A fração hidrometanólica passou por uma separação adicional usando cromatografia líquida de média pressão (MPLC). As frações resultantes foram analisadas usando cromatografia líquida de alta eficiência-fotodiodo (HPLC-PDA). BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K corresponderam aos picos nas frações 7, 9, 10 e 11, respectivamente.

2.2. GST recombinante de *Rhipicephalus microplus* (rRmGST) e inibição de rRmGST por braquidinas

A GST recombinante de *R. microplus* (rRmGST) foi preparada conforme descrito anteriormente [4, 23, 24]. A atividade enzimática da GST foi medida a 25 °C em um leitor de microplacas VersaMax™ e microplacas de 96 poços, utilizando o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e 3,4-dicloronitrobenzeno (DCNB) (Sigma-Aldrich), conforme descrito anteriormente [25]. Resumidamente, para os testes de inibição, as braquidinas (BRA-G, BRA-I, BRA-J, BRA-K) foram diluídas em 1% de DMSO a 10 mg/mL (solução estoque). A inibição da GST pelas braquidinas foi avaliada dentro de uma faixa de concentração de 0,010–0,2 mg/mL. Esses testes de inibição foram conduzidos utilizando 10 µL (equivalente a 0,7 µg de proteína) de proteína recombinante. GST, CDNB, GSH e DMSO (0,1%) foram utilizados como controles negativos. As leituras foram realizadas a 340 nm por 15 minutos, em intervalos de 15 segundos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3. Avaliação da atividade hemolítica de braquidinas em eritrócitos bovinos

O ensaio de hemólise *in vitro* foi realizado medindo a lise de eritrócitos bovinos conforme descrito anteriormente [26], com pequenas modificações. Sangue total bovino foi coletado e processado para obter uma suspensão de hemácias (RBC) em NaCl 0,15 M, que foi então incubada com concentrações variadas de braquidinas (BRA-G, BRA-I, BRA-J, BRA-K) preparadas em DMSO a 0,001%. No ensaio, 100 µL de uma suspensão de RBC a 2,5% foram misturados com 100 µL da solução de braquidinas (concentrações na faixa de 0,00625–0,2 mg/mL) e incubados por 30 min a 37 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para uma placa de cultura de 96 poços para medir a absorbância da hemoglobina liberada a 414 nm usando um leitor de microplacas. Controles negativo e positivo também foram incluídos no ensaio, no qual hemácias foram tratadas com NaCl 0,15 M e Triton X-100, respectivamente. Este ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMA, Brasil, sob o protocolo número 23115.004153/2022–58.

2.4. Estruturas de braquidinas e propriedades ADMET

A estrutura química de cada uma das braquidinas (BRA-G, BRA-I, BRA-J, BRA-K) foi desenhada usando o software ChemDraw JS versão 19.0.0. Representações de suas estruturas tridimensionais (3D) foram previstas usando o sistema de entrada de linha molecular simplificado (SMILES) no formato mol2. A estrutura molecular das braquidinas foi otimizada geometricamente por meio de cálculos clássicos de campo de força usando o software Avogadro configurado no MMFF94, usando o algoritmo de descida mais íngreme [27]. O software PreADMET foi usado para avaliar as propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) das braquidinas, seguindo a metodologia descrita em estudos anteriores [28, 29].

2.5. Análise de docagem molecular de braquidinas com GST de *Rhipicephalus microplus*

O modelo de estrutura 3D de GST de *R. microplus* foi criado e validado conforme descrito anteriormente [4]. Resumidamente, a sequência de aminoácidos de GST de *R. microplus* (número GenBank AAL99403.1) foi usada como uma consulta no servidor Phyre 2 [30], com modo de modelagem normal, para criar o modelo de estrutura GST do carrapato. O modelo foi validado usando o servidor PROCHECK 3.0 [31]. Estudos de docagem molecular foram realizados para avaliar a potencial pose de ligação e afinidade de braquidinas (BRA-G, BRA-I, BRA-J, BRA-K) no sítio H do modelo de estrutura da enzima GST do carrapato usando Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD). Os parâmetros do protocolo de docagem foram: plants

score como função de pontuação e iterated simplex (Ant Colony Optimization) como algoritmo de busca. A docagem molecular foi realizado dentro de uma esfera de encaixe virtual com raio de 15 Å e as seguintes coordenadas centrais: X: 6,06; Y: 3,61; Z: 28,00 Å. Isso permitiu obter MolDock score como medida de afinidade. Quanto mais negativo o número, melhor a ligação. A melhor posição de cada braquidina ligada à GST foi visualizada e submetida à análise utilizando o software PyMOL Molecular Graphics System v1.3 (<http://www.pymol.org/>). Resíduos dentro de 3,5 Å de braquidinas (retirados de cada melhor posição) foram avaliados.

2.6. Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada com base nos valores médios obtidos nos testes de inibição enzimática, utilizando ANOVA, seguido do teste de Tukey com nível de significância de $p < 0.05$, utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2, e a significância de cada concentração nos testes foi estabelecida com base nos intervalos de confiança não sobrepostos [32].

3. RESULTADOS

O extrato hidroetanólico de *F. platyphylla* por HPLC-UV/MS resultou em 12 picos. Os picos 7, 9, 10 e 11 foram coletados, e os compostos neles contidos foram identificados como flavonoides braquidinas BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K (Figura 1). As estruturas dessas braquidinas são mostradas na Fig. Suplementar (S1).

O efeito inibitório das braquidinas sobre a atividade da rRmGST foi determinado em concentrações fixas de CDNB (3 mM) e GSH (3 mM). A GST de *R. microplus* demonstrou ser inibida por BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K com valores de IC_{50} de 0,075, 0,079, 0,075 e 0,058 mg/mL, respectivamente (Tabela 1). Além disso, concentrações de braquidinas de até 0,2 mg/mL resultaram em hemólises mínimas de hemácias de animais (Tabela 1).

Os MolDock scores das simulações de docagem foram -142,537, -126,831, -108,571 e -123,041 para BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K, respectivamente. Os resíduos dentro de 3,5 Å de braquidinas, provavelmente envolvidos nas interações GST-braquidinas, são destacados na Figura 2. As características físico-químicas e as propriedades ADMET previstas das braquidinas são mostradas na Tabela Suplementar 1. BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K apresentam pesos moleculares de 700,220, 714,230, 684,220 e 538,200 g/mol, respectivamente. BRA-G, BRA-I e BRA-J apresentam valores de coeficiente de partição (LogP) abaixo de 5,0. BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K apresentam alta absorção intestinal humana (87,927%, 92,470%, 92,411% e 96,410%, respectivamente). BRA-G apresentou

mutagenicidade AMES positiva. Além disso, BRA-G, BRA-I e BRA-J podem penetrar no cérebro, visto que os valores previstos para sua distribuição através da barreira hematoencefálica (BHE) foram 0,0413806, 0,0208044 e 0,0238708, respectivamente.

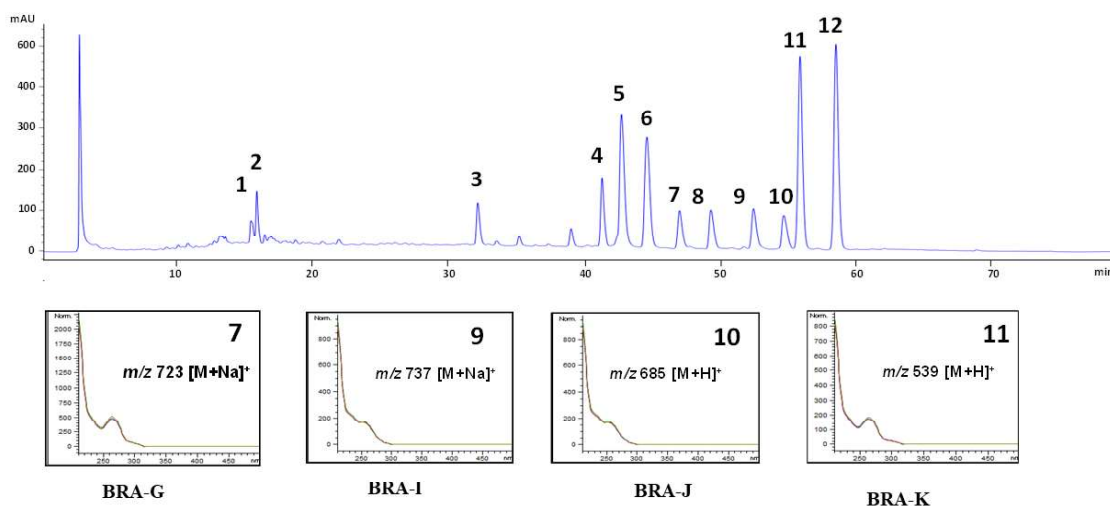


Figura 1. Análise HPLC-UV/MS do extrato hidroetanólico de *Fridericia platyphylla* a 254 nm e identificação das braquidinas G, I, J e K, adaptado de Da Rocha et al. [22].

Tabela 1. Inibição da atividade da GST de *Rhipicephalus microplus* por braquidinas e atividade hemolítica das moléculas em eritrócitos bovinos.

Brachydins	IC ₅₀ (mg/mL)	CI 95%	R ²	Hemolysis (%)*
BRA-G	0,075 ^a	0,065 – 0,088	0,90	0,99 ± 0,26
BRA-I	0,079 ^a	0,068 – 0,091	0,93	1,90 ± 0,13
BRA-J	0,075 ^a	0,064 – 0,088	0,91	1,08 ± 0,37
BRA-K	0,058 ^a	0,049 – 0,068	0,90	1,06 ± 0,65

Nota: IC₅₀: Concentração (mg/mL) resultando em 50% de inibição; CI: intervalo de confiança de 95%. A mesma letra sobrescrita na mesma coluna indica que os valores não diferem significativamente em $p < 0.05$. R²: Coeficiente de Correlação de Regressão. *Os valores fornecidos para a porcentagem de hemólise foram obtidos na concentração máxima de BRA testada, ou seja, 0,2 mg/mL.

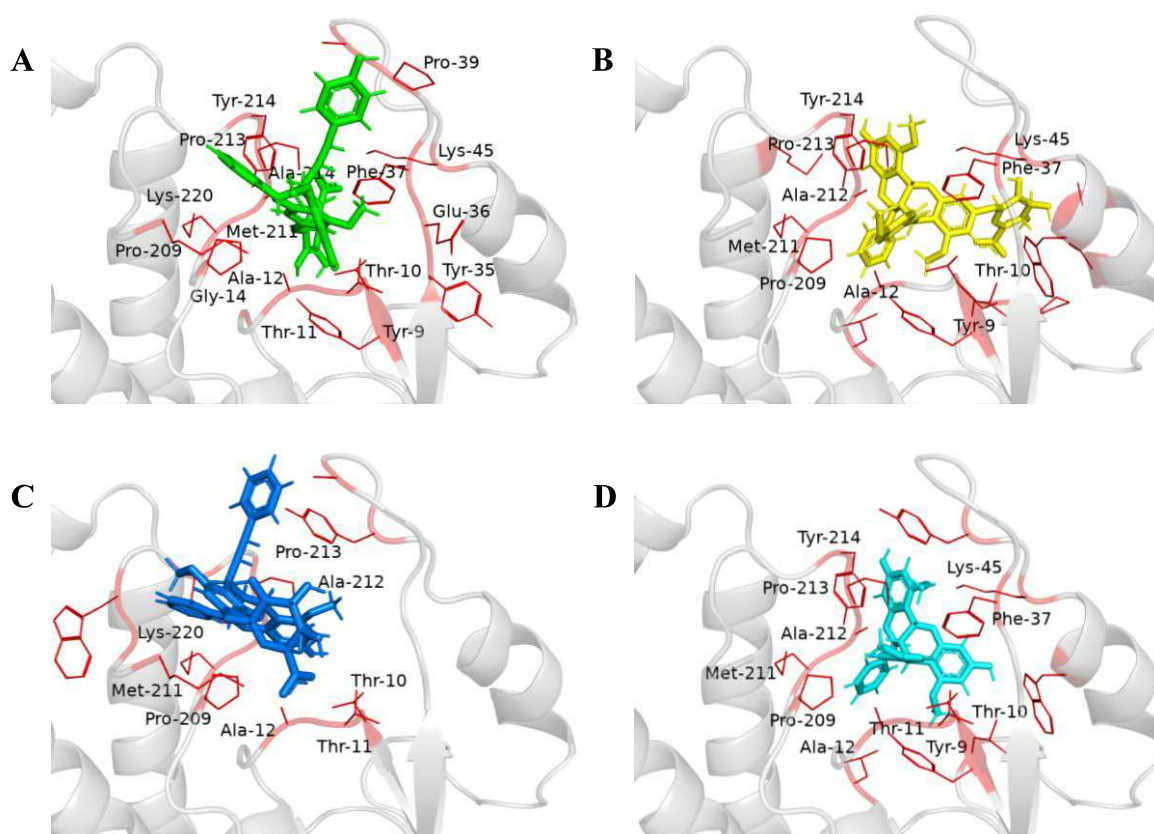


Figura 2. Representação em cartoon da GST de *Rhipicephalus microplus* em complexo com A) BRA-G; B) BRA-I; C) BRA-J; e D) BRA-K. Os ligantes são mostrados como bastões. Em vermelho, resíduos de GST a 3,5 Å de braiquidinas.

4. DISCUSSÃO

Carrapaticidas sintéticos tornaram-se comumente empregados na medicina veterinária e humana para o controle de doenças parasitárias. No entanto, o surgimento de resistência ressaltou a necessidade de abordagens alternativas [33]. Em resposta, há um interesse crescente na exploração de novos compostos bioativos, como flavonoides que possuem potência e seletividade aprimoradas para alvos de carrapatos, apresentando assim fármacos prospectivos para controlar este parasito. Métodos computacionais e *in vitro* facilitam a descoberta de novos compostos capazes de se ligar a alvos moleculares dentro de parasitos [34]. Consequentemente, este estudo fornece evidências *in silico* e *in vitro* da inibição da GST de *R. microplus* pelas braiquidinas BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K (Tabela 1 e Figura 2). Os flavonoides diméricos apresentam uma ampla gama de bioatividades, incluindo propriedades antiproliferativas e antiprotozoárias, e foi sugerido que os elementos chalcona presentes nessas estruturas flavonoides contribuem consideravelmente para seu potencial farmacológico [16, 17, 35].

Embora os flavonoides tenham demonstrado modular a atividade da GST [36], até onde sabemos, este é o primeiro estudo sobre a inibição da GST por braquidinas. Além disso, em carrapatos, o papel bem documentado da GST no metabolismo de compostos endo e xenobióticos, apoiado por elevadas taxas de transcrição do gene GST e pelo aumento da atividade enzimática quando expostos a esses compostos, posiciona as GSTs como alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos carrapaticidas [5]. Além disso, este estudo demonstra que BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K, em doses de até 0,2 mg/mL, causaram apenas hemólise limitada nos eritrócitos, com valores abaixo de 2% (Tabela 1). Pesquisas limitadas exploraram a toxicidade das braquidinas em células de mamíferos. Por exemplo, as braquidinas E e F, de raízes de *F. platyphylla*, exibiram citotoxicidade em células de queratinócitos não tumorais, com valores de IC₅₀ de 50,5 e 59,9 µg/mL, respectivamente [35]. Além disso, as braquidinas A, B e C, isoladas de *F. platyphylla*, não demonstraram toxicidade para macrófagos peritoneais na concentração de 20 µM [17]. As avaliações de toxicidade são importantes nos estágios iniciais do desenvolvimento de medicamentos, permitindo a avaliação da segurança de uma substância [37, 38].

Vários compostos sintéticos e naturais foram relatados como inibidores de GST, e suas atividades geralmente dependem de características estruturais específicas [39]. O potencial das braquidinas G, I, J e K para inibir a GST de *R. microplus* também foi avaliado *in silico* (Fig. 2). As braquidinas apresentaram altas energias de ligação (MolDock score <-100) em relação à GST de *R. microplus*. O MolDock tem uma precisão de encaixe muito alta quando se trata de identificar modos de ligação de ligantes. A pontuação de interação representa a energia total para a interação entre o ligante e a proteína, portanto, quanto menor o valor, melhor a interação [40, 41]. Neste estudo, avaliamos resíduos de GST dentro de uma proximidade de 3,5 Å às braquidinas, sugerida como uma distância de interação ideal [42, 43]. Os resíduos de GST que interagem com braquidinas estão localizados dentro do sítio H, que é uma área hidrofóbica. Dada a importância dos sítios G e H para a atividade da GST, sugere-se que as braquidinas podem interromper a atividade enzimática por meio de sua interação com resíduos cruciais do sítio H. Os resíduos Thr10, Ala12, Pro209, Met211 e Pro213 na GST de *R. microplus* podem ser resíduos-chave potencialmente envolvidos na interação, visto que todos estão a 3,5 Å de cada braquidina (Fig. 2). De fato, a interação entre o carrapaticida ciflumetofeno e uma GST de uma cepa resistente de *Tetranychus urticae*, a GST TuGSTd05, considerada uma candidata-chave na conferência de resistência, é facilitada por interações hidrofóbicas envolvendo resíduos como Ala12 [44].

Os parâmetros físico-químicos e as propriedades ADMET previstas das braquidinas foram analisados pela ferramenta Pre-ADMET (Tabela Suplementar S1). Prevê-se que BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K apresentem alta absorção, um fator crítico a ser considerado ao se considerar a administração oral de fármacos como potenciais agentes terapêuticos [45, 46]. Apesar da interação bem estabelecida de alguns flavonoides com membranas [47], dados limitados estão disponíveis sobre a penetração de braquidinas através da cutícula e membranas de carrapatos. De acordo com a Regra dos 5 de Lipinski, um composto é considerado semelhante a um fármaco se atender aos seguintes critérios: peso molecular inferior a 500 Da, coeficiente de partição (logP) inferior a 5 e possuir no máximo cinco doadores de ligações de hidrogênio e dez aceptadores de ligações de hidrogênio [48]. Neste estudo, as braquidinas violaram pelo menos dois dos parâmetros da Regra de Lipinski (Tabela Suplementar S1). No entanto, muitos produtos naturais que violam os critérios da Regra de Lipinski atravessam membranas celulares [49-51], sendo um exemplo notável a suramina, conhecida por sua atividade antiparasitária contra *Trypanosoma brucei* [52]. Essa droga entra no parasito ligando-se a uma glicoproteína de superfície que medeia sua internalização [52]. Além disso, terapêuticas orais ativas de várias categorias que não estão em conformidade com a Regra de Lipinski servem como substratos para transportadores biológicos [48]. Isso mantém aberta a possibilidade de que também braquidinas, que dificilmente se difundem passivamente através da bicamada lipídica, possam entrar nas células por tal mecanismo. Essa noção é apoiada pelo fato de que muitas características físico-químicas de BRA-G, BRA-I e BRA-J são semelhantes às de BRA-E e BRA-F, que demonstraram anteriormente exercer atividade antiproliferativa em diferentes linhagens de células tumorais, tornando provável sua importação para essas células [35].

BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K, a 0,2 mg/mL, não se mostraram eficazes em testes preliminares de imersão em larvas de *R. microplus*. No entanto, BRA-G aumentou significativamente o efeito da cipermetrina em tais ensaios (ensaios preliminares). Esta observação sugere que, ao inibir a GST de *R. microplus*, BRA-G interfere no processo de desintoxicação da cipermetrina no carrapato e potencializa o efeito larvicida deste piretróide.

Está bem estabelecido que o uso prolongado e inadequado de carrapaticidas pode aumentar a tolerância e a resistência em carrapatos, levando à evolução da resistência em várias espécies [11]. Metabólitos bioativos fornecem uma alternativa promissora para o controle de carrapatos, mesmo aqueles resistentes a carrapaticidas convencionais [53]. Atingir enzimas-chave de carrapatos, como a GST, representa uma abordagem inovadora com potencial para o

desenvolvimento de novos medicamentos. Com base nos resultados deste estudo, os flavonoides BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K podem atuar como inibidores da GST de *R. microplus*. A expansão da pesquisa sobre a inibição da GST por braquidinas e a modificação das estruturas e/ou formulações elaboradas com esses compostos para aumentar sua eficácia podem abrir caminho para sua possível aplicação como carrapaticidas, contribuindo para o desenvolvimento de medicamentos anticarrapatos inovadores.

CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo ressalta o potencial das braquidinas, particularmente BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K, como inibidores da GST de *R. microplus*. Essas descobertas são promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias de combate a ectoparasitos bovinos resistentes a carrapaticidas, oferecendo um caminho potencial para mitigar perdas econômicas na indústria pecuária. Mais pesquisas e ensaios de campo são necessários para explorar a aplicação prática das braquidinas no controle de carrapatos.

MATERIAL SUPLEMENTAR

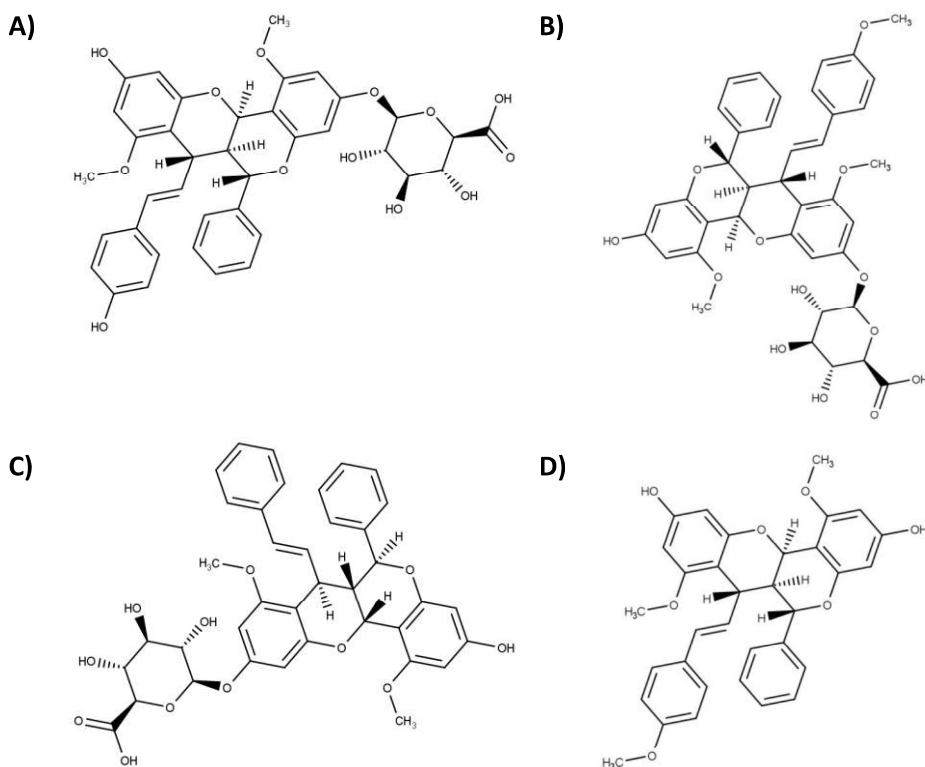


Figura Suplementar 1. Estruturas da braquidina: A) BRA-G (peso molecular: 700,220 g/mol); B) BRA-I (peso molecular: 714,230 g/mol); C) BRA-J (peso molecular: 684,220 g/mol); D) BRA-K (peso molecular: 538,200 g/mol).

Tabela Suplementar 1. Parâmetros físico-químicos e ADMET previstos para as braquidinas BRA-G, BRA-I, BRA-J e BRA-K.

Parâmetros	BRA-G	BRA-I	BRA-J	BRA-K
Peso molecular (g/mol)	700.220	714.230	684.220	538.200
Aceitadores de ligações de hidrogênio	13	12	13	7
Doadores de ligações de hidrogênio	6	6	5	2
LogP	3.105	3.471	3.419	5.358
Caco2	16.488	17.049	17.170	52.417
HIA	87.927	92.470	92.411	96.410
MDCK	0.04346	0.04343	0.04352	0.04474
Pgp_inibição	Não	Não	Inibidor	Inibidor
PPB	95.166	88.484	93.196	97.759
PWS (mg/L)	0.02580	0.005969	0.009229	0.01333
Skin_permeability	-2.687	-2.677	-2.638	-2.073
BBB	0.0413806	0.0208044	0.0238708	1.215
CYP_2C19_inh	Não	Não	Não	Inibidor
CYP_2C9_inh	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor
CYP_2D6_inh	Não	Não	Não	Não
CYP_2D6_sub	Não	Não	Não	Não
CYP_3 ^a 4_inh	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor
CYP_3 ^a 4_sub	Substrato	Substrato	Substrato	Substrato
Algae_at	0.000402348	0.000327527	0.000509442	0.00176314
Ames_test	Mutagênico	Não mutagênico	Não mutagênico	Não mutagênico
Carcino_Mo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Carcino_Rat	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
daphnia_at	0.00929077	0.00766383	0.00801967	0.00295207
hERG_inh	Ambíguo	Ambíguo	Ambíguo	Alto risco
Medaka_at	0.000307185	0.000213437	0.000226812	2.73E+00
Minnow_at	0.00111978	0.000893239	0.00109155	748E+00

BBB – Barreira Hematoencefálica (C.cérebro/C.sangue); Caco-2 – Modelo de células Caco-2; HIA – Modelo de Absorção Intestinal Humana (HIA, %); MDCK – Rim Canino de Madin-Darby (nm/s); Inibição de PGP – Inibidor da glicoproteína P; PPB – Ligação a Proteínas Plasmáticas (%); PWS – Solubilidade em água pura (mg/L); Permeabilidade Cutânea – Permeabilidade da pele em cm/hora; Algas em – Teste com algas (mg/L); Teste de Ames –

Teste de Ames com Salmonella; CYP – Citocromo P450; Carcino M – Teste de carcinogênese em camundongos; Carcino R – Teste de carcinogênese em ratos; Daphnia em – Teste com o crustáceo dáfnia; Inibição de hERG – Inibição do canal de potássio controlado por hERG; Medaka em – Teste com o peixe medaka; Minnow em – Teste com pequenos peixes de água doce.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

WASB: Investigação, Metodologia, Análise formal, Redação – rascunho original. CPT: Metodologia, Análise formal, Investigação. VASL: Metodologia, Análise formal, Investigação. CQR: Recursos, Investigação, Redação – revisão e edição. ISVJ: Recursos, Investigação, Redação – revisão e edição. PAMM: Conceitualização, Validação, Curadoria de dados, Análise formal, Redação – revisão e edição. LMCJ: Recursos, Supervisão, Redação – revisão e edição, Validação. AMSS: Conceitualização, Recursos, Aquisição de financiamento, Redação – revisão e edição, Validação, Administração do projeto.

LISTA DE ABREVIATURAS

BRAs = Braquidinas

GST = Glutathione S-transferase

MPLC = Cromatografia líquida de média pressão

DECLARAÇÃO ÉTICA

Este ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMA, Brasil, sob o protocolo número 23115.004153/2022-58.

CONSENTIMENTO PARA PUBLICAÇÃO

Não aplicável.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi parcialmente financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) - INFRA 03170/18, UNIVERSAL 00869/22 e pela FAPEMA IECT Biotecnologia/Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) processo 2677/17. Também foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses, seja financeiro ou de outra natureza.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) - INFRA 03170/18, UNIVERSAL 00869/22 e pela FAPEMA IECT Biotecnologia/Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) processo 2677/17. Também foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001).

REFERÊNCIAS

- [1] Grisi, L.; Leite, R.C.; Martins, J.R.S.; Barros, A.T.M.; Andreotti, R.; Cancado, P.H.D.; Leon, A.A.P.; Pereira, J.B.; Villela, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 2014, 23(2), 150-156. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014042> PMID: 25054492.
- [2] Agwunobi, D.O.; Yu, Z.; Liu, J. A retrospective review on ixodid tick resistance against synthetic acaricides: implications and perspectives for future resistance prevention and mitigation. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2021, 173(1), 104776. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104776> PMID: 33771255.
- [3] Waldman, J.; Klafke, G.M.; Tirloni, L.; Logullo, C.; da Silva Vaz, I., Jr Putative target sites in synganglion for novel ixodid tick control strategies. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2023, 14(3), 102123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102123> PMID: 36716581.
- [4] Bezerra, W.A.S.; Tavares, C.P.; Rocha, C.Q.; Vaz Junior, I.S.; Michels, P.A.M.; Costa Junior, L.M.; Soares, A.M.S. Anonaine from *Annona crassiflora* inhibits glutathione S-transferase and improves cypermethrin activity on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). *Exp. Parasitol.*, 2022, 243, 108398. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108398> PMID: 36228702
- [5] Ozelame, K.P.C.; Mattia, M.M.C.; Dedavid e Silva, L.A.; Randall, L.M.; Corvo, I.; Saporiti, T.; Seixas, A.; da Silva Vaz, I., Jr; Alvarez, G. Novel tick glutathione transferase inhibitors as promising acaricidal compounds. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2022, 13(5), 101970. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101970> PMID: 35662066.
- [6] Thakur, A.; Patwa, J.; Sharma, A.; Flora, S.J.S. Synthesis, molecular docking, BSA, and *in vitro* reactivation study of imidazopyridine oximes against paraoxon inhibited

acetylcholinesterase. *Med. Chem.*, 2022, 18(2), 273-287.
<http://dx.doi.org/10.2174/1573406417666210208223240> PMID: 33563155.

[7] Otarigho, B.; Falade, M.O. Natural Perylenequinone Compounds as Potent Inhibitors of *Schistosoma mansoni* Glutathione S-Transferase. *Life*, 2023, 13(10), 1957.
<http://dx.doi.org/10.3390/life13101957> PMID: 37895339.

[8] Turkan, F.; Harbi Calimli, M.; Akgun, A.; Gulbagca, F.; Sen, F. Toxicological effects of some antiparasitic drugs on equine liver glutathione S-Transferase enzyme activity. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2020, 180, 113048. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113048> PMID: 31887670.

[9] Costa-Junior, L.M.; Miller, R.J.; Alves, P.B.; Blank, A.F.; Li, A.Y.; Perez de Leon, A.A. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.*, 2016, 228(1), 60-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.028> PMID: 27692332.

[10] Quadros, D.G.; Johnson, T.L.; Whitney, T.R.; Oliver, J.D.; Oliva Chavez, A.S. Plant-derived natural compounds for tick pest control in livestock and wildlife: Pragmatism or Utopia? *Insects*, 2020, 11(8), 490. <http://dx.doi.org/10.3390/insects11080490> PMID: 32752256.

[11] Selles, S.M.A.; Kouidri, M.; Gonzalez, M.G.; Gonzalez, J.; Sanchez, M.; Gonzalez-Coloma, A.; Sanchis, J.; Elhachimi, L.; Olmeda, A.S.; Tercero, J.M.; Valcarcel, F. Acaricidal and repellent effects of essential oils against ticks: a review. *Pathogens*, 2021, 10(11), 1379. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10111379> PMID: 34832535.

[12] El Haddad, D.; Bitam, I.; Bouchenak, O.; Toubal, S.; Yahiaoui, K.; Arab, K.; Boumaza, S. Acaricidal activity of flavonoids extract of *Borago officinalis* L. (Boraginaceae) against brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Trop. Biomed.*, 2018, 35(2), 383-391. PMID: 33601812.

[13] Cen-Pacheco, F.; Ortiz-Celiseo, A.; Peniche-Cardena, A.; Bravo-Ruiz, O.; Lopez-Fentanes, F.C.; Valerio-Alfaro, G.; Fernandez, J.J. Studies on the bioactive flavonoids isolated from *Azadirachta indica*. *Nat. Prod. Res.*, 2020, 34(24), 3483-3491. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2019.1579808> PMID: 30835540.

[14] Hamed, R.R.; Maharem, T.M.; Guneidy, R.A.; Emam, M.A.; Abdel Karim, G.S.A. Purification of fat body glutathione S-transferase from the desert locust *Schistocerca gregaria*

: investigation of flavonoid inhibitory effects on enzyme activity. *Physiol. Entomol.*, 2019, 44(3-4), 187-199. <http://dx.doi.org/10.1111/phen.12289>.

[15] Inaba, K.; Ebihara, K.; Senda, M.; Yoshino, R.; Sakuma, C.; Koiwai, K.; Takaya, D.; Watanabe, C.; Watanabe, A.; Kawashima, Y.; Fukuzawa, K.; Imamura, R.; Kojima, H.; Okabe, T.; Uemura, N.; Kasai, S.; Kanuka, H.; Nishimura, T.; Watanabe, K.; Inoue, H.; Fujikawa, Y.; Honma, T.; Hirokawa, T.; Senda, T.; Niwa, R. Molecular action of larvicidal flavonoids on ecdysteroidogenic glutathione S-transferase Noppera-bo in *Aedes aegypti*. *BMC Biol.*, 2022, 20(1), 43. <http://dx.doi.org/10.1186/s12915-022-01233-2> PMID: 35172816.

[16] da Rocha, C.Q.; Queiroz, E.F.; Meira, C.S.; Moreira, D.R.M.; Soares, M.B.P.; Marcourt, L.; Vilegas, W.; Wolfender, J.L. Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J. Nat. Prod.*, 2014, 77(6), 1345-1350. <http://dx.doi.org/10.1021/np401060j> PMID: 24871307.

[17] Rocha, V.; Quintino da Rocha, C.; Ferreira Queiroz, E.; Marcourt, L.; Vilegas, W.; Grimaldi, G.; Furrer, P.; Allemann, E.; Wolfender, J.L.; Soares, M. Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from *Arrabidaea brachypoda*. *Molecules*, 2018, 24(1), 1-13. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24010001> PMID: 30577423.

[18] Saramago, L.; Gomes, H.; Aguilera, E.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Cabrera, M.; Alzugaray, M.; da Silva Vaz Junior, I.; Nunes da Fonseca, R.; Aguirre-Lopez, B.; Cabrera, N.; Perez-Montfort, R.; Merlino, A.; Moraes, J.; Alvarez, G. Novel and selective *Rhipicephalus microplus* triosephosphate isomerase inhibitors with Acaricidal activity. *Vet. Sci.*, 2018, 5(3), 74. <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci5030074> PMID: 30142944

[19] Shaker, B.; Ahmad, S.; Lee, J.; Jung, C.; Na, D. *In silico* methods and tools for drug discovery. *Comput. Biol. Med.*, 2021, 137, 104851. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104851> PMID: 34520990.

[20] Bitar, R.; Parker, M.; Walker, J. *Drug discovery. Translational interventional radiology*; Elsevier, 2023, pp. 51-54. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-823026-8.00029-8>

[21] Adibi, H.; Khodarahmi, R.; Ezati, M.; Ghavamipour, F.; Khosravi, N.; Sajedi, R.H.; Chalabi, M.; Farokhi, A. Synthesis and potential antidiabetic properties of curcumin-based derivatives: an *in vitro* and *in silico* study of α -glucosidase and α -amylase inhibition. *Med. Chem.*, 2023, 19(1), 99-117. <http://dx.doi.org/10.2174/1573406418666220509101854> PMID: 35579152.

[22] da Rocha, C.Q.; de-Faria, F.M.; Marcourt, L.; Ebrahimi, S.N.; Kitano, B.T.; Ghilardi, A.F.; Luiz Ferreira, A.; de Almeida, A.C.A.; Dunder, R.J.; Souza-Brito, A.R.M.; Hamburger,

- M.; Vilegas, W.; Queiroz, E.F.; Wolfender, J.L. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. *Phytochemistry*, 2017, 135, 93-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.12.002> PMID: 28010885.
- [23] da Silva Vaz, I., Jr; Torino 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. *Vet. Parasitol.*, 2004, 119(2-3), 237-245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.004> PMID: 14746982.
- [24] Ndawula, C., Jr; Sabadin, G.A.; Parizi, L.F.; da Silva Vaz, I., Jr Constituting a glutathione S-transferase-cocktail vaccine against tick infestation. *Vaccine*, 2019, 37(14), 1918-1927. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.039> PMID: 30824358.
- [25] Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Fleischner, G.; Gatmaitan, Z.; Arias, I.M.; Jakoby, W.B. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71(10), 3879-3882. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.71.10.3879> PMID: 4139704.
- [26] Choi, J.; Reipa, V.; Hitchins, V.M.; Goering, P.L.; Malinauskas, R.A. Physicochemical characterization and *in vitro* hemolysis evaluation of silver nanoparticles. *Toxicol. Sci.*, 2011, 123(1), 133-143. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr149> PMID: 21652737.
- [27] Hanwell, M.D.; Curtis, D.E.; Lonie, D.C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G.R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.*, 2012, 4(1), 17. <http://dx.doi.org/10.1186/1758-2946-4-17> PMID: 22889332.
- [28] Wadapurkar, R.M.; Shilpa, M.D.; Katti, A.K.S.; Sulochana, M.B. *In silico* drug design for *Staphylococcus aureus* and development of host-pathogen interaction network. *Informatics in Medicine Unlocked*, 2018, 10, 58-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imu.2017.11.002>
- [29] Tong, J.B.; Luo, D.; Bian, S.; Zhang, X. Structural investigation of tetrahydropteridin analogues as selective PLK1 inhibitors for treating cancer through combined QSAR techniques, molecular docking, and molecular dynamics simulations. *J. Mol. Liq.*, 2021, 335, 116235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116235>
- [30] Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J.E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.*, 2015, 10(6), 845-858. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.053> PMID: 25950237.
- [31] Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 1993, 26(2), 283-291.

<http://dx.doi.org/10.1107/S0021889892009944>.

[32] Reditakis, E.; Reditakis, N.E.; Tsagkarakou, A. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest Manag. Sci.*, 2005, 61(6), 577-582.

<http://dx.doi.org/10.1002/ps.1029> PMID: 15712366.

[33] Obaid, M.K.; Islam, N.; Alouffi, A.; Khan, A.Z.; da Silva Vaz, I., Jr; Tanaka, T.; Ali, A. Acaricides resistance in ticks: selection, diagnosis, mechanisms, and mitigation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2022, 12, 941831. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2022.941831> PMID: 35873149

[34] Malak, N.; Alotaibi, B.S.; Khan, A.; Khan, A.; Ullah, S.; Nasreen, N.; Niaz, S.; Chen, C.C. Density functional theory calculations and molecular docking analyses of flavonoids for their possible application against the acetylcholinesterase and triose-phosphate isomerase proteins of *Rhipicephalus microplus*. *Molecules*, 2023, 28(8), 3606. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28083606> PMID: 37110838.

[35] de Lima, C.A.; Cubero, M.C.Z.; Franco, Y.E.M.; Rodrigues, C.D.P.; do Nascimento, J.R.; Vendramini-Costa, D.B.; Sciani, J.M.; da Rocha, C.Q.; Longato, G.B. Antiproliferative activity of two unusual dimeric flavonoids, brachyidin E and brachyidin F, isolated from *Fridericia platyphylla* (Cham.) LG Lohmann: *in vitro* and molecular docking evaluation. *BioMed Res. Int.*, 2022, 2022, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/3319203> PMID: 35187163

[36] Boušova, I.; Skalova, L. Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences. *Drug Metab. Rev.*, 2012, 44(4), 267-286. <http://dx.doi.org/10.3109/03602532.2012.713969> PMID: 22998389

[37] Makris, S.L.; Kim, J.H.; Ellis, A.; Faber, W.; Harrouk, W.; Lewis, J.M.; Paule, M.G.; Seed, J.; Tassinari, M.; Tyl, R. Current and future needs for developmental toxicity testing. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.*, 2011, 92(5), 384-394. <http://dx.doi.org/10.1002/bdrb.20335> PMID: 21922641

[38] Arome, D.; Chinedu, E. The importance of toxicity testing. *Journal of Pharmaceutical BioSciences.*, 2013, 4, 146-148. [39] Ata, A.; Udenigwe, C. The discovery and application of inhibitors of glutathione S-transferase as therapeutic agents-a review. *Curr. Bioact. Compd.*, 2008, 4(1), 41-50. <http://dx.doi.org/10.2174/157340708784533384>

[40] Thomsen, R.; Christensen, M.H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J. Med. Chem.*, 2006, 49(11), 3315-3321. <http://dx.doi.org/10.1021/jm051197e> PMID: 16722650

- [41] Xavier, M.M.; Heck, G.S.; de Avila, M.B.; Levin, N.M.B.; Pinto, V.O.; Carvalho, N.L.; de Azevedo, W.F. SAnDReS a computational tool for statistical analysis of docking results and development of scoring functions. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2016, 19(10), 801-812. <http://dx.doi.org/10.2174/1386207319666160927111347> PMID: 27686428,
- [42] Liu, Z.; Wang, G.; Li, Z.; Wang, R. Geometrical preferences of the hydrogen bonds on protein–ligand binding interface derived from statistical surveys and quantum mechanics calculations. *J. Chem. Theory Comput.*, 2008, 4(11), 1959-1973. <http://dx.doi.org/10.1021/ct800267x> PMID: 26620338
- [43] Bianchi, V.; Gherardini, P.F.; Helmer-Citterich, M.; Ausiello, G. Identification of binding pockets in protein structures using a knowledge-based potential derived from local structural similarities. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13(S4)(Suppl. 4), S17. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-S4-S17> PMID: 22536963.
- [44] Pavlidi, N.; Khalighi, M.; Myridakis, A.; Dermauw, W.; Wybouw, N.; Tsakireli, D.; Stephanou, E.G.; Labrou, N.E.; Vontas, J.; Van Leeuwen, T. A glutathione-S-transferase (TuGSTd05) associated with acaricide resistance in *Tetranychus urticae* directly metabolizes the complex II inhibitor cyflumetofen. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2017, 80, 101-115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.12.003> PMID: 27932274.
- [45] Hou, T.; Wang, J.; Li, Y. ADME evaluation in drug discovery. 8. The prediction of human intestinal absorption by a support vector machine. *J. Chem. Inf. Model.*, 2007, 47(6), 2408-2415. <http://dx.doi.org/10.1021/ci7002076> PMID: 17929911
- [46] Hou, T.; Wang, J.; Zhang, W.; Xu, X. ADME evaluation in drug discovery. 7. Prediction of oral absorption by correlation and classification. *J. Chem. Inf. Model.*, 2007, 47(1), 208-218. <http://dx.doi.org/10.1021/ci600343x> PMID: 17238266.
- [47] Erlejman, A.G.; Verstraeten, S.V.; Fraga, C.G.; Oteiza, P.I. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radic. Res.*, 2004, 38(12), 1311- 1320. <http://dx.doi.org/10.1080/10715760400016105> PMID: 15763955.
- [48] Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 46(1-3), 3-26. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0) PMID: 11259830.

- [49] Leeson, P.D.; Davis, A.M. Time-related differences in the physical property profiles of oral drugs. *J. Med. Chem.*, 2004, 47(25), 6338-6348. <http://dx.doi.org/10.1021/jm049717d> PMID: 15566303.
- [50] O'Shea, R.; Moser, H.E. Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. *J. Med. Chem.*, 2008, 51(10), 2871-2878. <http://dx.doi.org/10.1021/jm700967e> PMID: 18260614.
- [51] Abdelmohsen, U.R.; Balasubramanian, S.; Oelschlaeger, T.A.; Grkovic, T.; Pham, N.B.; Quinn, R.J.; Hentschel, U. Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections. *Lancet Infect. Dis.*, 2017, 17(2), e30-e41. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30323-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30323-1) PMID: 27979695.
- [52] Wiedemar, N; Hauser, DA; Maser, P 100 years of suramin. *Antimicrobi. agen. chemother.*, 2020, 64(3), 1-14. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01168-19>.
- [53] Adenubi, O.T.; Ahmed, A.S.; Fasina, F.O.; McGaw, L.J.; Eloff, J.N.; Naidoo, V. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and metaanalysis. *Ind. Crops Prod.*, 2018, 123(1), 779-806. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.075>.

3.3 CAPÍTULO 3. Avaliação *in vitro* e *in silico* de compostos vegetais como inibidores da glutathione s-transferase em *Rhipicephalus microplus* e *R. decoloratus*

Molecular and Biochemical Parasitology. 2026; 1-20. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2026.111735>

Avaliação *in vitro* e *in silico* de compostos vegetais como inibidores da glutathione S-transferase em *Rhipicephalus microplus* e *R. decoloratus*

RESUMO

Os carrapatos são ectoparasitos amplamente distribuídos que transmitem diversos patógenos e causam perdas significativas na produção pecuária. A resistência a carrapaticidas comerciais tem se tornado cada vez mais comum, estimulando a busca por novos compostos com potencial para o controle de carrapatos. Entre os possíveis alvos, as glutathione S-transferases (GSTs) desempenham um papel central nos processos de desintoxicação e, portanto, são candidatas promissoras para superar a resistência a carrapaticidas. Neste trabalho, a atividade inibitória de compostos vegetais sobre GSTs recombinantes de *Rhipicephalus microplus* (rGST-Rm) e *R. decoloratus* (rGST-Rd) foi examinada utilizando abordagens *in vitro* e *in silico*. Os compostos testados incluíram 3 β -estearioxi-olean-12-eno, diosgenina, quercitrina, naringenina, ácido elágico, rutina e quercetina, que pertencem a diferentes classes químicas, incluindo triterpenos, esteroides, polifenóis e flavonoides. Ensaio *in vitro* mostraram que o 3 β -estearioxi-olean-12-eno e a naringenina inibiram a rGST-Rm com valores de IC₅₀ de 148,2 μ M e 160,7 μ M, respectivamente. Para a rGST-Rd, observou-se inibição pela quercitrina (IC₅₀ = 37,7 μ M), naringenina (IC₅₀ = 177,7 μ M) e rutina (IC₅₀ = 115,0 μ M). Análises de docagem molecular previram interações entre essas moléculas e as GSTs de carrapatos. No geral, os resultados corroboram o potencial da inibição da GST como estratégia para o desenvolvimento de carrapaticidas e indicam que alguns compostos vegetais podem servir como ponto de partida para futuros métodos de controle de carrapatos.

Palavras-chave: Inibição da GST, compostos vegetais, *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus decoloratus*, carrapatos.

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos de alta relevância veterinária, que ameaçam uma ampla gama de espécies hospedeiras, sendo o gado o mais afetado. Sua alimentação sanguínea causa lesões na pele e perda de peso, bem como uma diminuição na qualidade do leite, da carne e, de modo geral, dos produtos [1]. Espécies do gênero *Rhipicephalus*, principalmente *R. microplus* e *R. decoloratus*, estão entre os parasitos de maior importância econômica para o gado [2, 3]. Essas espécies têm distribuições geográficas parcialmente sobrepostas e transmitem diversos patógenos, representando sérios desafios para os sistemas pecuários e para a economia agrícola global [4, 5]. Além disso, a resistência generalizada tem diminuído progressivamente o desempenho dos acaricidas sintéticos usados para suprimir infestações [6, 7].

Os esforços atuais para desenvolver novas estratégias de controle envolvem cada vez mais compostos naturais e sintéticos [8]. Essa abordagem concentra-se em elucidar processos fisiológicos essenciais em carrapatos para permitir a inibição seletiva de enzimas específicas do parasito [9, 10]. Entre estes, as glutathione S-transferases (GSTs) (EC 2.5.1.18) têm atraído particular atenção como alvos de fármacos, pois desempenham papéis centrais na desintoxicação de xenobióticos e outros compostos nocivos [1, 11-14]. A inibição da GST compromete essas defesas, aumentando a suscetibilidade dos carrapatos a compostos exógenos e endógenos, e oferecendo uma abordagem potencialmente inovadora e sustentável para o controle de parasitos [15-17].

As plantas biossintetizam uma ampla gama de compostos com propriedades antimicrobianas e antiparasitárias, e tais compostos estão sendo investigados como alternativas candidatas para o controle de carrapatos [18-21]. Entre esses fitoquímicos estão os flavonoides, polifenóis e triterpenos, que demonstraram efeitos acaricidas contra várias espécies de carrapatos [22-24]. Notavelmente, vários desses compostos são relatados como inibidores de GST, posicionando-os como candidatos para o controle de *R. microplus* [17, 23].

Abordagens computacionais aceleraram a descoberta de compostos com potencial efeito carrapaticida [25]. Em particular, a docagem molecular, usada para estimar poses de ligação favoráveis de ligantes candidatos em sítios catalíticos ou alostéricos, ajuda a priorizar inibidores antes da avaliação experimental [26, 27]. A combinação de previsões *in silico* com ensaios *in vitro* expandiu a descoberta de inibidores enzimáticos naturais, incluindo da GST, para o controle de carrapatos [28-30]. Por exemplo, usando docagem molecular combinada

com ensaios *in vitro*, demonstramos anteriormente que flavonoides diméricos (braquidinas) isolados de *Fridericia platyphylla* inibem a GST de *R. microplus*, com valores de IC₅₀ de 97–110 µM [17]. Da mesma forma, o fitoquímico trans-anetol prejudicou a atividade da GST em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* [31], e o composto derivado de plantas ácido pistagrêmico mostrou afinidade prevista *in silico* à GST de *R. microplus* e causou 86% de mortalidade larval a 200 ppm [28].

Considerando a relevância científica e econômica do desenvolvimento de novos compostos para o controle de carrapatos e as diversas atividades biológicas exibidas por compostos vegetais, o presente estudo combinou metodologias *in silico* e *in vitro* para investigar os efeitos inibitórios de compostos de uma biblioteca de compostos vegetais sobre as GSTs de *R. microplus* e *R. decoloratus*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Compostos vegetais selecionados

Sete compostos foram selecionados da biblioteca de compostos vegetais do Laboratório de Química e Produtos Naturais (LQPN-UFMA) para este estudo. Diosgenina, quercitrina e naringenina foram adquiridas de uma empresa comercial (Sigma-Aldrich Ltda, São Paulo, Brasil). Os compostos 3β-estearioxi-olean-12-eno, ácido elágico, rutina e quercetina foram previamente purificados, conforme descrito por [32-34].

2.2 Produção de GSTs recombinantes de *Rhipicephalus microplus* e *R. decoloratus* e ensaios de inibição

As GSTs recombinantes de *R. microplus* (rGST-Rm) e *R. decoloratus* (rGST-Rd) foram expressas em *Escherichia coli* e purificadas conforme descrito anteriormente [9, 35, 36]. A pureza da proteína e a massa molecular aparente foram avaliadas por SDS-PAGE, e a identidade da proteína foi verificada por análise de western blot usando um anticorpo anti-GST de carrapato de coelho, confirmando a expressão correta e a integridade das enzimas recombinantes. A atividade enzimática foi medida a 25 °C em microplacas de 96 poços, utilizando o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB; Sigma-Aldrich, EUA). Soluções estoque de 3β-estearioxi-olean-12-eno, diosgenina, quercitrina, naringenina, ácido elágico, rutina e quercetina foram preparadas em DMSO a 2% e testadas em concentrações que variaram de 6,25 a 200 µM. Os ensaios de inibição foram conduzidos utilizando 10 µL de GSTs

recombinantes (1,42 µg de proteína), CDNB (3 mM) e glutationa (GSH, 3 mM). DMSO (0,05%) foi utilizado como controle negativo [37]. As leituras de absorbância foram registradas a 340 nm durante 30 min, com intervalos de 60 s, e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3 Avaliação da atividade hemolítica de compostos em eritrócitos bovinos

O ensaio de hemólise *in vitro* foi realizado medindo-se a lise de eritrócitos bovinos conforme descrito anteriormente [38], com pequenas modificações. Sangue bovino total foi coletado e processado para obtenção de uma suspensão de hemácias em NaCl 0,15 M, a qual foi então incubada com concentrações variáveis dos compostos preparados em DMSO 0,05%. Para cada teste, 100 µL de uma suspensão de hemácias a 2,5% foram misturados com 100 µL da solução do composto (6,25–200 µM) e incubados por 30 min a 37 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para uma placa de cultura de 96 poços para medir a absorbância da hemoglobina liberada a 414 nm utilizando um leitor de microplacas. As hemácias tratadas com NaCl 0,15M foram utilizadas como controle negativo, enquanto as hemácias tratadas com Triton X-100 0,1% foram utilizadas como controle positivo.

2.4 Preparação de ligantes e modelagem de proteínas

A estrutura química do 3β-estearioxi-olean-12-eno foi desenhada usando o ChemDraw JS v19.0.0. As estruturas da diosgenina, quercitrina, naringenina, ácido elágico, rutina e quercetina foram obtidas do banco de dados PubChem [39] com os CIDs 99474, 5280459, 932, 5281855, 5280805 e 5280343, respectivamente. O software PreADMET foi usado para prever as propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) dos compostos, seguindo a metodologia descrita em estudos anteriores [40, 41]. As estruturas moleculares de todos os compostos foram otimizadas geometricamente usando cálculos de campo de força clássico no software Avogadro [42], empregando o campo de força MMFF94 e o algoritmo de descida mais íngreme, em quatro etapas sob critérios de convergência padrão.

A estrutura tridimensional (3D) da GST de *R. microplus*, previamente modelada e validada pelo nosso grupo [9], foi empregada no presente estudo para análises de docagem molecular. Além disso, a estrutura 3D da GST de *R. decoloratus* (acesso GenBank QEU48914) foi prevista utilizando o servidor Phyre2 [43]. O melhor modelo estrutural identificado foi a GST de *Camelus dromedarius* (cadeia A; PDB ID: 7OPY), que apresentou 55% de identidade de sequência e 99% de cobertura de sequência, corroborando a geração de um modelo 3D confiável baseado em homologia. A estrutura resultante foi posteriormente validada utilizando

PROCHECK 3.0 e ERRAT para avaliar a qualidade estereoquímica e as interações atômicas não ligadas [44, 45].

2.5 Análise de docagem molecular

Estudos de docagem molecular foram conduzidos para avaliar as poses de ligação e afinidades dos compostos selecionados no sítio H do modelo GST do carrapato, utilizando o Molegro Virtual Docker v6.0 (MVD) [46, 47]. O protocolo de docagem foi configurado com o Plants score [48] como função de pontuação e o algoritmo de busca iterated simplex (Ant Colony Optimization). Para ambas as GSTs, a docagem molecular foi realizada dentro de uma esfera de ligação virtual de 15 Å de raio, centrada nas coordenadas X: 6,06; Y: 3,61; Z: 28,00 Å. A classificação final das poses utilizou o escore MolDock [46], onde valores mais negativos indicam interações previstas mais fortes. A melhor pose de docagem de cada composto ligado à GST foi visualizada e analisada posteriormente utilizando o PyMOL Molecular Graphics System v1.3 (<http://www.pymol.org/>). Os resíduos localizados a uma distância de até 3,5 Å de cada ligante na melhor conformação foram identificados e avaliados para ambas as GSTs.

2.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas nos valores médios derivados dos ensaios de inibição enzimática usando ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey, com um limiar de significância definido em $p < 0,05$, usando o GraphPad Prism v8.0.2. A significância estatística entre as concentrações foi avaliada com base em intervalos de confiança não sobrepostos [49].

3 RESULTADOS

3.1 Produção e purificação de recombinantes rGST-Rd e rGST-Rm

As GSTs recombinantes de *R. decoloratus* e *R. microplus* foram expressas em *E. coli*. A análise por SDS-PAGE das GSTs purificadas de *R. microplus* e *R. decoloratus* mostrou um peso molecular aparente de aproximadamente 25 kDa, consistente com os tamanhos esperados. Esse resultado foi confirmado por análise de Western blot utilizando um anticorpo anti-GST de carrapato de coelho (Figura 1). A presença de uma única banda no peso molecular esperado, tanto na análise por SDS-PAGE quanto na análise por Western blot, indica a correta expressão e integridade das proteínas recombinantes.

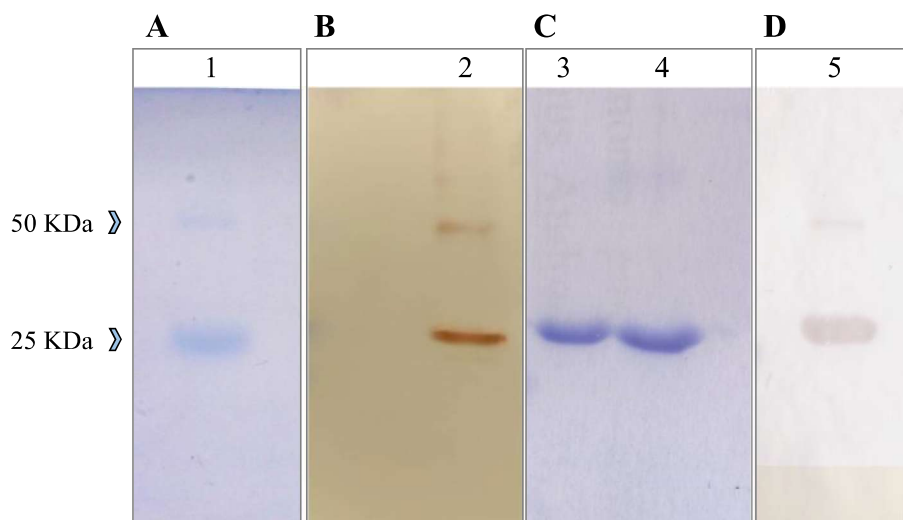


Figura 1. Análises de SDS–PAGE e western blot; (A) 12% de SDS–PAGE corado com azul de Coomassie, mostrando a GST recombinante purificado de *R. decoloratus* na faixa 1. (B) western blot de GST recombinante de *R. decoloratus* (rGST-Rd) contra soros de coelho imunizados com rGST-Rd, mostrado na faixa 2. (C) 12% de SDS–PAGE corado com azul de Coomassie, mostrando a GST recombinante purificado de *R. microplus* nas faixas 3 e 4. (D) Western blot de GST recombinante de *R. microplus* (rGST-Rm) contra soros de coelho imunizados com rGST-Rm, mostrado na faixa 5.

3.2 Estrutura dos compostos, modelagem da estrutura 3D da GST de *R. decoloratus* e análises ADMET

As estruturas químicas dos compostos selecionados são mostradas na Figura Suplementar 1. O melhor modelo identificado pelo servidor web Phyre2 para a preparação de um modelo estrutural 3D confiável da GST de *R. decoloratus* foi a GST de *Camelus dromedarius* (Cadeia A, ID PDB: 7OPY), com 55% de identidade e 99% de cobertura. O modelo resultante foi obtido com 100% de confiança. A estereoquímica do modelo proteico refinado revelou que, dos 176 resíduos de aminoácidos da GST de *R. decoloratus*, 92,1% estavam situados na região mais favorável do gráfico de Ramachandran (Figura Suplementar 2 e Figura Suplementar 3). A análise ERRAT indicou boa qualidade estrutural geral para a GST de *R. decoloratus* modelada, com um fator de qualidade geral de 82,52%.

As características físico-químicas e as propriedades ADMET previstas dos compostos naturais avaliados são apresentadas na Tabela Suplementar 1. Os pesos moleculares variaram de 272,07 g/mol para a naringenina a 680,65 g/mol para o 3 β -estearioxi-olean-12-eno. A quercitrina, a naringenina, o ácido elágico, a rutina e a quercetina apresentaram valores de

coeficiente de partição (LogP) inferiores a 5,0. Previu-se alta absorção intestinal humana (HIA) para o 3 β -estearioxi-olean-12-eno (100%), a diosgenina (96,20%) e a naringenina (87,32%), enquanto a quercitrina e a rutina apresentaram baixa absorção prevista. Em relação à mutagenicidade, a maioria dos compostos foi prevista como não mutagênica no teste de Ames, embora a naringenina, o ácido elágico e a quercetina tenham apresentado previsões positivas. Além disso, o 3 β -estearioxi-olean-12-eno e a diosgenina podem entrar no cérebro, uma vez que os valores previstos para sua distribuição através da barreira hematoencefálica (BHE) foram de 24,870 e 7,765, respectivamente.

3.3 Docagem molecular, inibição enzimática e efeito hemolítico

Como resultado das simulações de docagem molecular, todos os compostos apresentaram MolDock score negativos para ambas as espécies de carrapatos. O composto 3 β -estearioxi-olean-12-eno apresentou o menor MolDock score para GST de *R. microplus* (-111,198 au) e GST de *R. decoloratus* (-175,708 au), o que indica as maiores afinidades de ligação previstas (Tabela 1). Nos ensaios de inibição enzimática a 50 μ M, este composto inibiu a rGST-Rm em 39,4% \pm 12,9, enquanto não inibiu estatisticamente a rGST-Rd (3,53% \pm 6,1). O flavonóide quercitrina apresentou MolDock score de -53,342 au e -39,892 au para *R. microplus* e *R. decoloratus*, respectivamente, e exibiu o efeito inibitório mais forte entre as moléculas testadas, com 65,6% \pm 2,0 de inibição da GST de *R. decoloratus* (Tabela 1). Apesar do MolDock score relativamente alto (baixa afinidade prevista) da rutina para *R. decoloratus* (-33,399 au), este flavonóide inibiu a GST de *R. decoloratus* em 49,0% \pm 9,3. Além disso, todos os compostos exibiram atividade hemolítica mínima a 200 μ M (<5%) (Tabela 1).

O composto 3 β -estearioxi-olean-12-eno inibiu a GST de *R. microplus* de forma mais eficaz, com um IC₅₀ de 148,2 \pm 8,9 μ M, enquanto a quercitrina demonstrou a inibição mais forte da GST de *R. decoloratus*, exibindo um IC₅₀ de 37,7 \pm 1,9 μ M (Tabela 2). Além disso, os resíduos localizados a 3,5 Å de 3 β -estearioxi-olean-12-eno, quercitrina, naringenina e rutina, que apresentaram as maiores atividades inibitórias *in vitro* contra GSTs, provavelmente estão envolvidos em interações intermoleculares GST-composto (Figura 2).

Tabela 1. Resultados de docagem molecular dos compostos mais bem classificados com base nas pontuações do MolDock contra GSTs de carrapatos, atividades inibitórias e efeito hemolítico em eritrócitos bovinos.

ID	Compostos	Classe química	MolDock Score		In vitro GST (% ± SD)*		Hemólise (%)**
			<i>R. microplus</i>	<i>R. decoloratus</i>	<i>R. microplus</i>	<i>R. decoloratus</i>	
A	3β-estearioxi-olean-12-eno	Triterpeno	-111,198	-175,708	39,4 ± 12,9 ^a	3,53 ± 6,1 ^b	0,5 ± 0,6
B	Diosgenina	Esteróide	-56,749	-86,881	25,7 ± 10,7 ^a	24,7 ± 8,5 ^a	0,0 ± 0,0
C	Quercitrina	Flavonoide	-53,342	-39,892	24,0 ± 4,0 ^a	65,6 ± 2,0 ^c	0,0 ± 0,0
D	Naringenina	Flavonoide	-87,173	-74,140	27,8 ± 5,2 ^a	22,0 ± 4,5 ^a	0,4 ± 0,4
E	Ácido Elágico	Polifenol	-49,666	-70,580	21,4 ± 14,2 ^a	28,9 ± 15,0 ^a	0,0 ± 0,0
F	Rutina	Flavonoide	-47,980	-33,399	0,0 ± 0,0	49,0 ± 9,3 ^a	2,8 ± 1,8
G	Quercetina	Flavonoide	-93,052	-75,663	0,0 ± 0,0	25,6 ± 3,9 ^a	1,1 ± 0,8

* Concentração a 50 µM. **Concentração a 200 µM. DP: Desvio Padrão. A mesma letra sobrescrita na mesma coluna indica que os valores não diferem significativamente em p < 0.05.

Tabela 2. Inibição enzimática de compostos naturais contra glutathiona S-transferase (GST) de carrapatos.

ID	Compostos	IC ₅₀ ± SD (μM)		IC ₉₀ ± SD (μM)	
		<i>R. microplus</i>	<i>R. decoloratus</i>	<i>R. microplus</i>	<i>R. decoloratus</i>
A	3β-estearioxi-olean-12-eno	148,2 ± 8,9 ^a	> 200 ^c	> 200 ^c	> 200 ^c
B	Diosgenina	> 200 ^c	> 200 ^c	> 200 ^c	> 200 ^c
C	Quercitrina	> 200 ^c	37,7 ± 1,9 ^b	> 200 ^c	137,2 ± 39,0 ^a
D	Naringenina	160,7 ± 21,2 ^a	177,7 ± 1,1 ^a	> 200 ^c	ND
E	Ácido Elágico	> 200 ^c	> 200 ^c	> 200 ^c	> 200 ^c
F	Rutina	0,0	115,0 ± 11,3 ^a	> 200 ^c	> 200 ^c
G	Quercetina	0,0	> 200 ^c	> 200 ^c	> 200 ^c

IC₅₀ou₉₀: Concentração que resulta em 50% ou 90% de inibição. DP: Desvio Padrão. A mesma letra sobrescrita na mesma coluna indica que os valores não diferem significativamente em $p < 0,05$.

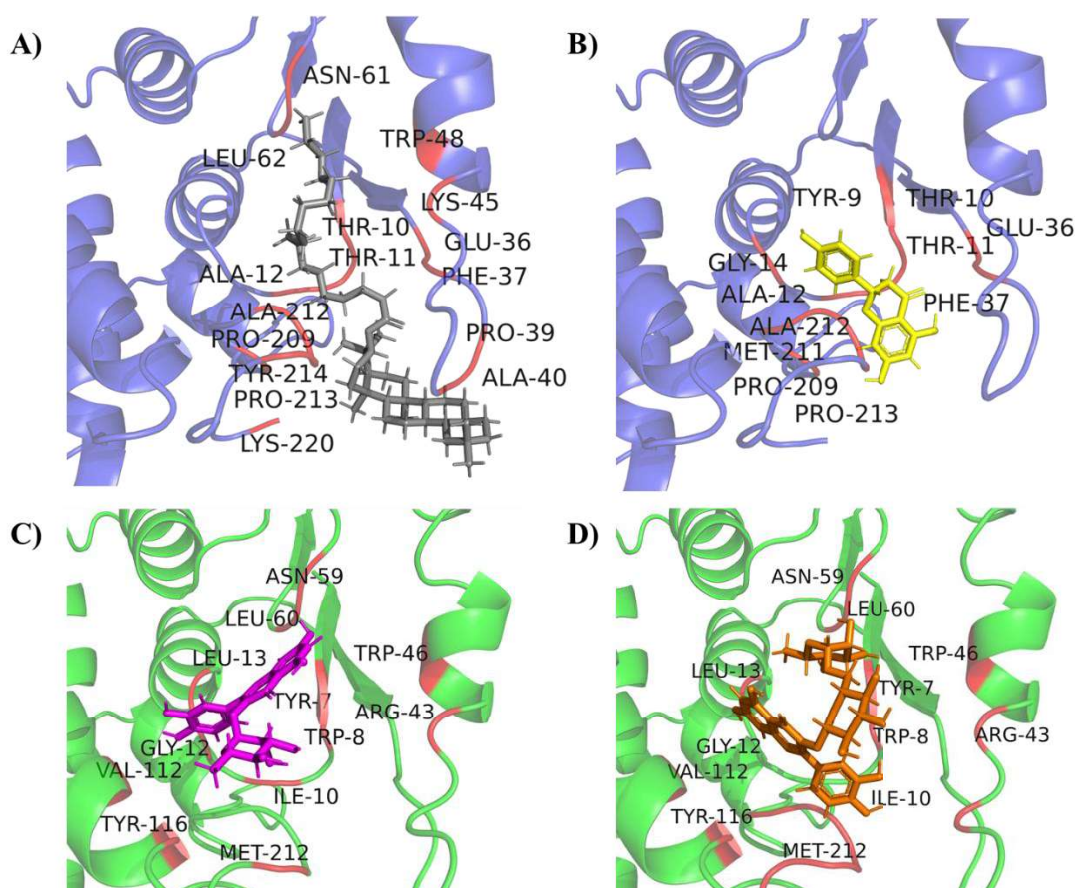


Figura 2. Representação em cartoon da GST de *Rhipicephalus microplus* (em azul) em complexo com A) 3β-estearioxi-olean-12-eno; B) Naringenina; e da GST de *Rhipicephalus*

decoloratus (em verde) em complexo com C) Quercitrina; e D) Rutina. Os ligantes são mostrados como bastões. Em vermelho, resíduos de GSTs dentro de 3,5 Å dos compostos.

4 DISCUSSÃO

Os carrapaticidas sintéticos continuam a ser amplamente aplicados tanto na prática veterinária como, em certa medida, na medicina humana para o controlo de parasitos. No entanto, o crescente surgimento de resistência aos carrapaticidas sublinha a necessidade urgente de estratégias de controlo alternativas [50]. Existe um interesse crescente na identificação de novos compostos bioativos, em particular compostos vegetais com maior efeito e seletividade contra alvos enzimáticos de carrapatos, que representam candidatos promissores para o controlo de parasitas. Este estudo fornece evidências *in silico* e *in vitro* que demonstram uma inibição prevista e confirmada experimentalmente *in vitro* das enzimas GST de *R. microplus* e *R. decoloratus* por compostos vegetais, apoiando o seu potencial como agentes carrapaticidas alternativos.

As análises de docagem molecular é fundamentada na qualidade estrutural dos modelos de GST empregados. A confiabilidade dos modelos estruturais GST utilizados neste estudo foi verificada por análises de validação. O modelo *R. microplus* GST foi previamente validado [9], enquanto o modelo *R. decoloratus* GST recém-gerado mostrou 91% dos resíduos em regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran, excedendo os limites aceitos para qualidade estrutural [44] e apoiando sua adequação para análises de docagem. Além disso, a qualidade estereoquímica da proteína modelada foi avaliada usando o ERRAT, que analisa interações atômicas não ligadas, com modelos nos quais mais de 80% das regiões se enquadram no limite de confiança de 95%, considerados confiáveis [45].

Os parâmetros físico-químicos e as propriedades ADMET previstas dos compostos foram analisados pela ferramenta Pre-ADMET (Tabela Suplementar 1). Prevê-se que o 3β-estearioxi-olean-12-eno, a diosgenina e a naringenina apresentem alta absorção, um fator a ser considerado ao contemplar a administração oral de medicamentos como potenciais agentes terapêuticos [51]. Apesar da interação bem estabelecida de alguns compostos vegetais com membranas [52], existem poucos dados disponíveis sobre a penetração dos compostos apresentados neste estudo através da cutícula e das membranas do carrapato. Além disso, embora alguns dos compostos avaliados tenham violado dois ou mais parâmetros da Regra de Lipinski, a diosgenina, a naringenina, o ácido elágico e a quercetina cumpriram os critérios de

Lipinski; no entanto, muitos compostos vegetais que violam essas regras ainda são capazes de atravessar membranas biológicas [53-55].

A docagem molecular foi realizada no sítio H das GSTs. Este bolso de ligação do co-substrato hidrofóbico é considerado um local de interações com compostos pesticidas xenobióticos e tem sido proposto como um alvo estratégico com menor probabilidade de desenvolvimento de resistência [56, 57]. Tais características reforçam a importância do sítio H na resistência a acaricidas mediada por GST e corroboram a relevância das presentes descobertas como ponto de partida para o projeto racional de compostos mais potentes direcionados à GST.

Todos os compostos analisados apresentaram pontuações MolDock negativas, variando de -175,708 a -33,399 (Tabela 1). As simulações de docagem foram realizadas com o algoritmo MolDock, uma ferramenta amplamente utilizada para prever conformações favoráveis de ligação de ligantes. As pontuações resultantes refletem as afinidades de ligação estimadas, com valores mais baixos sugerindo interações intermoleculares mais favoráveis [46, 58].

GSTs recombinantes de *R. microplus* (rGST-Rm) e *R. decoloratus* (rGST-Rd) foram expressas e purificadas com sucesso, apresentando bandas de ~25 kDa em SDS-PAGE (Figura 1), consistentes com os tamanhos relatados anteriormente para GSTs de carrapatos [36]. Essas enzimas purificadas foram posteriormente empregadas nos ensaios de inibição *in vitro*, que revelaram que cinco dos compostos testados inibiram significativamente a atividade de uma ou ambas as GSTs em concentrações submilimolares (Tabelas 1 e 2). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a relatar os efeitos inibitórios do 3 β -estearioxi-olean-12-eno e da naringenina sobre a GST de *R. microplus*, e da quercitrina, naringenina e rutina sobre a GST de *R. decoloratus*.

Embora as evidências da inibição de GSTs de carrapatos por triterpenos sejam limitadas, os flavonoides têm sido descritos com mais frequência como inibidores dessas enzimas [17, 23]. A capacidade da naringenina de inibir as GSTs em ambas as espécies de carrapatos (Tabela 2) destaca seu potencial como composto líder para o desenvolvimento de acaricidas de amplo espectro. O efeito de um composto contra múltiplas espécies apresenta diversas vantagens: aumenta o valor técnico e comercial dessas moléculas, permite aplicações mais amplas, reduz os custos de desenvolvimento e expande os mercados potenciais, facilitando assim uma adoção mais rápida e melhorando o retorno geral do investimento [5, 59].

Outros compostos, no entanto, foram específicos para determinadas espécies (Tabela 2). A quercitrina, por exemplo, apresentou maior inibição da rGST-Rd, sugerindo que é improvável que se comporte como um PAINS. Compostos de interferência pains-ensaio são conhecidos por interagirem de forma não específica com múltiplos alvos biológicos [60]. Diferenças na inibição da GST entre espécies já foram relatadas anteriormente [1] e são frequentemente explicadas por variações na estrutura do sítio ativo. Tais achados reforçam a importância de análises estruturais comparativas para orientar o desenvolvimento racional de acaricidas.

A divergência nas sequências de GST entre *R. microplus* e *R. decoloratus* reforça ainda mais esses efeitos específicos da espécie [61, 62]. Essa baixa identidade é consistente com relatos anteriores de diferenças estruturais entre GSTs de carrapatos, que são a base da variação antigênica e influenciam a especificidade do substrato e a afinidade de ligação [36].

A avaliação da toxicidade mostrou que os compostos, em concentrações de até 200 μ M, causaram menos de 5% de hemólise de hemácias bovinas (Tabela 1), sugerindo um perfil de segurança favorável. A avaliação da toxicidade em estágio inicial continua sendo uma etapa fundamental na descoberta de medicamentos, permitindo que os riscos potenciais sejam identificados antes de avançar para testes adicionais [63, 64].

A análise *in silico* de resíduos a 3,5 Å dos inibidores revelou contatos importantes. Na GST de *R. microplus*, Thr-10, Ala-12, Pro-209 e Pro-213 estavam próximos de 3 β -estearioxi-olean-12-eno e naringenina (Figura 2, A e B). Curiosamente, a interação do acaricida ciflumetofeno com uma GST de uma cepa resistente de *Tetranychus urticae* é mediada por interações hidrofóbicas envolvendo resíduos como Ala-12 [65]. Além disso, os resíduos Thr-10, Ala-12, Pro-209 e Pro-213 na GST de *R. microplus* interagem com os flavonoides braquidinas G, I, J e K [17]. Considerando a GST de *R. decoloratus*, os resíduos Tyr-7, Ile-10, Leu-13, Val-112 e Tyr-116, localizados a 3,5 Å da enzima (Figura 2, C e D), foram previamente identificados como potencialmente envolvidos na ligação com compostos de potencial inibitório. Por exemplo, Tyr-7 e Tyr-116 da GST foram descritos em estudos sobre *Taenia* e *Schistosoma* como importantes para a atividade catalítica e para a estabilização da ligação do ligante [66, 67].

Em conjunto, os resultados reforçam a GST como um alvo molecular relevante em carrapatos. Entre os compostos avaliados, o 3 β -estearioxi-olean-12-eno apresentou o efeito inibitório mais consistente sobre a GST de *R. microplus*, enquanto a quercitrina foi a mais ativa contra a GST de *R. decoloratus*. Embora os valores de IC₅₀ obtidos estejam dentro da faixa tipicamente relatada para inibidores de GST de primeira geração de fontes naturais, essas

moléculas servem principalmente como estruturas de suporte para otimização guiada por estrutura. Os dados indicam claramente que compostos vegetais estruturalmente diversos podem interferir na atividade da GST em ambas as espécies. Nesse contexto, os perfis inibitórios aqui relatados ampliam a base química para futuros refinamentos e fornecem uma base bioquímica para estudos subsequentes com o objetivo de avançar esses compostos para aplicações práticas no controle de carrapatos.

5 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que compostos naturais selecionados são capazes de inibir as glutathione S-transferases recombinantes de *Rhipicephalus microplus* e *R. decoloratus in vitro*, com o auxílio de análises consistentes de docagem molecular. Especificamente, o 3 β -estearioxi-olean-12-eno e a naringenina inibiram a rGST-Rm, enquanto a quercitrina, a naringenina e a rutina apresentaram atividade inibitória contra a rGST-Rd. Esses achados reforçam a relevância das GSTs como alvos moleculares e destacam a utilidade da combinação de previsões *in silico* com ensaios enzimáticos para a avaliação preliminar de moléculas com potencial carrapaticida.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

WASB: Investigação, Metodologia, Análise formal, Redação – rascunho original. CQR: Recursos, Investigação, Redação – revisão e edição. ISVJ: Recursos, Investigação, Redação – revisão e edição. SU: Metodologia, Investigação, Curadoria de dados e Análise formal. WFAJ: Investigação, Redação – revisão e edição. AMSS: Conceitualização, Recursos, Obtenção de financiamento, Redação – revisão e edição, Validação, Administração do projeto.

DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Brasil, e foram aprovados sob o Protocolo nº 23115.004153/2022–58.

CONFLITOS DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) - INFRA 03170/18, UNIVERSAL 00869/22 e FAPEMA IECT Biotecnologia/Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) processo 2677/17. Também foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001). O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 306298/2022-8) também apoiou este estudo. Os autores agradecem ao Dr. Paul Michels, da Universidade de Edimburgo, pela cuidadosa revisão do manuscrito.

DECLARAÇÃO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL (IA) E TECNOLOGIAS ASSISTIDAS POR IA NO PROCESSO DE ESCRITA

Durante a preparação deste trabalho, os autores utilizaram o ChatGPT para aprimorar a coesão de uma versão inicial do manuscrito. Após o uso desta ferramenta/serviço, os autores revisaram e editaram o texto conforme necessário e assumem total responsabilidade pelo conteúdo da publicação.

REFERÊNCIAS

- [1] K.P.C. Ozelame, M.M.C. Mattia, L.A.D. e Silva, L.M. Randall, I. Corvo, T. Saporiti, A. Seixas, I. da Silva Vaz Jr, G. Alvarez, Novel tick glutathione transferase inhibitors as promising acaricidal compounds, *Ticks Tick-Borne Diseases* 13(5) (2022) 1-7.
- [2] F. Jongejan, G. Uilenberg, The global importance of ticks, *Parasitology* 129(S1) (2004) 3-14.
- [3] L. Grisi, R.C. Leite, J.R.d.S. Martins, A.T.M.d. Barros, R. Andreotti, P.H.D. Cançado, A.A.P.d. León, J.B. Pereira, H.S. Villela, Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 23(2) (2014) 150-156.
- [4] E.M. De Clercq, S.O. Vanwambeke, M. Sungirai, S. Adehan, R. Lokossou, M. Madder, Geographic distribution of the invasive cattle tick *Rhipicephalus microplus*, a country-wide survey in Benin, *Experimental Applied Acarology* 58(4) (2012) 441-452.
- [5] E.M. van Dalen, C. Jansen van Rensburg, Competitive displacement and acaricide resistance of two *Rhipicephalus* (*Boophilus*) species collected on commercial farms in South Africa, *Experimental Applied Acarology* 92(1) (2024) 135-149.

- [6] J. Waldman, G.M. Klafke, I.d.S. Vaz Junior, Mechanisms of acaricide resistance in ticks, *Acta scientiae veterinariae* 51 (2023) 1-14.
- [7] M. Dehuri, B. Mohanty, P.K. Rath, B. Mishra, An insight into control strategies against bovine tropical tick (*Rhipicephalus microplus*) in context to acaricide resistance, *Medical Veterinary Entomology* (2025) 1-14.
- [8] M. Eser, D. Osmaniye, Discovery of Novel Thiazolohydrazone Derivatives as an Alternative Option in the Treatment of Zoonotic *Toxocara canis*: *In Vitro* and *In Silico* Evaluation, *Veterinary Medicine Science* 11(1) (2025) 1-12.
- [9] W.A. dos Santos Bezerra, C.P. Tavares, C.Q. da Rocha, I.d.S.V. Junior, P.A. Michels, L.M.C. Junior, A.M. dos Santos Soares, Anonaine from *Annona crassiflora* inhibits glutathione S-transferase and improves cypermethrin activity on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), *Experimental Parasitology* 243 (2022) 1-8.
- [10] B. Otarigho, M.O. Falade, Natural perylenequinone compounds as potent inhibitors of *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase, *Life* 13(10) (2023) 1-15.
- [11] X. Meng, Z. Wu, C. Jiang, D. Guan, N. Zhang, H. Jiang, Q. Shen, K. Qian, J. Wang, Identification and characterization of glutathione S-transferases and their potential roles in detoxification of abamectin in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*, *Pesticide Biochemistry Physiology* 182 (2022) 105050.
- [12] S. Saman, C.-C. Chen, N. Malak, A. Khan, N. Nasreen, A. Khan, S. Niaz, G. Rehman, R.I. Rodriguez-Vivas, R. Cossío-Bayúgar, Ethanolic extracts of *Datura innoxia* have promising acaricidal activity against *Rhipicephalus microplus* as it blocks the glutathione s-transferase activity of the target tick, *Genes* 14(1) (2022) 1-15.
- [13] K. Poee, M. Thulo, H. Makumbe, B. Akumadu, O. Otun, C. Aloke, I. Achilonu, Biophysical description of Bromosulfophthalein interaction with the 28-kDa glutathione transferase from *Schistosoma japonicum*, *Molecular Biochemical Parasitology* 252 (2022) 1-12.
- [14] M. Sureshan, D. Prabhu, S. Rajamanikandan, K. Saraboji, Discovery of potent inhibitors targeting Glutathione S-transferase of *Wuchereria bancrofti*: a step toward the development of effective anti-filariasis drugs, *Molecular Diversity* 28(2) (2024) 765-785.
- [15] E.P. Hernandez, K. Kusakisako, M.R. Talactac, R.L. Galay, T. Hatta, K. Fujisaki, N. Tsuji, T. Tanaka, Glutathione S-transferases play a role in the detoxification of flumethrin and chlorpyrifos in *Haemaphysalis longicornis*, *Parasites Vectors* 11(1) (2018) 1-14.

- [16] R. Zhang, J. Yang, J. Hu, F. Yang, J. Liang, H. Xue, X. Wei, B. Fu, M. Huang, H.J.P.B. Du, Physiology, Glutathione S-transferase directly metabolizes imidacloprid in the whitefly, *Bemisia tabaci*, 201 (2024) 105863.
- [17] W.A. dos Santos Bezerra, C.P. Tavares, V.A.S. Lima, C. Quintino da Rocha, I.d.S.V. Junior, P.A. Michels, L.M.C. Junior, A.M. dos Santos Soares, *In silico* and *In vitro* Assessment of Dimeric Flavonoids (Brachydins) on *Rhipicephalus microplus* Glutathione S-transferase, *Medicinal Chemistry* 20(9) (2024) 912-919.
- [18] B. Banumathi, B. Vaseeharan, P. Rajasekar, N.M. Prabhu, P. Ramasamy, K. Murugan, A. Canale, G. Benelli, Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*—A review, *Veterinary parasitology* 244 (2017) 102-110.
- [19] R. Vinturelle, C. Mattos, J. Meloni, H.D. Lamberti, J. Nogueira, I.d.S.V. Júnior, L. Rocha, V. Lione, E. Folly, Evaluation of essential oils as an ecological alternative in the search for control *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae), *Veterinary Parasitology: Regional Studies Reports* 23 (2021) 1-7.
- [20] S. Ullah, N. Malak, A. Khan, S. Niaz, R.C. Bayúgar, I. Ahmad, N. Nasreen, N. Bibi, M.B. Said, A. Khan, GCMS analysis and acaricidal activity of *Ailanthus altissima* extract against cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Hyalomma anatolicum*: *in vitro* and *in silico* approach, *Scientific Reports* 15(1) (2025) 1-14.
- [21] M.A. Taha, A.A.B. Ali, Evaluation of phytochemicals and essential oils of *Cupressus sempervirens* in controlling cattle tick *Rhipicephalus annulatus* (Acari: Ixodidae), *BMC Plant Biology* 25(1) (2025) 1-13.
- [22] F. Cen-Pacheco, A. Ortiz-Celiseo, A. Peniche-Cardena, O. Bravo-Ruiz, F.C. López-Fentanes, G. Valerio-Alfaro, J.J. Fernández, Studies on the bioactive flavonoids isolated from *Azadirachta indica*, *Natural Product Research* 34(24) (2020) 3483-3491.
- [23] R.A. Guneidy, M.A. Amer, A.E.E. Hakim, S. Abdel-Shafy, S.A. Allam, Effect of polyphenols extracted from *Punica granatum* and *Acacia saligna* plants on glutathione S-transferase of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Acari: Ixodidae), *Journal of Parasitic Diseases* 45(2) (2021) 524-538.
- [24] E.R. Kuvawoga, C. Mangwiro, M. Dhliwayo, P. Dzomba, Development and evaluation of a herbal anti-tick grease using *Cissus quadrangularis* terpenes and terpenoids as active compounds for controlling ticks on live stock, *Tropical Animal Health Production* 57(3) (2025) 1-11.

- [25] I.J. Das, K. Bhatta, I. Sarangi, H.B. Samal, Innovative computational approaches in drug discovery and design, *Advances in Pharmacology*, Elsevier2025, pp. 1-22.
- [26] M. Shah, M. Patel, M. Shah, M. Patel, M. Prajapati, Computational transformation in drug discovery: A comprehensive study on molecular docking and quantitative structure activity relationship (QSAR), *Intelligent Pharmacy* 2(5) (2024) 589-595.
- [27] S.C. Ja'afaru, A. Uzairu, I. Bayil, M.S. Sallau, G.I. Ndukwe, M.T. Ibrahim, A.T. Moin, A.M. Mollah, N. Absar, Unveiling potent inhibitors for schistosomiasis through ligand-based drug design, molecular docking, molecular dynamics simulations and pharmacokinetics predictions, *Plos one* 19(6) (2024) 1-35.
- [28] I. Ahmad, R. Ajaj, A. Rauf, A. Khan, N. Malak, S. Naz, Z. Ahmad, *In silico* investigation and experimental validation of pistagremic acid isolated from Pistacia integerrima Galls against *Rhipicephalus microplus* and *Sarcoptes scabiei*, *Current Research in Parasitology Vector-borne Diseases* (2025) 1-9.
- [29] M. Naveed, N. Malak, Z. Ullah, S. Ullah, N. Amin, I. Ahmad, M.A. Khan, M. Ben Said, H. Belkahia, I.A. Giantsis, *In vitro* and *in silico* study and pharmacokinetic analysis of the acaricidal effectiveness of Cersium arvense extract against *Rhipicephalus microplus*, *Scientific Reports* 15(1) (2025) 1-16.
- [30] S. Ghosh, S. Basu, T. Kayal, G. Ashok, S. Ramaiah, A. Anbarasu, Computational advancements to facilitate therapeutic application of phytochemicals: Where do we stand?, *Discover Applied Sciences* 7(5) (2025) 1-19.
- [31] A.C. Reis, I.F.M. Konig, S.P. de Souza, N. Melo, P.H.I. Gomes, H.F. Silva, T. de Castro Ramalho, R.N. Remedio, Exposure to trans-anethole impairs reproduction and inhibits glutathione-S-transferase (GST) in engorged *Rhipicephalus microplus* female ticks (Acari: Ixodidae), *Pesticide Biochemistry Physiology* 212 (2025) 106435.
- [32] C.Q. Rocha, F.C. Vilela, F.V. Santa-Cecília, G.P. Cavalcante, W. Vilegas, A. Giusti-Paiva, M.H. dos Santos, Oleanane-type triterpenoid: an anti-inflammatory compound of the roots Arrabidaea brachypoda, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25(3) (2015) 228-232.
- [33] R.N. Moraes-Neto, G.G. Coutinho, A.C.S. Ataíde, A. de Oliveira Rezende, C.E.C. Nascimento, R.P. de Albuquerque, C.Q. da Rocha, A.S. Rêgo, M.d.S. de Sousa Cartágenes, A.L. Abreu-Silva, Ethyl acetate fraction of Bixa orellana and its component ellagic acid exert antibacterial and anti-inflammatory properties against Mycobacterium abscessus subsp. massiliense, *Antibiotics* 11(6) (2022) 1-20.

- [34] G.A.C. Ribeiro, C.Q. da Rocha, W.B. Veloso, L.M.F. Dantas, E.M. Richter, I.S. da Silva, A.A. Tanaka, Flow-through amperometric methods for detection of the bioactive compound quercetin: performance of glassy carbon and screen-printed carbon electrodes, *Journal of Solid State Electrochemistry* 24(8) (2020) 1759-1768.
- [35] I. Silva Vaz Jr, T.T. Lermen, A. Michelon, C.A.S. Ferreira, D.R.J. de Freitas, C. Termignoni, A. Masuda, Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase, *Veterinary parasitology* 119(2-3) (2004) 237-245.
- [36] C. Ndawula Jr, G.A. Sabadin, L.F. Parizi, I. da Silva Vaz Jr, Constituting a glutathione S-transferase-cocktail vaccine against tick infestation, *Vaccine* 37(14) (2019) 1918-1927.
- [37] W.H. Habig, M.J. Pabst, G. Fleischner, Z. Gatmaitan, I.M. Arias, W.B. Jakoby, The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71(10) (1974) 3879-3882.
- [38] J. Choi, V. Reipa, V.M. Hitchins, P.L. Goering, R.A. Malinauskas, Physicochemical characterization and *in vitro* hemolysis evaluation of silver nanoparticles, *Toxicological Sciences* 123(1) (2011) 133-143.
- [39] S. Kim, J. Chen, T. Cheng, A. Gindulyte, J. He, S. He, Q. Li, B.A. Shoemaker, P.A. Thiessen, B. Yu, PubChem 2025 update, *Nucleic acids research* 53(D1) (2025) 1516-1525.
- [40] R.M. Wadapurkar, M. Shilpa, A.K.S. Katti, M. Sulochana, *In silico* drug design for *Staphylococcus aureus* and development of host-pathogen interaction network, *Informatics in Medicine Unlocked* 10 (2018) 58-70.
- [41] J.-B. Tong, D. Luo, S. Bian, X. Zhang, Structural investigation of tetrahydropteridin analogues as selective PLK1 inhibitors for treating cancer through combined QSAR techniques, molecular docking, and molecular dynamics simulations, *Journal of Molecular Liquids* 335 (2021) 1-17.
- [42] M.D. Hanwell, D.E. Curtis, D.C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G.R. Hutchison, Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *Journal of cheminformatics* 4(1) (2012) 1-17.
- [43] L.A. Kelley, S. Mezulis, C.M. Yates, M.N. Wass, M.J. Sternberg, The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis, *Nature protocols* 10(6) (2015) 845-858.
- [44] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *Applied Crystallography* 26(2) (1993) 283-291.

- [45] C. Colovos, T.O. Yeates, Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions, *Protein science* 2(9) (1993) 1511-1519.
- [46] R. Thomsen, M.H. Christensen, MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking, *Journal of medicinal chemistry* 49(11) (2006) 3315-3321.
- [47] G. Bitencourt-Ferreira, W.F. de Azevedo Jr, Molegro virtual docker for docking, *Docking screens for drug discovery*, Springer2019, pp. 149-167.
- [48] O. Korb, T. Stutzle, T.E. Exner, Empirical scoring functions for advanced protein– ligand docking with PLANTS, *Journal of chemical information modeling* 49(1) (2009) 84-96.
- [49] E. Roditakis, N.E. Roditakis, A. Tsagkarakou, Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete, *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science* 61(6) (2005) 577-582.
- [50] J.F. Rojas-Cabeza, E.N. Moreno-Cordova, J.F. Ayala-Zavala, A. Ochoa-Teran, D.E. Sonenshine, J.G. Valenzuela, R.R. Sotelo-Mundo, A review of acaricides and their resistance mechanisms in hard ticks and control alternatives with synergistic agents, *Acta tropica* 261 (2025) 1-23.
- [51] T. Hou, J. Wang, Y. Li, ADME evaluation in drug discovery. 8. The prediction of human intestinal absorption by a support vector machine, *Journal of chemical information modeling* 47(6) (2007) 2408-2415.
- [52] A. Erlejman, S. Verstraeten, C. Fraga, P. Oteiza, The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects, *Free radical research* 38(12) (2004) 1311-1320.
- [53] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced drug delivery reviews* 23(1-3) (1997) 3-25.
- [54] P.D. Leeson, A.M. Davis, Time-related differences in the physical property profiles of oral drugs, *Journal of medicinal chemistry* 47(25) (2004) 6338-6348.
- [55] R. O'Shea, H.E. Moser, Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery, *Journal of medicinal chemistry* 51(10) (2008) 2871-2878.
- [56] C.S. Bodourian, N. Poudel, A.C. Papageorgiou, M. Antoniadis, N.D. Georgakis, H. Abe, N.E. Labrou, Ligandability assessment of human glutathione transferase M1-1 using pesticides as chemical probes, *International Journal of Molecular Sciences* 23(7) (2022) 1-16.
- [57] W. Rangubpit, E. Suwan, D. Sangthong, K. Wongpanit, R.W. Stich, P. Pongprayoon, S. Jittapalpong, Elucidating structure and dynamics of glutathione S-transferase from

Rhipicephalus (Boophilus) microplus, Journal of Biomolecular Structure Dynamics 41(15) (2023) 7309-7317.

[58] M. Morrone Xavier, G. Sehnem Heck, M. Boff de Avila, N. Maria Bernhardt Levin, V. Oliveira Pinto, N. Lemes Carvalho, W. Filgueira de Azevedo, SAnDReS a computational tool for statistical analysis of docking results and development of scoring functions, Combinatorial chemistry high throughput screening 19(10) (2016) 801-812.

[59] S. De Rouck, E. İnak, W. Dermauw, T. Van Leeuwen, A review of the molecular mechanisms of acaricide resistance in mites and ticks, Insect Biochemistry Molecular Biology 159 (2023) 1-22.

[60] J.L. Dahlin, J.W.M. Nissink, J.M. Strasser, S. Francis, L. Higgins, H. Zhou, Z. Zhang, M.A. Walters, PAINS in the assay: chemical mechanisms of assay interference and promiscuous enzymatic inhibition observed during a sulfhydryl-scavenging HTS, Journal of medicinal chemistry 58(5) (2015) 2091-2113.

[61] S. Baron, N.A. van der Merwe, C. Maritz-Olivier, The genetic relationship between *R. microplus* and *R. decoloratus* ticks in South Africa and their population structure, Molecular phylogenetics evolution 129 (2018) 60-69.

[62] M. Sankar, B. Kumar, H.V. Manjunathachar, B.C. Parthasarathi, A. Nandi, C.K.S. Neethu, G. Nagar, S. Ghosh, Genetic Diversity of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* for a Global Scenario: A Comprehensive Review, Pathogens 13(6) (2024) 1-15.

[63] S.L. Makris, J.H. Kim, A. Ellis, W. Faber, W. Harrouk, J.M. Lewis, M.G. Paule, J. Seed, M. Tassinari, R. Tyl, Current and future needs for developmental toxicity testing, Birth Defects Research Part B: Developmental Reproductive Toxicology 92(5) (2011) 384-394.

[64] D. Arome, E. Chinedu, The importance of toxicity testing, Journal of Pharmaceutical BioSciences 4 (2013) 146-148.

[65] N. Pavlidi, M. Khalighi, A. Myridakis, W. Dermauw, N. Wybouw, D. Tsakireli, E.G. Stephanou, N.E. Labrou, J. Vontas, T. Van Leeuwen, A glutathione-S-transferase (TuGSTd05) associated with acaricide resistance in *Tetranychus urticae* directly metabolizes the complex II inhibitor cyflumetofen, Insect Biochemistry Molecular Biology 80 (2017) 101-115.

[66] M. Andújar-Sánchez, A.W. Smith, J.M. Clemente-Jimenez, F. Rodriguez-Vico, F.J. Las Heras-Vazquez, V. Jara-Perez, A. Cámara-Artigas, Crystallographic and thermodynamic analysis of the binding of S-octylglutathione to the Tyr 7 to Phe mutant of glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum*, Biochemistry 44(4) (2005) 1174-1183.

- [67] C. Sánchez-Juárez, R. Flores-López, L.d.C. Sánchez-Perez, P. García-Gutiérrez, L. Jiménez, A. Landa, R.A. Zubillaga, Discovery and Characterization of Two Selective Inhibitors for a Mu-Class Glutathione S-Transferase of 25 kDa from *Taenia solium* Using Computational and Bioinformatics Tools, *Biomolecules* 15(1) (2024) 1-17.
- [68] J. Rosado-Aguilar, K. Arjona-Cambranes, J. Torres-Acosta, R. Rodríguez-Vivas, M. Bolio-González, A. Ortega-Pacheco, A. Alzina-López, E. Gutiérrez-Ruiz, E. Gutiérrez-Blanco, A. Aguilar-Caballero, Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks, *Veterinary Parasitology* 238 (2017) 66-76.
- [69] A. Figueiredo, L.A. Anholeto, D.F. Cola, R.R. Fantatto, I.B. Santos, Y.A. Gainza, G.A. Sousa, L.J. Pickett, L.F. Fraceto, A.C. de Souza Chagas, Nanoformulations with synthetic and plant-derived compounds for cattle tick control, *Veterinary Parasitology* 309 (2022) 1-9.
- [70] A. Gamal, S.M. Aboelhadid, F.I. Abo El-Ela, A.-A.S. Abdel-Baki, S.M. Ibrahim, A.M. El-Mallah, S. Al-Quraishy, A.O. Hassan, S.M. Gadelhaq, Synthesis of carvacrol-loaded invasomes nanoparticles improved acaricide efficacy, cuticle invasion and inhibition of acetylcholinesterase against hard ticks, *Microorganisms* 11(3) (2023) 1-18.

Material Suplementar

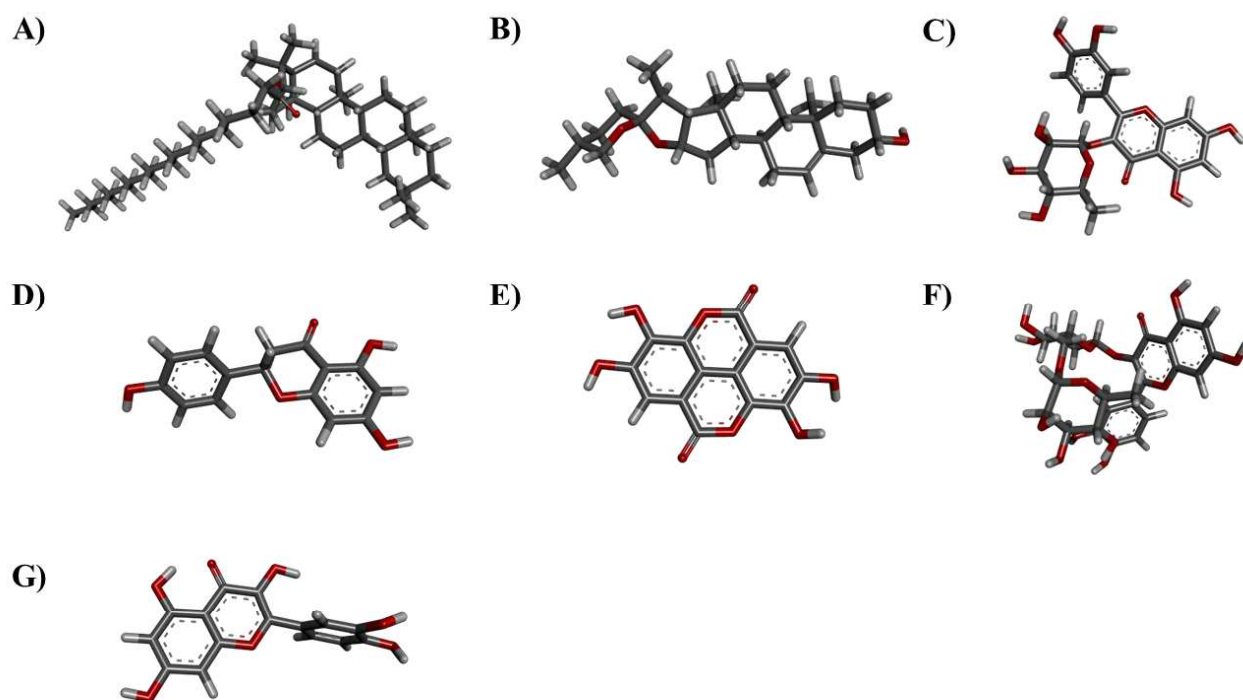


Figura Suplementar 1. Estruturas moleculares 3D de compostos naturais. A) 3 β -estearioxi-olean-12-eno; B) Diosgenina; C) Quercitrina; D) Naringenina; E) Ácido Elágico; F) Rutina; G) Quercetina.

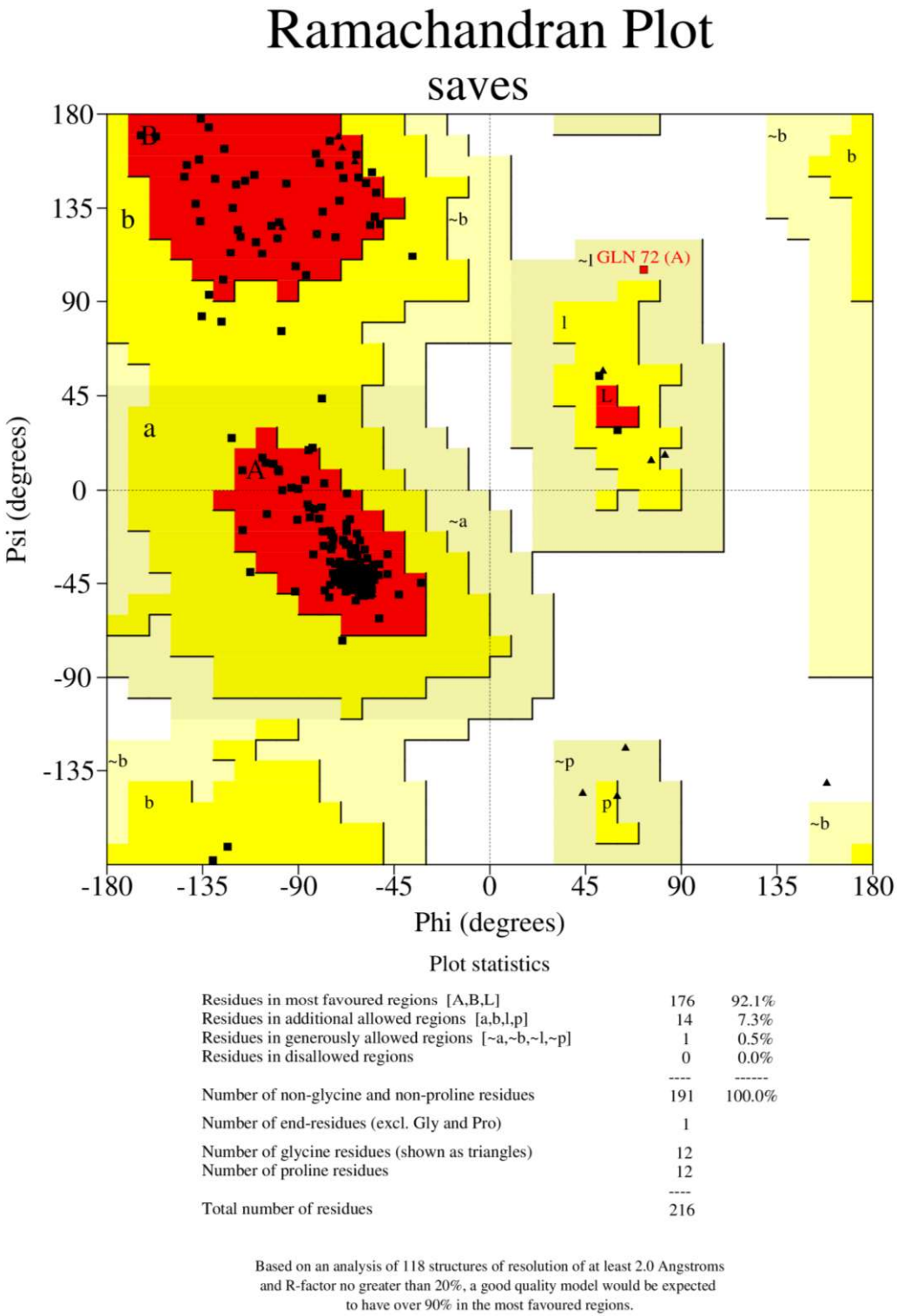


Figura Suplementar 2. Diagrama de Ramachandran da estrutura prevista da glutathione S-transferase (GST) de *Rhipicephalus decoloratus*. As regiões vermelha, amarelo-escuro e amarelo-clara correspondem às regiões mais favorecidas, permitidas e generosamente permitidas.

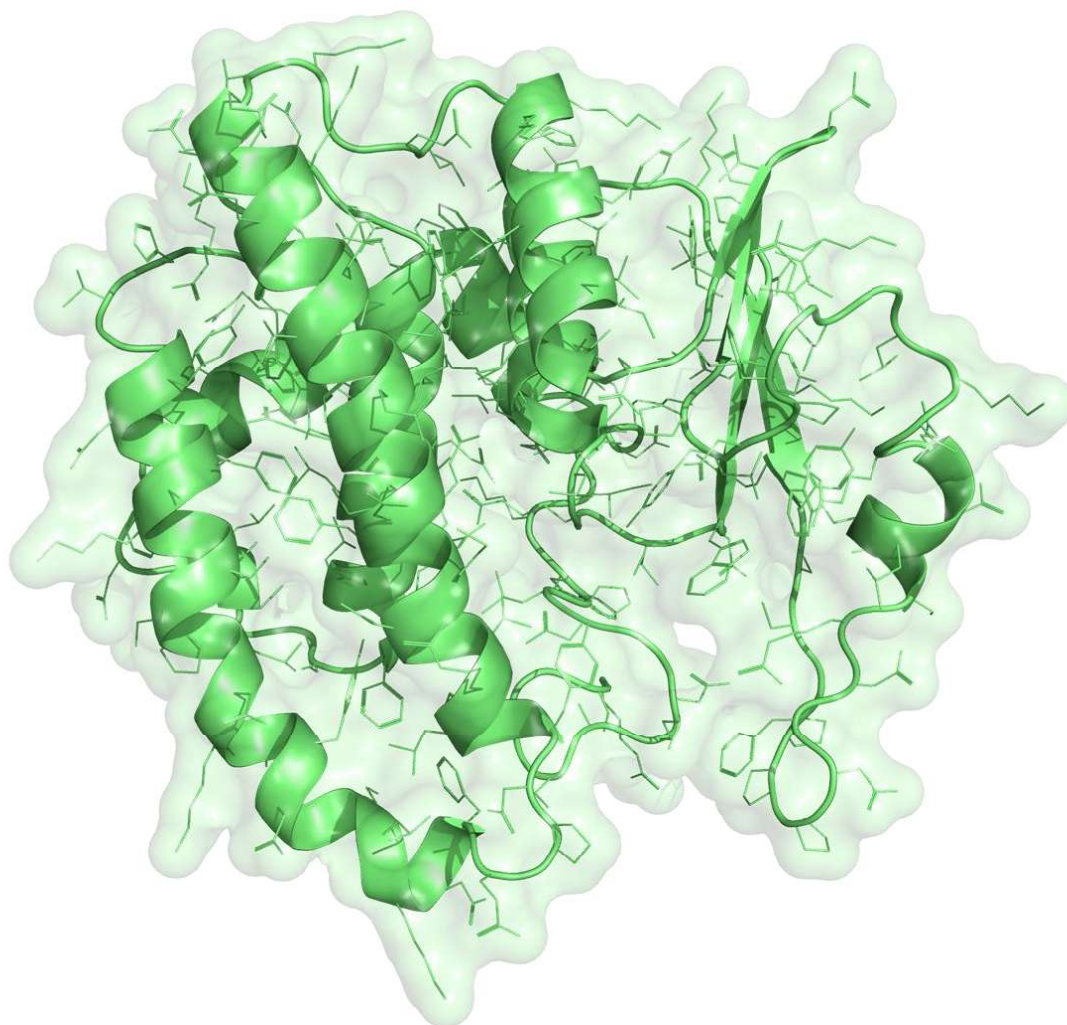


Figura suplementar 3. Representação tridimensional (3D) da glutathione S-transferase de *Rhipicephalus decoloratus* (cadeia A).

Tabela Suplementar 1. Parâmetros físico-químicos e ADMET previstos para 3 β -estearioxi-olean-12-eno, diosgenina, quercitrina, naringenina, ácido elágico, rutina e quercetina.

Parameter	3 β -stearioxy-olean-12-ene	Diosgenina	Quercitrina	Naringenina	Ácido elágico	Rutina	Quercetina
Peso Molecular (g/mol)	680.650	414.310	448.100	272.070	302.010	610.150	302.040
Aceitadores de ligações de hidrogênio	2	3	11	5	8	16	7
Doadores de ligações de hidrogênio	0	1	7	3	4	10	5
LogP	14.162	5.679	1.530	2.562	0.796	-0.763	2.155
Caco2	56.590	55.443	7.372	10.521	20.488	7.912	3.412
HIA	100	96.201	24.947	87.318	61.395	2.861	63.485
MDCK	62.851	0.237	1.819	44.635	17.297	0.326	13.352
Pgp_inhibition	Inibidor	Inibidor	Non	Non	Non	Non	Non
PPB	100	98.867	64.952	100	88.402	43.897	93.236
PWS (mg/L)	4,54E-05	0.761	151.862	251.402	922.464	217.206	96.438
Skin_permeability	-0.654	-2.477	-4.645	-4.180	-34.440	-4.666	-4.433
BBB	24.870	7.765	0.0369544	0.59697	0.321339	0.0285642	0.172765
CYP_2C19_inh	Inibidor	Non	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor
CYP_2C9_inh	Inibidor	Inibitor	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor
CYP_2D6_inh	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
CYP_2D6_sub	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
CYP_3A4_inh	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor
CYP_3A4_sub	Substrato	Substrato	Fracamente	Non	Non	Fracamente	Non
Algae_at (mg/L)	0.00000791578	0.00726841	0.0203185	0.0475596	0.043818	0.0069585	0.0378136
Ames_test	Não mutagênico	Não mutagênico	Não mutagênico	Mutagen	Mutagen	Não mutagênico	Mutagen
Carcino_Mo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Carcino_Rat	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
daphnia_at	3,24185E-06	0.040307	0.55858	0.155909	0.15038	2.552	0.214345
hERG_inh	Baixo_risco	Baixo_risco	Alto_risco	Médio_risco	Baixo_risco	Ambíguo	Médio_risco
Medaka_at	4.08843E-11	0.00269867	0.564664	0.0384477	0.0399862	12.343	0.0778806
Minnow_at	2.05568E-12	0.00145003	0.325909	0.0220966	0.021897	5.442	0.0335026

BBB – Barreira Hematoencefálica (C.cérebro/C.sangue); Caco-2 – Modelo de células Caco-2; HIA – Modelo de Absorção Intestinal Humana (HIA, %); MDCK – Rim Canino de Madin-Darby (nm/s); Inibição de PGP – Inibidor da glicoproteína P; PPB – Ligação a Proteínas Plasmáticas (%); PWS – Solubilidade em água pura (mg/L); Permeabilidade Cutânea – Permeabilidade da pele em cm/hora; Algas em – teste com algas (mg/L); Teste de Ames – Teste de Ames com Salmonella; CYP – Citocromo P450; Carcino M – teste de carcinogênese em camundongos; Carcino R – teste de carcinogênese em ratos; Daphnia em – teste com o crustáceo dafnia; Inibição de hERG – Inibição do canal de potássio controlado por hERG; Medaka em – teste com o peixe medaka; Minnow em – teste com pequenos peixes de água doce.

4 DISCUSSÃO INTEGRADORA

Nesta tese a enzima GST de *R. microplus* é estudada como alvo biotecnológico estratégico para o controle de *Rhipicephalus R. microplus* e *R. decoloratus*, integrando estratégias de modelagem de estrutura de proteínas e docagem molecular com validações *in vitro* utilizando enzimas recombinantes e ensaios em carrapatos. Em conjunto, os estudos mostram que a inibição de GST não deve ser interpretada apenas como efeito tóxico direto sobre carrapatos, mas também como uma interferência no sistema de desintoxicação do parasito, podendo inclusive, aumentar a suscetibilidade dos carrapatos a xenobióticos. Esse estudo é particularmente relevante em cenário de resistência crescente aos carrapaticidas comerciais, pois desloca o foco de alvos clássicos para outra via metabólica, permitindo explorar novas rotas de desenvolvimento e otimização de moléculas bioativas.

Do ponto de vista de impacto e alinhamento social, os três capítulos convergem para uma proposta com aderência clara aos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODSs) ao buscar alternativas e complementos aos carrapaticidas tradicionais com foco em alvos metabólicos, a tese contribui para ODS 3 (Saúde e Bem-Estar) ao mitigar doenças transmitidas por carrapatos e reduzir exposição ocupacional e resíduos químicos; para ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis) ao indicar direcionamentos para diminuir doses efetivas e pressão ambiental via associação de compostos naturais; e para ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura) ao estruturar um pipeline biotecnológico integrando triagem computacional, validação bioquímica e ensaios biológicos. Em síntese, o estudo não apenas demonstra compostos ativos, mas estabelece uma lógica de desenvolvimento ao integrar GST como alvo, produtos naturais como ponto inicial e integração de estudos *in silico* e *in vitro*, criando base para bioprodutos tecnológicos aplicáveis ao controle sustentável de carrapatos.

5 CONCLUSÃO

Este estudo evidencia, por meio de abordagens *in silico* e *in vitro*, o potencial promissor de produtos naturais como inibidores seletivos das enzimas GSTs de carrapatos, reforçando sua viabilidade como alvos terapêuticos no controle dessas espécies. Os compostos avaliados não apenas demonstraram capacidade de interferir no metabolismo enzimático dos parasitos, mas também apresentaram efeitos quando combinados a carrapaticidas comerciais, aumentando sua eficácia especialmente em estágios larvais. Além disso, vários dos inibidores testados exibiram baixos índices de toxicidade em células de mamíferos, ampliando suas perspectivas de

aplicação segura. Dessa forma, os resultados obtidos consolidam a importância da bioprospecção de produtos naturais no desenvolvimento de novos bioacaricidas e oferecem subsídios relevantes para estratégias sustentáveis de manejo integrado de carrapatos.

REFERÊNCIAS

- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D. D., Gilleard, J., Iqbal, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. *Veterinary parasitology*, v. 203, n. 1-2, p. 6-20, 2014.
- Adang, A. E. P., Moree, W. J., Brussee, J., Mulder, G. J., & Van der Gen, A. Inhibition of glutathione S-transferase 3-3 by glutathione derivatives that bind covalently to the active site. *Biochemical Journal*, v. 278, n. 1, p. 63-68, 1991.
- Akumadu, B. O., Pandian, R., Olfen, J., Worth, R., Thulo, M., Mentor, T., Achilonu, I. Molecular basis of inhibition of *Schistosoma japonicum* glutathione transferase by ellagic acid: Insights into biophysical and structural studies. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 240, p. 111319, 2020.
- ALLOCATI, N., FEDERICI, L., MASULLI, M., DI ILIO, C. Distribution of glutathione transferases in Gram-positive bacteria and Archaea. *Biochimie*, v. 94, n. 3, p. 588-596, 2012.
- ALLOCATI, N., MASULLI, M., DI ILIO, C., FEDERICI, L. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2018.
- Amante, M., Hailu, Y., Terefe, G., & Asres, K. *In vitro* louscidal and carrapaticidal activities of alkaloid of *Calpurnia aurea* extracts against *Linognathus ovillus* and *Amblyomma variegatum*. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, v. 10, n. 1, p. 431-437, 2019.
- Armstrong, R. N. Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chemical research in toxicology*, v. 4, n. 2, p. 131-140, 1991.
- Bandara, K. J., Karunaratne, S. P. Mechanisms of acaricide resistance in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Sri Lanka. *Pesticide biochemistry and physiology*, v.139, n. 1, p. 68-72, 2017.
- BEATI, L.; KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 1, p. 32-48, 2001.
- Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., & Mehlhorn, H. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases?. *Parasitology Research*, v. 115, p. 2545-2560, 2016.

Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. A., & Velázquez, D. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, v. 30, n. 8, p. 453-459, 2005.

Bezerra W.A.S., Tavares C.P., Rocha C.Q, Junior I.D.S.V., Michels P.A., Junior L.M.C., Soares A.M.S. Anonaine from *Annona crassiflora* inhibits glutathione S-transferase and improves cypermethrin activity on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). *Experimental Parasitology*. 2022;243:1-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108398>.

Bezerra, W. A. S., Tavares, C. P., Lima, V. A. S., Quintino da Rocha, C., Junior, I. D. S. V., Michels, P. A., Soares, A. M. S. *In silico* and *In vitro* Assessment of Dimeric Flavonoids (Brachydins) on *Rhipicephalus microplus* Glutathione S-transferase. *Medicinal Chemistry*. 20;9: 912-919. 2024.

Bhambhani, S., Kondhare, K. R., & Giri, A. P. Diversity in chemical structures and biological properties of plant alkaloids. *Molecules*, v. 26, n. 11, p. 3374, 2021.

Bowman, D. D. Georgis' Parasitology for Veterinarians. 10th ed. St. Louis: Elsevier, 2010.

Bustos-Baena, A. S., Bravo-Ramos, J. L., Romero-Salas, D., Sánchez-Montes, S., Ortiz-Carbajal, L. A., Sánchez-Otero, M. G. *In vitro* and *in silico* studies of the carrapaticidal and anticholinesterase activities of *Randia aculeata* seeds against the southern cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 33, p. 1-6, 2024.

Cerqueira, A. P. M., da Cunha Santos, M., Soares Rezende, G. L., dos Santos Junior, M. C., Botura, M. B. Integrated Approach to *in silico* and *in vitro* Assays for Identification of *Rhipicephalus microplus* Glutathione S-Transferase Inhibitors. *Pestic Biochem Physiol*, 1-41. 2025.

Costa, G. C., Silva, F. A., Manzato, V. M., Torquato, R. J., Gonzalez, Y. G., Parizi, L. F., Tanaka, A. S. A multiepitope chimeric antigen from *Rhipicephalus microplus*-secreted salivary proteins elicits anti-tick protective antibodies in rabbit. *Veterinary Parasitology*, v. 318, p. 109932, 2023.

Costa-Junior Lm, Silva Cr, Soares Ams, Menezes As, Silva Mr, Amarante Af, Costa Ef, Alencar Lmju. Assessment of biophysical properties of *Haemonchus contortus* from different life cycle stages with atomic force microscopy, *Ultramicroscopy*, v. 209, n.1, p. 1-21, 2020.

Cruz, B. C., Lima Mendes, A. F., Maciel, W. G., Dos Santos, I. B., Gomes, L. V. C., Felippelli, G., Oliveira, G. P. Biological parameters for *Rhipicephalus microplus* in the field and laboratory and estimation of its annual number of generations in a tropical region. *Parasitology research*, v. 119, p. 2421-2430, 2020.

Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1830, no. 5 (2013): 3217-3266. 2013.

- Divya, T. M., Soorya, V. C., Amithamol, K. K., Juliet, S., Ravindran, R., Nair, S. N., Ajithkumar, K. G. Carrapaticidal activity of alkaloid fractions of *Leucas indica* Spreng against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* tick. *Tropical Biomedicine* 31(1): 46–53. 2014.
- Djebir, S., Ksouri, S., Trigui, M., Tounsi, S., Boumaaza, A., Hadeif, Y., Benakhla, A. Chemical composition and carrapaticidal activity of the essential oils of some plant species of Lamiaceae and Myrtaceae against the vector of tropical bovine theileriosis: *Hyalomma scupense* (syn. *Hyalomma detritum*). *BioMed research international*, v. 2019, 2019.
- Emmanuel, N., Beyuo, J., Richard, O. S., Amafu-Dey, H. Some Aspects of the Biology of Female *Rhipicephalus decoloratus* (Koch, 1844) in the Laboratory. *Int. J. Anim. Veter. Adv*, v. 3, n. 6, p. 416-418, 2011.
- Escobar-Chavarría, O., Cossío-Bayúgar, R., Ramírez-Noguera, P., Prado-Ochoa, M. G., Velázquez-Sánchez, A. M., Muñoz-Guzmán, M. A., Alba-Hurtado, F. *In vivo* and *in vitro* apoptosis induced by new carrapaticidal ethyl-carbamates in *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2021.
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A. D., Petney, T. N. Ticks of Europe and North Africa: a guide to species identification. Cham: Springer, 2018.
- Feyera, T., Abdisa, E. *In vitro* carrapaticidal activity of crude extracts of *Schinus molle* (L.) leaves against field population of *Bophilus decoloratus* and *Rhipicephalus pulchellus* ticks. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 10, n. 36, p. 772-777, 2016.
- GERARDI, M., RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A., BINDER, L. C., KRAWCZAK, F. S., GREGORI, F., LABRUNA, M. B. Comparative susceptibility of different populations of *Amblyomma sculptum* to *Rickettsia rickettsii*. *Frontiers in physiology*, v. 10, p. 1-12, 2019.
- GRISI, L., LEITE, R. C., MARTINS, J. R. D. S., BARROS, A. T. M. D., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P. H. D., VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Akıncioğlu, H., Koksall, Z., Turkan, F. and Alwasel, S., 2016. The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on metabolic enzymes including acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, glutathione S-transferase, lactoperoxidase, and carbonic anhydrase isoenzymes I, II, IX, and XII. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(6), 1095-1101.
- Guneidy, R. A., Amer, M. A., Hakim, A. E. E., Abdel-Shafy, S., Allam, S. A. Effect of polyphenols extracted from *Punica granatum* and *Acacia saligna* plants on glutathione S-transferase of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitic Diseases*, v. 45, p. 524-538, 2021.
- Guneidy, R. A., Shahein, Y. E., Aboueilella, A. M., Zaki, E. R., Hamed, R. R. Inhibition of the recombinant cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* glutathione S-transferase. *Ticks and tick-borne diseases*, v. 5, n. 5, p. 528-536, 2014.

- Gupta, P., Robin, V. V., Dharmarajan, G. Towards a more healthy conservation paradigm: integrating disease and molecular ecology to aid biological conservation. *Journal of Genetics*, v. 99, n. 1, p. 1-26, 2020.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 45, n. 1, p. 51-88, 2005.
- He, H., Chen, A.C., Davey, R.B., Ivie, G.W. and George, J.E. Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(8), 737-743. 1999.
- Hernandez, E.P., Kusakisako, K., Talactac, M.R., Galay, R.L., Hatta, T., Fujisaki, K., Tsuji, N. and Tanaka, T. Glutathione S-transferases play a role in the detoxification of flumethrin and chlorpyrifos in *Haemaphysalis longicornis*. *Parasites & Vectors*, 11, 1-14. 2018.
- Hernandez, E.P., Shimazaki, K., Niihara, H., Umemiya-Shirafuji, R., Fujisaki, K. and Tanaka, T. Expression analysis of glutathione S-transferases and ferritins during the embryogenesis of the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Heliyon*, 6(3). 2020.
- Horak, I. G., Heyne, H., Williams, R., Gallivan, G. J., Spickett, A. M., Bezuidenhout, J. D., & Estrada-Peña, A. The ixodid ticks (Acari: Ixodidae) of southern Africa. Springer, 2018.
- Jiménez-Arellanes, M. A., García-Martínez, I., & Rojas-Tomé, S. Potencial biológico de especies medicinales del género *Cnidocolus* (Euphorbiaceae). *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, v. 45, n. 4, p. 1-6, 2014.
- Jongejan, F., Berger, L., Reck, J., Ferreira, P. T., de Jesus, M. S., Scott, F. B., Klafke, G. RaTexT®: a novel rapid tick exposure test for detecting acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus* ticks in Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 17, n. 1, p. 365, 2024.
- Jongejan, F., Uilenberg, G. The global importance of ticks. *Parasitology*, v. 129, n. S1, p. S3-S14, 2004.
- Kapkaç, H. A., Arslanyolu, M. Identification of glutathione-S-transferase m19 and m34 among responsive GST genes against 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene treatment of *Tetrahymena thermophila*. *European Journal of Protistology*, v. 81, p. 125838, 2021.
- Kemal, J., Zerihun, T., Alemu, S., Sali, K., Nasir, M., Abraha, A., Feyera, T. *In vitro* carrapaticidal activity of selected medicinal plants traditionally used against ticks in eastern Ethiopia. *Journal of Parasitology Research*, v. 2020, n. 1, p. 7834026, 2020.
- Ketley, J. N., Habig, W. H., & Jakoby, W. B. Binding of nonsubstrate ligands to the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 250, n. 22, p. 8670-8673, 1975.
- Klafke, G. M., Sabatini, G. A., de Albuquerque, T. A., Martins, J. R., Kemp, D. H., Miller, R. J., & Schumaker, T. T. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. Veterinary parasitology, v. 142, n. 3-4, p. 386-390, 2006.

Klompen, J. S. H., Black, W., Keirans, J. E., Oliver Jr, J. H. Evolution of ticks. Annual review of entomology, v. 41, n. 1, p. 141-161, 1996.

Kotepui, M., Kotepui, K., Mahittikorn, A., Majima, H. J., Tangpong, J., & Yen, H. C. Association of reduced glutathione levels with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria: A systematic review and meta-analysis. Scientific Reports, v. 13, n. 1, p. 16483, 2023.

Kristensen, M. Glutathione S-transferase and insecticide resistance in laboratory strains and field populations of *Musca domestica*. Journal of economic entomology, v. 98, n. 4, p. 1341-1348, 2005.

Lallement, P. A., Brouwer, B., Keech, O., Hecker, A., Rouhier, N. The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. Frontiers in pharmacology, v. 5, p. 192, 2014.

Le Gall, V. L., Klafke, G. M., & Torres, T. T. Detoxification mechanisms involved in ivermectin resistance in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Scientific Reports, 8(1), 12401. 2018.

Lima, H. G. D., Santos, F. O., Santos, A. C. V., Silva, G. D. D., Santos, R. J. D., Carneiro, K. D. O., Botura, M. B. Anti-tick effect and cholinesterase inhibition caused by *Prosopis juliflora* alkaloids: *in vitro* and *in silico* studies. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 29, p. 1-15, 2020.

Mahajan, S., Atkins, W. M. The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, v. 62, p. 1221-1233, 2005.

Mannervik, B., Helena Danielson, U., & Ketterer, B. Glutathione transferases - structure and catalytic activit. Critical Reviews in Biochemistry, v. 23, n. 3, p. 283-337, 1988.

Mapp, C. E., Fryer, A. A., De Marzo, N., Pozzato, V., Padoan, M., Boschetto, P., ... & Spiteri, M. A. Glutathione S-transferase GSTP1 is a susceptibility gene for occupational asthma induced by isocyanates. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 109, n. 5, p. 867-872, 2002.

Mashiyama, S. T., Malabanan, M. M., Akiva, E., Bhosle, R., Branch, M. C., Hillerich, B., Babbitt, P. C. Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. PLoS biology, v. 12, n. 4, p. e1001843, 2014.

Masoud, H. M., Helmy, M. S., Darwish, D. A., Ibrahim, M. A. Purification, characterization, and enzyme kinetics of a glutathione S transferase from larvae of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, v. 21, n. 1, p. 28, 2023.

- Mastropaolo, M., Mangold, A. J., Guglielmone, A. A., Nava, S. Non-parasitic life cycle of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Panicum maximum* pastures in northern Argentina. *Research in veterinary science*, v. 115, p. 138-145, 2017.
- Mathew, N., Kalyanasundaram, M., & Balaraman, K. Glutathione S-transferase (GST) inhibitors. *Expert opinion on therapeutic patents*, v. 16, n. 4, p. 431-444, 2006.
- Meister, A., Anderson, M. E. *Annual review of biochemistry*, v. 52, n. 1, p. 711-760, 1983.
- Metzger, A.; Mukasa, G.; Shankar, A.H.; Ndeezi, G.; Melikian, G.; Semba, R.D. Antioxidant status and acute malaria in children in Kampala, Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, n. 2, p. 115-9, 2001.
- Mukanganyama, S., Bezabih, M., Robert, M., Ngadjui, B. T., Kapche, G. F., Ngandeu, F., Abegaz, B. The evaluation of novel natural products as inhibitors of human glutathione transferase P1-1. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 26, n. 4, p. 460-467, 2011.
- Muleya, V., Hayeshi, R., Ranson, H., Abegaz, B., Bezabih, M. T., Robert, M., Mukanganyama, S. Modulation of *Anopheles gambiae* Epsilon glutathione transferase activity by plant natural products *in vitro*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 3, p. 391-399, 2008.
- Nathan, S. T., Mathew, N., Kalyanasundaram, M., & Balaraman, K. Structure of glutathione S-transferase of the filarial parasite *Wuchereria bancrofti*: a target for drug development against adult worm. *Journal of Molecular Modeling*, v. 11, p. 194-199, 2005.
- Ndawula Jr, C., Sabadin, G. A., Parizi, L. F., Silva Vaz Jr, I. Constituting a glutathione S-transferase-cocktail vaccine against tick infestation. *Vaccine*, v. 37, n. 14, p. 1918-1927, 2019.
- Núñez, J. L., ME, M. C., & Moltedo, H. L. *Boophilus microplus*. La garrapata comun del ganado vacuno. 1982.
- Nyhangare, E. T., Mvumi, B. M., McGaw, L. J., Eloff, J. N. Addition of a surfactant to water increases the carrapaticidal activity of extracts of some plant species used to control ticks by Zimbabwean smallholder farmers. *BMC veterinary research*, v. 15, n. 1, p. 404, 2019.
- Oakley, A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug metabolism reviews*, v. 43, n. 2, p. 138-151, 2011.
- Ogden, N. H., Lindsay, L. R. Effects of climate and climate change on vectors and vector-borne diseases: ticks are different. *Trends in parasitology*, v. 32, n. 8, p. 646-656, 2016.
- Oliveira Jta, Souza Pfn, Vasconcelos Im, Dias Lp, Martins Tf, Van Tilburg Mf, Guedes Mif, Sousa Dob. Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability, *Biochimie*, v. 157, n. 1, p. 10-21, 2019.
- Otarigho, B., Falade, M. O. Natural Perylenequinone Compounds as Potent Inhibitors of *Schistosoma mansoni* Glutathione S-Transferase. *Life*, v. 13, n. 10, p. 1957, 2023.

- Ozelame, K. P. C., Mattia, M. M. C., Silva, L. A. D., Randall L. M., Corvo, I., Saporiti, T., Seixas, A., Vaz Jr, I. S., Alvarez, G. Novel tick glutathione transferase inhibitors as promising carrapaticidal compounds. *Ticks and Tick-borne Diseases*, p. 1-23, 2022.
- Parizi, L. F., Utiumi, K. U., Imamura, S., Onuma, M., Ohashi, K., Masuda, A., Silva Vaz Jr, I. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Experimental parasitology*, v. 127, n. 1, p. 113-118, 2011.
- Pereira, D. F. S., Ribeiro, H. S., Gonçalves, A. A. M., da Silva, A. V., Lair, D. F., de Oliveira, D. S., Giunchetti, R. C. *Rhipicephalus microplus*: An overview of vaccine antigens against the cattle tick. *Ticks and tick-borne diseases*, v. 13, n. 1, p. 101828, 2022.
- Perez-Martinez, M. B., Moo-Llanes, D. A., Ibarra-Cerdeña, C. N., Romero-Salas, D., Cruz-Romero, A., López-Hernández, K. M., & Aguilar-Dominguez, M. Worldwide comparison between the potential distribution of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under climate change scenarios. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 37, n. 4, p. 745-753, 2023.
- Perner, J., Kotál, J., Hatalová, T., Urbanová, V., Bartošová-Sojková, P., Brophy, P. M., & Kopáček, P. Inducible glutathione S-transferase (IrGST1) from the tick *Ixodes ricinus* is a haem-binding protein. *Insect biochemistry and molecular biology*, v. 95, p. 44-54, 2018.
- Petruczynik, A., Plech, T., Tuzimski, T., Misiurek, J., Kaproń, B., Misiurek, D., ... & Waksmundzka-Hajnos, M. Determination of selected isoquinoline alkaloids from *Mahonia aquifolia*; *Meconopsis cambrica*; *Corydalis lutea*; *Dicentra spectabilis*; *Fumaria officinalis*; *Macleaya cordata* extracts by HPLC-DAD and comparison of their cytotoxic activity. *Toxins*, v. 11, n. 10, p. 575, 2019.
- Pfäffle, M., Littwin, N., Muders, S. V., Petney, T. N. The ecology of tick-borne diseases. *International journal for parasitology*, v. 43, n. 12-13, p. 1059-1077, 2013.
- Rangubpit, W., Suwan, E., Sangthong, D., Wongpanit, K., Stich, R.W., Pongprayoon, P. and Jittapalapong, S. Elucidating structure and dynamics of glutathione S-transferase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 41, no. 15 (2023): 7309-7317. 2023.
- Rangubpit, W., Suwan, E., Sangthong, D., Wongpanit, K., Stich, R. W., Pongprayoon, P., & Jittapalapong, S. Observing how glutathione and S-hexyl glutathione bind to glutathione S-transferase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 21, p. 12775, 2022.
- Reis, A. C., Konig, I. F. M., de Souza, S. P., Melo, N., Gomes, P. H. I., Silva, H. F., ... & Remedio, R. N. Exposure to trans-anethole impairs reproduction and inhibits glutathione-S-transferase (GST) in engorged *Rhipicephalus microplus* female ticks (Acari: Ixodidae). *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 212, p. 106435, 2025.
- Rinaldi, M. V., Díaz, I. E., Suffredini, I. B., & Moreno, P. R. Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 27, n. 1, p. 77-83, 2017.

Wadapurkar, R. M., Shilpa, M., Katti, A. K. S., Sulochana, M. *In silico* drug design for *Staphylococcus aureus* and development of host–pathogen interaction network. *Informatics in Medicine Unlocked*, v. 10, p. 58–70, 2018.

Tong, J.-B., Luo, D., Bian, S., Zhang, X. Structural investigation of tetrahydropteridin analogues as selective PLK1 inhibitors for treating cancer through combined QSAR techniques, molecular docking, and molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Liquids*, v. 335, p. 1–17, 2021.

Rochlin, I., Toledo, A. Emerging tick-borne pathogens of public health importance: a mini-review. *Journal of medical microbiology*, v. 69, n. 6, p. 1-11, 2020.

Rodrigues, V., Pina, F. T. B., Barros, J. C., Andreotti, R. Carrapato-estrela (*Amblyomma sculptum*): ecologia, biologia, controle e importância. Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2015.

Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., Perez de León, A. A., Villela, H. S., Torres-Acosta, J. F. D. J., Fragoso Sánchez, H., García Carrasco, D. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, v. 8, n. 1, p. 61-74, 2017.

Rodríguez-Vivas, R. I., Jonsson, N. N., Bhushan, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology research*, v. 117, p. 3-29, 2018.

Rodríguez-Vivas, R. I., Perez-Cogollo, L. C., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M. M., Trinidad-Martinez, I., Miller, R. J., Klafke, G. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, n. 2, p. 113-122, 2014.

Sangster, N. C. Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology*, v. 98, n. 1-3, p. 89-109, 2001.

Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, v. 1, n. 6, p. 168-182, 2013.

Schettters, T., Bishop, R., Crampton, M., Kopáček, P., Lew-Tabor, A., Maritz-Olivier, C., De la Fuente, J. Cattle tick vaccine researchers join forces in CATVAC. *Parasites & Vectors*, v.9, n.1, p. 7-7. 2016.

Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Karsch-Mizrachi, I. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, v. 2020, p. baaa062, 2020.

Selles, S. M. A., Kouidri, M., González, M. G., González, J., Sánchez, M., González-Coloma, A., Valcárcel, F. Carrapaticidal and repellent effects of essential oils against ticks: a review. *Pathogens*, v. 10, n. 11, p. 1379, 2021.

Shahein, Y., Abouelella, A. and Hamed, R. Glutathione S-Transferase Genes from Ticks. An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology-From Analytical Procedures to Biomedical Applications. 1-25. 2013.

- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical journal*, v. 360, n. 1, p. 1-16, 2001.
- Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T., Sepčić, K. Biochemical biomarkers in environmental studies—lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 17, n. 3, p. 571-581, 2010.
- Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 674, n. 1-2, p. 137-147, 2009.
- Hellou, J., Ross, N. W., Moon, T. W. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 19, n. 6, p. 2007-2023, 2012.
- Aloke, C., Onisuru, O. O., Achilonu, I. Glutathione S-transferase: A versatile and dynamic enzyme. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 734, p. 150774, 2024.
- Stoian, I. A. M., Vlad, A., Gilca, M., Dragos, D. Modulation of glutathione-s-transferase by phytochemicals: To activate or inhibit—That is the question. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, n. 15, p. 7202, 2025.
- Silva, G. D., Lima, H. G., De Freitas, H. F., Da Rocha Pita, S. S., Dos Santos Luz, Y., De Figueiredo, M. P., Botura, M. B. *In vitro* and *in silico* studies of the larvicidal and anticholinesterase activities of berberine and piperine alkaloids on *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 12, n. 2, p. 1-6, 2021.
- Silveira, W. H., Carvalho, Gabriel Domingos., PECONICK, Ana Paula. Medidas de controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: uma breve revisão. *PUBVET*, v. 8, p. 1136-1282, 2014.
- Simic, T., Savic-Radojevic, A., Pljesa-Ercegovac, M., Matic, M., & Mimic-Oka, J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nature reviews urology*, v. 6, n. 5, p. 281-289, 2009.
- Sinning, I., Kleywegt, G.J., Cowan, S.W., Reinemer, P., Dirr, H.W., Huber, R., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N., Ji, X., Board, P.G. and Olin, B. Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the Mu and Pi class enzymes. *Journal of molecular biology*, 232(1), 192-212. 1993.
- Sonenshine, D. E.; Roe, R. M. *Biology of Ticks*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2014.
- Sonenshine, Daniel E.; Roe, R. Michael. *Biology of ticks*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2014.
- Srivastava, P., Puri, S. K., Kamboj, K. K., & Pandey, V. C. Glutathione-S-transferase activity in malarial parasites. *Tropical Medicine & International Health*, v. 4, n. 4, p. 251-254, 1999.
- Stone, B. F. The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Australian Veterinary Journal*, v. 48, n. 6, p. 345-350, 1972.

- Stotzer, E. S., Lopes, L. B., Eckstein, C., de Moraes, M. C. M. M., Rodrigues, D. S., Bastianetto, E. Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 8, n. 3, p. 198-221, 2014.
- Hou, T., Wang, J., Li, Y. ADME evaluation in drug discovery. 8. The prediction of human intestinal absorption by a support vector machine. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 47, n. 6, p. 2408–2415, 2007.
- Erlejman, A., Verstraeten, S., Fraga, C., Oteiza, P. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radical Research*, v. 38, n. 12, p. 1311–1320, 2004.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, 1997.
- Leeson, P. D., Davis, A. M. Time-related differences in the physical property profiles of oral drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 25, p. 6338–6348, 2004.
- O'Shea, R., Moser, H. E. Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, n. 10, p. 2871–2878, 2008.
- Tabor, A. E., Ali, A., Rehman, G., Rocha Garcia, G., Zangirolamo, A. F., Malardo, T., & Jonsson, N. N. Cattle tick *Rhipicephalus microplus*-host interface: a review of resistant and susceptible host responses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, p. 506, 2017.
- Tew, K. D. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer research*, v. 54, n. 16, p. 4313-4320, 1994.
- Liao, F., Han, C., Deng, Q., Zhou, Z., Bao, T., Zhong, M., Hu, Y. Natural products as mite control agents in animals: a review. *Molecules*, v. 28, n. 19, p. 6818, 2023.
- Obaid, M. K., Islam, N., Alouffi, A., Khan, A. Z., da Silva Vaz Jr, I., Tanaka, T., Ali, A. Acaricides resistance in ticks: selection, diagnosis, mechanisms, and mitigation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, p. 941831, 2022.
- Van Dalen, E. M., Jansen van Rensburg, C. Competitive displacement and acaricide resistance of two *Rhipicephalus* (*Boophilus*) species collected on commercial farms in South Africa. *Experimental and Applied Acarology*, v. 92, n. 1, p. 135-149, 2024.
- Van Dalen, E. M., van Rensburg, C. J. Evolution of acaricide resistance of *Rhipicephalus decoloratus* on commercial farms in South Africa. *Experimental and Applied Acarology*, v. 90, n. 3, p. 339-355, 2023.
- Van Wyk, R. D., Baron, S., & Maritz-Olivier, C. An integrative approach to understanding pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus* and *R. decoloratus* ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, n. 4, p. 586-594, 2016.
- Vaz Junior, I. S., Lermen, T. T., Michelon, A., Ferreira, C. A. S., de Freitas, D. R. J., 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.

Vontas, J. G., Enayati, A. A., Small, G. J., Hemingway, J. A simple biochemical assay for glutathione S-transferase activity and its possible field application for screening glutathione S-transferase-based insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 68, n. 3, p. 184-192, 2000.

Walker, A. R. Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species. Edinburgh: Bioscience Reports, 2003.

Walker, A. R. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Edinburgh: Bioscience Reports, 2003.

Wang, Z., Zhao, Z., Abou-Zaid, M. M., Arnason, J. T., Liu, R., Walshe-Roussel, B., Scott, I. M. Inhibition of insect glutathione s-transferase (gst) by conifer extracts. *Archives of insect biochemistry and physiology*, v. 87, n. 4, p. 234-249, 2014.

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.

Willadsen, P. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, v. 129, n. S1, p. S367-S387, 2004.

Xavier, M. M, Heck, G. S., Avila, M. B., Levin, N. B. L., Pintro, V. O., Carvalho, N. L., Azevedo, W. F. SANdReS a computational tool for statistical analysis of docking results and development of scoring functions. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, v. 19, n. 10, p. 801-812, 2016.

Xu, C., Li, C. Y. T., Kong, A. N. T. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research*, v. 28, p. 249-268, 2005.

Yawa, M., Nyangiwe, N., Jaja, I. F., Kadzere, C. T., & Marufu, M. C. Geographic distribution of boophilid ticks in communal grazing cattle in the north-eastern region of the Eastern Cape Province, South Africa. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v. 23, p. 100538, 2021.

Yawa, M., Nyangiwe, N., Jaja, I. F., Marufu, M. C., Kadzere, C. T. Acaricide resistance of *Rhipicephalus decoloratus* ticks collected from communal grazing cattle in South Africa. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, v. 9, n. 1, p. 33, 2022.

Ye, J., Singh, A., Ward, O. P. Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 117-135, 2004.

Zhuge, X. L., Xu, H., Xiu, Z. J., Yang, H. L. Biochemical functions of glutathione S-transferase family of *Salix babylonica*. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 364, 2020.