

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

ALBERTO JORGE OLIVEIRA LOPES

**Estudo computacional da interação de terpenos com a acetilcolinesterase de
Rhipicephalus microplus e potenciais novos candidatos a carrapaticidas**

São Luis – MA
2015

ALBERTO JORGE OLIVEIRA LOPES

**Estudo computacional da interação de terpenos com a acetilcolinesterase de
Rhipicephalus microplus e potenciais novos candidatos a carrapaticidas**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do
Maranhão, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves
Lima

Lopes, Alberto Jorge Oliveira

Estudo computacional da interação de terpenos com acetilcolinesterase de *Rhipicephalus microplus* e potenciais novos candidatos a carrapaticidas / Alberto Jorge Oliveira Lopes. — São Luis, 2015.

82f.

Orientador: Prof. Dr. Lívio Martins Costa Junior

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.

1. Acetilcolinesterase
 2. Carrapato
 3. Modelagem por homologia
 4. simulações por dinâmica molecular
- I. Título.

CDU 595.42

ALBERTO JORGE OLIVEIRA LOPES

**Estudo computacional da interação de terpenos com a acetilcolinesterase de
Rhipicephalus microplus e potenciais novos candidatos a carrapaticidas**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do
Maranhão, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para
obtenção do título de Mestre.

São Luis – MA, 07 de Julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior – UFMA
Presidente

Dr. José Reck Júnior – IPVDF/RS
1º Avaliador

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira – UFMA
2º Avaliador

Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes – UFMA
3º Avaliador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa, meus familiares, parentes, sobrinhos, afilhados e em especial às minhas avós Adelaide Gouveia Silva (*in memoriam*) e Antônia Viégas Pinto (*in memoriam*) que mesmo sem saber o que é, ou o que representa o “Me.”, estariam profundamente orgulhosas de ter um neto com isso.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Maranhão pela constante busca da melhoria na qualidade do ensino;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade de realizar o mestrado em um programa reconhecido e que almeja crescer cada vez mais;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pelo apoio financeiro ao projeto;

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA – pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado;

Ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho da Universidade Federal do Ceará – CENAPAD – UFC, pela disponibilidade dos recursos computacionais utilizados neste projeto;

Ao Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior pela orientação e confiança – especialmente neste trabalho – com quem tive a oportunidade de dar meus primeiros passos na pesquisa científica que me permitiram crescer muito e ver que sempre posso ir além do que eu acredito ser meu limite;

Ao Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima pela co-orientação, por toda atenção e receptividade em seu grupo de pesquisa, por ter me apresentado com excelência esse mundo fantástico da química computacional, além de não ter medido esforços para que os muitos problemas que apareceram nessa jornada fossem rapidamente resolvidos;

Ao Prof. Dr. Ricardo Martins Ramos, hoje também um grande amigo que foi indispensável para a execução desse trabalho. Sempre com um sorriso no rosto, uma tranquilidade ímpar e um “vai dar certo”, conseguia botar ordem na casa quando eu acreditava que não iria conseguir. Sua contribuição científica e humana para mim será eterna!

À Profa. Dra. Flavia Raquel Fernandes do Nascimento e ao Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes, coordenadora e vice-coordenador do PPGCS, por toda sua dedicação e empenho em sempre elevar a qualidade do PPGCS e da UFMA, como também pelas valiosas sugestões feitas ao projeto, desde a minha seleção até a qualificação;

Aos professores do PPGCS por todos os ensinamentos científicos e de vida transmitidos nas disciplinas, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender, em especial às Profas. Dras. Maria Nilce de Sousa Ribeiro, Alcione Miranda dos Santos e Flávia Maria Mendonça do Amaral;

A toda equipe do CENAPAD-UFC, sempre muito solícita e eficiente na resolução dos problemas;

À minha amada esposa Cleydlenne Costa Vasconcelos Lopes, sempre ao meu lado, me acalmando nos momentos que pensei em desistir, sempre me dando força para crescer e ser uma pessoa melhor. Por você eu acordo todos os dias, mais do que nunca, com muita vontade de vencer. Te amo!

Aos meus pais Jorge Pinto Lopes e Jane Gouveia Oliveira por todo amor, carinho, atenção, auxílio e paciência dedicados a mim do meu nascimento até hoje. Durante muito tempo fiquei ausente, mas sei que vocês sabem que foi para que eu alcançasse meus objetivos. Saber que orgulho vocês é a maior alegria que a vida já deu;

Ao meu irmão Lucas Oliveira Lopes, a quem sempre tento ensinar algo e com quem aprendo muito também;

Aos meus sogros Conceição de Maria Gois Costa Vasconcelos e Edmilson Alves de Vasconcelos, pelo carinho e acolhimento de sempre;

Aos meus tios e tias, primos e primas, sobrinhos e sobrinhas por cada palavra e cada gesto de incentivo e coragem mesmo que inconsciente;

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Animal (UFMA): Suzana G. Lopes, Giselle C. Oliveira, Andrea Claudia M. Jansen, Tatiane A. Penha, Aldilene S. Lima, José Gracione N. Sousa Filho e Sebastião F. A. Neto pelos anos de convivência, amizade e trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Química Computacional e Planejamento de Fármaco: Lucas A. Nascimento, Prof. Me. Allan N. Costa, Luciano e Jorge Roberto pela presteza de sempre quando eu chegava com milhares de dúvidas e pelas boas conversas e risos que tivemos;

A todos os amigos do PPGCS, em especial aos da turma 2013-2015 por todas as conversas, risos, discussões, confraternizações e apoio durante todo esse período! Alexandro Ferraz Tobias, Ana Karlla Dos Santos Sousa, Ângela Tâmara Lemos Souza, Carlos Eduardo Medeiros Santos, Francisco Carlos Costa Magalhães, Gustavo Pereira Calado, Jonas Rodrigues Sanches, Johnny Ramos do Nascimento, Jose Pereira Guará, Josianne Rocha Barboza, Letícia Prince Pereira Pontes, Luciely Ribeiro Batista, Ludmila Bacellar Palhano Portela, Maristela Martins Dos Reis Teixeira, Nayrana Soares do Carmo, Renata Ohana Alves Benevides, Tereza Cristina Monteiro de Melo Prazeres e Vanessa Conceição da Silva - vocês são sensacionais!

A todos os demais amigos e colegas que sempre me deram força e incentivos de entrar e me manter na pós-graduação,

Recebam o meu abraço e o meu MUITO OBRIGADO!

“Sonhos determinam o que você quer. Ações determinam o que você conquista.”

Aldo Novak

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.”

Bill Gates

“So, carry on, there's a meaning to life which someday we may find... Carry on, it's time to forget the remains from the past, to carry on”

Andre Matos, na música Carry On – Angra

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é o principal ectoparasita da bovinocultura mundial sendo responsável por perdas de bilhões de dólares que afetam diretamente o retorno de tal produção animal. Seu controle é difícil devido à resistência dos carrapatos a todas as bases químicas de acaricidas comercialmente disponíveis. A atividade acaricida de terpenos tem sido avaliada em vários estudos que mostram resultados satisfatórios, indicando que estes compostos são fontes potenciais de novos produtos acaricidas. O objetivo desse trabalho foi selecionar terpenos com potencial atividade sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE) de *R. microplus*. As propriedades do volume molecular, os parâmetros geométricos e vibracionais de terpenos foram obtidos a partir de cálculos de química quântica no nível da teoria do funcional de densidade. Metodologias de bioinformática foram aplicadas para estudar a interação de terpenos identificados em óleos essenciais de *Citrus* spp. e *Lippia* spp. com as três AChE de *R. microplus*. Como não existem estruturas experimentais disponíveis, modelos das três AChE foram gerados por modelagem por homologia e em seguida refinadas por simulações de dinâmica molecular. Logo após, foram realizados estudos de docagem molecular para detectar a melhor conformação energética de interação e simulações de dinâmica molecular desse complexo foram realizadas para estudarmos o comportamento dessa interação. Os resultados sugerem que a conhecida atividade carrapaticida do carvacrol está associada com a sua interação com a AChE, enquanto que a atividade carrapaticida do timol não está associado com a inibição dessa mesma enzima. Além disso, como esperado, mostrou uma excelente interação do carrapaticida cumafós e relata o primeiro registro da interação da AChE de *R. microplus* com os terpenos gama-muuruleno e elemol, moléculas com poucos estudos e que a partir de agora configuram-se como candidatos potenciais para novos produtos acaricidas.

Palavras-chave: acetilcolinesterase, *Rhipicephalus microplus*, modelagem por homologia, docagem, simulações por dinâmica molecular.

ABSTRACT

The tick *Rhipicephalus microplus* is the major cattle ectoparasite of the world accounting for losses of billions of dollars that directly affect the return of such livestock. Its control is difficult due to the resistance of ticks to all chemical bases commercially available miticides. Acaricidal activity of terpenes has been evaluated in several studies that show satisfactory results, indicating these compounds are potential sources of new acaricidal products. The aim of this work was to select terpenes with potential activity against enzyme acetylcholinesterase (AChE) from *R. microplus*. Properties of the molecular volume, geometric parameters and vibrational terpenes were obtained from quantum chemical calculations the density functional theory level. Bioinformatic methodologies were applied to study the interaction of terpenes identified in essential oils of *Citrus* spp. and *Lippia* spp. with three AChE *R. microplus*. Since there are no available experimental structures, models of the three AChE were generated by homology modeling and then refined by molecular dynamics simulations. Soon after, were studies of molecular docking to detect best energy conformation of interaction and molecular dynamics simulations of this complex were carried out to study the behavior of this interaction. Our results suggest that the known acaricide activity of carvacrol is associated with its interaction with AChEs, while the acaricide activity of thymol is not associated with inhibition of that enzyme. Also, as expected, showed an excellent interaction coumafos acaricide and reports the first record of interaction of AChE from *R. microplus* with gamma-muuruleno and elemol terpenes, molecules with few studies and that now configure themselves as candidates potential new acaricidal products.

Keywords: Acetylcholinesterase, *Rhipicephalus microplus*, Homology modeling, Docking, Molecular dynamics simulations

LISTA DE ABREVIACÕES

ACh	- acetilcolina
AChE	- acetilcolinesterase
AmAChE	- acetilcolinesterase de <i>Apis mellifera</i>
BHC	- hexaclorociclo-hexano
DDT	- diclorodifeniltricloroetano
DFT / TFD	- Density Funtional Theory / Teoria do Funcional de Densidade
DM / MD	- Dinâmica Molecular / Molecular Dynamics
fs	- fentonsegundo
GABA	- ácido gama-aminobutírico
Glu-Cl	- canal cloreto controlado por glutamato
GST	- Glutathione S Transferase
K	- Graus Kelvin
K _i	- constante de inibição
LC50	- concentração letal 50%
ns	- nanosegundos
OH	- hidroxila
PDB	- Protein Data Bank
ps	- picosegundo
RmAChE	- acetilcolinesterase de <i>R. microplus</i>
RMN	- ressonância magnética nuclear
RMSD	- root mean-square deviation
SAMS	- S-Adenosil L-Metionina sintetase
SNC	- sistema nervoso central
VdAChE	- acetilcolinesterase de <i>Varroa destructor</i>
ΔG_{bind}	- energia livre de ligação

LISTA DE FIGURAS

Artigo

Figura 1 – Estrutura química dos terpenos selecionados e cumafós utilizados para a análise da interação com o receptor da acetilcolinesterase de *Rhipicephalus microplus*59

Figura 2 – Representações esquemáticas do modelo RmAChEs. Traço RmAChE1 fita (A) e a superfície molecular (B), traço RmAChE2 fita (C) e a superfície molecular (D), traço RmAChE3 fita (E) e a superfície molecular (F)60

Figura 3 - "A", "C" e "E" indica a posição de ligantes para RmAChE1, RmAChE2 e RmAChE3, respectivamente. "B", "D" e "F" é uma ampliação de "A", "C" e "E", respectivamente. Roxo e barra estão listados os resíduos de aminoácidos que interagem por meio de ligações de hidrogénio com os ligantes. Vermelho e barra indicam resíduos de aminoácidos da tríade catalítica (Ser216, His454 e Glu341) para RmAChE1. Os ligantes são representados por pau e bola (Cumafos - laranja, timol - verde, carvacrol - ciano, elemol - rosa e Gamma-murolene - amarelo). Figura feita com o software UCSF Chimera61

Support Information / Informação Suporte

Figura S1 – Alinhamento de sequências de aminoácidos das AChE de *R. microplus*. Resíduos conservados estão em caixa com a identidade mostrado com um fundo vermelho e similaridade com letras vermelhas. O alinhamento foi gerado usando CLUSTALOMEGA e exibido usando ESPript65

Figura S2 - Tempo dependência dos parâmetros estruturais das simulações MD em relação à estrutura inicial. a: RMSD de átomos de C α ; b: Raio de giro (Rg); c: Número total de ligações de hidrogênio (Nhb). Sistema de Cor: RmAChE1 (preto) RmAChE2 (vermelho) RmAChE3 (verde). As Figuras 3 foram geradas utilizando Xmgrace.....66

Figura S3 – Contatos identificados entre ligantes e RmAChE1 calculados para últimos 4,0 ns de simulações MD. A, Cumafos. B, Gamma-murolene. C, carvacrol. D, elemol. sistema de cores: ligações de hidrogênio (verde), contatos hidrofóbicos (cinza), provável que o resíduo do sítio de aminoácidos ativa faz contato hidrofóbico (laranja), provável que o resíduo do sítio de aminoácidos activa é ligação de hidrogênio hidrofóbico (vermelho). Os números em barras indicam a porcentagem de contatos para cada aminoácido. Contatos avaliados em capturas instantâneas tomados todos os 100 ps da fase de produção67

Figura S4 - Contatos identificados entre ligantes e RmAChE2 calculados para últimos 4,0 ns de simulações MD. A, Cumafos. B, timol. C, carvacrol. D, elemol. E, Gamma-murolene. sistema de cores: ligações de hidrogênio (verde), contatos hidrofóbicos (cinza). Os números em barras indicam a porcentagem de contatos para cada aminoácido. Contatos avaliados em capturas instantâneas tomados todos os 100 ps da fase de produção.68

Figura S5 - Contatos identificados entre ligantes e RmAChE3 calculados para últimos 4,0 ns de simulações MD. A, Cumafos. B, Gamma-murolene. C, carvacrol. D, elemol. sistema de cores: ligações de hidrogênio (verde), contatos hidrofóbicos (cinza). Os números em barras indicam a porcentagem de contatos para cada aminoácido. Contatos avaliados em capturas instantâneas tomados todos os 100 ps da fase de produção..69

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 – Classe de carrapaticidas, seus compostos ativos e alvo de atuação.....	18
---	----

Artigo

Tabela 1 – Total calculado Energias eletrônico (E, Hartree), Energia Relativa (AE, kcal / mol), EHOMO (Hartree), ELUMO (Hartree), Dureza (η), potencial químico (μ) e eletrofilicas (ω), Potencial de Ionização (I) e Electron afinidade (A), electronegatividade (χ) em eV, volume molecular (Mv, cm ³ /mol) do acaricida cumafós e os terpenos isomeros categoria A e B.	62
Tabela 2 – Parâmetros de afinidade da docagem molecular	63

Support Information / Informação Suporte

Tabela S1 – Estruturas utilizadas como modelos obtidas do PDB.....	70
Tabela S2 – Parâmetros estruturais dos modelos obtidos por modelagem por homologia	71
Tabela S3 – Média de parâmetros estruturais de RmACHes a partir dos últimos 10 ns das simulações	72
Tabela S4 - Modelos secundários gerados por modelagem por homologia e refinado através de simulações de dinâmica molecular (-RmACHes), que foram utilizados na docagem molecular e simulações de dinâmica molecular	73
Tabela S5 – Interações das conformações escolhidos na docagem	74

SUMÁRIO

	página
1.0 Referencial Teórico	15
1.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>	15
1.2 Controle de <i>R. microplus</i>	16
1.2.1 Organofosforados	16
1.2.2 Piretróides Sintéticos	16
1.2.3 Formamidínicos	17
1.2.4 Fenilpirazóis	17
1.2.5 Lactonas Macrocíclicas	17
1.2.6 Inibidores de Crescimento	18
1.3 Plantas de uso medicinal	19
1.3.1 Terpenos e atividade carrapaticida	19
1.4 Acetilcolina e acetilcolinesterase	20
1.5 Planejamento de Fármacos	21
1.6 Bioinformática Estrutural	23
1.6.1 Modelagem por homologia	24
1.7 Docagem Molecular	25
1.8 Dinâmica Molecular	27
1.9 Bioinformática e o desenvolvimento de novos antiparasitários	28
2.0 Objetivo	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30

3.0 Referências Bibliográficas	31
4.0 Artigo Científico	41
5.0 Anexos	75
5.1 – Carta de submissão	76
5.2 – Colaboração Artigo -	77

1. Referencial Teórico

1.1 *Rhipicephalus microplus*

Dentre os principais problemas enfrentados pela pecuária bovina o carrapato *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) configura-se como o principal ectoparasito (KLAFKE, 2011), sendo responsável por prejuízos aos produtores como anemia, diminuição da produção de leite e do ganho de peso, diminuição da qualidade do couro, transmissão de patógenos e aumento da mortalidade do rebanho, que afetam diretamente a rentabilidade da bovinocultura (ALONSO et al., 1992; FAO, 2004; Andreotti, 2010). Em 2014, somente no Brasil, os prejuízos diretos e indiretos ocasionados pelo *R. microplus* foram estimados em 3,24 bilhões de dólares (GRISI et al., 2014).

R. microplus provavelmente originou-se no sul da Ásia adaptando-se perfeitamente as condições climáticas e ambientais das áreas tropicais, as quais oferecem temperatura e umidade favoráveis à manutenção do seu ciclo biológico (POWELL & REID, 1982). Sua chegada à América do Sul é atribuída aos primeiros animais trazidos do Velho Mundo pelos colonizadores no século XIX. É uma das espécies de carrapato com maior distribuição mundial, sendo encontrado nas zonas tropicais e subtropicais da Ásia, nordeste da Austrália, Américas Central e do Sul, México e Caribe entre os paralelos 32°N e 32°S (JOHNSTON; KEMP; PEARSON, 1986; ESTRADA-PEÑA et al., 2006).

É um carrapato com ciclo de um hospedeiro (monoxênico), preferencialmente bovinos ou em casos mais particulares equídeos, bubalinos e pequenos ruminantes nos quais realiza todo seu ciclo biológico. Seu ciclo é dividido em fase de vida livre (fase não parasitária) quando o carrapato está no ambiente, o que corresponde a cerca de 95% da população e, fase parasitária quando está sobre o hospedeiro, que corresponde aos 5% restantes da população. Os machos geralmente são encontrados sob as fêmeas, estas que após fertilização e ingurgitamento desprendem-se dos hospedeiros e vão ao ambiente onde iniciam o período de incubação e postura dos ovos. Durante este período uma fêmea pode liberar mais de 3000 ovos originando larvas que eclodem em aproximadamente 14 dias e após sete dias de eclosão, já são consideradas infestantes (PEREIRA & LABRUNA, 2008).

1.2 Controle de *R. microplus*

O controle de *R. microplus* é complexo em virtude da influência e interação de vários fatores como: raça do bovino, época do ano, condições ambientais e manejo. A utilização de carrapaticidas químicos sintéticos como organofosforados, piretróides, formamidínicos, fenilpirazol, lactonas

macrocíclicas e fluazuron é a principal ferramenta disponível para controle destes parasitos (Tabela 1).

1.2.1 Organofosforados

Os organofosforados são o grupo de carrapaticida mais antigo disponível para comercialização, que se iniciou na década de 1950. Substituíram os organoclorados DDT e BHC, que apresentavam sérios problemas de contaminação ambiental e residual nos produtos de origem animal, além de ação carcinogênica (GEORGE; POUND; DAVEY, 2008).

A atividade tóxica dos organofosforados está vinculada à inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual hidrolisa a acetilcolina (ACh). Essa inibição causada pelos organofosforados, eleva o número de ACh livre até níveis tóxicos para os carrapatos, devido a competição dos organofosforados com a acetilcolina pela interação com o sítio ativo da AChE. Quando um ligante diferente da acetilcolina está no sítio da acetilcolinesterase, esta se encontra fosforilada, causando um aumento dos níveis de acetilcolina na fenda sináptica e como consequência a transmissão contínua e desordenada de impulsos nervosos hiperativando fibras musculares, que pode ocasionar paralisia e morte (ESPINOZA et al., 1991). Os principais representantes dos organofosforados utilizados no controle de carrapatos são: Ethion, Clorpirifós, Clorfenvinfós e Cumafós. Os mecanismos de resistência a estes compostos são relacionados com a insensibilidade da acetilcolinesterase, o aumento do metabolismo das esterases localizadas no intertegumento de fêmeas ingurgitadas resistentes e com a super expressão dessas enzimas em larvas, relacionada a um gene semi-dominante (VILLARINO; WAGHELA; WAGNER, 2001; FOIL et al., 2004).

1.2.2 Piretróides sintéticos

Os piretróides sintéticos são um dos grupos químico mais utilizado para controle de carrapatos. Foram introduzidos no mercado brasileiro na década de 1980. Atuam no sistema nervoso central (SNC) dos artrópodes, resultando na hiperexcitabilidade dos artrópodes ao alterar o equilíbrio de íons Na^+ e Cl^- dos canais de sódio controlados por voltagem ao modificá-los e mantê-los abertos por mais tempo, permitindo assim mais entrada de sódio para o interior da membrana ocasionando convulsões, paralisia e morte do animal (ROMA et al., 2009; MARTINS & VALLE, 2012). Os principais representantes dos piretróides são a Cipermetrina, Deltametrina e Permetrina. O principal mecanismo de resistência a estes compostos tem sido atribuído a mutações que substituem um dos nucleotídeos do gene do canal de sódio, alterando a composição polipeptídica do canal, causando assim uma insensibilidade do sítio de ação dos piretróides. São conhecidos três pontos de mutação associados à resistência de piretróides no canal de sódio de *R. microplus* (HE et

al., 1999, MORGAN et al., 2009; JOHNSON et al., 2010; LOVIS et al., 2012; MARTINS & VALLE, 2012). Além do canal de sódio, um segundo mecanismo, a detoxificação metabólica mediada pela ação de esterases (SINGH & RATH, 2014) e do citocromo P450 é atribuída à resistência dos carrapatos aos piretróides sintéticos (MILLER; DAVEEY; GEORGE, 1999)

1.2.3 Formamidínicos

O amitraz é o principal carrapaticida do grupo dos amidínicos há mais de 30 anos. Este produto possui baixa toxicidade para bovinos e para os seres humanos pois atua em receptores octopaminérgicos – ausentes em vertebrados, inibindo as monoaminoxidases além de não apresentarem período residual na carne e ser rapidamente degradado no ambiente (LI et al., 2004; JOHNSON & HOPE, 2007). No entanto, não devem ser utilizados em felinos e em equídeos, pois é tóxico para esses grupos (GUPTA, 2012). Pouco se sabe a respeito do que causa essa toxicidade a esses grupos, mas especula-se que o amitraz atue inibindo a liberação da acetilcolina das fendas sinápticas das células do sistema nervoso parassimpático do intestino desses animais (BOTTEON et al., 1998). Apesar dos mecanismos de resistência ao amitraz ainda não serem bem esclarecidos, aponta-se que algumas populações de *R. microplus* resistentes demonstram aumento de atividade enzimática de esterases e glutatona-S-transferase (LI, 2004).

1.2.4 Fenilpirazól

O fipronil, um fenilpirazol, atua bloqueando os canais de íons cloreto, que são controlados por ácido gama-aminobutírico (GABA) presente nos neurônios do sistema nervoso central dos insetos (BLOOMQUIST, 2003). O fipronil também bloqueia os canais de íons cloreto mediados pelo glutamato (NARAHASHI et al., 2007) e esta característica explica em parte a maior toxicidade seletiva para os artrópodes, já que os mamíferos não possuem este tipo de canal.

1.2.5 Lactonas macrocíclicas

As lactonas macrocíclicas são divididas em avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina) e em milbemicinas (moxidectina). A atividade das avermectinas ocorre através da interação com os canais de cloro mediados pelo GABA ou devido à alta afinidade do produto aos canais Cloreto–Glutamato (GluCl) resultando em paralisia e morte dos parasitos (SHOOP; MROZIK; FISHER, 1995).

1.2.6 Inibidores de crescimento

Fluazuron e diflubenzuron atuam bloqueando a síntese de quitina dos artrópodes, impedindo seu crescimento. Seu modo de ação ainda não é conhecido, no entanto já existe relato de populações de carrapatos resistentes a este acaricida no Brasil (Reck et al, 2014).

Tabela 1 – Classe de carrapaticidas, seus compostos ativos e alvo de atuação

Classe	Compostos ativo	Principal alvo de atuação
Piretróides Sintéticos	Cipermetrina, Deltametrina e Permetrina	Canal de Sódio
Organofosforados	Ethion, Clorpirifós, Clorfenvinfós e Coumafós	Acetilcolinesterase
Formamidínicos	Amitraz	Receptores octopaminérgicos
Fenilpirazois	Fipronil	Ácido gama-aminobutírico (GABA) / Canais Cloreto–Glutamato (GluCl)
Lactonas Macroclínicas	Avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina) e Milbemicinas (moxidectina)	Ácido gama-aminobutírico (GABA) / Canais Cloreto–Glutamato (GluCl)
Inibidor de Crescimento	Fluazuron, Diflubenzuron	Bloqueio da síntese de quitina dos artrópodes

No entanto, já existem na literatura registros de populações destes carrapatos resistentes a todas essas bases químicas (GRAF et al., 2004; ROSARIO–CRUZ et al., 2009; ANDREOTTI, 2010; FERNANDEZ–SALAS; RODRÍGUEZ–VIVAS; ALONSO–DÍAZ, 2012; CORLEY et al., 2013; LOVIS et al., 2013; RECK et al., 2014). A troca constante de formulações, o manejo inadequado dos banhos carrapaticidas, o uso excessivo do carrapaticida, a falta do conhecimento da ecologia e epidemiologia do carrapato e o alto número de tratamentos dos animais realizados ao ano pelos produtores contribuem para a seleção de populações de carrapatos resistentes aos grupos químicos (LEITE et al., 1995; SPAGNOL; PARANHOS, ALBUQUERQUE, 2010). Segundo a FAO (2004) consideram-se resistentes as populações de carrapatos expostas aos carrapaticidas que mantêm seu potencial de sobrevivência e reprodução preservados, aumentando assim o número de carrapatos tolerantes aos carrapaticidas.

Além da resistência, o uso de carrapaticidas químicos sintéticos apresentam prejuízos como o impacto ambiental, alto custo econômico e indução tóxica para os hospedeiros vertebrados, ocasionando um aumento na procura de novas alternativas com boa eficiência carrapaticida e baixo impacto ambiental (BORGES et al., 2007; CHAGAS et al., 2012), sendo fatores determinantes para a busca de novos compostos em plantas de uso medicinal (CÂMPELO, 2011).

1.3 Plantas de uso medicinal

Há muitos séculos as plantas são utilizadas no tratamento de doenças, sendo até hoje objeto de pesquisas que visam desenvolvimento de medicamentos humanos e veterinários (HAMMOND; FIELDING; BISHOP, 1997) e estima-se que cerca de 30% dos medicamentos recentemente introduzidos no mercado são direta ou indiretamente de origem vegetal (WILLCOX et al., 2001).

Muitas plantas são reportadas como detentoras de propriedades medicinais para uso veterinário. No entanto, evidências científicas sobre a eficácia da maioria dos produtos vegetais são limitadas, independentemente de sua ampla utilização. A validação científica da eficácia da planta e avaliação de possíveis efeitos colaterais é necessária antes da sua adoção como um novo método de tratamento (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006). Para a maioria das plantas com propriedades bioativas, pouco se sabe quais são os compostos envolvidos, pois, em geral, a composição química é complexa, o que dificulta a total identificação destes metabólitos que em sua maioria são resultados do metabolismo secundário dos vegetais.

O metabolismo vegetal é tradicionalmente dividido em primário e secundário. O primário está associado com a formação, manutenção e reprodução das plantas envolvendo proteínas, carboidratos e lipídios. O secundário é derivado biologicamente dos metabólitos primários. As plantas produzem uma série de compostos como alcalóides, terpenóides, lectinas, polifenóis entre outros, que não estão diretamente relacionados com crescimento ou reprodução, mas são sintetizados pela planta para exercerem atividades como atração de polinizadores, adaptação ambiental e mecanismos de defesa contra nematódeos fitopatogênicos, insetos ou aves (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; TAIZ & ZEIGHER, 2004).

O uso de produtos de origem vegetal tem como vantagens o suprimento sustentável, baixo custo, biodegradabilidade, biodiversidade da flora nacional e fácil aceitação pela população. Desta maneira, a utilização de produtos naturais é um dos caminhos para descoberta de novas substâncias bioativas que mais evoluiu nos últimos anos (BRUHN, 1989; PRANCE, 1991; DEWITT, 1994; MACIEL; PINTO; VEIGA-JUNIOR, 2002). Dentre essas substâncias uma classe que vem sendo alvo de inúmeras pesquisas são os terpenos.

1.3.1 Terpenos e atividade carrapaticida

Terpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais de diversas espécies vegetais e já são utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Representam um dos maiores grupos de metabólitos vegetais e são os principais constituintes dos óleos essenciais (RATTAN, 2010). Esses compostos hidrofóbicos comumente armazenados nos dutos de resina, células de óleos ou tricomas glandulares (WINK & SCHIMMER, 1999) são formados por moléculas de isopreno (5

C) e são descritos com diversas atividades biológicas como ação antimicrobiana, fungicida, antiviral, anti-hiperglicêmica, antiinflamatória e atividade antiparasitária (PADUCH et al., 2007). O efeito tóxico de terpenos em artrópodes é comumente mediado por alterações nos mecanismos nervosos, atuando principalmente nos receptores de acetilcolinesterase, ácido gama-aminobutírico, octopamina e tiromina (BLENAU, RADEMACHER; BAUMANN, 2012).

A atividade carrapaticida de terpenos já foi avaliada por diversos trabalhos (DAEMON et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009; CHAGAS et al., 2012; CRUZ et al., 2013; ARAUJO et al., 2015; ASSIS-LAGE et al., 2015; PEIXOTO et al., 2015) que mostram resultados satisfatórios, indicando que esses compostos são potenciais fontes para novos produtos carrapaticidas. Dentre as principais formas de atuação de terpenos em artrópodes, os receptores de acetilcolinesterase são os mais comumente reportados e alvos de diversas pesquisas que visam obter novos fármacos inibidores desta enzima, devido também a participação desta enzima na doença de Alzheimer.

1.4 Acetilcolina e Acetilcolinesterase

Acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor, que fica armazenado em vesículas sinápticas neuronais, sendo liberada na fenda sináptica que após despolarização das vesículas. Após a liberação a ACh pode se ligar aos receptores muscarínicos, nicotínicos e posteriormente à AChE que faz a reciclagem dessa ACh. Existem dois tipos de colinesterases: a AChE e a butirilcolinesterase (BChE), que possuem estruturas semelhantes mas diferem em relação à distribuição, substrato e funções. Ambas pertencem à classe das serino-hidrolases, que englobam muitas proteínas. Enquanto a AChE possui grande especificidade para a ACh, estando associada a funções colinérgicas e fisiológicas bem determinadas, a BChE não apresenta grande especificidade e não é associada a funções colinérgicas além de não existir consenso quanto sua função fisiológica (RANG et al., 2012).

A AChE é uma enzima da membrana plasmática dos neurônios pós-ganglionares, localizada próximo dos receptores muscarínicos e nicotínicos, formada por quatro subunidades, sendo que cada subunidade possui seu sítio ativo e é responsável pela reciclagem da AChE que foi utilizada nas sinapses colinérgicas. Essa reciclagem ocorre pela rápida hidrólise do neurotransmissor ACh, onde cada um dos quatro sítios ativos hidrolisa 10.000 moléculas de ACh por segundo e obtêm-se como produto colina e acetato, com liberação de um próton (ROSENBERRY, 1975; ROMANI et al., 2003; RANG et al., 2012). A hidrólise da ACh pela AChE ocorre após a ACh se ligar aos receptores muscarínico ou nicotínico da membrana, ocasionando despolarização da membrana que proporciona um potencial de ação difundindo o impulso (LI et al., 2004).

A AChE desempenha um papel essencial na transmissão colinérgica que é fundamental na manutenção das atividades vitais dos artrópodes e animais superiores (FOURNIER; MUTERO; RUNGGER, 1992). Ao ser inibida, a AChE provoca o acúmulo da acetilcolina nas sinapses, de modo que a membrana pós-sináptica permanece em estado de estimulação permanente, ocasionando um estado de ataxia, falta de coordenação no sistema neuromuscular e eventual morte (SINGH & SINGH, 2000; AYGUN et al, 2002).

Devido ao papel crucial da AChE, esta tem servido como alvo para uma ampla gama de agentes químicos naturais e sintéticos (MILLARD & BROOMFIELD 1995), sendo reportado que quase todos os efeitos farmacológicos dos agentes anticolinesterásicos são em respostas à inibição da AChE (GOODMAN & GILMAN, 2003).

O gene *Ace* (gene da acetilcolinesterase), segundo RUSSEL e colaboradores, (2004) sofreu pelo menos quatro eventos de duplicação e pelo menos um de deleção durante sua evolução dos nematódeos até os vertebrados. A primeira duplicação ocorreu na segregação de nematódeos, artrópodes e vertebrados, dando origem aos genes *Ace1* e *Ace2*. As três outras duplicações restantes ocorreram apenas em nematódeos e em vertebrados. A deleção ocorreu em dípteros, que perderam o gene *Ace1* que é presente em humanos e nematódeos. Entre os cordados, observa-se grande heterogeneidade entre o número de cópias do gene *Ace* onde os cefalocordados apresentam duas cópias do gene e os urocordados apenas uma (SUTHERLAND et al., 1997). Vertebrados, além da AChE, possuem a enzima BChE que apresenta propriedades catalíticas diferentes da AChE (TOUTAN, 1989).

Em carrapatos da família Ixodidae, outro evento de duplicação gerou uma terceira cópia do gene *Ace* (TEMEYER, DAVEY, CHEN, 2004). Esses três genes geram três enzimas – RmAChE 1 (BAXTER & BARKER 1998), RmAChE 2 (HERNANDEZ et al. 1999) e RmAChE 3 (TEMEYER, DAVEY, CHEN, 2004) distintas uma das outras, dividindo apenas poucas porções homólogas (TEMEYER, DAVEY, CHEN, 2004). O conhecimento da estrutura da AChE permite que pesquisas que visem o planejamento de fármacos possam se desenvolver de forma mais rápida ao possibilitar verificação de estruturas com atividade anti-AChE.

1.5 Planejamento de Fármacos

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo longo, de alto custo e que envolve diversas áreas do conhecimento (WILLIAMS & HONG, 2011). Nessa perspectiva, a química computacional aliada à bioinformática, vem se destacando nesse processo por utilizar bases de ciências como bioquímica, farmacologia, biologia molecular, imunologia, farmacocinética, toxicologia, físico-química, cristalografia de raios-X e métodos de modelagem. Essas análises

apresentam como objeto de estudo o planejamento e desenvolvimento de compostos bioativos, que podem ser usados para prevenção, tratamento ou cura de enfermidades humanas e animais. Além disso, também podem envolver investigações com os fármacos já existentes, avaliando suas propriedades farmacológicas e as relações entre a estrutura química e suas atividades biológicas (WERMUTH, 2003). Essas ciências têm fornecido um notável direcionamento no estudo e planejamento de fármacos com inúmeros casos de sucesso, envolvendo o emprego de simulações computacionais (OPREA, 2005).

Cada vez mais o conceito de desenvolvimento de novos agentes que se baseiam em um alvo específico vem sendo utilizado (SELZER et al., 2000). De acordo com GASTEIGER (2006) para a descoberta de um composto ativo são necessários cinco passos: i) identificação e ii) posterior validação do alvo, na maioria das vezes uma proteína, iii) identificação e iv) otimização de estruturas químicas; e v) testes *in vitro* das estruturas otimizadas. O primeiro passo envolve a pesquisas de alvos dos agentes antiparasitários, enquanto os passos iii e iv utilizam métodos de quimioinformática como modelagem por homologia e docagem molecular.

Ao selecionar um alvo, recomenda-se que ele possua duas características em especial: que seja responsável por executar ou atuar de forma essencial no metabolismo do organismo alvo, como é o caso da acetilcolinesterase, cuja sua ativação ou inativação ocasiona danos ao alvo e que apresente diferenças significativas ao homólogo do hospedeiro ou preferencialmente seja ausente neste (BARRET; MOTTRAM; COOMBS, 1999; LINARES; RAVASCHINO; RODRIGUÉZ, 2006). Em relação aos candidatos a fármacos, os mesmos podem ser selecionados a partir de triagens *in vitro* (biológicas, bioquímicas) ou *in silico* (computacionais) de produtos naturais, compostos sintéticos ou coleções combinatórias, ou ainda mediante planejamento racional (GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2010).

Para realizar estudos computacionais, é necessário conhecer a estrutura tridimensional do alvo. Entretanto diversos organismos ainda não possuem suas possíveis estruturas alvo de pesquisas em formato tridimensional, fazendo com que alvos de indivíduos modelos como *Caenorhabditis elegans* (GEARY; THOMPSON; KLEIN, 1999) e *Drosophila melanogaster* (GILLEARD; WOODS; DOW, 2005) sejam comumente utilizados como bases para avaliações de eficiência de novos produtos antiparasitários. Homologias de alvos de outros parasitos são então utilizadas para as pesquisas a partir dos receptores desses organismos modelo (KRASKY et al., 2007). Desse modo, a bioinformática representa a principal ferramenta para a obtenção dessas estruturas tridimensionais.

1.6 Bioinformática Estrutural

A utilização de conhecimentos das ciências exatas somadas à biologia molecular permitiu o desenvolvimento de um novo campo da biologia, conhecido como bioinformática. Ao ser aplicada em protocolos de análise de sequências, estudo de interações moleculares e sistemas avançados de simulação computacional, a bioinformática vem apresentando grande sucesso. O desenvolvimento de ferramentas computacionais eficazes depende do conhecimento gerado a partir dessas diversas áreas de conhecimento (HAMMAMI & FLISS, 2010).

A bioinformática fornece ferramentas para análise de dados biológicos, permitindo a comparação e a correlação dos resultados da pesquisa teórica com a pesquisa experimental. Dentre estas ferramentas destacam-se os bancos de dados on-line UniProt (WU et al., 2006) e *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN et al., 2000), além de ferramentas de bio e quimioinformática, que contêm informações geradas a partir de projetos de genômica e proteômica são essenciais para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (HAMMAMI & FLISS, 2010).

Em resposta aos avanços obtidos pela proteômica, as relações estrutura–função de proteínas estão sendo cada vez mais bem compreendidas, devido principalmente ao elevado aumento da quantidade de estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas disponíveis em bancos de dados públicos como o PDB (BERMAN et al., 2000). Por sua vez, as particularidades envolvidas na análise estrutural das macromoléculas biológicas levaram ao desenvolvimento de uma subárea da bioinformática: a bioinformática estrutural (CHOU, 2004).

A determinação estrutural em três dimensões de uma macromolécula biológica na maioria das vezes uma proteína, representa uma das principais etapas para o entendimento de sua função e de seu mecanismo de ação. Cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN) e microscopia eletrônica são as principais técnicas empregadas para obtenção dessas estruturas (HUANG et al., 2010). Tais métodos, contudo, normalmente requerem grandes recursos estruturais e financeiros. A modelagem por homologia (ou comparativa) é um dos meios alternativos desenvolvidos para reverter este entrave. A rapidez e o custo pequeno comparado aos demais métodos, são as principais vantagens do uso emprego de métodos computacionais na determinação estrutural de macromoléculas biológicas (TAKEDA–SHITAKA et al., 2004; XIANG, 2006).

A estrutura 3D de uma proteína é de grande importância pois com essa informação torna-se mais fácil e confiável atribuir uma função a uma proteína desconhecida (WATSON et al., 2007). Além disso, quando a proteína caracteriza-se como um potencial alvo farmacológico, essa estrutura pode ser utilizada para o planejamento de agentes terapêuticos mais seletivos e eficientes (PANG, 2003; LUNDSTROM, 2006). O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de

complexos do tipo ligante–receptor permite a aplicação de estratégias como docagem molecular e planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (GUIDO et al., 2010).

Os métodos de planejamento de fármacos que se concentram na estrutura do receptor se baseiam no conhecimento do arranjo topológico dos alvos biológicos, utilizando como base os dados em 3D da macromolécula em estudo. Essa informação pode ser obtida mediante a análise de estruturas cristalográficas por RMN ou modelagem por homologia (GUIDO et al., 2010). Avanços na capacidade computacional e na tecnologia têm impulsionado pesquisas *in silico* e técnicas de modelagem como frente de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (MA et al., 2011).

1.6.1 Modelagem por homologia

Embora os projetos de genômica estrutural apresentem grande sucesso e que o avanço tecnológico dos métodos de cristalografia de raios–X e RMN estejam em plena expansão, a maiorias das estruturas experimentais de alvos com potencial terapêutico não estarão disponíveis em um futuro próximo (DEANE & BLUNDELL, 2003; WATSON et al., 2007).

Quando a estrutura tridimensional do receptor já está elucidada em um ou mais banco de dados é possível seguir com estudos de docagem e dinâmica molecular através do método direto. Caso a estrutura tridimensional não esteja resolvida na literatura, uma etapa extra é realizada para a obtenção de um modelo homólogo. Para tal, pode–se utilizar a técnica de modelagem por homologia onde uma nova estrutura tridimensional é gerada com base em uma ou mais estruturas já conhecidas.

A modelagem por homologia está fundamentalmente baseada na observação geral de que proteínas com sequências similares têm estruturas semelhantes. Utilizando-se de estruturas estabelecidas experimentalmente, chamadas de moldes, modelos 3D de alvos podem ser obtidos para uma sequência homóloga desde que esta última compartilhe similaridade de sequência mínima de 30% com a estrutura molde. A regra geral que relaciona o percentual de similaridade entre o modelo e o alvo a ser modelado com a aplicabilidade da estrutura 3D gerada é considerada a seguir (CAVASOTTO & PHATAK, 2009):

- acima de 50% de similaridade: o modelo gerado é considerado preciso o suficiente para aplicações de descoberta de compostos biologicamente ativos;
- entre 25 e 50% de similaridade: o modelo gerado pode ser usado para avaliar alvos farmacológicos potenciais e para o planejamento de experimentos de mutagênese;
- entre 10 e 25% de similaridade: o modelo gerado pode ser usado somente de forma especulativa.

Os fundamentos da modelagem por homologia estão presentes em uma variedade de softwares, podendo ser livres, de código aberto e proprietários. Quando modelos obtidos por softwares livres e pago foram comparados, observou-se que quando a similaridade entre a sequência alvo e a sequência do molde é de pelo menos 40%, não são verificadas diferenças significativas em relação ao nível de exatidão entre as estruturas (NAYEEM; SITKOFF; JUNIOR, 2006).

A modelagem por homologia foi utilizada com sucesso para desenvolver um modelo de cisteino–proteínases de *Plasmodium falciparum* que foi utilizado para identificar novas drogas antimaláricas (RING et al, 1993). KARSKY e colaboradores (2007) também fizeram uso de modelagem por homologia para avaliar novas drogas antiparasitárias, onde utilizou-se como alvo S–Adenosil L–Metionina sintetase (SAMS) de parasitos como *Ascaris suum* (nematódeo que causa a ascaridíase em suínos), *Brugia malayi* (nematódeo parasito de mamíferos, incluindo humanos causador da dirofilariose linfática), *Haemonchus contortus* (nematódeo parasito de ruminantes), *Rhipicephalus appendiculatus* (carrapato de ruminantes na África) e *Rhipicephalus microplus* (carrapato bovino no Brasil) sendo que os resultados obtidos forneceram importantes informações para o desenvolvimento de novos inibidores específicos de SAMS de invertebrados. O'REILLY e colaboradores (2013) utilizaram modelos homólogos do canal de sódio de importantes parasitos da agropecuária como *Tetranychus urticae* (ácaro rajado parasito de várias culturas com algodoeiro, morangueiro, roseira, tomateiro, feijoeiro, soja, pessegueiro etc), *Varroa destructor* (ácaro parasito de colméias) e *R. microplus*, obtidos a partir da estrutura tridimensional do canal de sódio de *Musca domestica*, para avaliar a interação de análogos de acaricidas comerciais, obtendo resultados que contribuíram para o entendimento da interação inseticida versus alvo.

Nesse contexto, a modelagem por homologia é o método mais bem sucedido de predição de estruturas de proteínas ainda não cristalografadas, sendo uma alternativa versátil e rápida para gerar modelos estruturais confiáveis os quais são utilizados tanto para o estudo da função de proteínas quanto para a descoberta, planejamento e otimização de novos fármacos (DEANE & BLUNDELL, 2003; WATSON et al., 2007; CAVASOTTO & PHATAK, 2009). As estruturas cristalografadas e os modelos gerados por modelagem por homologia são posteriormente utilizados em ensaios de docagem molecular para avaliar a interação destes receptores com os candidatos a fármacos.

1.7 Docagem Molecular

Os sítios ativos das enzimas exibem alta seletividade no reconhecimento de pequenas moléculas o que acaba direcionando as pesquisas para a busca de novos compostos que ativem ou bloqueiem determinada via bioquímica, exercendo assim um efeito farmacológico. Dentre as metodologias computacionais mais empregadas no estudo e planejamento de fármacos podemos

destacar o *docking* ou docagem molecular que busca auxiliar o entendimento da atividade biológica explicando e prevendo as interações entre o ligante e a macromolécula alvo de interesse terapêutico (TERAMOTO & FUKUNISHI, 2007).

A docagem molecular consiste na predição do posicionamento (orientação e conformação) de um ligante (fármaco ou candidato a fármaco) dentro de um sítio de interação alvo (KITCHEN et al., 2004). Com o aumento de demandas no campo da biologia molecular estrutural e na área de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor, a docagem ganhou grande importância, especialmente nas três últimas décadas. O rápido aumento na capacidade de cálculo dos processadores modernos e maior facilidade de acesso às estruturas de pequenas moléculas (ligantes) em bancos de estruturas foram determinantes para isso (MORRIS & LIM-WILBY, 2008).

A docagem necessita das informações químicas do ligante e do receptor o mais detalhado possível. A complementaridade estrutural e química desempenha um papel fundamental em decidir quais partes do ligante podem interagir com quais partes da proteína para formar um complexo funcional (KORTAGERE & EKINS, 2010). Para avaliar os resultados da docagem utilizam-se os valores da energia de interação do complexo ligante-proteína, da energia intramolecular do ligante ou constante de inibição (MAGALHAES; BARBOSA; DARDENNE, 2004).

Para a realização das docagens os softwares mais utilizados são o GOLD, o AutoDock, o DOCK e o EADock, que realizam a docagem automática de um ligante flexível no sítio ativo de uma macromolécula rígida (MORRIS et al., 1998; ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2009). Durante a interação biológica, tanto o ligante quanto o receptor adaptam suas conformações um com o outro. Esse fenômeno é chamado de encaixe induzido. Como consequência, algoritmos de docagem molecular devem trabalhar com a flexibilidade de ambas as moléculas. No entanto, levando em conta os graus de liberdade existentes no espaço conformacional, isso levaria a uma explosão combinatória de soluções, fazendo da docagem molecular uma operação extremamente demorada. Em decorrência disso, os softwares de docagem molecular trabalham atribuindo flexibilidade apenas ao ligante enquanto que o receptor é mantido rígido. Uma forma de resolver a limitação da rigidez da estrutura do alvo é combinar a estratégia de docagem molecular com simulações por dinâmica molecular (MORRIS & LIM-WILBY, 2008).

A simulação computacional faz uma busca dos diferentes modos de ligação adquiridos pelas múltiplas conformações do ligante dentro do sítio ativo do receptor e a afinidade de cada modo de ligação adquirida por cada conformação é feita por uma função matemática denominada de algorítmico genético, que faz a busca conformacional de encaixe e interação do ligante dentro do receptor (MORRIS et al., 1998; HUEY et al., 2007).

Os algoritmos genéticos, também conhecidos como evolucionários, são programados para usar o mesmo princípio da evolução biológica, tendo como base a explicação de Darwin para o processo de evolução natural das espécies. Um ser vivo é a unidade principal e fundamental de um algoritmo genético, pois estes podem codificar possíveis soluções para um determinado problema a ser analisado e solucionado na manipulação de suas características, através da transmissão genética (teoria da evolução) para seus descendentes. Dentro da simulação computacional de docagem, o arranjo de um ligante dentro de um receptor protéico pode ser definido por um conjunto de valores que descrevem a tradução, a orientação e a conformação do ligante com os resíduos de aminoácidos que interagem diretamente com o ligante no sítio ativo do receptor (KASTRITIS et al., 2013).

1.8 Dinâmica Molecular

Simulações por dinâmica molecular (DM) começaram a se popularizar na década de 1980 com os crescentes avanços na capacidade de processamento dos computadores. Sua principal aplicação é no estudo do movimento de proteínas e biopolímeros (SALSBURY JR, 2010). Fundamentada em princípios de mecânica clássica, a DM fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema (NAMBA et al., 2008).

O principal objetivo da DM é permitir correlacionar um sistema microscópico simulado com um sistema macroscópico real, tornando-se assim uma ferramenta útil no estudo das relações estrutura-atividade de macromoléculas biológicas, sistemas biológicos de interesse biomédico e planejamento racional de fármacos (ANDRUSIER et al., 2008; SALSBURY JR, 2010).

Apenas o resultado da conformação de menor energia livre de ligação obtido em um cálculo de docagem não nos dá informações suficientes sobre como esta interação se comporta, pois não nos traz nenhuma informação sobre sua dinâmica no meio biológico. Modelos em três dimensões nos trazem informações importantes a respeito de estruturas biológicas, porém quando são consideradas as possíveis interações com ligantes, a importante informação sobre a dinâmica dessa interação fica ausente, pois em um meio biológico quando um fármaco encontra seu alvo, este se encontra em constante movimento possuindo infinitas alterações conformacionais (DURRANT & MCCAMMON, 2011).

Em simulações de DM, a flexibilidade é atribuída também ao receptor, possibilitando uma amostragem das interações e da complementaridade ligante-receptor. Além disso, a incorporação de íons e moléculas de solvente nas simulações de sistemas receptor-ligante é essencial para uma caracterização mais aproximada do ambiente fisiológico (NAMBA et al., 2008).

1.9 Bioinformática e o desenvolvimento de novos alvos antiparasitários

A utilização de bioinformática para pesquisas de novos agentes antiparasitários já apresenta exemplos de sucesso. Nathan e colaboradores (2005) desenvolveram o modelo estrutural da glutathione-S-transferase (GST) de *Wuchereria bancrofti*, nematódeo causador da filariose em humanos, por modelagem por homologia e em seguida executaram a docagem molecular de metabólitos vegetais como curcumina e plumbagina. As docagens indicaram que estes compostos possuíam grande interação com os aminoácidos do sítio ativo da GST. Baseados nos resultados desse trabalho, Srinivasan e colaboradores (2009) testaram esses mesmos compostos sobre a GST isolada de *Setaria digitata*, como também avaliaram seu potencial antifilarial *in vitro*, onde os resultados obtidos nas docagens foram confirmados pelos testes, verificando-se inibição da GST e atividade antifilarial desses metabólitos sobre *S. digitata*, organismo modelo utilizado em ensaios que visam desenvolvimento de novos fármacos para filariose devido suas semelhanças biológicas com *Wuchereria bancrofti*.

Do mesmo modo, novos inibidores da enzima diidroorotato desidrogenase de *T. cruzi* foram identificados em testes de *screening* em bancos de dados *on line* e cuja interação foi verificada por docagem molecular e em seguida sua atividade biológica confirmada em testes *in vitro* (Cheleski et al., 2010). Rocha (2010) também utilizou docagem molecular para identificar novos inibidores da enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi*, onde as moléculas selecionadas na docagem apresentaram excelente efeito de inibição *in vitro*.

Quinonas foram avaliadas por docagem molecular para seleção de novos inibidores da enzima tripanotiona redutase de *T. cruzi* e validadas por dinâmica molecular, onde foi observado que as quinonas mantiveram-se interagindo com os aminoácidos do sítio ativo durante toda a simulação, dando embasamento para novos fármacos de origem vegetal contra *T. cruzi* (Molfetta et al., 2010).

As estruturas das AChEs do ácaro *Varroa destructor* (VdAChE), parasito de colméias de abelhas e da abelha *Apis mellifera* (AmAChE) foram desenvolvidos por modelagem por homologia. Verificou-se que as estruturas possuíam diferenças consideráveis e os resultados da docagem demonstraram forte interação da molécula candidata a acaricida com a VdAChE e pouca interação com AmAChE. Em seguida, testes *in vitro* demonstraram inibição da atividade da VdAChE e nenhum efeito sobre a AmAChE, como também 100% de mortalidade do ácaro nos testes *in vivo*, sendo inofensivo às abelhas (Dulin et al., 2014). Todos esses dados reforçam a grande relação entre ensaios *in silico*, *in vitro* e *in vivo* para a identificação e desenvolvimento de novos pesticidas.

No presente trabalho empregamos ferramentas de bioinformática para avaliar a interação de terpenos identificados como constituintes dos óleos essenciais de *Citrus* spp. e *Lippia* spp. que

possuem conhecida atividade carrapaticida sobre a acetilcolinesterase do carrapato bovino *R. microplus*.

2. Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

Selecionar terpenos com potencial atividade sobre o modelo da acetilcolinesterase de *Rhipicephalus microplus*.

2.2 – Objetivos Específicos

- Identificar as propriedades químicas e físico-químicas dos terpenos que possam ser mais eficazes no receptor da acetilcolinesterase do carrapato *R. microplus* através de química quântica;
- Desenvolver análise quimiométrica dos terpenos selecionados;
- Realizar cálculos de docagem molecular dos terpenos para verificar quais destes podem ser considerados potenciais produtos carrapaticidas;
- Realizar simulações de dinâmica molecular das interações obtidas nas docagens para verificar como essas interações se comportam.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, M.; ARELLANO-SOTA, C.; CERESER, V. H.; CORDOVES, C. O.; GUGLIELMONE, A. A.; KESSLER, R.; MANGOLD, A. J.; NARI, A.; PATARROYO, J. H.; SOLARI, M. A.; VEJA, C. A.; VIZCAÍNO, O.; CAMUS, E. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Revue Scientifique et Technique Office International des Épizooties*, Paris. v. 11, n. 3, p. 713–733, 1992.
- ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2010. 36 p. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, 180). Disponível em: <<http://www.cnpge.embrapa.br/publicacoes/doc/DOC180.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2013.
- ANDRUSIER, N.; MASHIACH, E.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. Principles of flexible protein–protein docking. *Proteins*, v. 73, p. 271–289, 2008.
- ARAUJO, L. X. et al. Acaricidal activity of thymol against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under semi-natural conditions. *Parasitology Research*. DOI 10.1007/s00436-015-4547-3, 2015.
- ASSIS LAGE, T. C. DE et al. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, v. 148, p. 24–29, 2015.
- AYGUN, D.; DOGANAY, Z.; ALTINTOP, L.; GUVEN, H.; ONAR, M.; DENIZ, T.; SUNTER, T.; Serum acetylcholinesterase and prognosis of acute organophosphate poisoning. *Journal of Toxicology – Clinical Toxicology*, Nova Iorque, v. 40, n. 7, p. 903–910, 2002.
- BARRETT, M.P.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. *Trends Microbiol.* v. 7, p. 82–88, 1999.
- BAXTER, G.; BARKER, S. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *Boophilus microplus*: characterisation and role in organophosphate resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, Oxford, v. 28, n. 8, p. 581–589, 1998.
- BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, G.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, Londres, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BLENAU, W.; RADEMACHER, E.; BAUMANN, A. Plant essential oils and formamidines as insecticides/ acaricides: what are the molecular targets? *Apidologie*, Paris, v. 43, n. 3, p. 334–347, 2012.
- BLOOMQUIST, J.R. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Archives of insect biochemistry and physiology*, Nova Iorque, v. 54, n. 4, p. 145–156, 2003.
- BMC Biology*, v. 9, p. 1–9, 2011.
- BORGES, L. M. F.; SOARES, S. F.; FONSECA, I. N.; CHAVES, V. V.; LOULY, C. C. B. Resistência acaricida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de Goiânia–GO, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, Goiânia, v. 36, n. 1, 87–95, 2007.
- BOTTEON, P.T.L.; BOTTEON, R.C.C.M.; SARTORI, F. Cólica em equinos associada ao uso de amitraz. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.20, p.219–220, 1998.

- BRUHN, J. G. The use of natural products in modern medicine. *Acta pharmaceutica nórdica*, Estocolmo, v. 1, n. 1, p. 117–130, 1989.
- CAMPÊLO, L. M. L. **Avaliação farmacológica do óleo essencial de Citrus limon (Burm) no Sistema Nervoso Central: Um estudo comportamental, histológico e neuroquímico.** 151 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Piauí, 2011.
- CAVASOTTO, C. N.; PHATAK, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discovery Today*, Oxford, v. 14, n. 13–14, p. 1–8, 2009.
- CHAGAS, A. C. S.; BARROS, L. D.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA M.C.S.; BIZZO, H.R. *In vitro* efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, Berlin, v. 110, n. 1, p. 295–303, 2012.
- CHELESKI, J. et al. Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 12, p. 5899–5909, 2010.
- CHOU, K.C. Structural bioinformatics and its impact to biomedical science. *Current medicinal chemistry*, Schiphol, v. 11, n. 16, p. 2105–2134, 2004.
- COHEN, N. C.; BLANEY, J. M.; HUMBLET, C.; GUND, P.; BARRY, D. C. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. *Journal of medicinal chemistry*, Washington, v. 33, n. 3, p. 883–94, 1990.
- CORLEY, S. W.; JONSSON, N. N.; PIPER, E. K.; CUTULLÉ, C.; STEAR, M. J.; SEDDON, J. M. Mutation in the Rm β AOR gene is associated with amitraz resistance in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. Washington, v. 110, n. 42, p. 16772–16777, 2013.
- CRUZ, E. M.; COSTA-JUNIOR, L. M.; PINTO, J. A.; SANTOS, D. D.; ARAUJO, S. A.; ARRIGONI-BLANK, M. D.; BACCI, L.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S.C.; BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 195, n. 1–2, p. 198–202, 2013.
- DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; ROSA, L. S.; CLEMENTE, M. A. ARCOVERDE, A. Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, Berlin, v. 105, n. 2, p. 495–497, 2009.
- DEANE, C.M.; BLUNDELL, T. L. Protein homology modelling and drug discovery. In: WERMUTH, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. London, Elsevier Academic Press, p. 445–458, 2003.
- DEANE, C.M.; BLUNDELL, T. L. Protein homology modelling and drug discovery. In: WERMUTH, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. London, Elsevier Academic Press, p. 445–458, 2003.
- DEWITT, S. H. Molecular Diversity Strategies. *Pharmaceutical News*, Boston, v. 1, n. 4, 11–14, 1994.
- DULIN, F. et al. Protecting honey bees: identification of a new varroacide by in silico, *in vitro*, and *in vivo* studies. *Parasitology Research*, v. 113, n. 12, p. 4601–4610, 2014.
- DURRANT, J.D., MCCAMMON, J.A. Molecular dynamics simulations and drug discovery.

- ESPINOZA, B.; TARRAB-HAZDAI, R.; HIMMELOCH, S.; ARNON, R.; Acetylcholinesterase from *Schistosoma mansoni*: immunological characterization. *Immunol Lett.* v. 28, p. 167–174, 1991.
- ESTRADA-PENÑA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER, A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental & applied acarology*, Amsterdam, v. 38, n. 2–3, p. 219–235, 2006.
- FERNANDEZ-SALAS, A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; ALONSO-DÍAZ, M. A. Resistance of *Rhipicephalus microplus* to Amitraz and Cypermethrin in Tropical Cattle Farms in Veracruz, Mexico. *Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 98, n. 5, p. 1010–1014, 2012.
- FOIL, L. D.; COLEMAN, P.; EISLER, M.; FRAGOSO-SANCHEZ, H.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; GUERRERO, F. D.; JONSSON, N. N.; LANGSTAFF, I. G.; LI, A. Y.; MACHILA, N.; MILLER, R. J.; MORTON, J.; PRUETT, J. H.; TORR, S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 125, n. 1–2, p. 163–181, 2004.
- Food and Agricultural Organization. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants: Guidelines. [homepage]. Local: FAO. 2004. Available from: <http://www.fao.org/ag/aga.html>.
- FOURNIER, D.; MUTERO, A.; RUNGGER, D. *Drosophila* acetylcholinesterase – expression of a functional precursor in *Xenopus* oocytes, *European journal of biochemistry*, Berlin, v. 203, n.3, p. 513–519, 1992.
- GASTEIGER, J. Chemoinformatics: a new field with a long tradition. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Heidelberg, v. 384, n. 1, p. 57–64, 2006.
- GEARY, T.; THOMPSON, D.; KLEIN, R. Mechanism based screening: discovery of the next generation of anthelmintics depends on more basic research. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v. 29, n. 1, p. 105–112, 1999.
- GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance. In: BOWMAN, A. S.; NUTTALL, P. A. Ticks: biology, disease and control. Cambridge, UK: Cambridge University Press, p.415–416, 2008.
- GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminthes in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 139, n. 4, p. 308–320, 2006.
- GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1647 p.
- GRAF, J. F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G. A.; MOLENTO, M. B.; BORDIN, E. L.; ARANTES, G. J. Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, Londres, v.129, p. 427–442, 2004.
- GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária*, v. 23, n. 2, p. 150–6, 2014.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.
- GUPTA, Ramesh C. Amitraz. In: *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. 2nd edn, (Ed) R.C. Gupta, Academic Press/Elsevier, Amsterdam, pp. 559–604, 2012.
- HAMMAMI, R.; FLISS, I. Current trends in antimicrobial agent research: chemo- and bioinformatics approaches. *Drug Discovery Today*, Oxford, v. 15, n. 13–14, p. 540–546, 2010.
- HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Veterinary research communications*, Dordrecht v. 21, n. 3, p. 213–228, 1997.
- HE, H.; CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W.; GEORGE, J. E. Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochemical and biophysical research communications*, Nova Iorque, v. 261, n. 3, 558–561, 1999.
- HERNANDEZ, R.; HE, H.; CHEN, A.; IVIE, G.; GEORGE, J.; WAGNER, G. Cloning and sequencing of a putative acetylcholinesterase cDNA from *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 36, n. 6, p. 764–770, 1999.
- HUANG, H.; YU, H. W.; CHEN, C.; HSU, C.; CHEN, H.; LEE, K.; TSAI, F.; CHEN, C. Y. C. Current developments of computer-aided drug design. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 41, n. 6, p. 623–635, 2010.
- HUEY, R.; MORRIS, G.M.; OLSON, A.J.; GOODSSELL, D.S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*. Malden, v. 28, n. 6, p. 1145–52, 2007.
- JOHNSON, N. N.; CUTULLÈ, C.; CORLEY, S. W.; SEDDON, J. M. Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* associated with resistance to flumethrin but not to cypermethrin. *International Journal for Parasitology*, Nova Iorque, v. 40, n. 14, p. 1659–1664, 2010.
- JOHNSTON L, A.Y.; KEMP D. H.; PEARSON R.D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology*, Nova Iorque, v. 16, n. p. 27–34. 1986.
- JONSSON, N. N.; HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 146, n. 3–4, 193–198, 2007.
- KASTRITIS, P. L.; VISSCHER, K. M.; DIJK, D. J. V.; BONVIN, A. M. J. J. Solvated protein-protein docking using kyte-doolittle-based water preferences. *Proteins*, Nova Iorque, v. 81, n. 3, p. 510–518, 2013.
- KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J.; BAJORATH, J. Docking and Scoring In Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nature reviews drug discovery*, Londres, v. 3, n. 11, p. 935 – 949, 2004.
- KLAFKE, Guilherme Marcondes. **Diagnóstico e mecanismos de resistência a ivermectina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)**. 176f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, 2011.
- KORTAGERE, S.; EKINS, S. Troubleshooting computational methods in drug discovery. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, Nova Iorque, v. 61, n. 2, p. 67–75, 2010.

KRASKY, A.; ROHWER, A.; SCHROEDER, J.; SELZER, P. M. A combined bioinformatics and chemoinformatics approach for the development of new antiparasitic drugs. *Genomics*, San Diego, v. 89, n. 1, p. 36–43, 2007.

LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B.; OLIVEIRA, P. R.; MONTEIRO, A. M. F.; CAETANO JÚNIOR, J. *In vitro* susceptibility of engorged females from different populations of *Boophilus microplus* to commercial acaricides. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 4, n. 2, p. 283–294, 1995.

LI, A. Y. Status of resistance to acaricides in Mexican strains of the Southern cattle Tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Resistance Pest Management Newsletter*. v.13, n.2 p. 7–12, 2004.

LI, A. Y.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J.; GEORGE, J. E. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 41, n. 2, p. 193–200, 2004.

LINARES, G. E.; RAVASCHINO, E. L.; RODRIGUEZ, J. B. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Current medicinal chemistry*, Schiphol, v. 13, n. 3, p. 335–360, 2006.

LOVIS, L.; GUERRERO, F. D.; MILLER, R. J.; BODINE, D. M.; BETSCHART B.; SAGER, H. Distribution patterns of three sodium channel mutations associated with pyrethroid resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from North and South American, South Africa and Australia. *International Journal for Parasitology–Drugs and drug resistance*. Nova Iorque, v. 2, p. 216–224, 2012.

LOVIS, L.; REGGI, J.; BERGGOETZ, M.; BETSCHART, B.; SAGER, H. Determination of acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) field populations of Argentina, South Africa, and Australia with the Larval Tarsal Test. *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 50, n. 2, p. 326–335, 2013.

LUNDSTROM, K. Structural genomics: the ultimate approach for rational drug design. *Molecular biotechnology*, Totowa, v. 34, n. 2, p. 205–12, 2006.

MA, D. L.; CHAN, D. S. H.; LEE, P.; KWAN, M. H. T.; LEUNG, C. H. Molecular modeling of drug–DNA interactions: Virtual screening to structure–based design. *Biochimie*, Paris, v. 93, n. 8, p. 1252–1266, 2011.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA–JR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química nova*, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAGALHÃES, C. S., BARBOSA, H. J. C., DARDENNE, L. E. A Genetic Algorithm for the Ligand-Protein Docking Problem, *Genetics and Molecular Biology*. v. 27, n. 4, p. 605–610 2004.

MARTINS, A. J.; VALLE, D. The Pyrethroid Knockdown Resistance, *Insecticides–Basic and Other Applications*, Dr. Sonia Soloneski (Ed.), ISBN: 978–953–51–0007–2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-basic-and-other-applications/the-pyrethroid-knockdownresistance>

MILLARD, C. B.; BROOMFIELD, C. A. Anticholinesterases: Medical applications of neurochemical principles. *Journal of neurochemistry*, Oxford, v. 64, n. 7, p.1909–1918, 1995.

MILLER, R. J.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 36, n. 5, p. 533–538, 1999.

MOLFETTA, F. A. DE et al. Docking and molecular dynamics simulation of quinone compounds with trypanocidal activity. *Journal of Molecular Modeling*, v. 15, n. 10, p. 1175–1184, 2009.

- MONTEIRO, C. M.; DAEMON, E.; CLEMENTE, M. E.; ROSA, L. S.; MATURANO, R. Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, Berlin, v. 105, n. 4, p. 1093–1097, 2009.
- MORGAN, J. A.; CORLEY, S. W.; JACKSON, L. A.; LEW–TABOR, A. E.; MOOLHUIJZEN, P. M.; JONSSON, N. N. Identification of a mutation in the para–sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricides. *International Journal for Parasitology*, Nova Iorque, v. 39, n. 7, p. 775–779, 2009.
- MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*. Malden, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998.
- MORRIS, G.M.; LIM–WILBY, M. Molecular docking. In: KUKOL, A. Molecular Modeling of Proteins, Totowa, Humana Press, p. 365–82, 2008.
- MORRIS, G.M.; LIM–WILBY, M. Molecular docking. In: KUKOL, A. Molecular Modeling of Proteins, Totowa, Humana Press, p. 365–82, 2008.
- NAMBA, A.M., SILVA, V.B., SILVA, C.H.T.P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*. v. 33, p. 13-24, 2008.
- NARAHASHI, T.; ZHAO, X.; IKEDA, K.; YEH, J. Z. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Human Experimental Toxicology*, Basingstoke, v. 26, n. 4, p. 361–366, 2007.
- NATHAN, S. T. et al. 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, n. 3, p. 194–199, 2005.
- NAYEEM, A.; SITKOFF, D.; JUNIOR, S. K. A comparative study of available software for high accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. *Protein Science*. Nova Iorque, v. 15, n. 4, p. 808–824, 2006.
- OPREA, T. I. Chemoinformatics in drug discovery. Weinheim: Wiley–VCH, 2005. 493 p.
- O'REILLY, A. O.; WILLIAMSON, M. S.; GONZÁLEZ–CABRERA, J.; TURBERG, A.; FIELD, L. M.; WALLACE, B. A.; DAVIES, T. G. Predictive 3D modelling of the interactions of pyrethroids with the voltage–gated sodium channels of ticks and mites. *Pest management science*, West Sussex, v. 70, n. 3, p. 369–377, 2013.
- PADUCH, R.; KANDEFER–SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* Warsaw, v. 55, n. 5, p. 315–327, 2007.
- PANG, T. Impact of pharmacogenomics on neglected diseases of the developing world. *American journal of pharmacogenomics*, Auckland, v. 3, n. 6, p. 393–8, 2003.
- PEIXOTO, M. G. et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 210, n. 1-2, p. 118–122, 2015.
- PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: Med Vet Livros, 2008. p. 15–55.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. *Plant physiology*, Lancaster, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.

- POWELL, R.; REID, T. Project tick control. *Queensland Agricultural Journal*. Queensland, v. 108, n.6, p. 279–300.1982.
- PRANCE, G. T. What is ethnobotany today? *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 32, n. 1–3, p. 209–216, 1991.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. Farmacologia. Elsevier, 7^a ed. 2012.
- RATTAN, Rameshwar S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, v. 29, n. 9, p. 913–920, 2010.
- RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; DOS SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 201, n. 1–2, p. 128–136, 2014.
- RING, C. S.; SUN, E.; MCKERROW, J. H.; LEE, G. K.; ROSENTHAL, P. J.; KUNTZ, I. D.; COHEN, F. E. Structure-based inhibitor design by using protein models for the development of antiparasitic agents. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. Washington, v. 90, n. 8, p. 3583–3586, 1993.
- ROCHA, JOSMAR RODRIGUES. Planejamento de inibidores das enzimas Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e Diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado em Físico-Química). Universidade de São Paulo. 2010. 132 p.
- ROMA, G. C.; DE OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Determination of LC(50) of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, Amsterdam, n. 123, n. 3, p. 269–272, 2009.
- ROMANII, R.; ANTOGNELLI, C.; BALDRACCHINI, F.; de SANTIS, A.; ISANI, G.; GIOVANNINI, E.; ROSI, G. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chemico-Biological Interactions*, Amsterdam, v. 145, n. 3, p. 321–329. 2003.
- ROSARIO-CRUZ, R.; GUERRERO, F. D.; MILLER, R. J.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; TIJERINA, M.; DOMINGUES-GARCIA, D. I.; HERNANDEZ-ORTIZ, R.; CORNEL, A. J.; MCABEE, R. D.; ALONSO-DIAZ, M. A. Molecular survey of pyrethroid resistance mechanisms in Mexican field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitology Research*, Berlin, v.105, n.4, p.1145–1153, 2009.
- ROSENBERRY, T. L. Acetylcholinesterase. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, Nova Iorque, v. 43, n. 1, p. 103–218, 1975.
- RUSSELL, R. J.; CLAUDIANOS, C.; CAMPBELL, P. M.; HORNE, I.; SUTHERLAND, T. D.; OAKESHOTT, J. G. Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, San Diego, v. 79, n. 3, 84–93, 2004.
- SALSBURY JR, F.R. Molecular dynamics simulations of protein dynamics and their relevance to drug discovery. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 10, p. 738-744, 2010.
- SELZER, P. M.; BRUTSCHE, S.; WIESNER, P.; SCHMID, P.; MÜLLNER, H. Target-based drug discovery for the development of novel anti-infectives. *International journal of medical microbiology*, Stuttgart, v. 290, n. 2, p. 191–201, 2000.
- SHOOP, W. L.; MROZIK, H.; FISHER, M. H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 139–156, 1995.

SINGH, K.; SINGH, D. K. Toxicity to the snail *Limnaea acuminata* of plant-derived molluscicides in combination with synergists. *Pest Management Science*, West Sussex, v. 56, n. 3, p. 889–898, 2000.

SINGH, N. K.; RATH, S. S. Esterase mediated resistance against synthetic pyrethroids in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Punjab districts of India. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 204, n. 3–4, p. 330–338, 2014.

SPAGNOL, F. H.; PARANHOS, E. B.; ALBUQUERQUE, G. R.; Avaliação in vitro da ação sobre o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Canestrini, 1887 (Acari: ixodidae) de bovinos leiteiros no município de Itamaraju, Bahia, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*. Goiânia, v. 11, n. 3, p. 731–736, 2010.

SRINIVASAN, L.; MATHEW, N.; MUTHUSWAMY, K. In vitro antifilarial activity of glutathione S-transferase inhibitors. *Parasitology Research*, v. 105, n. 4, p. 1179–1182, 2009.

SUTHERLAND D.; MCCLELLAN JS.; MILNER D.; SOONG W.; AXON N.; SANDERS M.; HESTER A.; KAO YH.; POZATEK T.; ROUTT S.; PEZZEMENTI L. Two cholinesterase activities and genes are present in amphioxus. *Journal of experimental zoology*, Filadélfia, v. 277, n. 3, 213–229, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia vegetal*. Artmed, Porto Alegre, RS, p. 309–332, 2004.

TAKEDA–SHITAKA, M.; TAKAYA, D.; CHIBA, C.; TANAKA, H.; UMEYAMA, H. Protein structure prediction in structure based drug design. *Current medicinal chemistry*, Schiphol, v. 11, n. 5, p. 551–558, 2004.

TEMEYER, K.; DAVEY, R.; CHEN, A. Identification of a third *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cDNA presumptively encoding an acetylcholinesterase. *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 41, n. 3, p. 259–268, 2004.

TERAMOTO, R.; FUKUNISHI, H. Supervised consensus scoring for docking and virtual screening. *Journal of chemical information and modeling*, Washington, v. 47, n. 2, p. 526–34, 2007.

TOUTANT, J. P. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms, *Progress in neurobiology*, Oxford, v. 32, n. 6 423–446, 1989.

VILLARINO, M. A.; WAGHELA, S. D.; WAGNER, G. G. Histochemical localizations on esterases in integument of the female *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Tick. *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 38, n. 6, p. 780–782, 2001.

WATSON, J. D.; SANDERSON, S.; EZERSKY, A.; SAVCHENKO, A.; EDWARDS, A.; ORENGO, C.; JOACHIMIAK, A.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. Towards Fully Automated Structure-based Function Prediction in Structural Genomics: A Case Study. *Journal of molecular biology*, Londres, v. 367, n. 5, p. 1511–22, 2007.

WATSON, J. D.; SANDERSON, S.; EZERSKY, A.; SAVCHENKO, A.; EDWARDS, A.; ORENGO, C.; JOACHIMIAK, A.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. Towards Fully Automated Structure-based Function Prediction in Structural Genomics: A Case Study. *Journal of molecular biology*, Londres, v. 367, n. 5, p. 1511–22, 2007.

WATSON, J. D.; SANDERSON, S.; EZERSKY, A.; SAVCHENKO, A.; EDWARDS, A.; ORENGO, C.; JOACHIMIAK, A.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. Towards Fully Automated Structure-based Function Prediction in Structural Genomics: A Case Study. *Journal of molecular biology*, Londres, v. 367, n. 5, p. 1511–22, 2007.

WERMUTH, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry. 2 ed, 2003.

- WILLCOX, M. L.; COSENTINO, M. J.; PINK, R.; BODEKER, G.; WAYLING, S. Natural products for the treatment of tropical diseases. *Trends in parasitology*, Oxford, v. 17, n. 2, p. 58–60, 1997.
- WILLIAMS, C. H.; HONG, C. C. Multi-step usage of in vivo models during rational drug design and discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, Basileia, v. 12, n. 4, p. 2262–74, 2011.
- WINK, M.; SCHIMMER, O. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites. In: Wink, M. (Ed.), *Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology*. Annual Plant Reviews No. 3. Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 17–133.
- WU, C. H.; APWEILER, R.; BAIROCH, A.; NATALE, D. A.; BARKER, W. C.; BOECKMANN, B.; FERRO, S.; GASTEIGER, E.; HUANG, H.; LOPEZ, R.; MAGRANE, M.; MARTIN, M. J.; MAZUMDER, R.; O'DONOVAN, C.; REDASCHI, N.; SUZEK, B. The Universal Protein Resource (UniProt): an expanding universe of protein information. *Nucleic Acids Research*, Londres, v. 34, p. 187–191, 2006.
- XIANG, Z. Advances in homology protein structure modeling. *Current Protein & Peptide Science*, Flórida, v. 7, n. 3, p. 217–27, 2006.
- ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. *Journal of cellular and molecular medicine*, Bucharest v. 13, n. 2, p. 238–248, 2009.

Artigo submetido para a revista The Journal of Physical Chemistry B

Fator de Impacto: 3.187

New candidate acaricidal terpenes acting against acetylcholinesterase models of *Rhipicephalus microplus*: A theoretical investigation

Alberto Jorge Oliveira Lopes¹, Francisco das Chagas Alves Lima^{2*}, Ricardo Martins Ramos^{3,2*}, Kevin B. Temeyer⁴, Adalberto A. Pérez de León⁴ and Livio Martins Costa Junior¹

¹Animal Parasitology Laboratory, Biological and Health Science Center, Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, 65080-805, Brazil.

²Computational Quantum Chemistry and Drug Planning Laboratory, Department of Chemistry, Environment Sciences Center, State University of Piauí, Teresina, PI, 64002-150, Brazil.

³Research in Information Systems Laboratory, Department of Information, Environment, Health and Food Production, Federal Institute of Piauí, Teresina, PI, 64002-370, Brazil.

⁴Knipling-Bushland U.S. Livestock Insects Research Laboratory and Veterinary Pest Genomics Center, United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service, Kerrville, TX 78028, United States of America.

*Corresponding authors:

Prof. Francisco das Chagas Alves Lima, PhD

Rua João Cabral, 2231 - Pirajá, Teresina - PI, 64002-150

+5586994288638

fdcalima@gmail.com

Prof. Ricardo Martins Ramos, PhD

Praça da Liberdade, 1597 - Centro, Teresina - PI, 64002-370

+5586994421780

ricardo@ifpi.edu.br

Abstract

The tick *Rhipicephalus microplus* is the major cattle ectoparasite of the world. Control is difficult due to development of tick resistance to all available chemical acaricides. Acaricide activity of terpenes has been evaluated by several studies indicating that these compounds are potential sources for new acaricide products, but have not elucidated the mode of action of these compounds. We have applied homology modeling, molecular docking, molecular dynamics (MD) simulations and DFT calculation to study the interaction of 27 terpenes and coumaphos in models of acetylcholinesterase (AChE) 1, 2 and 3 from *R. microplus*. The results showed that gamma-murolene exhibits better binding energies in three models of RmAChE evaluated, being higher than the acaricide coumaphos in RmAChE 2 and 3. Elemol also showed that good binding energy results compared to other terpenes. Carvacrol and thymol isomers have known acaricidal activity and showed close values of binding energy, but carvacrol performed a higher number of hydrophobic interactions and was more solvated in DMSO. The simulation indicated that thymol moved away from the active site region in RmAChE 1 and 3 models, while other compounds continued performing interactions with the same amino acids identified in docking. Gamma-murolene and elemol are predicted in this study as potential new acaricides. Further, activity of the terpene carvacrol appears to be associated with its interaction with RmAChEs, while isomers of thymol are not predicted to inhibit these same enzymes.

Keywords: Acetylcholinesterase, *Rhipicephalus microplus*, terpenes, Docking, Molecular dynamics simulations, quantum chemical descriptors

Introduction

The southern cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae), is considered the most harmful ectoparasite of livestock globally having its most significant economic impact on cattle production in tropical and subtropical regions directly as an obligate blood feeder and indirectly as the vector of *Anaplasma marginale* that causes anaplasmosis, and *Babesia bovis* and *B. bigemina*, which cause bovine babesiosis.¹⁻³ Synthetic chemicals with acaricidal properties have been developed in commercial formulations that farmers use intensively for *R. microplus* control. However, the prevalence of resistance to all synthetic compounds commercially available continues to expand among *R. microplus* populations.⁴⁻¹²

Major mechanisms involved in the resistance to acaricides in *R. microplus* populations include target site insensitivity and metabolism/detoxification processes. Phenotypic resistance in the *R. microplus* to organophosphate acaricides appears to involve target site insensitivity and metabolic processes.^{10,11,13-15} Efforts to ascertain the mode of action and selectivity of candidate acaricidal compounds, including the analysis of natural products or other chemical entities through computational approaches,¹⁶⁻¹⁸ as early as possible will help optimize the product development process, among other things, by minimizing the risk for cross-resistance with commercially available classes of acaricides used for *R. microplus* control.

A particularity of the *R. microplus* is the multiple isoforms of acetylcholinesterase (AChE) detected thus far. Five AChE isoforms were documented biochemically,¹⁹ transcriptomic sequences for seven putative AChEs were reported²⁰ and three recombinant and biochemically active AChEs from *R. microplus* (RmAChE) have been produced.²¹ Acaricidal organophosphates, such as coumaphos, compete with acetylcholine for binding at the active site of AChE in the *R. microplus*, which decreases neurotransmitter hydrolysis and results in the accumulation of acetylcholine at toxic levels that cause tick paralysis and death.^{22,23} Research involving computational approaches offer the possibility to identify

and prioritize safer substances to a specific target,^{24,25} such RmAChE, which might identify and enable novel modes of AChE inhibition to overcome organophosphate resistance and mitigate the toxicity of organophosphates on non-target organisms.

Natural products are a cornucopia of chemical entities that can be utilized to discover new bioactive substances, including those with acaricidal activity.²⁶⁻³⁰ Several plant species are the source of essential oils, where the terpenes are major constituents that are used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries.³¹ Research results have documented the acaricidal activity of terpenes^{16,32-36} and have indicated that computational and medicinal chemistry approaches can be applied to this class of chemicals to accelerate the discovery and prioritization of candidate compounds that could be developed^{37,38} and commercialized as safer and more specific products for *R. microplus* control. Essential oils containing terpenes have shown acaricidal effects, apparently mediating changes in neural mechanisms by acting on AChE, gamma-aminobutyric acid and glutamate-gated chloride channels, the voltage-gated sodium channel and octopamine or tyramine receptors.^{39,40} However, the specific mode of action of terpenes in several essential oils against *R. microplus* remains unclear.

The essential oils of *Lippia* spp. and *Citrus* spp. were shown to have acaricidal properties.^{34,36,41} Here, we applied computational protocols including quantum chemistry calculations, homology modeling, molecular docking, and molecular dynamics (MD) simulations to analyze the chemical and biological interactions of terpenes found in *Lippia* spp. and *Citrus* spp. essential oils against *R. microplus* AChE models. We hypothesized that this approach could identify terpenes with acaricidal potential against *R. microplus* to inform the identification of drug-like terpenes and their analogues to rationalize prioritization of candidate acaricides for *in vitro* and *in vivo* tests.

Methods

Terpene selection

Terpenes comprising $\geq 2\%$ of the chemical composition of essential oils from *Lippia* spp. or *Citrus* spp. were identified based on previous studies.^{34,36,41} Terpene isomers were classified into two categories according to the number of carbon atoms present in the molecular formula: (Category A) terpene isomers with 12 or 15 carbon atoms and (Category B) terpene isomers with 10 or 11 carbon atoms.

Predictive models and theoretical calculations

Terpene geometry, electronic and vibrational properties were studied using the program Gaussian 09.⁴² The program GaussView 5.0.8⁴³ was used to obtain 3D structural models. Geometric optimization calculations were performed according to the method of Density Functional Theory (DFT) by combining the B3LYP functional hybrid and the base set 6-31 ++ G (d, p). Frequency calculations were performed to obtain thermodynamic properties and to verify that each optimization achieved an energy minimum.

The quantum chemical descriptors extracted directly from the Gaussian output file were ChelpG charge, molecular volume (Mv), the energy of the highest occupied molecular orbital (E_{HOMO}) and the energy of the lowest unoccupied molecular orbital (E_{LUMO}). From these two orbital energies, the following descriptors were calculated: hardness, $\eta = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$; chemical potential, $\mu = -(E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}})/2$; electrophilicity, $\omega = \mu^2/(2\eta)$; ionization potential, $I = -E_{\text{HOMO}}$; electron affinity, $A = -E_{\text{LUMO}}$, and the electronegativity, $\chi = (I + A)/2$. (44,45). All calculations were performed in the gas phase and incorporated solvent effects dimethyl sulfoxide (DMSO) using the polarizable continuum model (PCM).⁴⁶⁻⁴⁸

The Gibbs energy of solvation (ΔG_{solv}) for coumaphos and some terpenes were determined using continuum solvation models (SMD) (49). The solvation Gibbs energy in SMD is calculated by equation (1)

$$\Delta G_{\text{solv}} = (E_{\text{solv}} + G_{\text{nes}}) - E_{\text{gas}} \quad (1)$$

where E_{solv} and E_{gas} are the respective electronic energies of the solute in the presence and absence of the solvent field and G_{nes} is the sum of non-electrostatic contributions to the solvation Gibbs energy such as cavitation and dispersion–repulsion interactions. The output of an SMD solvent-phase calculation encompasses $E_{\text{solv}} + G_{\text{nes}}$ such that ΔG_{solv} is defined at the reference state of 1 mol L⁻¹ (standard liquid reference state).

Homology modeling

The Protein Data Bank (PDB)⁵⁰ was searched for homologous protein structures using amino acid sequences publicly available in NCBI for RmAChE1, RmAChE2 and RmAChE3 (amino-acids sequences access code: CAA11702, ADM35952 and AAP92139, respectively). Structural models for RmAChEs were generated by homology modeling using the MODELLER 9.14^{51,52} (<http://salilab.org/modeller/>). The quality of homology models was evaluated using the programs according to the methodology described in the literature⁵³⁻⁵⁵ and Z-Score.^{56,57} An additional stage of model refinement of generated models was carried out using molecular dynamics (MD) simulations.

MD simulations of uncomplexed RmAChEs

MD simulations were done using GROMOS96 53a6 force field⁵⁸ implemented in GROMACS package,⁵⁹ version 4.6.7. All systems were simulated according to the methodology described in the literature.⁶⁰⁻⁶⁶ Systems charge totaled -21 for RmAChE1, -4 for RmAChE2, and 6 for RmAChE3. Sodium ions were added to neutralize the negative charges of systems for RmAChE1 and RmAChE2, and chloride ions were added to neutralize the positive charges in the RmAChE3 system. Simulations were performed for 60 nanoseconds (ns).

Docking protocol

All docking procedures utilized the Autodock 4.2 package.⁶⁷⁻⁶⁹ RmAChE1, RmAChE2 and RmAChE3 models and ligands were prepared for docking simulations with AutoDock Tools (ADT), version 1.5.6.⁷⁰ The docking methodology described in the literature were used.^{66,71-73} The grid box was centered on Trp97 for RmAChE1, Trp94 for RmAChE2, and Trp103 for RmAChE3. Initial coordinates of RmAChEs complexes for MD simulations were chosen using the criterion of lowest docking conformation of cluster with lowest energy combined with visual inspection. Thymol and carvacrol, two terpenes previously shown to be acaricidal³⁴ and the control compound coumaphos were subjected to MD simulations.

MD simulations of complexed RmAChEs

RmAChE-ligand complexes were subjected to MD simulations using GROMACS package, version 5.0.4. All MD simulations were run for 10 ns, the first 6 ns of each simulation was considered as part of the heating (0.025 ns) and the equilibration (5.975 ns) steps and were not used for data analysis. MD simulations between uncomplexed RmAChEs described above and RmAChE-ligand complexes were similar except that with the complexed enzyme systems: 1) each system was submitted to a maximum of 50.000 steps of steepest descent energy minimization; 2) the temperature of the system was based on two coupling groups (Protein_ligand and Water_and_ions) using V-rescale thermostat; 3) electrostatic interactions among non-ligand atoms were evaluated by the PME method with a charge grid spacing of 1.6 Å; and 4) pressure in the systems was weakly coupled to a pressure bath of 1 atm applying an isotropic scaling and 2 ps of relaxation time using the Parrinello-Rahman barostat.

To increase sampling, all RmAChE-ligand complex MD simulations were run thrice for 10 ns using different starting atomic velocities assuming a Maxwellian distribution. A total of forty-five simulations were performed. Data generated

during the last 4 nanoseconds of each simulation system, the period defined as the production stage, were used for analysis. A total of 123 snapshots, each taken every 100 ps, were obtained for each complex during the production stage. Where applicable, detailed interactions were calculated using the LigPlot+ program.⁷⁴ A minimum binding of 50% of contacts to hydrophobic interactions in the analyzed frames was established as the criterion for binding efficiency.⁶⁶

Results

Twenty-seven terpenes comprising at least 2% of the *Lippia* spp. or *Citrus* spp. essential oils were selected. The chemical structures of these terpenes and coumaphos are depicted in Figure 1. As shown in Figure 1, the terpenes exhibit different conformations, functional groups and several molecular formulas, C₁₀H₁₄, C₁₀H₁₆, C₁₀H₂₀, C₁₅H₂₄, C₁₀H₁₄O, C₁₀H₁₈O, C₁₀H₁₈O₂, C₁₁H₁₆O, C₁₂H₁₆O, C₁₅H₂₄O, while coumaphos has the molecular formula C₁₄H₁₆PSCl₅. We classified the isomers in two categories: Category A, the isomers C₁₅H₂₄, C₁₂H₁₆O, C₁₅H₂₄O; Category B, the isomers C₁₀H₁₄, C₁₀H₁₆, C₁₀H₂₀, C₁₀H₁₄O, C₁₀H₁₈O, C₁₀H₁₈O₂, C₁₁H₁₆O and coumaphos acaricide.

The calculated total electronic energies (E), relative energies (ΔE) and quantum chemical descriptors obtained by B3LYP method with 6-31++G** basis set for the compound of category A and B are shown in Table 1. The stability of a conformer is determined by its relative energy (ΔE) with respect to the most stable isomer. Four isomers have the molecular formula C₁₅H₂₄, of these, gamma-murolene is more stable than beta-elemene, bicyclogermacrene and beta-caryophyllene with higher relative energies of 22.87, 28.20 and 28.59 kcal/mol, respectively. The relative energy difference between spathulenol and caryophyllene oxide is 19.27 kcal/mol. Elemol and thymol acetate no have conformational isomer (Table 1).

Carvone, carvacrol and thymol have the molecular formula C₁₀H₁₄O. The ΔE values are very close with only 0.38 kcal/mol between carvone and carvacrol and 1.88 kcal/mol between carvone and thymol. The greatest ΔE for the isomers of category B were observed between alpha-terpinene and mircene (19.83 kcal/mol), alpha-terpinene and beta-pinene (21.14 kcal/mol), 1,8-cineole and cis-sabinenehydrate (13.32 kcal/mol), 1,8-cineole and linalool of 20.62 kcal/mol. The differences of energies are computed based on chemical structures observed in Figure 1.

Previous studies⁷⁵⁻⁷⁷ showed that the quantum chemical calculation could be helpful in evaluating the reaction activity of functional groups, so calculated the general molecular and geometrical descriptors of the terpenes and coumaphos (Table 1). These descriptors were very informative in this case, because according to the nucleophilic addition mechanism of the Schiff base, higher reactivity should match higher E_{LUMO} , lower ionization potential, and lower electronegativity (χ).⁷⁵

The molecular volume (Mv) was computed for the terpenes and coumaphos because that is an important physicochemical property that influences pharmacological interactions between small molecules and biological systems.⁷⁶ Ochoa et al.,⁷⁷ used this descriptor to suggest that the mechanism of action of terpenes and phenylpropanes might be related to an effect on the mycobacterial cell wall. In this work, the molecular volume of the coumaphos and terpenes show that in Table 1. The molecular volume of coumaphos was calculated at 264.944 cm³/mol, and is greater than all of the terpenes. The molecular volume of the terpenes in category A are more close to that of coumaphos than those terpenes in category B. The larger volumes were calculated for bicyclogermacrene, beta-caryophyllene, beta-elemene, caryophyllene oxide, gamma-murolene, and elemol with 203.58, 192.477, 188.185, 187.800, 186.421 and 184.896 cm³/mol, respectively. The terpenes in category B have a lower molecular volume than the terpenes in category A. Alpha-terpineneol (173.011 cm³/mol), linalool (162.556 cm³/mol), thymol methyl ether (161.075 cm³/mol), carvone

(152.265 cm³/mol). For isomers carvacrol and thymol the molecular volume calculated were 147.677 and 127.340 cm³/mol, respectively.

The HOMO energy calculated for coumaphos was -0.24477 (Hartree) and for terpenes the values obtained were between -0.20127 (hartree) higher energy for α -terpene and -0.26147 (hartree) lower energy for cis-sabinene hydrate. The Electron Affinity of the terpenes were computed between 0.27 eV (beta-pinene) and 1.83 eV (neral). These values were calculated as $A = -E_{\text{LUMO}}$. The hardness descriptor corresponds to the HOMO-LUMO gap. It is related to stability: a large hardness implies high stability for the molecule and thus low reactivity. The other quantum chemical descriptors are listed in Table 1.

The alignment between RmAChE 1, 2, and 3 showed a relatively low rate of conserved residues and similarity (Fig. S1 in Support Information section). Table S1 shows a low sequence identity of AChEs (42 to 46% for RmAChE1, 33 to 44% for RmAChE2 and 34 to 36% for RmAChE3) with crystallographic structures and information about the template structures used to construct models. In Table S2, the values of the analyzed parameters show good quality of the homology models. In order to avoid potential artifacts, an additional stage of model refinement was carried out using molecular dynamics simulation. One MD simulation with duration of 60 ns was carried out for RmAChE1, RmAChE2 and RmAChE3 with starting atomic velocities from a Maxwellian distribution. To ensure that the simulations were stable, some structural parameters were monitored during the course of the MD simulations, specifically, the atom-positional root-mean-square deviation (RMSD), the radius of gyration (Rg) and the total number of intramolecular hydrogen bonds (NHb-intra) (Fig S2). The stability of the systems was reached during the last 10 ns of the simulations. To facilitate the analysis and the comparison, the average values of these parameters in each system are shown in Table S3. The data show that considering each parameter independently, no significant variations were observed among the simulations.

The three RmAChEs structures (models refined through molecular dynamics simulations) have large structural and energy differences (Table S4). Fig. 2 shows the schematic representations of models after refinement for simulation DM. The structure with the lowest potential energy for each MD simulation was chosen for molecular docking and molecular dynamics simulations.

Docking studies yielded crucial information concerning the orientation of the molecule in the binding pocket of the enzyme and the interaction between the target (enzyme) and the small molecules (ligands) at the molecular level. Table 2 shows the results of docking of the terpenes and coumaphos with RmAChEs models. The lowest binding energy (ΔG_{bind}) between coumaphos and RmAChEs were observed in RmAChE1 (-7.55 Kcal/mol) and RmAChE2 (-7.76 Kcal/mol), while in RmAChE3 the binding energy calculated was -5.71 Kcal/mol. The inhibition constant (K_i) calculated for the complexes of coumaphos and RmAChE1, RmAChE2 and RmAChE3 were 2.94, 2.04 and 65.17 nM, respectively.

The molecular docking simulations of the 27 terpenes selected with RmAChEs shows greater selectivity for compounds of group A. In all systems, the gamma-murolene has the lowest binding energy. The lowest energy to this ligand is -8.82 (RmAChE2), a difference of 1.94 Kcal/mol (RmAChE1), and 2.46 Kcal/mol (RmAChE3). In the RmAChE1 docking model, elemol, caryophyllene oxide, thymol acetate, beta-elemene and beta-caryophyllene, category A terpenes have affinity parameters of binding energy (ΔG_{bind}) calculated at -6.75, -6.57, -6.43, -6.38, -6.29 Kcal/mol, respectively, and inhibition constant (K_i) 8.98, 11.27, 15.35, 19.47, 20.98 and 24.4 nM, respectively. For RmAChE2, the affinity parameters are gamma-murolene (-8.82 Kcal/mol), beta-elemene (-8.09 Kcal/mol) and elemol (-7.68 Kcal/mol). We can see that gamma-murolene and beta-elemene have binding energy and inhibition constant lower than

coumaphos. The RmAChE3 docking model shows the lowest binding energy for all studied molecules. However, the lower affinity parameters were gamma-murolene, beta-caryophyllene and elemol, respectively.

In RmAChE1, the terpenes in category A have higher affinity parameters when compared to the terpenes in category B, except for carvone, alpha-terpinenol, geranial and alpha-terpinene in RmAChE2, and terpinolene in RmAChE3. It can be seen that the lower binding energy and affinity constant values were obtained in RmAChE2. It is also noticed that gamma-murolene, elemol, beta-elemene, thymol acetate and beta-caryophyllene ranked consistently among the top five terpenes according to the results of affinity docking simulations for binding energy and inhibition constant.

However, for molecular dynamics simulations we chose gamma-murolene to exhibit the lowest free energy values and elemol also to generally exhibit relatively good binding energy in all three RmAChE models, thymol and carvacrol because these terpenes were previously shown to be acaricidal,³⁴ and coumaphos for the control compound.

Table S5 lists interactions to the conformations on molecular docking of carvacrol, thymol, elemol, gamma-murolene and coumaphos in all RmAChE models. In RmAChE1 the ligand-receptor interaction analyses suggest that carvacrol makes hydrophobic interactions with amino acids (Gln82, Val83, Leu84, Ser94, Thr95, Met96, Trp97, Asn98, Ala99, Ser139 and Thr141) and one hydrogen bond with Asp85. Thymol makes hydrophobic interactions with amino acids (Met96, Trp97, Val146, Tyr147, Gln443, Asn444, Gly463, Glu464 and Tyr472) and one hydrogen bond with Pro459. Gamma-murolene and elemol have very similar interactions with amino acids (Ser94, Trp97, Ser139, Tyr147, Glu215, Pro459 and Phe462), however, elemol shows one interaction hydrogen bond with Thr141. This amino acid shows hydrophobic interaction in gamma-murolene. The hydrophobic interactions observed in the coumaphos were (Gly93, Ser94, Thr95, Met96, Trp97, Gly135, Thr141, Glu215, Trp446, Gly455, Val458 and Pro459) and one hydrogen bond with Tyr147. In RmAChE2 hydrogen bonds is not observed for carvacrol and elemol, but is observed for thymol (Arg161) and coumaphos (Ser338, Asn339 and Tyr543). The hydrophobic interactions that are most repeated in terpenes are (Tyr160, Arg161, Gly166, Phe167, Asn177, Gly179, Leu180, Gln183, Ser215 and Leu313), and for coumaphos (Phe132, Ser210, Ile214, Gln235, Arg244, Gly300, Ser301, Thr333, Glu336, Gly337, Ile340, His456 and Glu459). In RmAChE3 the five ligand molecules make hydrophobic interactions with amino acids (Leu183, Met186, Lys187, Lys190, Ile215, His218, Gly226 and Phe228), and hydrogen bond with Leu227 (Carvacrol, thymol and coumaphos), His218 (Elemol) and Lys187 (coumaphos). Figure 3 shows the region of interaction inside of the active site and the main interaction of molecules with amino acid residues in the RmAChEs models. In RmAChE1 the elemol and gamma-murolene are very near to the coumaphos region, however, carvacrol and thymol are in opposition region inside of the active site (Figure 3A and 3B). The Figure 3C and 3D shows that carvacrol, thymol, elemol and gamma-murolene are in different regions in the active site compared to coumaphos in RmAChE2. Carvacrol, thymol, elemol, gamma-murolene and coumaphos are in the same region of the active site of the RmAChE3 (Figure 3E and 3F).

The gamma-murolene, elemol, carvacrol, thymol and coumaphos were chosen for more detailed analysis of interaction with the RmAChEs through molecular dynamics simulations. The lowest docking-energy conformation of the cluster with lowest energy was chosen as initial structure for the molecular dynamics simulations of the RmAChEs_ligands (terpenes or coumaphos) complexes. Figures S3, S4 and S5 shows the frequency of contacts of the ligands with the RmAChE1, RmAChE2 e RmAChE3, respectively.

Tight interactions were observed between coumaphos and RmAChE1 through hydrogen bonds and hydrophobic contacts (Trp97 - 89% probably residue of active site) (Fig. S3A). Thymol has hydrophobic interactions with frequency less than 50% (Lys477 - 13%, Glu474 - 11%, Ser442 - 10%, Cys471 - 9%, Arg440 - 9% and Thr16 - 8%), and the frequency of hydrogen bonds is also low (Val14 - 8% and Lys477 - 4%) (data not shown). Carvacrol interacted with

Trp97 (probable residue of the active site) with both hydrophobic contacts (65%) and hydrogen bonds (4.8%) (Fig. S3B). Elemol exhibited interaction through hydrophobic contacts (Tyr147 - 74%, Thr141 - 67%, Trp97 - 54%, Val458 - 52%, Pro459 - 52% and Ser139 - 51%) and hydrogen bonds (Tyr147 - 7%) (Fig. S3C). Compared to elemol, gamma-murolene (Figure S3D) showed far less hydrophobic contacts (Trp97 - 89% probable active site residue) and no hydrogen bonds.

Coumaphos also interacted with RmAChE2 (Figure S4A). Thymol showed results for RmAChE2 different from those noted above with RmAChE1 (Figure S4B), which may be due to structural and energetic changes between these isozymes, making hydrophobic contacts (including the Tyr160 with 100% frequency) and by hydrogen bonding (Arg161 - 89%). Both types of interactions were noted for carvacrol (Figure S4C). Elemol presented several hydrophobic interactions (His219 - 58%, probable residue of the active site) and two interactions by hydrogen bonds (His219 - Gly183 and 11% - 7%) (Figure S4D). As compared to its interaction with RmAChE1, Gamma-murolene exhibited to a greater number of hydrophobic interactions with RmAChE2 (Figure S4E).

Coumaphos interacted with RmAChE3 in fewer occasions as compared to the other two RmAChEs (Figure S5A). Thymol interacted with RmAChE3 through hydrophobic contacts, but all these occurred with a frequency of less than 50% (data not shown), and no hydrogen bonds were detected. Carvacrol (His218 and probable residue of the active site) and elemol exhibited hydrophobic and hydrogen bond interactions (Figure S5B and S5C, respectively), gamma-murolene exhibited hydrophobic interactions with RmAChE3 (Figure S5D). In general, with the exception of thymol, after 10 ns molecular dynamics simulation, gamma-murolene, elemol, carvacrol and coumaphos continued performing interactions with most of the amino acids identified in the molecular docking (Table S5).

Discussion

Dulin et al.,⁷⁸ found with use of computational protocols that the insecticide pirimicarb showed low affinity parameters with the AChE model from *Apis mellifera* bee, but showed high affinity parameters against AChE model from *Varroa destructor* acari, a parasite of colony bees. This finding was confirmed by authors using *in vitro* and *in vivo* tests, where pirimicarb proved to be efficient against *V. destructor* acari and inoffensive to *A. mellifera* bee.

Computational protocols were used to successfully select some molecules like tirofiban, a fibrinogen antagonist,⁷⁹ saquinavir, ritonavir and indinavir, drugs for the treatment of HIV,⁸⁰ dorzolamide, a carbonic anhydrase inhibitor⁸¹ and the antihypertensive drug, captopril.⁸² Results from these previous studies strongly support that computational protocols can be used to select molecules with pharmaceutical potential.

Terpenes are constituents of essential oils from several plant species that are known to have insecticidal and acaricidal activities, including biocidal properties against livestock pests.^{16,32-36} Acetylcholinesterase inhibition in the nervous system of arthropods and mammals is one of the possible modes of action reported for terpenes.⁸³ However, the results of attempts to correlate the toxicity of terpenes for insects and ticks with acetylcholinesterase inhibition are inconclusive.⁸⁴⁻⁸⁶

This gap in our knowledge was addressed in the reported series of experiments, and here where we integrated computational methods to try to understand the chemical biology of interactions between RmAChEs and terpenes, some of which were shown by our research group to be new acaricidal sources.^{34,36,41} The inclusion of the organophosphate acaricide coumaphos as part of the analyses validated the approach. This strategy also allowed the identification and prioritization of gamma-murolene, and elemol as candidate terpenes for further *in vitro* and *in vivo* studies.

Gamma-murolene is a sesquiterpene that forms part of various essential oils shown to have pesticidal activity against mosquitoes like *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*,⁸⁷⁻⁸⁹ the fly *Synthesiomyia nudiseta*,⁹⁰

beetles like *Bruchus dentipes*,⁹¹ and *R. microplus* populations resistant to several classes of acaricides.^{36,92} However, the results presented here constitute the first report of how gamma-murolene could exert acaricidal effects through the apparent inhibition of RmAChEs. As a significant component of the essential oil from *Cunninghamia konishii* (Taxodiaceae), gamma-murolene may also contribute to its insecticidal properties because the efficiency of the major compound isolated, alpha-pinene, against *A. aegypti* and *A. albopictus* was lower than the pure essential oil.⁹³ Although gamma-murolene was reported to act as a pheromone for the beetle *Scolytus multistriatus* *in vitro* tests, this effect was not observed under field conditions when gamma-murolene was tested alone or in combination with other terpenes.⁹⁴ In the case of the alfalfa wasp, *Bruchophagus roddi*, gamma-murolene strongly inhibited oviposition, which was reported to be due to antagonism of the insect nervous system.⁹⁵

Elemol has been shown to exhibit strong inhibition of AChE from bovine erythrocytes.⁹⁶ Peixoto et al.,³⁶ evaluated essential oils of different chemotypes of *Lippia alba* for efficacy against *R. microplus* larvae sensitive to organophosphate. The chemotype containing 4.33% of elemol, which represented the third most abundant compound in *L. alba* oil, had a LC₅₀ against the *R. microplus* that was significantly lower than that obtained with the chemotype lacking that terpene. Both *L. alba* chemotypes have carvone and limonene as major components and in similar quantities, which indicates that elemol may influence the difference in chemotype acaricidal potency. In our studies, elemol exhibited hydrogen bond and hydrophobic interactions with the RmAChEs. The chemical composition of elemol (C₁₅H₂₆O) includes oxygen, which allows the formation of hydrogen bonds. Results obtained from MD simulations showed that gamma-murolene and elemol maintained interactions with the same amino acid residues identified in docking analyses, which indicates that these compounds bind and interact the active site and neighbors active site residues of RmAChEs.

In our computational molecular docking study it was observed that the terpenes in category A ranked first according to results of the affinity parameters, which qualifies candidates as RmAChEs inhibitors. These results can be understood by analysis of quantum chemical descriptors.

The quantum chemistry descriptors lower HOMO energy, high LUMO energy and molecular volume between 185 and 188 cm³/mol are import to understand the chemical reactivity of terpene category A. the combination of these three parameters are important for reactivity. Gamma-murolene and elemol have a lower HOMO energy of -0.23348 a.u (-6.35 eV) and 0,24016 a.u (-6.53 eV), respectively, while the high LUMO energy of the gamma-murolene (-0.001186 a.u - 0.32 eV) and elemol (-0.01652 a.u - -0.45 eV). The molecular volume for the gamma- murolene is 186 cm³/mol) and of the elemol 185 cm³/mol. Howerer, the molecular volume calculated for spathulenol was 169 cm³/mol. The molecular volume below 180 cm³/mol makes the spathulenol molecule with lower affinity to the active site of RmAChEs (see Table 1).

We also analyzed the isomeric terpenes carvacrol and thymol because they have shown potent acaricidal activity against the *R. microplus*.³⁴ Theoretical calculations suggested that carvacrol has a volume 14% greater than thymol. The hydroxyl group (OH) in thymol is positioned in a way that decreases the area available for contact with the active site of RmAChEs. This condition does not occur with carvacrol, which has a larger contact area because of the way its OH is positioned. The ChelpG charge calculated for oxygen in the carvacrol and thymol were 0.689 and 0.677, respectively. The high electronic density in carvacrol makes the hydrogen bond stronger between OH---Asp85 (-4.693 Kcal/mol). The hydrogen bond energy calculated for thymol of the interaction OH---Pro459 was -1.517 Kcal/mol. These results were obtained in docking calculations, thus, the carvacrol is more soluble in DMSO that the thymol.

Another important parameter obtained in DFT calculation was solvation energy. Solvation energies were calculated for the isomers carvacrol (7.91 Kcal/mol) and thymol (6.59 Kcal/mol). Although carvacrol and thymol are known to inhibit the AChE from the fish *Electrophorus electricus*, bioassay results indicate carvacrol is the more potent inhibitor, and this difference in efficacy is also associated with the hydroxyl group position, suggesting that position of this group has a fundamental role in the inhibitory effect of AChE.^{97,98} Observations from our computational analyses are in agreement with those previous findings where greater inhibitory potency was also linked to the position of the hydroxyl group in carvacrol.

The computational chemistry results reported here also advance our understanding of the more potent *in vitro* acaricidal effects of carvacrol over thymol against the *R. microplus*.³⁴ In comparison with thymol, carvacrol tended to interact with a larger number of amino acid residues in RmAChEs. Based on docking analysis results, carvacrol exhibited better interaction parameters when compared with thymol in RmAChEs 1 and 2. Data obtained from MD simulations, detected that thymol undid the interactions found in molecular docking causing removal this terpene far away from the active site of RmAChEs 1 and 3, as evidenced by the low interaction frequency in these models, and the identification of interactions with amino acid residues located far from the catalytic site.

Beta-caryophyllene, a sesquiterpene showing a higher docking rate in our study, has been reported to be a potent repellent, insecticide, and AChE inhibitor for the rice weevil *Sitophilus oryzae*.⁹⁹ This sesquiterpene also showed relevant pesticidal properties against the mites *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus*¹⁰⁰ and *Tetranychus urticae*.¹⁰¹ Leaf extracts of *Casimiroa edulis* (Rutaceae), whose major component is beta-caryophyllene, were insecticidal against larvae of the African cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (102). Beta-caryophyllene repelled the cotton aphid *Aphis gossypii* and this sesquiterpene inhibited the aphid's AChE, polyphenoloxidase, carboxylesterase, and glutathione S-transferase *in vitro*.¹⁰³ Various *L. gracilis*³⁴ and *L. alba*³⁶ genotypes contain beta-caryophyllene and their essential oils are active against the *R. microplus*. Data reported here and the results of previous studies indicate that the multiplicity of biological effects associated with beta-caryophyllene could be the result of action on different pest targets, including RmAChE.

Molecular affinity docking data reported here expands our knowledge of the pesticidal properties of caryophyllene oxide that was reported to be acaricidal against *T. urticae*¹⁰⁴ and insecticidal against the beetles *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*.¹⁰⁵ Caryophyllene oxide was identified as the third major constituent in the essential oil of two *L. alba* chemotypes, which were more efficient against the *R. microplus* than chemotypes lacking that terpene.³⁶

The terpenes 1,8-cineole, beta-pinene, and gamma-terpinene were evaluated *in vitro* for their potential to inhibit AChE from human erythrocytes, and 1,8-cineole showed high inhibitory activity.¹⁰⁶ 1,8-cineole also exhibited strong inhibition of AChE of *S. oryzae*, *T. castaneum* and *Sarcoptes scabiei*,¹⁰⁷⁻¹⁰⁸ and in the present study this terpene showed binding energy and inhibition constant values consistent with those biochemical activities outranking beta-pinene and gamma-terpinene in molecular affinity docking results for the three RmAChE models. 1,8-cineol and beta-pinene have been shown to be acaricidal against *R. microplus*.¹⁰⁹ The higher interaction energy noted for beta-pinene suggests that beta-pinene exerts its acaricidal effects by acting on target(s) other than RmAChEs. This hypothesis is supported by previous studies where beta-pinene failed to inhibit AChEs *in vitro*.⁹⁸ Gamma-terpinene also was demonstrated to lack inhibitory activity of AChE *in vitro*.⁹⁸

The medium-low binding energy for limonene, p-cymene, and linalool would not make these terpenes a priority for further testing of effects on AChEs. This observation is supported by *in vitro* results where these terpenes showed lower

AChE inhibitory.^{83,106} Limonene lacked *in vitro* efficacy against *R. microplus* larvae sensitive, or resistant to commercially available acaricides.^{35,36} Low efficacy against *R. microplus* larvae and adults was reported for linalool.¹¹⁰ Some of the compounds with a lower ranking in molecular docking efficiency identified here should be considered for further testing as a way to refine structure-activity relationships, and the predictive value of the computer-aided approach to identify terpenes with selective affinity for RmAChEs, or other receptors in the nervous system of ticks such as GABA, GluCl, octopamine and sodium channel voltage-gated which could also be the site of their action. These possibilities are illustrated by beta-pinene that had low affinity for RmAChEs but showed high acaricidal activity *in vitro*, and thymol, which is known to be active against the *R. microplus* but did not interact with RmAChEs. Emerging mechanism-based screens for the *R. microplus* will help us test these hypotheses.^{17,111,112}

Conclusion

We report here the first record of *in silico* interactions between RmAChEs models and the terpenes gamma-murolene and elemol. Our computational approach modeled chemical biology interactions that could aid in the prioritization of terpenes in essential oils for *in vitro* and *in vivo* testing of acaricidal efficacy against *R. microplus*. Gamma-murolene and elemol are predicted in this study as potential new acaricides. Computational analyses provided additional information on the acaricidal activity of carvacrol, which apparently involves inhibition of the three RmAChEs models. By contrast, the computer-aided strategy indicated that the acaricidal effect of thymol, an isomer of carvacrol, is not associated with the inhibition of RmAChEs. The *in silico* screening strategy described here was validated by the interactions documented between the commercial organophosphate acaricide coumaphos and the RmAChE models.

Acknowledgments

The National Counsel of Technological and Scientific Development – CNPq is acknowledged for financial support and the fellowship to LMCJr. Thanks to Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão – FAPEMA for financial support and M.Sc scholarship to AJOL and to Brazilian Center of High Performance Processing (CENAPAD-UFC). The United States Department of Agriculture is an equal opportunity provider and employer.

References

- (1) Alonso, M.; Arellano-Sota, C.; Cereser, V. H.; Cordoves, C. O.; Guglielmone, A. A.; et al. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Rev Sci Tech*, **1992**, *11*, 713-733.
- (2) Food and Agricultural Organization. **2004**. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants: Guidelines. <http://www.fao.org/ag/aga.html>. Accessed 22 11 2012.
- (3) Grisi, L.; Leite, R. C.; Martins, J. R. S.; Barros, A. T. M.; Andreotti, R.; et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, **2014**, *23*, 150-156.
- (4) Graf, J. F.; Gogolewski, R.; Leach-Bing, N.; Sabatini, G. A.; Molento, M. B.; et al. Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, **2004**, *129*, 427-442.
- (5) Li, A. Y.; Chen, A. C.; Miller, R. J.; Davey, R.; George, J. E. Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pest Manage Sci*, **2007**, *63*, 882-889.
- (6) Rosario-Cruz, R.; Guerrero, F. D.; Miller, R. J.; Rodriguez-Vivas, R. I.; Tijerina, M.; et al. Molecular survey of pyrethroid resistance mechanisms in Mexican field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res*, **2009**, *105*, 1145-1153.
- (7) Andreotti, R. *Situação atual da resistência do carrapato-do-boi Rhipicephalus (Boophilus) microplus aos acaricidas no Brasil*. Embrapa, Campo Grande, 2010; 1st ed.
- (8) Castro-Janer, E.; Martins, J. R.; Mendes, M. C.; Namindome, A.; Klafke, G. M. et al. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using *in vitro* larval bioassays. *Vet Parasitol*, **2010**, *173*, 300-306.
- (9) Fernández-Salas, A.; Rodríguez-Vivas, R. I.; Alonso-Díaz, M. A. Resistance of *Rhipicephalus microplus* to Amitraz and Cypermethrin in Tropical Cattle Farms in Veracruz, Mexico. *J Parasitol*, **2012**, *98*, 1010-1014.
- (10) Lovis, L.; Guerrero, F. D.; Miller, R. J.; Bodine, D. M.; Betschart, B. et al. Distribution patterns of three sodium channel mutations associated with pyrethroid resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from North and South America, South Africa and Australia. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **2012**, *3*, 216-24.
- (11) Corley, S. W.; Jonsson, N. N.; Piper, E. K.; Cutullé, C.; Stear, M. J.; Seddon, J. M. Mutation in the Rm β AOR Gene Is Associated with Amitraz Resistance in the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (42), 16772-16777.
- (12) Reck, J.; Klafke, G. M.; Webster, A.; Dall'Agnol, B.; Scheffer, R.; Souza, U. A.; Corassini, V. B.; Vargas, R.; Santos, J. S.; Martins, J. R. S. First Report of Fluazuron Resistance in *Rhipicephalus microplus*: A Field Tick Population Resistant to Six Classes of Acaricides. *Vet. Parasitol.* **2014**, *201* (1-2), 128-136.
- (13) Guerrero, F. D.; Leon, A. A. P.; Rodriguez-Vivas, R. I.; Jonsson, N.; Miller, R. J. et al. In *Biology of Ticks Volume 2*, Sonenshine, D. E.; Roe, R. M., Eds.; Oxford University Press, New York, 2014; Vol 2, Chapter 13, pp 353-381.
- (14) Li, A. Y.; Davey, R. B.; Miller, R. J.; George, J. E. Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. *J Med Entomol*, **2003**, *40*, 482-490.
- (15) Temeyer, K. B.; Chen, A. C.; Davey, R. B.; Guerrero, F. D.; Howell, J. M.; et al. Novel approaches for control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Mex Cienc Pecu*, **2012**, *3*, 25-40.

- (16) Concepción, R. L.; Froylán, I. V.; Herminia, I. P. M.; Norberto, M. A.; Héctor, J. S. Z. et al. In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Exp Appl Acarol*, **2013**, *61*, 251-257.
- (17) Swale, D. R.; Tong, F.; Temeyer, K. B.; Li, A.; Lam, P. C. et al. Inhibitor profile of bis(n)-tacrine and N-methylcarbamates on acetylcholinesterase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Phlebotomus papatasi*. *Pestic Biochem Physiol*, **2013**, *106*, 85-92.
- (18) Medema, M. H.; Fischbach, M. A. (2015) Computational approaches to natural product discovery. *Nat Chem Biol*, **2015**, *11*, 639-648.
- (19) Nolan, J.; Schnitzerling, H. J.; Schuntner, C. A. Multiple forms of acetylcholinesterase from resistant and susceptible strains of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Can.). *Pestic. Biochem. Physiol.* **1972**, *2* (1), 85-94.
- (20) Bellgard, M. I.; Moolhuijzen, P. M.; Guerrero, F. D.; Schibeci, D.; Rodriguez-Valle, M.; et al. CattleTickBase: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int J Parasitol*, **2012**, *42*, 161-169.
- (21) Temeyer, K. B.; Davey, R. B.; Chen, A. C. Identification of a third *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cDNA presumptively encoding an acetylcholinesterase. *J Med Entomol*, **2004**, *41*, 259-268.
- (22) Foil, L. D.; Coleman, P.; Eisler, M.; Fragoso-Sanchez, H.; Garcia-Vazquez, Z.; et al. Factors That Influence the Prevalence of Acaricide Resistance and Tick-Borne Diseases. *Vet. Parasitol.* **2004**, *125*, 163-181.
- (23) Temeyer, K. B.; Tuckow, A. P.; Brake, D. K.; Li, A. Y.; Pérez de León, A. A. Acetylcholinesterases of blood-feeding flies and ticks. *Chem Biol Interact*, **2013**, *203*, 319-322.
- (24) Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud Avançados*, **2010**, *24*, 81-98.
- (25) Niraj, R. R.; Saini, V.; Kumar, A. QSAR analyses of organophosphates for insecticidal activity and its in silico validation using molecular docking study. *Environ Toxicol Pharmacol*, **2015**, *40*, 886-894.
- (26) Bruhn, J. G. The use of natural products in modern medicine. *Acta pharm*, **1989**, *1*, 117-130.
- (27) Prance, G. T. What is ethnobotany today? *J Ethnopharmacol*, **1991**, *32*, 209-216.
- (28) Dewitt, S. H. Molecular diversity strategies. *Pharmac News*, **1994**, *1*, 11-14.
- (29) Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga, V. F.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 429-438.
- (30) Kibble, M.; Saarinen, N.; Tang, J.; Wennerberg, K.; Mäkelä, S. et al. Network pharmacology applications to map the unexplored target space and therapeutic potential of natural products. *Nat Prod Rep*. **2015**, *32*, 1249-1266.
- (31) Rattan, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.* **2010**, *29*, 913-920.
- (32) Daemon, E.; Monteiro, C. M. O.; Rosa, L. S.; Clemente, M. A.; Arcoverde, A. Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res*, **2009**, *105*, 495-497.
- (33) Chagas, A. C. S.; Barros, L. D.; Cotinguiba, F.; Furlan, M.; Giglioti, R. et al. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* **2012**, *110* (1), 295-303.

- (34) Cruz, E. M. O.; Costa-Junior, L. M.; Pinto, J. A. O.; Santos, D. D. A.; Araujo, S. A. et al. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* **2013**, *195* (1-2), 198–202.
- (35) Assis-Lage, T. C.; Montanari, R. M.; Fernandes, S. A.; de Oliveira Monteiro, C. M.; Senra, T. O. S. et al. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis Dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.* **2015**, *148*, 24–29.
- (36) Peixoto, M. G.; Costa-Júnior, L. M.; Blank, A. F.; Lima, A. D. S.; Menezes, T. S. A. et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* **2015**, *210*, 118–122.
- (37) Wermuth, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. Academic Press, London, 2003; 2 ed.
- (38) Oprea, T. I. *Chemoinformatics in drug discovery*. Wiley–VCH, Weinheim, 2005.
- (39) Blenau, W.; Rademacher, E.; Baumann, A. Plant essential oils and formamidines as insecticides/ acaricides: what are the molecular targets? *Apidologie*, **2012**, *43*, 334–347.
- (40) Costa-Júnior, L. M.; Miller, R. J.; Alves, P. B.; Blank, A. F.; Li, A. et al. Susceptibility of organophosphate-resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to *Lippia gracilis* essential oil and its major components. *Vet Parasitol*, **2016**, *228*, 60-64.
- (41) Lopes, A. J. O. Eficiência de óleos essenciais de *Citrus* spp. sobre o carrapato canino *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Bachelor Degree Thesis, 2012, Federal University of Maranhão, 22p.
- (42) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A. et al. **2009**, *Gaussian 09*, Revision D.01, Gaussian, Inc, Wallingford CT.
- (43) Dennington, R.; Keith, T.; Millam, J. **2008** *GaussView*, Version 5.0.8, Semichem Inc, Shawnee Mission, KS.
- (44) Parr, R. G.; von Szentpály, L.; Liu, S. Electrophilicity Index. *J Am Chem Soc*, 1999, *121*, 1922–1924.
- (45) Zhan, C. G.; Nichols, J. A.; Dixon, D. A. Ionization Potential, Electron Affinity, Electronegativity, Hardness, and Electron Excitation Energy: Molecular Properties From Density Functional Theory Orbital Energies. *J. Phys Chem A*, **2003**, *107*, 4184–4195.
- (46) Miertus, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilizaion of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chem Phys*, **1981**, *55*, 117–129.
- (47) Cammi, R.; Tomasi, J. Remarks on the use of the apparent surface charges (ASC) methods in solvation problems: Iterative versus matrix-inversion procedures and the renormalization of the apparent charges. *J Comput Chem*, **1995**, *16*, 1449–1458.
- (48) Scalmani, G.; Frisch, M. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. *J Chem Phys*, **2010**, *132*, 114110.
- (49) Ho, J.; Klamt, A.; Coote, M. L. Comment on the correct use of continuum solvent models. *J Phys Chem Am*, **2010**, *114*, 13442–13444.
- (50) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G; Bhat, T. N. el al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, **2000**, *28*, 235–242.

- (51) Sali, A.; Blundell, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, **1993**, *234*, 779-815.
- (52) Webb, B.; Sali, A. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol*. **2014**, *1137*, 1-15.
- (53) Shen, M. Y.; Sali, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci*, **2006**, *15*, 2507-2512.
- (54) 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 Crystallogr*, **1993**, *26*, 283–291.
- (55) Colovos, C.; Yeates, T. O. Verification of protein structures: patterns of non-bonded atomic interactions. *Protein Sci*, **1993**, *2*, 1511–1519.
- (56) Sippl, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins*, **1993**, *17*, 355–362.
- (57) Wiederstein, M.; Sippl, M. J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res*. **2007**, *35*, 407–410.
- (58) Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark A. E.; van Gunsteren, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J Comput Chem*, **2004**, *25*, 1656-1676.
- (59) Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem*, **2005**, *26*: 1701–1718.
- (60) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. In *Intermolecular forces*. Pullman B. Ed.; Reidel: Dordrecht, 1981; Chapter 14 pp. 331–342.
- (61) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys*, **1984**, *81*, 3684-3690.
- (62) Nosé, S.; Klein, M. L. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Mol Phys*, **1983**, *50*, 1055-1076.
- (63) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys*, **1981**, *52*, 7182-7190.
- (64) Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. J. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem*. **1997**, *18*, 1463–1472.
- (65) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An Nlog-(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* **1993**, *98*, 10089.
- (66) Goodsell, D. S.; Morris, G. M.; Olson, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J Mol Recognit* **1996**, *9*, 1-5.
- (67) Goodsell, D. S. In *Protein-Protein Interactions, A Molecular Cloning Manual*. Golemis, E. A.; Adams, P. D. Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2005; 2 ed, pp.885-892.
- (68) Morris, G. M.; Huey, R.; Olson, A. J. Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Curr Protoc Bioinformatics*, **2008**, *24*, 1–40.
- (69) Sanner, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graphics Mod*. **1999**, *17*, 57–61.

- (70) Gasteiger, J.; Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity - a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, **1980**, *36*, 3219–3228.
- (71) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem*. **1998**, *19*, 1639–1662.
- (72) Solis, F. J.; Wets, R. J. B. Minimization by random search techniques. *Math Oper Res*. **1981**, *6*, 19–30.
- (73) Laskowski, R. A.; Swindells, M. B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model*, **2011**, *51*, 2778–2786.
- (74) Ramos, R. M.; Perez, J. M.; Baptista, L. A.; Amorim, H. L. N. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-N-Acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* with isoniazid: A computational study on a new possible mechanism of resistance. *J Mol Model*, **2012**, *18*, 4013–4024.
- (75) Ai, Y.; Yu, L.; Tan, X.; Chai, X.; Liu, S. Discovery of Covalent Ligands via Noncovalent Docking by Dissecting Covalent Docking Based on a “Steric-Clashes Alleviating Receptor (SCAR)” Strategy. *J Chem Inf Model*, **2016**, InPress DOI: 10.1021/acs.jcim.6b00334
- (76) Martínez, F.; Gómez, A. Estimation of the solubility of sulfonamides in aqueous media from partition coefficients and entropies of fusion. *Phys Chem Liq*, **2002**, *40*, 411–420.
- (77) Ochoa, S. A.; Nevárez-Moorillón, G. V.; Sánchez-Torres, L. E.; Villanueva-García, M.; Sánchez-Ramírez, B. E.; Rodríguez-Valdez, L. M. Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *BMC Complement Altern Med*, **2015**, *15*, 332–343.
- (78) Dulin, F.; Zatylny-Gaudin, C.; Ballandonne, C.; Guillet, B.; Bonafos, R. et al. Protecting honey bees: identification of a new varroacide by *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies. *Parasitol Res*, **2014**, *113*, 4601–4610.
- (79) Hartman, G. D.; Egbertson, M. S.; Halczenko, W.; Laswell, W. L.; Duggan, M. E. et al. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 1. Discovery and design of exosite inhibitors. *J Med Chem*, **1992**, *35*, 4640–4642.
- (80) Van Drie, J. H. Computer-aided drug design: the next 20 years. *J Comput Aided Mol Des* **2007**, *21*, 591–601.
- (81) Vijayakrishnan, R. Structure-based drug design and modern medicine. *J Postgrad Med* **2009**, *55*, 301–304.
- (82) Talele, T. T.; Khedkar, S. A.; Rigby, A. C. Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. *Curr Top Med Chem*, **2010**, *10*, 127–141.
- (83) Miyazawa, M.; Watanabe, H.; Kameoka, H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a pmenthane skeleton. *J Agri Food Chem*, **1997**, *45*, 677–679.
- (84) Ryan, M. F.; Byrne, O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J Chem Ecol*. **1988**, *14*, 1965–1975.
- (85) Lee, B. H.; Choi, W. S.; Lee, S. E.; Park, B. S. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Crop Protec*, **2001**, *20*, 317–320.
- (86) Lee, S. E.; Lee, B. H.; Choi, W. S.; Park, B. S.; Kim, J. G. et al. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Pest. Manag. Sci*. **2001**, *57*, 548–553.

- (87) Albuquerque, M. R.; Silveira, E. R.; Uchôa, D. E.; Lemos, T. L.; Souza, E. B. et al. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) Baker (Asteraceae). *J Agric Food Chem*, **2004**, 52, 6708–6711.
- (88) Govindaraj, S.; RanjithaKumari, B. D. Composition and larvicidal activity of *Artemisia vulgaris* L. stem essential oil against *Aedes aegypti*. *Jordan J Biol Sci*, **2013**, 6, 11-16.
- (89) Hemalatha, P.; Elumalai, D.; Vignesh, A.; Murugesan, K.; Kaleena, P. K. (2014) Bioefficacy of essential oils of *Lantana camara aculeata* , against *Aedes aegypti* , *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *Int J Pure Applied Zool*, **2014**, 2, 329–338.
- (90) Abdel Fattah, A. K.; Hussein, K. T.; Shoukry, K. K. Biocidal activity of two botanical volatile oils against the larvae of *Synthesiomyia nudiseta* (Wulp) (Diptera: Muscidae). *Egypt Acad J Biolog Sci*, **2009**, 2, 89–101
- (91) Tozlu, E.; Cakir, A.; Kordali, S.; Tozlu, G.; Ozer, H. et al. Chemical compositions and insecticidal effects of essential oils isolated from *Achillea gypsicola*, *Satureja hortensis*, *Origanum acutidens* and *Hypericum scabrum* against broadbean weevil (*Bruchus dentipes*). *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2011**, 130, 9–17.
- (92) Lebouvier, N.; Hue, T.; Hnawia, E.; Lesaffre, L.; Menut, C. Acaricidal activity of essential oils from five endemic conifers of New Caledonia on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res*, **2013**, 112, 1379–1384.
- (93) Cheng, S. S.; Lin, C. Y.; Chung, M. J.; Liu, Y. H.; Huang, C. G. et al. Larvicidal activities of wood and leaf essential oils and ethanolic extracts from *Cunninghamia konishii* Hayata against the dengue mosquitoes. *Ind. Crops Prod*, **2013**, 47, 310-315.
- (94) Millar, J. G.; Zhao, C. H.; Lanier, G. N.; O’Callaghan, D. P.; Griggs, M. et al. Components of moribund american elm trees as attractants to elm bark beetles, *Hylurgopinus rufipes* and *Scolytus multistriatus*. *J. Chem. Ecol.* **1986**, 12, 583–608.
- (95) Kamm, J. A.; Buttery, R. G. Ovipositional Behavior of the Alfalfa Seed Chalcid (Hymenoptera: Eurytomidae) in Response to Volatile Components of Alfalfa. *Env. Entomol* **1986**, 15, 388–391.
- (96) Miyazawa, M.; Watanabe, H.; Umemoto, K.; Kameoka, H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *J Agric Food Chem*. **1998**, 6, 3431-3434.
- (97) Jukic, M.; Politeo, O.; Maksimovic, M.; Milos, M.; Milos, M. Properties of Thymol , Carvacrol and Their Derivatives Thymoquinone and Thymohydroquinone. *Phytoter Res*, **2007**, 261, 259–261.
- (98) Orhan, I.; Kartal, M.; Kan, Y.; Sener, B. Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase. *Z. Naturforsch. C*, **2008**, 63, 547–553.
- (99) Chaubey, M. K. Responses of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Curculionidae) against essential oils and pure compounds. *Herva Polinica*. **2012**, 58, 33-44.
- (100) Oh, M. S.; Yang, J. Y.; Kim, M. G.; Lee, H. S. Acaricidal Activities of beta-Caryophyllene Oxide and Structural Analogues Derived from *Psidium cattleianum* Oil against House Dust Mites. *Pest Manag. Sci*. **2013**, 70, 757–762.
- (101) Araújo, M. J. C.; Câmara, C. a G.; Born, F. S.; Moraes, M. M.; Badji, C. A. Acaricidal Activity and Repellency of Essential Oil from *Piper aduncum* and Its Components against *Tetranychus urticae*. *Exp. Appl. Acarol*. **2012**, 57 139–155.

- (102) Barakat, D. A. Insecticidal and Antifeedant Activities and Chemical Composition of *Casimiroa edulis* La Llave & Lex (Rutaceae) Leaf Extract and its Fractions Against *Spodoptera littoralis* Larvae. *Aust J Basic and Appl Sci*, **2011**, 5, 693–703.
- (103) Liu, Y.; Ming, X.; Zhang, Q. C.; Zhou, F. Y.; Wei, J. Q. Toxicity of β -caryophyllene from *Vitex negundo* (Lamiales: Verbenaceae) to *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) and its action mechanism. *Acta Entomol Sin*. **2010**, 53, 396-404.
- (104) Moraes, M. M.; Câmara, C. A. G.; Santos, M. L.; Fagg, C. W. Essential oil composition of *Eugenia langsdorffii* O. Berg.: relationships between some terpenoids and toxicity against *Tetranychus urticae*. *J Braz Chem Soc*. **2012**, 23(9):1647-1656.
- (105) Liu, P.; Liu, X. C.; Dong, H. W.; Liu, Z. L.; Du, S. S. Chemical composition and insecticidal activity of the essential oil of *Illicium pachyphyllum* fruits against two grain storage insects. *Molecules*, **2012**, 17, 14870-81.
- (106) Perry, N. S, Houghton, P. J.; Theobald, A.; Jenner, P.; Perry, E. K. *In-vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J Pharm Pharmacol*. **2000**, 52, 895-902
- (107) Abdelgaleil, S. A. M.; Mohamed, M. I. E.; Badawy, M. E. I.; El-Arami, S. A. A. Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *J Chem Ecol*. **2009**, 35, 518–525.
- (108) Hu, Z.; Chen, Z.; Yin, Z.; Jia, R.; Song, X. et al. In vitro acaricidal activity of 1,8-cineole against *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* and regulating effects on enzyme activity. *Parasitol Res*. **2015**, 114, 2959-2967.
- (109) Prates, H. T.; Leite, R. C.; Craveiro, A. A.; Oliveira, A. B. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). *J Braz Chem Soc*. **1998**, 9, 193–197.
- (110) Senra, T. O. S.; Zeringóta, V.; Monteiro, C. M. O.; Calmon, F.; Maturano, R. et al. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res*, **2013**, 112, 1461–1466.
- (111) Gross, A. D.; Temeyer, K. B.; Day, T. A.; Pérez de León, A. A.; Kimber, M. J. et al. Pharmacological characterization of a tyramine receptor from the southern cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol*. **2015**, 63, 47-53.
- (112) Yang, Y.; Nachman, R. J.; Pietrantonio, P. V. Molecular and pharmacological characterization of the *Chelicerata pyrokinin* receptor from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochem Mol Biol*. **2015**, 60, 13-23.

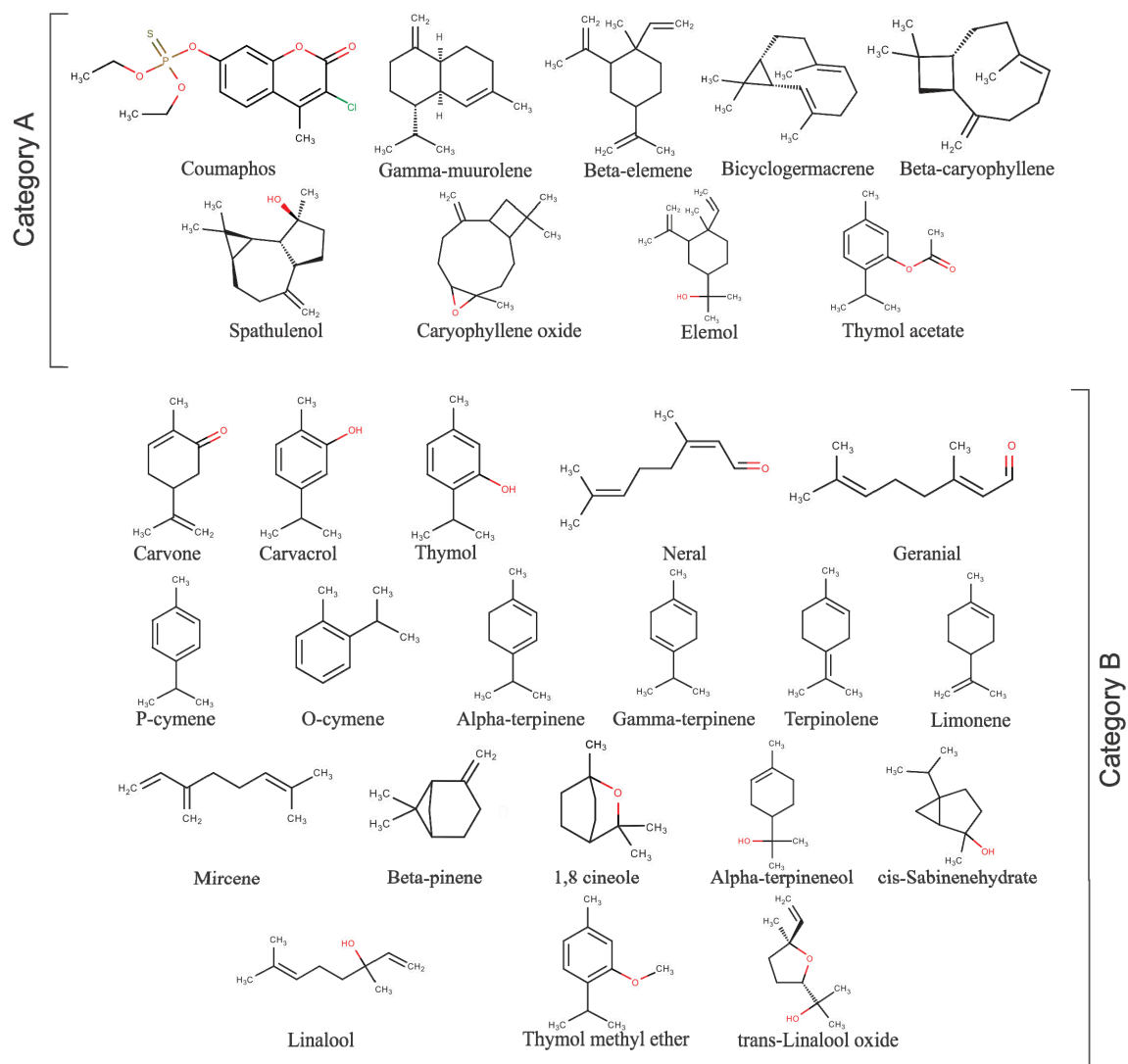


Figure 1. Chemical structures of twenty-seven terpenes constituting at least 2% of the *Lippia* spp. or *Citrus* spp. essential oils and coumaphos that were used for computational analyses of chemical biology interactions with *Rhipicephalus microplus* acetylcholinesterases.

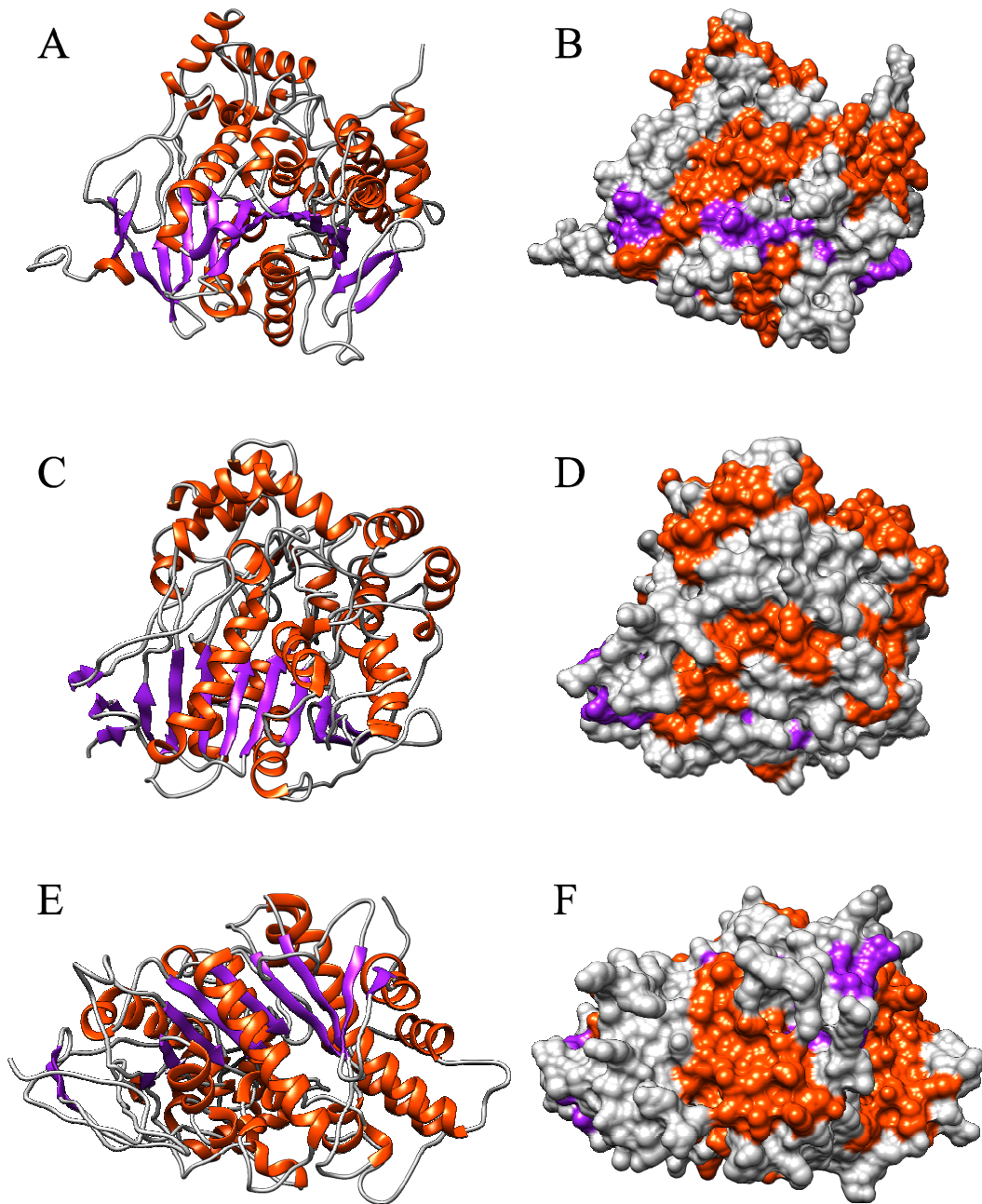


Figure 2. Schematic representations of the RmAChE models. RmAChE1 ribbon trace (A) and molecular surface (B), RmAChE2 ribbon trace (C) and molecular surface (D), RmAChE3 ribbon trace (E) and molecular surface (F). Figure made with UCSF Chimera software (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

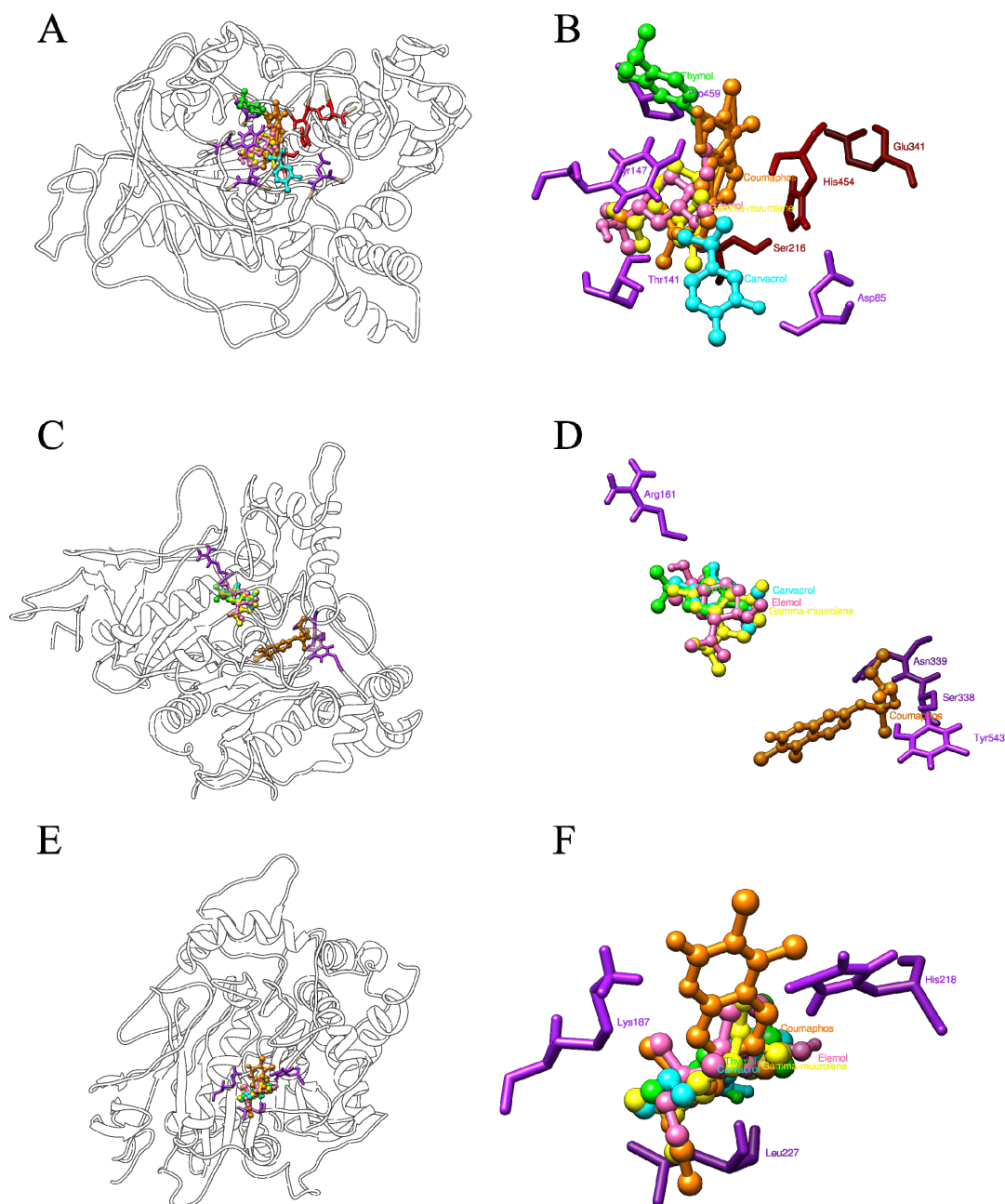


Figure 3. "A", "C" and "E" shows the position of ligands to RmAChE1, RmAChE2 and RmAChE3, respectively. "B", "D" and "F" is an enlargement of "A", "C" and "E", respectively. Purple and stick are shown the amino acid residues that interact through hydrogen bonds with the ligands. Red and stick indicates amino acid residues of catalytic triad (Ser216, Glu341 and His454) to RmAChE1. The ligands are represented by stick and ball (Coumaphos - orange, Thymol - green, Carvacrol - cyan, Elemol - pink and Gamma-murolene - yellow). Figure made with UCSF Chimera software (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>)

Table 1. Calculated Total Electronic Energies (E, Hartree), Relative Energy (ΔE , kcal/mol), E_{HOMO} (Hartree), E_{LUMO} (Hartree), Hardness (η), Chemical Potential (μ), and Electrophilicity (ω), Ionization Potential (I) and Electron Affinity (A), electronegativity (χ) in eV, Molecular volume (Mv, cm³/mol) of acaricide coumaphos and the isomers terpenes category A and B.

Category	Coumpound	E	ΔE	E_{HOMO}	E_{LUMO}	η	μ	ω	I	A	χ	Mv
Acaricide A	Coumaphos	-2.118.839812	-	-0.24477	-0.08394	4.38	4.47	2.29	6.66	2.28	4.47	264.944
	Gamma-muurolene	-585.730158	0.00	-0.23348	-0.01167	6.04	3.33	0.92	6.35	0.32	3.33	186.421
	Beta-elemene	-585.693715	22.87	-0.24381	-0.01186	6.31	3.48	0.96	6.63	0.32	3.48	188.185
	Bicyclogermacrene	-585.685214	28.20	-0.20806	-0.01146	5.35	2.99	0.83	5.66	0.31	2.99	203.583
	Beta-caryophyllene	-585.684590	28.59	-0.22701	-0.01110	5.88	3.24	0.89	6.18	0.30	3.24	192.477
	Spathulenol	-660.925172	0.00	-0.23840	-0.01619	6.05	3.46	0.99	6.49	0.44	3.46	168.886
	Caryophyllene oxide	-660.894466	19.27	-0.24577	-0.01362	6.33	3.53	0.99	6.69	0.37	3.53	187.800
	Elemol	-662.121077	-	-0.24016	-0.01652	6.09	3.49	1.00	6.53	0.45	3.49	184.896
B	Thymol acetate	-617.177616	-	-0.24060	-0.01706	6.08	3.51	1.10	6.55	0.46	3.51	171.318
	Carvone	-464.554043	0.00	-0.24868	-0.06111	5.10	4.22	1.74	6.77	1.66	4.22	152.265
	Carvacrol	-464.553437	0.38	-0.22339	-0.01526	5.66	3.25	0.93	6.08	0.42	3.25	147.677
	Thymol	-464.551050	1.88	-0.22179	-0.01608	5.60	3.34	0.94	6.04	0.44	3.34	127.340
	Neral	-465.695551	0.00	-0.24574	-0.06715	4.86	4.26	1.87	6.69	1.83	4.26	134.408
	Geranial	-465.694484	0.69	-0.24509	-0.06527	4.89	4.22	1.82	6.67	1.78	4.22	129.050
	P-cymene	-389.331957	0.00	-0.23535	-0.01135	6.10	3.36	0.92	6.40	0.30	3.36	120.005
	O-cymene	-389.328194	2.36	-0.23899	-0.01067	6.21	3.40	0.93	6.50	0.29	3.40	111.795
	Alpha-terpinene	-390.486153	0.00	-0.20127	-0.02437	4.81	3.07	0.98	5.48	0.66	3.07	124.113
	Gamma-terpinene	-390.482193	2.49	-0.22448	-0.01064	5.82	3.20	0.88	6.11	0.29	3.20	125.615
	Terpinolene	-390.480393	3.62	-0.22345	-0.01214	5.75	3.21	0.89	6.08	0.33	3.21	127.656
	Limonene	-390.476774	5.89	-0.23380	-0.01084	6.07	3.33	0.91	6.36	0.30	3.33	123.333
	Mircene	-390.454556	19.83	-0.23331	-0.03830	5.31	3.37	1.29	6.35	1.04	3.37	135.890
	Beta-pinene	-390.452459	21.14	-0.23781	-0.00976	6.32	3.53	0.91	6.47	0.27	3.53	117.063
	1.8 – cineole	-466.908597	0.00	-0.23966	-0.01251	6.18	3.32	0.95	6.52	0.34	3.32	127.753
	Alpha-terpineneol	-466.903427	3.24	-0.22844	-0.01536	8.80	3.73	0.95	6.22	0.42	3.73	173.011
	Cis-sabinene hidrate	-466.887373	13.32	-0.26147	-0.01278	6.77	3.41	1.03	7.12	0.35	3.41	138.561
	Linalool	-466.875732	20.62	-0.23707	-0.01366	6.08	3.34	0.96	6.45	0.37	3.34	162.556
	Thymol methyl ether	-503.826431	-	-0.21733	-0.01101	5.61	3.11	0.86	5.91	0.30	3.11	161.075
	Trans-Linalool oxide	-542.100750	-	-0.25193	-0.01476	6.45	3.63	1.02	6.86	0.40	3.63	142.898

Table 2. Parameters affinity of the molecular docking.

RmAChE1			RmAChE2			RmAChE3		
Ligand	ΔG_{bind}^* (kcal/mol)	Ki ^{**} (uM)	Ligand	ΔG_{bind}^* (kcal/mol)	Ki ^{**} (uM)	Ligand	ΔG_{bind}^* (kcal/mol)	Ki ^{**} (uM)
Coumaphos	-7.55	2.94	Coumaphos	-7.76	2.04	Coumaphos	-5.71	65.17
Gamma-muurolene	-6.88	8.98	Gamma-muurolene	-8.82	0.33	Gamma-muurolene	-6.36	21.60
Elemol	-6.75	11.27	Beta-elemene	-8.09	1.18	Beta-caryophyllene	-6.30	24.14
Caryophyllene oxide	-6.57	15.35	Elemol	-7.68	2.33	Elemol	-6.28	24.88
Thymol acetate	-6.43	19.47	Thymol acetate	-7.14	5.88	Caryophyllene oxide	-6.21	28.08
Beta-elemene	-6.38	20.98	Beta-caryophyllene	-7.14	5.83	Beta-elemene	-6.05	36.62
Beta-caryophyllene	-6.29	24.4	Carvone	-6.55	15.91	Bicyclogermacrene	-5.99	40.71
Spathulenol	-5.99	40.69	Alpha-terpineol	-6.49	17.58	Terpinolene	-5.72	64.02
Bicyclogermacrene	-5.87	49.59	Geranial	-6.40	20.28	Thymol acetate	-5.65	72.23
Carvone	-5.70	66.70	Alpha-terpinene	-6.24	26.89	Spathulenol	-5.57	82.96
Geranial	-5.69	67.2	Spathulenol	-6.21	28.24	Neral	-5.54	86.24
Alpha-terpineol	-5.65	72.45	Neral	-6.19	29.18	Geranial	-5.5	92.91
Neral	-5.58	81.09	Limonene	-6.17	29.89	Mircene	-5.48	95.98
Carvacrol	-5.55	87.06	Thymol methyl ether	-6.14	31.57	Alpha-terpineol	-5.36	118.36
Linalool	-5.25	141.28	1.8 – cineole	-6.07	35.62	1.8 – cineole	-5.33	124.52
Thymol	-5.24	143.25	Carvacrol	-6.06	36	Carvone	-5.29	132.85
Trans-Linalool oxide	-5.23	145.81	Terpinolene	-6.02	38.34	Thymol	-5.16	166.38
1.8 – cineole	-5.21	151.39	Trans-Linalool oxide	-5.97	42.28	Alpha-terpinene	-5.15	168.96
Thymol methyl ether	-5.14	169.32	Cis-sabinene hidrate	-5.93	45.31	Carvacrol	-5.08	187.82
Cis-sabinene hidrate	-5.13	172.75	P-cymene	-5.86	50.77	Linalool	-4.94	238.35
Terpinolene	-5.13	173.61	Bicyclogermacrene	-5.83	53.13	Limonene	-4.91	252.44
Alpha-terpinene	-5.06	195.44	Linalool	-5.83	53.16	Thymol methyl ether	-4.83	287.55
Limonene	-4.97	227.71	Caryophyllene oxide	-5.81	54.74	P-cymene	-4.83	286.86
O-cymene	-4.96	230.54	Beta-pinene	-5.76	60.03	Trans-Linalool oxide	-4.83	289.79
Mircene	-4.89	276.5	Thymol	-5.76	59.78	Cis-sabinene hidrate	-4.73	343.79
P-cymene	-4.77	320.63	Mircene	-5.71	64.75	O-cymene	-4.72	345.91
Beta-pinene	-4.67	374.91	Gamma-terpinene	-5.69	67.66	Gamma-terpinene	-4.69	362.15
Gamma-terpinene	-4.64	402.25	O-cymene	-5.67	69.53	Beta-pinene	-4.63	404.24

* ΔG_{bind} represents the binding energy ** Ki represents the inhibition constant

Supporting Information

```

AChE1 1 .....MDPEQDMLHENLASCHLTLDLVCGGVVLRCLS
AChE2 1 .....MYVRVSLVFASVWIIACLG
AChE3 1 MYSRTVVV.LLYGYAIRSAHARCITFPQPGDPTCTCEKITYLAQPFNVLP.FAGTPTTAQP

AChE1 35 IEPEDASNRVSDQDAEDPVETVVVETAWGPKVGFIAQSP.....LGRFVRVYGC
AChE2 20 YTKTQFAKGIQVLEDCVSPVQIRAGKLRGAKRVVLDG.....KFAVATG
AChE3 61 ASGKQQLSLVVPDQIQSLSTTSRPLSTEESEIVETNSGPFVQGRVYAANETLVQVGC

AChE1 85 IPFAKPPPTCKRFDRAESDEEPWTDVLDATVKNKSCFQVLDITLYGNFSGSTMWNAVTEMS
AChE2 66 VPFAKPPVGEELRKRQFQSAEPWVLEKRDATVLPSCMGNGVFKSP...KN--WLPYQQKS
AChE3 121 IPFAKPPVGLRFRNPVPVKP.WSSVYQATKKRPFPCDTDFYIN...SNVTIPTANS..S

AChE1 145 EDCLKLVNVAEPPTSSGR...PLAVLVWLYGGGFYSGITSLDVYDARTLVSEENVVVV
AChE2 123 EDCLKLVNVPRLNLSA.....LPVMAWHCGGFQECFAAIPLDCTYLAAFGNVVV
AChE3 175 EDCLKLVNVPSSRECVLGRFSCVPKTVIVYHGGTSSFGSSGWDWYDGKEFVARGDVVVV

AChE1 202 SMNRYRVAASLGF.LSFGNETLP.GNAGLYDQYMAKKNVQENVAAFGGDPDRVTLFCSAGAAIS
AChE2 177 TIAVRIQSFGL.YUETSAPGNMGLHDOQLAKKVIQENIAAFGGMPGEVTLKQWSAGASIS
AChE3 235 SMNRYRVGPMGFFHSSSTHSSGNAGLHDOPLAKKWKQENLRNFGGDPDDVTLVQOSAGAAIS

AChE1 262 AFHLVLSPLSSSLFHRVHIOGSPAVPWGFQDQDKARQSAKKLATALRAP....DSLDQ
AChE2 236 TCFHLISPCQAQFRRAHVOCAAVTKKGRARDKTEMLEYSKKFAANFGCYGDSAAVASQ
AChE3 295 ICHLVLSPLSKGLFRHIMESSGSPYFRIADNTRREGPFKEVKLALALQCARNDMTIESHMA

AChE1 317 ELDCLRCERDZDINNETNGGVVDFFPVFADGVFLPDTQALTDKGSFARNISVMLG
AChE2 296 UVADCMRRVNASLLVAEALFVCGSGGRKEFLYGLLEFLIEKRMAD...FFGDKVLMIG
AChE3 355 EMVLCILRKTDGK?LITMSNTFCVHATLFFGFGGDTLEDDLYLMRQ.KKFKKALTLTG

AChE1 377 SNANCGSNFQOYFGFPVIDETP..EVTHENFTAVLEALDPSLEQPIAEIMNTVYAGEI
AChE2 352 QANCGSNILYTSFRDTFSEALFPRKINNAEMIHFVLSGLY.KLSLSDTEKQKEMMGSDIG
AChE3 414 NNLDCGSYFYLFVFGRALEDQA.HKTRHYEVDLYVSYCLQMLLRKNVSPHRYVLSHIG

AChE1 435 PSTAADTAKADSIVCQYHFTCFVVR.....WDTFARAGIDVYQVVFARRSSQNPWQ
AChE2 411 DHDYDALQALAAZTKGDLHVKCGALNTACKLANATANAQSRKKEVHFXLKNVVSACVKRQ
AChE3 473 ERENKKAQKAAZAVGDFAITCFETKY.....FLESFASMNKNVHYVYFTHRPSFTWPG

AChE1 489 WCGVIHGSDVPFVFCGPLNDIYCYSEEDKTLRRIMRYANFAKCGNPNLPEDGSPGSTI
AChE2 471 WCGMTHGSDPLVFCRVFERQGGCAG.DMDYSRNIMKLSDFAKCRPPVGFHG....K
AChE3 527 WVGFTHGSDVPFVFCGLFFSSFTIATDQGRELSKMLTETTFANCKRVPDVASK?....

AChE1 549 RWPERRTDSLKRIVLDVNESVGWAHR.QTYCDFWENVRNRRTFPVPSC
AChE2 524 EWPKEPTADSRSMKLTATGSEASTFNNEPRKILKELKLY.....
AChE3 582 .WPEFTAKNQVYELNPKRYTYGRGPNEKNCFWKSYLEP.....

```

Figure S1. Amino acid sequence alignment of AChEs of *R. microplus*. Conserved residues are boxed with identity shown with a red background and similarity with red lettering. The alignment was generated using CLUSTAL OMEGA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) and displayed using ESPrpt (<http://esprpt.ibcp.fr>)

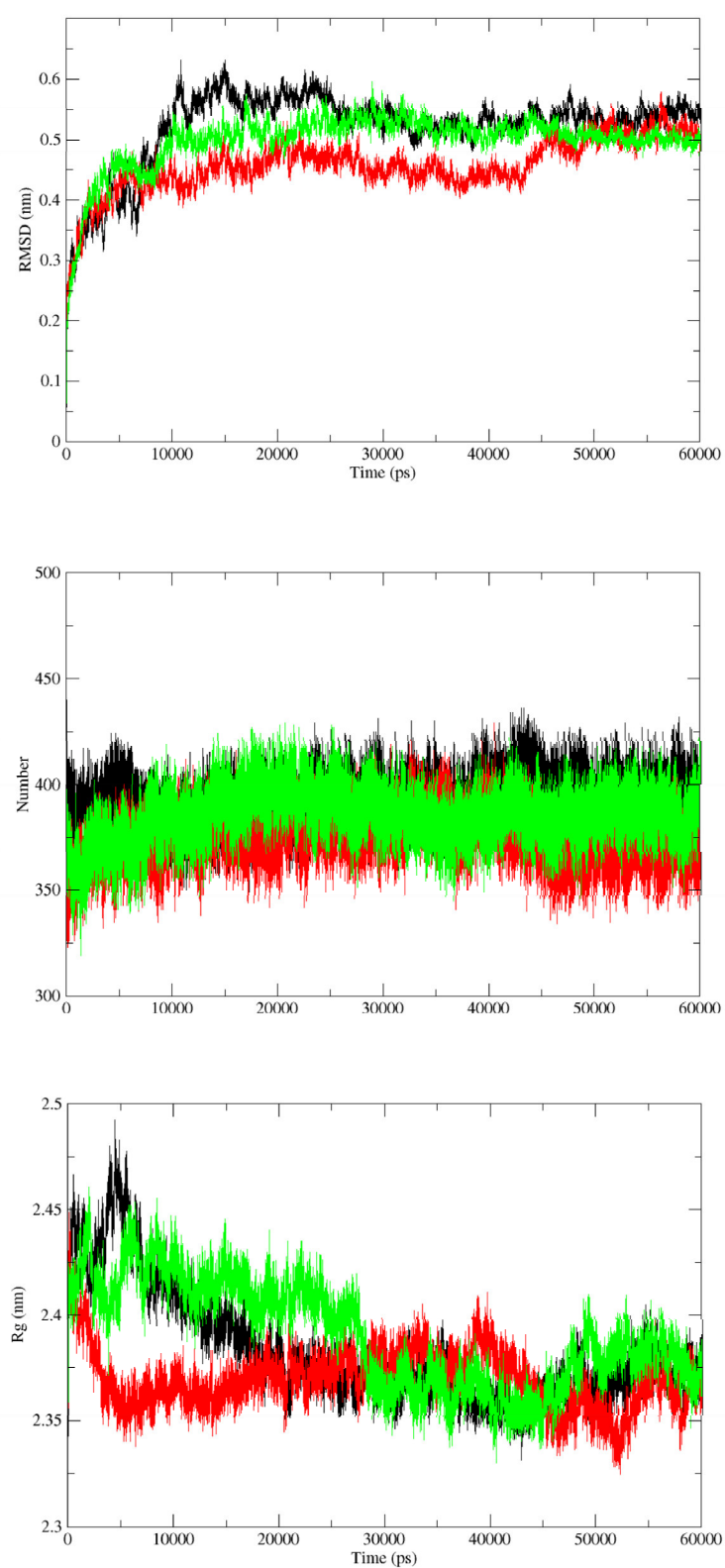


Figure S2. Time dependence of structural parameters from MD simulations with respect to the initial structure. a: Atom-positional root mean-square deviation (RMSD) of $C\alpha$ atoms; b: Radius of gyration (R_g); c: Total number of hydrogen bonds (N_{hb}). Color system: RmACHe1(black) RmACHe2(red) RmACHe3(green). Figure were generated using Xmgrace (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>)

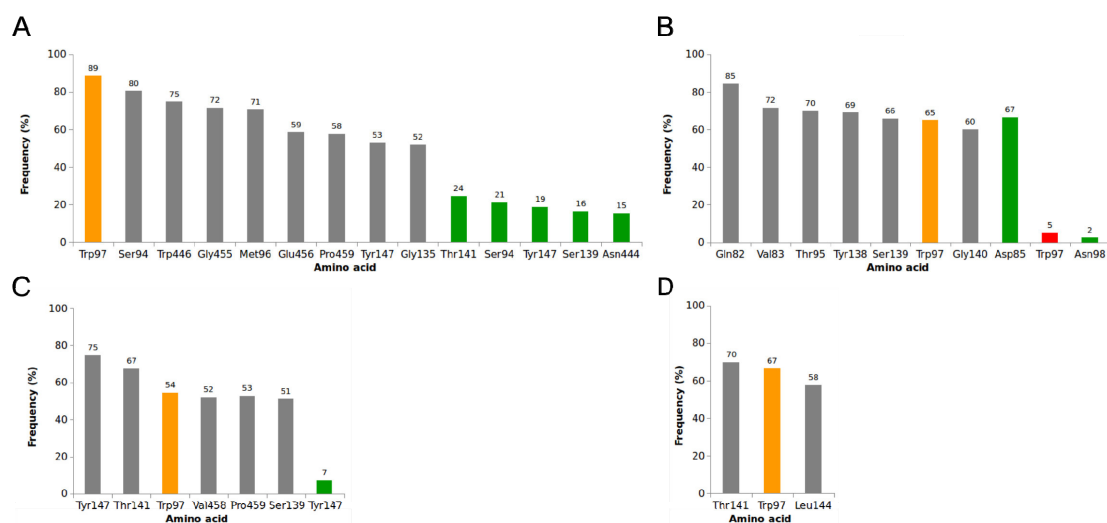


Figure S3. Identified contacts between ligands and RmACHE1 calculated for last 4.0 ns of MD simulations. A, Coumaphos. B, Gamma-murolene. C, Carvacrol. D, Elemol. Color system: hydrogen bonds (green), hydrophobic contacts (gray), likely the active site amino acid residue makes hydrophobic contact (orange), likely the active site amino acid residue is hydrophobic hydrogen bond (red). The numbers on bars indicate the percentage of contacts for each amino acid. Contacts evaluated on snapshots taken every 100 ps of the production stage.

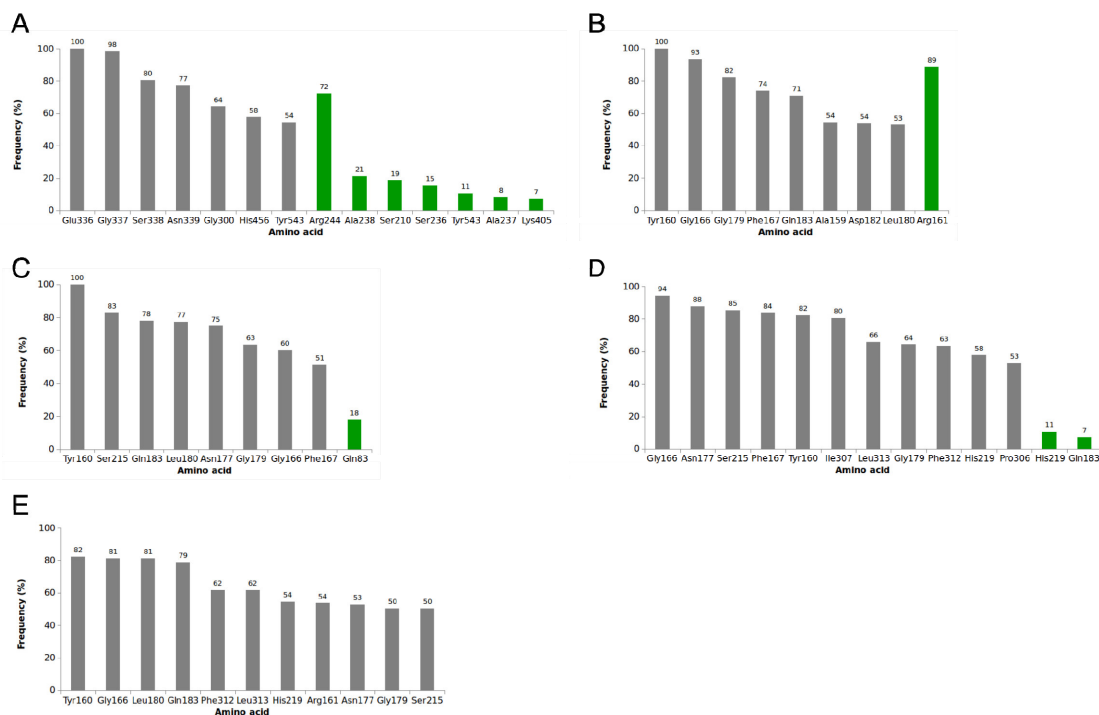


Figure S4. Identified contacts between ligands and RmACHE2 calculated for last 4.0 ns of MD simulations. A, Coumaphos. B, Thymol. C, Carvacrol. D, Elemol. E, Gamma-murolene. Color system: hydrogen bonds (green), hydrophobic contacts (gray). The numbers on bars indicate the percentage of contacts for each amino acid. Contacts evaluated on snapshots taken every 100 ps of the production stage.

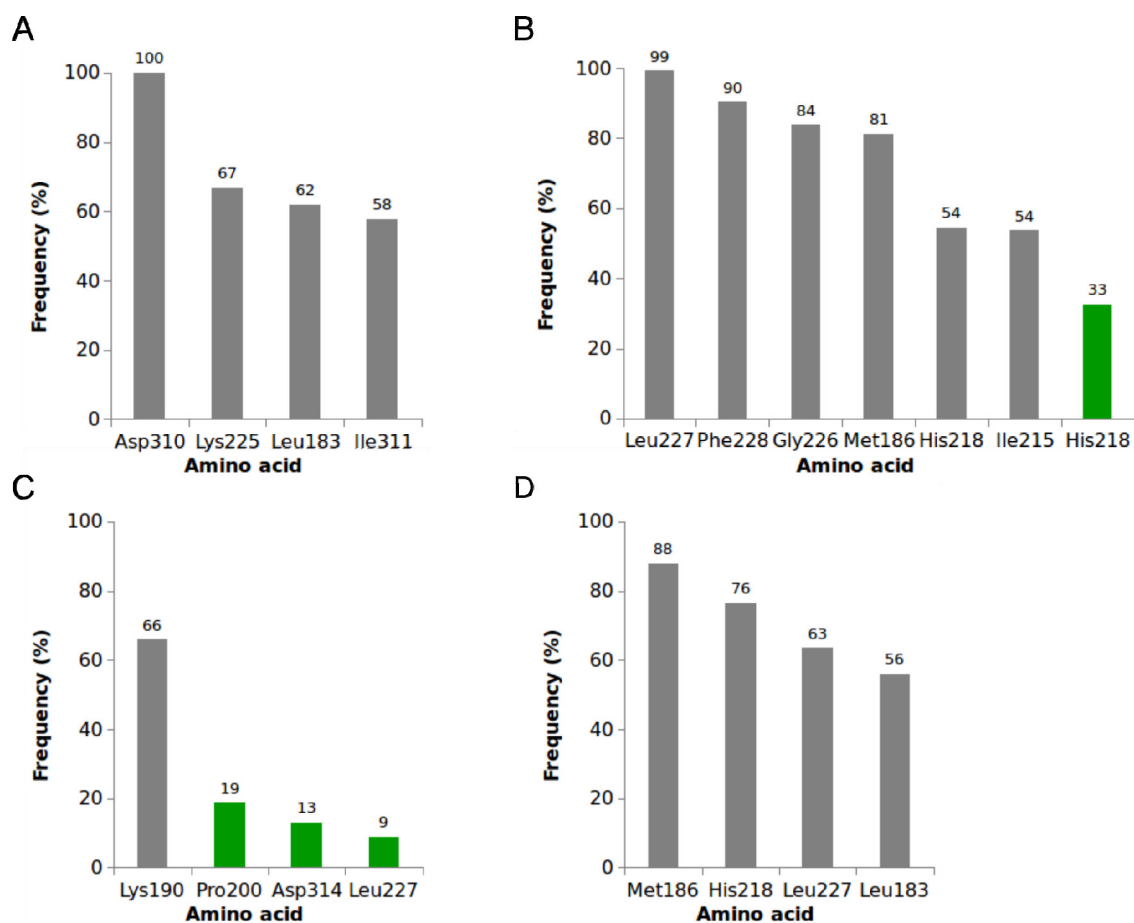


Figure S5. Identified contacts between ligands and RmAChE3 calculated for last 4.0 ns of MD simulations. A, Coumaphos. B, Gamma-murolene. C, Carvacrol. D, Elemol. Color system: hydrogen bonds (green), hydrophobic contacts (gray). The numbers on bars indicate the percentage of contacts for each amino acid. Contacts evaluated on snapshots taken every 100 ps of the production stage.

Table S1. Amino acid sequences from protein database used for homology modeling of acetylcholinesterases 1, 2, and 3 from the southern cattle fever tick *Rhipicephalus microplus*.

Model	NCBI code	Quantity structures used as template	Sequence identity % [^]	PDB IDs of the templates*
RmAChE1	CAA11702	28	42 to 46	1KU6, 1N5M, 1Q83, 1B41, 1F8U, 1MAA, 1C2B, 2XUD, 2C0P, 2HA4, 2J4C, 2JGE, 2WHP, 2WID, 2W6X, 2Y1K, 2X8B, 2XUD, 2JGF, 3DL7, 3ZLT, 3LII, 4A16, 4B00, 4AXB, 4AQD, 4BDT, 4B84
RmAChE2	ADM35952	20	33 to 44	1C2B, 1C7I, 1CLE, 1MAA, 1MX1, 1N5M, 1P0I, 1Q83, 1YA4, 2C0P, 2JGE, 2J4C, 2JGF, 2WHP, 2XUD, 2XUF, 2Y1K, 3ZLT, 4BDT, 4EY4
RmAChE3	AAP92139	21	34 to 36	1EAA, 1GQR, 1P0I, 1Q83, 1SOM, 1UT6, 2C58, 2CEK, 2DFP, 2J4C, 2PM8, 2W9I, 2WIF, 2XQF, 3GEL, 3IGM, 309M, 4AQD, 4AXB, 4B00, 4BDT

[^]Sequence identity of *Rhipicephalus microplus* (Rm) acetylcholinesterases (AChE) with crystallographic structures available in the PDB.

*Identifications (IDs) of amino acid sequence templates in the PDB that matched protein sequences for RmAChE 1, 2, and 3 registered with the respective NCBI code.

Table S2. Structural parameters of the homology models for the southern cattle fever tick, *Rhipicephalus microplus*, acetylcholinesterases 1, 2, and 3.

Model*	Procheck					Errat	Z-Score
	Core	Allow.	Gener.	Desall.	Overall G-factor ^a		
RmAChE1	70.8	26.9	2.1	0.2	-0.79	95.32	88.93
RmAChE2	74.0	23.6	1.1	1.3	-0.73	95.58	91.99
RmAChE3	67.9	28.7	1.5	1.9	-0.73	93.01	79.96

* *Rhipicephalus microplus* acetylcholinesterases 1, 2, and 3: RmAChE1, RmAChE2, and RmAChE3

^a dihedral G-factor

Table S3. Average of structural parameters analyzed in southern cattle fever tick, *Rhipicephalus microplus*, acetylcholinesterases 1, 2, and 3 during the last 10 nanoseconds of the molecular dynamics simulations

Simulation*	RMSD (nm) ^a	Rg (nm ³) ^b	NHb-intra ^c
RmAChE1	0,53 ± 0,01	2,37 ± 0,008	395,5 ± 9,6
RmAChE2	0,51 ± 0,01	2,35 ± 0,011	369,6 ± 9,7
RmAChE3	0,50 ± 0,01	2,37 ± 0,008	387,8 ± 9,4

* *Rhipicephalus microplus* acetylcholinesterases 1, 2, and 3: RmAChE1, RmAChE2, and RmAChE3

^a Root mean square deviation of RmAChE Cα atoms from starting coordinates (homology model); ^b Radius of gyration; ^c Number of hydrogen bonds (intramolecular)

Table S4. Secondary structure models generated by homology modeling and refined through molecular dynamics simulations (MD-RmAChEs), that were used in molecular docking and molecular dynamics simulations.

Model	Number of helices	Secondary structures		
		helices (residues)	Number of β -strands	β -strands (residues)
RmAChE1	14	α 1 (151 - 153), α 2 (185 - 203), α 3 (218 - 226), α 4 (254 - 268), α 5 (287 - 294), α 6 (321 - 324), α 7 (341 - 349), α 8 (363 - 373), α 9 (379 - 389), α 10 (398 - 412), α 11 (416 - 427), α 12 (457 - 461), α 13 (474 - 492), α 14 (539 - 548)	17	β 1 (25 - 27), β 2 (38 - 42), β 3 (45 - 47), β 4 (71 - 73), β 5 (79 - 81), β 6 (102 - 104), β 7 (108 - 116), β 8 (127 - 134), β 9 (159 - 163), β 10 (171 - 173), β 11 (182 - 184), β 12 (209 - 217), β 13 (236 - 241), β 14 (332 - 337), β 15 (433 - 438), β 16 (518 - 523), β 17 (528 - 532)
RmAChE2	16	α 1 (145 - 150), α 2 (163 - 166), α 3 (178 - 189), α 4 (193 - 197), α 5 (211 - 218), α 6 (223 - 227), α 7 (248 - 262), α 8 (274 - 281), α 9 (286 - 293), α 10 (361 - 370), α 11 (378 - 384), α 12 (402 - 410), α 13 (414 - 420), α 14 (459 - 464), α 15 (479 - 493), α 16 (532 - 540)	17	β 1 (10 - 15), β 2 (21 - 23), β 3 (25 - 28), β 4 (30 - 34), β 5 (38 - 45), β 6 (70 - 74), β 7 (108 - 112), β 8 (122 - 130), β 9 (134 - 136), β 10 (154 - 158), β 11 (205 - 208), β 12 (231 - 235), β 13 (327 - 334), β 14 (421 - 423), β 15 (430 - 439), β 16 (515 - 519), β 17 (522 - 525)
RmAChE3	16	α 1 (143 - 144), α 2 (178 - 196), α 3 (211 - 218), α 4 (248 - 256), α 5 (272 - 281), α 6 (285 - 291), α 7 (316 - 321), α 8 (338 - 346), α 9 (362 - 367), α 10 (384 - 386), α 11 (397 - 411), α 12 (414 - 426), α 13 (454 - 459), α 14 (474 - 479), α 15 (485 - 490), α 16 (528 - 533)	18	β 1 (12 - 18), β 2 (21 - 27), β 3 (41 - 45), β 4 (57 - 59), β 5 (66 - 68), β 6 (98 - 103), β 7 (120 - 125), β 8 (150 - 157), β 9 (202 - 207), β 10 (219 - 221), β 11 (229 - 234), β 12 (324 - 326), β 13 (329 - 336), β 14 (429 - 436), β 15 (463 - 465), β 16 (468 - 470), β 17 (510 - 515), β 18 (521 - 525)

Table S5. Interactions to the conformations chosen from docking.

Ligand	RmAChE1		RmAChE2		RmAChE3	
	Hydrogen bonds	Hydrophobic interactions	Hydrogen bonds	Hydrophobic interactions	Hydrogen bonds	Hydrophobic interactions
Carvacrol	Asp85	Gln82, Val83, Leu84, Ser94, Thr95, Met96, Trp97, Asn98, Ala99, Ser139 and Thr141	-	Tyr160, Arg161, Gly166, Phe167, Asn177, Gly179, Leu180, Gln183, Ser215 and Leu313	Leu227	Leu183, Met186, Lys187, Lys190, Ile215, His218, Gly226 and Phe228
Timol	Pro459	Met96, Trp97, Val146, Tyr147, Gln443, Asn444, Gly463, Glu464 and Tyr472	Arg161	Ala159, Tyr160, Gly166, Phe167, Asn177, Gly179, Leu180, Asp182 and Gln183	Leu227	Leu183, Met186, Lys187, Lys190, Ile215, His218, Gly226 and Phe228
Elemol	Thr141	Ser94, Trp97, Tyr133, Ser139, Tyr147, Glu215, Pro459 and Phe462	-	Tyr160, Arg161, Gly166, Phe167, Asn177, Gly179, Leu180, Gln183, Ser215, His219, Ile307, Phe212 and Leu313	His218	Leu183, Met186, Lys187, Lys190, Ile215, Lys225, Gly226, Leu227 and Phe228
Gama-muurulene	-	Ser94, Trp97, Ser139, Thr141, Tyr147, Glu215, Val458, Pro459 and Phe462	-	Tyr160, Arg161, Gly166, Phe167, Asn177, Gly179, Leu180, Gln183, Ser215, Thr216, His219 and Leu313	-	Leu183, Met186, Lys187, Lys190, Ile215, His218, Lys225, Gly226, Leu227 and Phe228
Coumaphos	Tyr147	Gly93, Ser94, Thr95, Met96, Trp97, Gly135, Thr141, Glu215, Trp446, Gly455, Val458 and Pro459	Ser338, Asn339 and Tyr543	Phe132, Ser210, Ile214, Gln235, Arg244, Gly300, Ser301, Thr333, Glu336, Gly337, Ile340, His456 and Glu459	Lys187 and Leu227	Leu183, Met186, Lys190, His218, Lys225, Gly226, Phe228 and Asp310

ANEXOS



Alberto J. O. Lopes <lopesajo@gmail.com>

Manuscript jp-2016-09571w assigned to Editor

1 mensagem

The Journal of Physical Chemistry

26 de setembro de 2016

<onbehalf+eic+jpc.acs.org@manuscriptcentral.com>

10:14

Responder a: eic@jpc.acs.org

Para: fdcalima@pq.cnpq.br

Cc: lopesajo@gmail.com, fdcalima@gmail.com, ricardo@ifpi.edu.br, kevin.temeyer@ars.usda.gov, beto.perezdeleon@ars.usda.gov, livioslz@yahoo.com, batista-office@jpc.acs.org

26-Sep-2016

RE: Manuscript Submission Editor Assignment

Journal: The Journal of Physical Chemistry

Part: Part B: Biophysical Chemistry, Biomaterials, Liquids, and Soft Matter

Section: B: Biophysical Chemistry and Biomolecules

Please note that the final decision on journal Part and Section remains with the journal Editors.

Title: "New Candidate Acaricidal Terpenes Acting Against Acetylcholinesterase Models of Rhipicephalus Microplus: A Theoretical Investigation"

Authors: Lopes, Alberto; Lima, Francisco; Ramos, Ricardo; Temeyer, Kevin; León, Adalberto ; Costa Junior, Livio

Manuscript ID: jp-2016-09571w

Dear Dr. Lima:

We are pleased to acknowledge receipt of your manuscript jp-2016-09571w entitled "New Candidate Acaricidal Terpenes Acting Against Acetylcholinesterase Models of Rhipicephalus Microplus: A Theoretical Investigation". Submission of a manuscript to The Journal of Physical Chemistry implies that the work reported therein has not received prior publication and is not under consideration for publication elsewhere in any medium, including electronic journals and computer databases, per the ACS Journal Publishing Agreement. If otherwise, please notify the assigned editor listed below:

Prof. Victor S. Batista

Senior Editor

The Journal of Physical Chemistry

Phone: 1-203-432-6672

Fax: 1-202-513-8845

Email: batista-office@jpc.acs.org

Furthermore, it is our policy that all authors must approve submission of this manuscript. If you are a co-author, we hope that you approve of the manuscript and its submission to The Journal of Physical Chemistry. If you do not approve of this submission, please notify the assigned editor immediately with a letter of explanation. If you do approve this manuscript submission, no further action is necessary.

ACS Publications uses CrossCheck's iThenticate software to detect instances of similarity in submitted manuscripts. In publishing only original research, ACS is committed to deterring plagiarism, including self-plagiarism. Your manuscript may be screened for similarity to published material.

The assigned editor will inform the corresponding author of his/her decision on the manuscript as soon as possible. Please address all future correspondence regarding this manuscript to the assigned editor.

Sincerely,

The Journal of Physical Chemistry Editorial Office

PLEASE NOTE: This email message, including any attachments, contains confidential information related to peer review and is intended solely for the personal use of the recipient(s) named above. No part of this communication or any related attachments may be shared with or disclosed to any third party or organization without the explicit prior written consent of the journal Editor and ACS. If the reader of this message is not the intended recipient or is not responsible for delivering it to the intended recipient, you have received this communication in error. Please notify the sender immediately by e-mail, and delete the original message. Thank you.

RESEARCH ARTICLE

Chenopodium ambrosioides L. Reduces Synovial Inflammation and Pain in Experimental Osteoarthritis

Gustavo P. Calado¹, Alberto Jorge O. Lopes¹, Livio M. Costa Junior¹, Francisco das Chagas A. Lima², Lucilene A. Silva¹, Wanderson S. Pereira¹, Flávia M. M. do Amaral¹, João Batista S. Garcia¹, Maria do Socorro de S. Cartágenes¹, Flávia R. F. Nascimento^{1*}

1 Health Sciences Graduate Program, Federal University of Maranhao, Biologic and Health Sciences Center, Av. dos Portugueses 1966, São Luís, MA, CEP:65085–580, Brazil, **2** Chemistry Graduate Program, Quantum Chemistry Computational Group, Department of Chemistry, State University of Piauí – 64002–150, Teresina, PI, Brazil

* nascimentoofrr@yahoo.com.br



OPEN ACCESS

Citation: Calado GP, Lopes AJO, Costa Junior LM, Lima FdCA, Silva LA, Pereira WS, et al. (2015) *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces Synovial Inflammation and Pain in Experimental Osteoarthritis. PLoS ONE 10(11): e0141886. doi:10.1371/journal.pone.0141886

Editor: Dominique Heymann, Faculté de médecine de Nantes, FRANCE

Received: June 25, 2015

Accepted: October 14, 2015

Published: November 2, 2015

Copyright: © 2015 Calado et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento em Pesquisa (CNPq).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The chronicity of osteoarthritis (OA), characterized by pain and inflammation in the joints, is linked to a glutamate receptor, N-methyl-D-aspartate (NMDA). The use of plant species such as *Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae) as NMDA antagonists offers a promising perspective. This work aims to analyze the antinociceptive and anti-inflammatory responses of the crude hydroalcoholic extract (HCE) of *C. ambrosioides* leaves in an experimental OA model. Wistar rats were separated into six groups (n = 24): clean (C), negative control (CTL-), positive control (CTL+), HCE0.5, HCE5 and HCE50. The first group received no intervention. The other groups received an intra-articular injection of sodium monoiodoacetate (MIA) (8 mg/kg) on day 0. After six hours, they were orally treated with saline, Maxicam plus (meloxicam + chondroitin sulfate) and HCE at doses of 0.5 mg/kg, 5 mg/kg and 50 mg/kg, respectively. After three, seven and ten days, clinical evaluations were performed (knee diameter, mechanical allodynia, mechanical hyperalgesia and motor activity). On the tenth day, after euthanasia, synovial fluid and draining lymph node were collected for cellular quantification, and cartilage was collected for histopathological analysis. Finally, molecular docking was performed to evaluate the compatibility of ascaridole, a monoterpene found in HCE, with the NMDA receptor. After the third day, HCE reduced knee edema. HCE5 showed less cellular infiltrate in the cartilage and synovium and lower intensities of allodynia from the third day and of hyperalgesia from the seventh day up to the last treatment day. The HCE5 and HCE50 groups improved in forced walking. In relation to molecular docking, ascaridole showed NMDA receptor binding affinity. *C. ambrosioides* HCE was effective in the treatment of OA because it reduced synovial inflammation and behavioral changes due to pain. This effect may be related to the antagonistic effect of ascaridole on the NMDA receptor.

respectively). After three, seven and ten days, the motor activity of the animals was measured to evaluate the walking score using a *Rotarod* device. A shows the kinetics of the animals' walking score, and B shows the percentage improvement in walking on day ten compared to day three. The data are represented as the means $\pm$ standard errors of the mean. The dashed red line represents the Clean group (without OA and untreated). * $p < 0.05$ compared to CTL- group. (XLSX)

S1 Table. Histopathological analysis of the synovial membrane from animals with MIA-induced OA and treated with *Chenopodium ambrosioides* HCE.

(XLSX)

S2 Table. Count of synovial and popliteal lymph node cells from animals with MIA-induced OA and treated with *Chenopodium ambrosioides* HCE.

(XLSX)

Acknowledgments

We would like to thank the “Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho” from Federal University of Ceara (CENAPAD-UFC) for his help with molecular docking and quantum chemistry calculation. The authors are also grateful to Arthur André Castro da Costa for assistance in the clinical trials. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) and Conselho Nacional de Desenvolvimento em Pesquisa (CNPq), Brazil.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GPC MSSC FRFN. Performed the experiments: GPC AJOL FCAL LAS WSP JBSG MSSC FRFN. Analyzed the data: GPC AJOL LMCJ FCAL MSSC FRFN. Contributed reagents/materials/analysis tools: LAS FMMA JBSG MSSC FRFN. Wrote the paper: GPC AJOL LMCJ FMMA LAS JBSG MSSC FRFN.

References

1. Kumar R, Mishra AK, Dubey NK, Tripathi YB. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxinigenic and antioxidant activity. *Int J Food Microbiol.* 2007; 115: 159–164. PMID: [17174000](#)
2. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, Plantarum. 2002.
3. Dembitsky V, Shkrob I, Hanus LO. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 2008; 152: 209–215.
4. Pinheiro Neto VF, Araujo BMA, Guerra PC, Borges MOR, Borges ACR. Efeitos do cataplasma das folhas de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) na reparação de tecidos moles e ósseo em rádio de coelhos. *J Bras Fitomed*, 2005; 3(2): 62–66.
5. Nascimento FRF, Cruz GVB, Pereira PVS, Maciel MCG, Silva LA, Azevedo APS, et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *J Life Sci.* 2006; 78: 2650–2653.
6. Patricio FJ, Costa GC, Pereira PVS, Aragao-Filho W, Sousa SM, Frazao JB, et al. Efficacy of the intraleisional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol.* 2008; 115: 313–319. PMID: [18035510](#)
7. Monzote L, Gille L, Scull R, Setzer WN, Steinbauer S, Garcia M, et al. Combinations of ascaridole, carvacrol and caryophyllene oxide against *Leishmania*. *Acta trop.* 2015–17; 145: 31–38.
8. Sousa LHA, Rios CEP, Assunção AKM, Fialho EMS, Costa GC, Nascimento FRF. Avaliação da ação analgésica do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. em ensaios pré-clínicos. *Rev Ciênc Saude.* 2012; 14 (1).