



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**EFEITOS CARRAPATICIDA E ANTI-HELMÍNTICO *IN VITRO* DE
ALCALOIDES SOBRE PARASITOS DE RUMINANTES E
CITOTOXICIDADE**

GISELE DIAS DA SILVA
Médica Veterinária

Salvador – Bahia
2020

GISELE DIAS DA SILVA

**EFEITOS CARRAPATICIDA E ANTI-HELMÍNTICO *IN VITRO* DE
ALCALOIDES SOBRE PARASITOS DE RUMINANTES E
CITOTOXICIDADE**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Lima Costa (UFBA)

Co-orientador: Profa. Dra. Maria José Moreira Batatinha (UFBA)

Co-orientador: Profa. Dra. Mariana Borges Botura (UEFS)

Salvador – Bahia
Novembro de 2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S58e Silva, Gisele Dias da.
Efeitos carrapaticida e anti-helmíntico de alcaloides *in vitro* sobre parasitos de ruminantes e citotoxicidade. / Gisele Dias da Silva. – 2020.
123 f.: il. color.

Orientadora: Silvia Lima Costa.
Coorientadores: Maria José Moreira Batatinha.
Mariana Borges Botura.
Tese (Doutorado – Ciência Animal nos Trópicos) -- Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2021.

1. Bovinos. 2. Caprinos 3. Berberina. 4.Harmalina. 5. Piperina. I. Costa, Silvia Lima. II. Batatinha, Maria José Moreira. III. Botura, Mariana Borges. IV. Título.

CDU: 595.42: 615.9

Efeitos carrapaticida e anti-helmíntico in vitro de alcaloides sobre parasitos de ruminantes e citotoxicidade

GISELE DIAS DA SILVA

Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutora em Ciências Animal nos Trópicos

Salvador, 27 de novembro de 2020

**Dra. Silvia Lima Costa
Orientadora
UFBA**

Comissão examinadora:

**Dra. Maria Consuelo Caribé Ayres
Presidente
EMEVZ / UFBA**

**Dra. Maria José Moreira Batista
UFBA**

**Dr. Lívio Martins Costa Junior
UFMA**

**Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto
UFRB**

**Dr. Thiago Campanharo Bahiense
UFBA**

**Dr. Luis Fernando Pita Gondim
Coordenador PPGCAT
EMEVZ / UFBA**



Emitido em 27/11/2020

ATA Nº 2318/2020 - EMEVZ (12.01.32)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado eletronicamente em 26/01/2021 20:33)

LUIS FERNANDO PITA GONDIM

COORDENADOR - TITULAR
DEAPAC/EMEVZ (12.01.32.02)

Matricula: 1085375

(Assinado eletronicamente em 21/01/2021 14:28)

MARIA CONSUELO CARIBE AYRES

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DEAPAC/EMEVZ (12.01.32.02)

Matricula: 285741

(Assinado eletronicamente em 27/01/2021 12:35)

SILVIA LIMA COSTA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DBFICS (12.01.20.03)
Matricula: 288059

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufba.br/documentos/> informando seu número: 2318, ano: 2020, tipo: ATA, data de emissão: 21/01/2021 e o código de verificação: da2bc62214

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GISELE DIAS DA SILVA – Nascida em 05 de novembro de 1980, na cidade de Salvador-BA. cursou a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA), e se formou no ano de 2009. Em 2012, obteve o título de Mestre pelo Programa de pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos – UFBA. Atua na área de Medicina Veterinária, com ênfase em Toxicologia animal, Plantas medicinais e Parasitologia.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha existência e oportunidade de evoluir.

À minha família, minha filha Valentina, que muitas vezes sabotou meus momentos de estudo querendo “colinho” de mãe! Em especial, ao meu marido Dinho, companheiro, que não mediu esforços para que eu pudesse me dedicar integralmente a este trabalho. Sem vocês, nada disso seria possível!

À Prof.^a Silvia Lima Costa pela orientação neste trabalho.

À Prof.^a Maria José Moreira Batatinha por todos esses anos de orientação e aprendizagem que me tornaram mais forte!

Às Prof.^{as} Mariana Borges Botura e Rosângela Soares Uzêda pela colaboração e orientação em todos os momentos em que foram solicitadas.

Aos alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Toxicologia (LATOX) agradeço a oportunidade de aprender e repassar conhecimento como tutora de vocês.

Aos Profs. Samuel Silva da Rocha Pita e Humberto Fonseca de Freitas do Laboratório de Bioinformática e Modelagem Molecular da faculdade de Farmácia (UFBA) pela execução do estudo *in silico* e colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Pita Godim, coordenador do Laboratório de cultivo celular da Escola de Medicina Veterinária (UFBA), em especial a Waléria Borges pela grande colaboração no provimento das células para o teste de citotoxicidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos.

RESUMO

SILVA, G.D. **Efeitos carrapaticida e anti-helmíntico de alcaloides *in vitro* sobre parasitos de ruminantes e citotoxicidade.** Salvador, Bahia, 2020. 123p. Tese (Doutor em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2020.

A utilização inadequada de antiparasitários tem favorecido à seleção de parasitos resistentes aos produtos químicos comerciais, o que tem incentivado pesquisas sobre a investigação de compostos obtidos de plantas para o controle das parasitoses dos animais. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antiparasitária e citotoxicidade dos alcaloides berberina, harmalina e piperina sobre parasitos de ruminantes. Os alcaloides utilizados neste estudo foram obtidos comercialmente, e suas atividades carrapaticida e anti-helmíntica foram investigadas contra larvas de *Rhipicephalus microplus* e nematoides gastrintestinais (NGI) de caprinos, respectivamente. Para a avaliação carrapaticida dos alcaloides foi utilizado o teste de imersão de larvas, enquanto que na avaliação anti-helmíntica foram empregados os testes de eclosão de ovos (TEO) e motilidade larvar (TML). Foram também investigados, a relação entre o efeito carrapaticida e a inibição *in vitro* (espectrofotometria) e *in silico* (acoplamento e dinâmica molecular) da enzima acetilcolinesterase de *R. microplus* (*RmAChE*) e os possíveis efeitos citotóxicos destes alcaloides em cultivo de células Vero através do teste de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenitetrazólio (MTT). Na avaliação carrapaticida, tanto a berberina (97%) quanto a piperina (98%) apresentaram atividade superior a 95%, não diferindo do controle positivo (fipronil, 100%, $p > 0,05$). Na mesma concentração (24 mM), apenas o tratamento com a harmalina resultou em baixa atividade carrapaticida (32,75%). A maior atividade anticolinesterásica *in vitro* foi observada para a berberina ($CI_{50} = 88,13 \mu\text{M}$, concentração inibitória 50%), enquanto a piperina apresentou baixa atividade inibitória da *RmAChE* ($CI_{50} > 200 \mu\text{M}$). Evidências obtidas no estudo *in silico* com a berberina e a *RmAChE* sugerem que este alcaloide preenche preferencialmente o sítio aniônico periférico (PAS) da enzima. Os resultados da avaliação anti-helmíntica revelaram que a berberina, a harmalina e a piperina apresentaram atividade ovicida com valores de concentração efetiva 50% (CE_{50}) iguais a 1,32; 1,6 e 0,0074 mM, respectivamente. No TML, apenas o alcaloide berberina apresentou eficácia larvicida com percentual de inibição da motilidade larvar igual a 98,17% (2,69 mM). Na avaliação citotóxica, os três alcaloides apresentam reduzida toxicidade para células Vero, com efeito citotóxico inferior a 50%. Estes resultados sugerem que os alcaloides berberina e piperina apresentam potencial antiparasitário com baixa toxicidade para células de mamíferos, e o provável mecanismo de ação carrapaticida da berberina está relacionado à inibição da enzima acetilcolinesterase de *R. microplus*.

Palavras-chave: bovinos, caprinos, berberina, harmalina, piperina

ABSTRACT

SILVA, G.D. **Acaricidal and anthelmintic effects of alkaloids *in vitro* on ruminants parasites and cytotoxicity.** Salvador, Bahia, 2020. 123p. Tese (Doutor em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2020.

The inappropriate use of antiparasitic agents has favored the selection of parasites resistant to commercial chemical products, which has encouraged research on the investigation of compounds obtained from plants for the control of animal's parasites. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the antiparasitic activity and cytotoxicity of berberine, harmaline and piperine alkaloids on ruminant's parasites. The alkaloids used in this study were obtained commercially, and their acaricidal and anthelmintic activities were investigated against *Rhipicephalus microplus* larvae and gastrointestinal nematodes (GIN) of goats, respectively. For the acaricidal evaluation of the alkaloids, the larval immersion test was used, while in the anthelmintic evaluation, the egg hatch (EHA) and larval motility (LMA) assay were used. The relationship between the acaricidal effect and the *in vitro* (spectrophotometry) and *in silico* (docking and molecular dynamics) inhibition of *R. microplus* acetylcholinesterase (*RmAChE*) and the possible cytotoxic effects of these alkaloids in Vero cell (MTT test) were also investigated. In the acaricidal evaluation, both berberine (97%) and piperine (98%) showed activity greater than 95%, not differing from the positive control (fipronil, 100%, $p > 0.05$). At the same concentration (24 mM), only treatment with harmaline resulted in low larvicidal activity (32.75%). The highest anticholinesterase activity *in vitro* was observed for berberine ($IC_{50} = 88.13 \mu\text{M}$, inhibitory concentration 50%), while piperine showed low inhibitory activity of *RmAChE* ($IC_{50} > 200 \mu\text{M}$). Evidence obtained in the *in silico* study with berberine and *RmAChE* 1 suggests that this alkaloid fills preferentially the peripheral anionic site (PAS) of the enzyme. The results of the anthelmintic evaluation revealed that berberine, harmaline and piperine showed ovicidal activity with values effective concentration 50% (EC_{50}) equal to 1.32, 1.6 and 0.0074 mM, respectively. In LMA, only the berberine alkaloid showed larvicidal efficacy with a percentage of larval motility inhibition equal to 98.17% (2.69 mM). In cytotoxic evaluation, the three alkaloids have reduced toxicity to Vero cells, with a cytotoxic effect of less than 50%. These results suggest that the alkaloids berberine and piperine have antiparasitic potential with low toxicity for mammalian cells, and the likely mechanism of acaricidal action of berberine is related to the inhibition of the acetylcholinesterase enzyme of *R. microplus*.

Keywords: cattle, goats, berberine, harmaline, piperine

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Efeitos carrapaticida e anti-helmíntico de alcaloides *in vitro* sobre parasitos de ruminantes e citotoxicidade.

	Página
Figura 1 - Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i>	18
Figura 2 - Ciclo biológico dos nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes....	20
Figura 3 - Estrutura química dos alcaloides berberina, harmalina e piperina.....	38

CAPÍTULO I

Estudos *in vitro* e *in silico* das atividades larvicida e anticolinesterásica dos alcaloides berberina, harmalina e piperina sobre *Rhipicephalus microplus*.

	Página
Figura 1 - Percentual de mortalidade (média \pm desvio padrão) <i>in vitro</i> de larvas de <i>R. microplus</i> expostas aos alcaloides berberina e piperina. (Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$).....	49
Figura 2 - Percentual de inibição (média \pm desvio padrão) <i>in vitro</i> da atividade da acetilcolinesterase exposta ao alcaloide berberina. (Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$).....	50
Figura 3 - Principais interações da <i>RmAChE</i> 1 complexada com a berberina. A estrutura <i>RmAChE</i> 1 é mostrada em <i>cartoon</i> (branco) e seus resíduos interagentes e a berberina estão representados em bastões e coloridos da seguinte forma: sítio interação (ciano), sítio aniônico periférico (PAS, azul escuro) e berberina (amarelo). Esta imagem foi gerada pelo Pymol 2.1.0 (Schrödinger, 2013)	51

CAPÍTULO II

Avaliação anti-helmíntica *in vitro* dos alcaloides berberina, harmalina e piperina sobre nematoides gastrintestinais de caprinos e citotoxicidade.

	Página
Figura 1 - Percentual de inibição da eclosão de ovos (média \pm desvio padrão) <i>in vitro</i> de nematoides gastrintestinais de caprinos tratados com alcaloides. (Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$).....	72
Figura 2 - Deposição de agregados na superfície de larvas de primeiro estágio (L1) expostas ao tratamento com berberina (A) e piperina (B). Controles: água destilada (C) e DMSO 0,5% (D).....	73
Figura 3 - Percentual de inibição (média \pm desvio padrão) da motilidade de larvas <i>in vitro</i> de terceiro estágio de nematoides gastrintestinais após o tratamento com alcaloides. (Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$).....	75
Figura 4 - Percentual de viabilidade celular de células Vero (média \pm desvio padrão) após o tratamento com alcaloides. (Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$).....	76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Avaliação anti-helmíntica *in vitro* dos alcaloides berberina, harmalina e piperina sobre nematoides gastrintestinais de caprinos e citotoxicidade.

Página

Tabela 1 - Valores da concentração efetiva 50% (CE₅₀) para inibir a eclosão de ovos ou motilidade de larvas, e para matar 50% (CC₅₀) de células Vero após o tratamento com alcaloides.....

73

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

Efeitos carrapaticida e anti-helmíntico de alcaloides *in vitro* sobre parasitos de ruminantes e citotoxicidade.

	Página
Quadro 1 - Atividade carrapaticida <i>in vitro</i> de plantas e compostos isolados contra <i>R. microplus</i>	23
Quadro 2 - Atividade anti-helmíntica <i>in vitro</i> de plantas e compostos isolados contra NGI de pequenos ruminantes.....	26

SUMÁRIO

EFEITOS CARRAPATICIDA E ANTI-HELMÍNTICO DE ALCALOIDES *IN VITRO* SOBRE PARASITOS DE RUMINANTES E CITOTOXICIDADE

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 HIPÓTESES.....	17
4 REVISÃO DE LITERATURA	17
4.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> (Acari: Ixodidae)	17
4.2 Nematoides Gastrintestinais (superfamília Trichonstrongyloidea)	18
4.3 Controle das principais parasitoses de ruminantes.....	20
4.4 Metabólitos secundários de plantas.....	27
4.4.1 Alcaloides.....	28
4.4.1.1 Berberina.....	28
4.4.1.1.1 Características gerais e estrutura química.....	28
4.4.1.1.2 Atividades biológicas.....	29
4.4.1.2 Harmalina.....	32
4.4.1.2.1 Características gerais e estrutura química.....	32
4.4.1.2.2 Atividades biológicas.....	32
4.4.1.3 Piperina.....	34
4.4.1.3.1 Características gerais e estrutura química.....	34
4.4.1.3.2 Atividades biológicas.....	35
4.5 Mecanismos de ação dos carrapaticidas.....	38
4.5.1 Acetilcolinesterase.....	39
4.5.1.1 Estudo da atividade anticolinesterásica.....	40
5 CAPÍTULO I: Estudos <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> das atividades larvicida e anticolinesterásica dos alcaloides berberina, harmalina e piperina sobre <i>Rhipicephalus microplus</i>.....	41
5.1 RESUMO.....	41
5.2 ABSTRACT.....	42
5.3 INTRODUÇÃO.....	43
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44

5.4.1 Obtenção dos alcaloides.....	44
5.4.2 Amostra de <i>Rhipicephalus microplus</i>	45
5.4.3 Estudos <i>in vitro</i>	45
5.4.3.1 Avaliação da atividade carrapaticida: Teste de imersão de larvas.....	45
5.4.3.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica.....	46
5.4.3.3 Análise estatística.....	47
5.4.4 Estudos <i>in silico</i>	47
5.4.4.1 Estudos de acoplamento molecular na enzima acetilcolinesterase de <i>Rhipicephalus microplus</i> 1 (<i>RmAChE</i> 1)	47
5.4.4.2 Simulação de dinâmica molecular do complexo alcaloide – <i>RmAChE</i> 1.....	47
5.5 RESULTADOS.....	49
5.5.1 Atividade carrapaticida <i>in vitro</i>	49
5.5.2 Atividade anticolinesterásica <i>in vitro</i>	49
5.5.3 Ensaio de acoplamento e dinâmica molecular <i>in silico</i>	50
5.6 DISCUSSÃO.....	52
5.7 CONCLUSÃO.....	56
5.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
6 CAPÍTULO II: Avaliação anti-helmítica <i>in vitro</i> dos alcaloides berberina, harmalina e piperina sobre nematoides gastrintestinais de caprinos e citotoxicidade.....	65
6.1 RESUMO.....	65
6.2 ABSTRACT.....	66
6.3 INTRODUÇÃO.....	67
6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	68
6.4.1 Obtenção dos alcaloides.....	68
6.4.2 Avaliação anti-helmítica <i>in vitro</i>	68
6.4.2.1 Teste de eclosão de ovos (TEO).....	69
6.4.2.2 Teste de motilidade larvar (TML).....	69
6.4.3 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	70
6.4.3.1 Cultivos de células Vero.....	70
6.4.3.2 Ensaio de viabilidade celular.....	70
6.4.4 Análise estatística.....	71
6.5 RESULTADOS.....	71
6.5.1 Atividade ovicida.....	71

6.5.2 Atividade larvicida.....	74
6.5.3 Atividade citotóxica.....	75
6.6 DISCUSSÃO.....	76
6.7 CONCLUSÃO.....	80
6.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
APÊNDICE A - Curva de absorção à 412 nm versus concentração do substrato (acetiltiocolina μM)	116
APÊNDICE B - Log da concentração do inibidor (berberina μM) em função do percentual de inibição (%)......	117
APÊNDICE C - Valores de desvio médio padrão (RMSD) na simulação de 10 ns (A) e valores do raio de giro (Rg) na simulação de 4-10 ns (B) para <i>RmAChE 1 (apo)</i> e o complexo com a berberina.....	118
APÊNDICE D - Flutuação Média (RMSF) de resíduos de <i>RmAChE1 (apo)</i> e do complexo com berberina.....	119
APÊNDICE E - Área de contato (Å^3) entre resíduos da <i>RmAChE</i> e berberina.....	120
ANEXO 1- Certificado da CEUA para o estudo carrapaticida e anticolinesterásico....	121
ANEXO 2 - Certificado da CEUA para o estudo anti-helmíntico.....	122

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta um dos maiores rebanhos de bovinos do mundo, com aproximadamente 214 milhões de cabeças. Deste efetivo, 13% estão localizados na região Nordeste, com predominância para o Estado da Bahia, que dispõe do maior rebanho desta região com 35,72%. Em relação ao rebanho caprino, o país é detentor de aproximadamente 11 milhões de cabeças, com destaque para a região Nordeste, com o maior percentual deste rebanho (94,5%). O Estado da Bahia participa com 32,79% do efetivo nordestino, sendo o maior produtor nesta região (IBGE, 2019). Fatores relacionados ao manejo inadequado dos animais, associado às características climáticas altamente favoráveis à ocorrência de parasitos, têm propiciado o estabelecimento de doenças como as ixodidioses e nematodioses gastrintestinais em bovinos e caprinos, respectivamente, contribuindo para elevadas perdas econômicas (GRISI et al., 2002; SÁ e SÁ, 2004; GRISI et al., 2014).

Em bovinos, altas infestações pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* leva à redução na produção de leite e carne, diminuição do ganho de peso, depreciação do couro e mortalidade dos animais, principalmente em decorrência da sua atuação como vetor na transmissão dos agentes causadores da babesiose e anaplasmose bovina (BANUMATHI et al., 2017).

As infecções por nematoides gastrintestinais em caprinos são responsáveis pela redução na ingestão de alimentos com consequentes reduções do crescimento, ganho de peso, desempenho reprodutivo e produção de leite (VAN HOUTERT e SYKES, 1996; SANTOS et al., 2019). O helminto *Haemonchus contortus* é o parasito mais prevalente nas infecções de pequenos ruminantes no Brasil (BORGES et al., 2015; KANETO et al., 2016), e por ter hábito alimentar hematófago, pode causar anemia severa, edema submandibular e letargia, podendo levar os animais a óbito em infecções maciças (WALLER et al., 1996).

O principal método de controle destas parasitoses é por meio da utilização de produtos carrapaticidas e anti-helmínticos químicos comerciais. Entretanto, o uso excessivo e inadequado desses produtos tem selecionado populações de parasitos resistentes aos mesmos (ROEBER, JEX e GASSER, 2013) e contribuído para aumentar o risco de contaminação do ambiente e alimentos de origem animal com seus resíduos (GONÇALVES et al., 2016). Estes fatores têm incentivado pesquisas sobre a busca de novas moléculas ativas, que sejam menos tóxicas e mais eficientes. Plantas geralmente contêm uma ampla variedade de compostos que podem ser testados como fonte alternativa de tratamento promissor no controle de parasitos (TORRES et al., 2014, ROSADO-AGUILAR et al., 2017; ADENUBI et al., 2018). As

atividades farmacológicas de plantas podem ser atribuídas a um ou mais compostos químicos produzidos pelo metabolismo secundário da planta, e que estão diretamente envolvidos com mecanismos de defesa e adaptação das plantas ao meio ambiente (SANTOS, 2010).

Dentre os vários compostos ativos vegetais incluem-se os alcaloides, metabólitos secundários que apresentam na sua estrutura química um anel heterocíclico com um ou mais átomos de nitrogênio (ROBERTS e WINK, 1998; ANISZEWSKI, 2007). Berberina, piperina e harmalina são alcaloides farmacologicamente ativos e encontrados em diferentes espécies de plantas. A berberina é um composto amplamente distribuído no reino vegetal (famílias Berberidaceae, Papaveraceae e Ranunculaceae) (KIM et al., 2004; ASAI et al., 2007; ANDOLA et al., 2010) com ações antiprotozoária (SOFFAR et al., 2001), anti-helmíntica (SATOU et al., 2002), antibacteriana (DZIEDZIC, WOJTYCZKA e KUBINA, 2015), antiviral (LUGANINI et al., 2019), antifúngica (SINGH et al., 2001), antitumoral (LU et al., 2015; KAUR et al., 2016), neuroprotetora (HE et al., 2017) e anticolinesterásica (KIM et al., 2004; JUNG et al., 2009; EL-WAHAB et al., 2013; ROSELLI et al., 2016; HUSSIEN et al., 2018; BALKRISHNA et al., 2019; KONG et al., 2019).

A piperina pode ser isolada principalmente dos frutos de espécies do gênero *Piper* sp. (SEMLER e GROSS, 1988) e apresenta atividades farmacológicas que incluem ação inseticida (SAMUEL et al., 2016), antitumoral (GREENSHIELDS et al., 2015; GUNASEKARAN, ELANGOVAN e DEVARAJ, 2017), carrapaticida (CHAGAS et al., 2012; KUMAR et al., 2012), anti-helmíntica (SUDHAKAR et al., 2013), imunomoduladora (SHENOY et al., 2014; DOUCETTE et al., 2015) e anticolinesterásica (CHONPATHOMPIKUNLERT, WATTANATHORN e MUCHIMAPURA, 2010; DAHIYA et al., 2018).

O alcaloide harmalina pode ser obtido das sementes e frutos da *Peganum harmala*, (BOURNINE et al., 2017) e tem atividades antifúngica e antibacteriana (NENAAH 2010), carrapaticida (SHANG et al., 2016), anticolinesterásica (YANG et al., 2015a), antitumoral (BOURNINE et al., 2017) e inibição da enzima monoamina oxidase (NASEHI et al., 2015).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima essencial para o funcionamento do sistema nervoso dos artrópodes e sua inibição leva à paralisia neuromuscular e consequente morte do parasito (TAN et al., 2011). A inibição desta enzima corresponde ao mecanismo de ação dos carrapaticidas sintéticos organofosforados e carbamatos disponíveis comercialmente e frequentemente utilizados na Medicina Veterinária (GUERRERO, LOVIS e MARTINS, 2012). No carrapato *R. microplus* três AChEs (*RmAChE* 1, *RmAChE* 2 e *RmAChE* 3) foram

descritas, as quais apresentam diferentes propriedades cinéticas, sugerindo que estas enzimas desempenham diferentes funções no carrapato (TEMEYER et al., 2010).

Nenhum relato sobre as atividades carrapaticida contra *R. microplus* e anti-helmíntica sobre nematoides gastrintestinais de caprinos foram descritos até o momento para a berberina, piperina e harmalina, havendo apenas uma citação para a piperina (CHAGAS et al., 2012). Além disso, estes três alcaloides apresentam comportamento inibitório contra AChEs de peixe e/ou roedores, o que justificou a realização deste trabalho que visa contribuir para o desenvolvimento de novos carrapaticidas e anti-helmínticos eficazes e seguros.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar *in vitro* a atividade antiparasitária e citotoxicidade dos alcaloides berberina, harmalina e piperina sobre ecto e endoparasitos de ruminantes.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a atividade carrapaticida dos alcaloides berberina, harmalina e piperina em larvas de *R. microplus*;
- Avaliar *in vitro* a atividade anticolinesterásica dos alcaloides berberina, harmalina e piperina em larvas de *R. microplus*;
- Avaliar *in vitro* a atividade anti-helmíntica dos alcaloides berberina, harmalina e piperina sobre nematoides gastrintestinais de caprinos em ensaios de eclosão de ovos e motilidade larvar;
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos alcaloides berberina, harmalina e piperina em cultivos de células Vero;
- Avaliar *in silico* as interações dos alcaloides berberina, harmalina e piperina no sítio ativo da enzima acetilcolinesterase de *R. microplus* através do acoplamento (*docking*) e dinâmica molecular.

3 HIPÓTESES

- Os alcaloides berberina, harmalina e piperina têm efeito carrapaticida sobre larvas de *R. microplus* com mecanismo de ação anticolinesterásico;
- Os alcaloides berberina, harmalina e piperina têm ação anti-helmíntica sobre ovos e larvas infectantes dos nematoides gastrintestinais de caprinos;
- Os alcaloides berberina, harmalina e piperina têm baixa toxicidade em células Vero.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

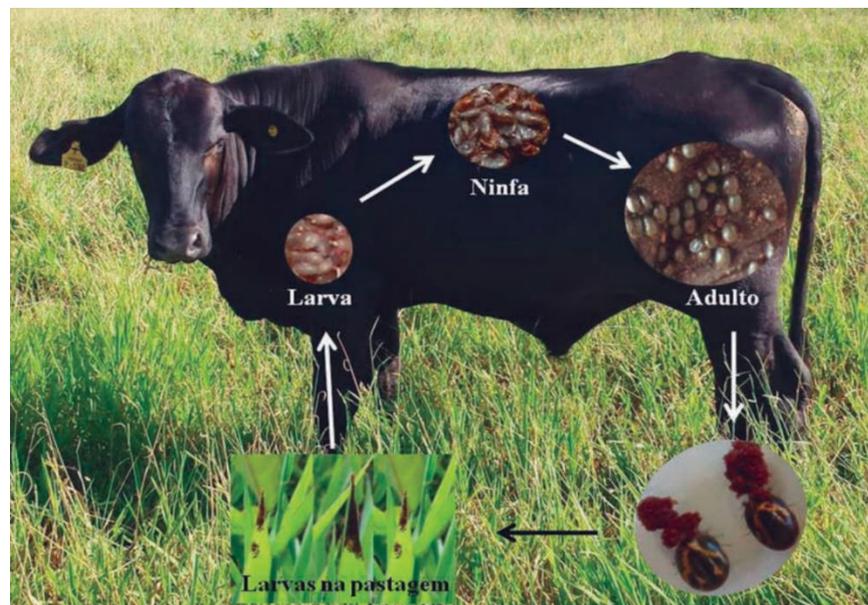
O carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasito hematófago com ampla distribuição mundial e grande importância econômica (ANGUS, 1996; BANUMATHI et al., 2017). Esta espécie de carrapato parasita preferencialmente bovinos, embora, outros animais também possam ser hospedeiros (BARROS-BATTESTI, ARZUA e BECHARA, 2006). As infestações por este carrapato estão associadas a perdas econômicas na pecuária bovina, devido à redução na produção de leite e carne, diminuição do ganho de peso, depreciação do couro e mortalidade dos animais. O carrapato *R. microplus* também pode atuar como vetor na transmissão de protozoários como *Babesia bigemina* e *B. bovis*, bem como bactérias da espécie *Anaplasma marginale*, que são os agentes etiológicos do Complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (JONSSON, 2006; BANUMATHI et al., 2017). Segundo Rodrigues e Leite (2013), infestações maciças por esta espécie de carrapato diminuem a produção leiteira com redução anual média de 90 L de leite/vaca. No Brasil, este carrapato é responsável por prejuízos econômicos anuais estimados em 3,2 bilhões de dólares, ficando atrás apenas dos nematoides gastrintestinais com 7,1 bilhões (GRISI et al., 2014). De acordo com Andreotti, Garcia e Koller (2019), o controle deste carrapato é importante para o aumento da produção e rentabilidade do sistema de criação do rebanho.

Ao contrário de outros carrapatos, o ciclo biológico de *R. microplus* (Figura 1) é realizado em um único hospedeiro (ciclo monoxeno), onde são realizadas duas mudas no mesmo animal, do estágio larvar para ninfa e de ninfa para adulto. Este carrapato apresenta duas fases distintas em seu ciclo de vida: a fase parasitária, no hospedeiro, e a fase não parasitária (vida livre), ocorrendo no meio ambiente. O ciclo se inicia com a fêmea ingurgitada (teleógina), que se desprende do bovino, cai ao solo e realiza a oviposição cerca

de três dias depois. A eclosão das larvas ocorre cerca de 21 dias após a completa postura dos ovos. As larvas ativas migram para as extremidades das folhas no pasto a procura do hospedeiro. Em contato com o bovino, a larva se fixa e inicia sua alimentação (6-8 dias). Em seguida, mudam para ninfas, que após um período de 9-16 dias, sofre nova muda atingindo o estágio adulto com diferenciação sexual para machos ou fêmeas. Durante o ingurgitamento da fêmea ocorre o acasalamento. A fase parasitária dura em média 21 dias, desde a fixação das larvas no bovino até a queda da teleógina ao solo, sendo que os machos permanecem no hospedeiro por um período maior para a realização de novas cópulas (GONZALES, 1974; FARIAS et al., 1995).

Fatores climáticos como, temperatura e umidade, podem influenciar no ciclo de vida do carrapato, principalmente na fase não parasitária. A oviposição e a eclosão das larvas no ambiente são aceleradas sob temperaturas elevadas, enquanto o frio diminui ou inibe o desenvolvimento de ovos e larvas (HITCHCOCK, 1955). No hospedeiro, o ciclo biológico ocorre independente das condições climáticas (FARIAS et al., 1995). Segundo Lima (1995), umidade relativa do ar acima de 70%, elevada precipitação pluviométrica e temperaturas até 25°C favorecem a ocorrência de larvas de *R. microplus* nas pastagens.

Figura 1- Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*.



Fonte: (ANDREOTTI, GARCIA e KOLLER, 2019)

4.2 Nematoides gastrintestinais (superfamília Trichonstrongyloidea)

De acordo com Costa, Simões e Riet-Correa (2011), as principais espécies de nematoides encontradas no trato gastrintestinal de pequenos ruminantes são: *Haemonchus*

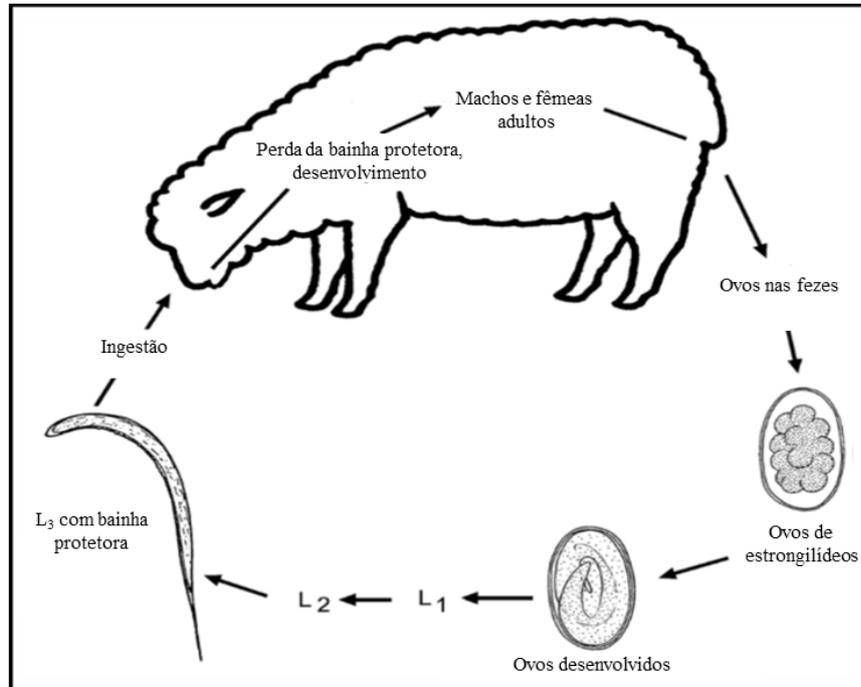
contortus e *Trichostrongylus axei* no abomaso, *T. colubriformis*, *Strongyloides papillosus*, *Cooperia punctata*, *C. pectinata* e *Bunostomum trigonocephalum* no intestino delgado, e *Oesophagostomum colubianum*, *Trichuris ovis*, *T. globulosa* e *Skrjabinema sp.*, no intestino grosso. Nas infecções naturais, os animais geralmente encontram-se infectados com mais de um gênero de nematoides, sendo *H. contortus* a espécie mais importante em caprinos e ovinos criados em áreas tropicais e subtropicais (CANTACESSI, CAMPBELL e GASSER, 2012). No Brasil, *Haemonchus sp.* e *Trichostrongylus sp.* tem se mostrado como os gêneros mais prevalentes dentre os nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes (AHID et al., 2007; COELHO et al., 2010; LIMA et al., 2010; MELO et al., 2013; BORGES et al., 2015; KANETO et al., 2016), se desenvolvendo, preferencialmente, em climas quentes e úmidos (ZAJAC, 2006).

Os nematoides gastrintestinais (NGI) constituem uma importante causa de doença que interfere na produção de pequenos ruminantes, resultando, dentre outros, na redução da ingestão de alimentos, com consequentes reduções do crescimento, ganho de peso, desempenho reprodutivo e produção de leite (VAN HOUTERT e SYKES, 1996; SANTOS et al., 2019). Altas infecções por *H. contortus* são tipicamente acompanhadas por sinais clínicos relacionados à atividade hematófaga deste parasito, como anemia severa, edema submandibular e letargia, podendo levar os animais a óbito (WALLER et al., 1996). Altos níveis de infecção de caprinos por NGI, podem também diminuir a qualidade do leite, com redução nos teores de gordura e proteína (ALBERTI et al., 2014).

O ciclo biológico destes nematoides apresentam duas fases: uma fase parasitária, no hospedeiro, e outra não parasitária (vida livre) no ambiente (TAYLOR, COOP e WALL, 2010) (Figura 2). Os helmintos adultos parasitam o abomaso ou intestino de pequenos ruminantes produzindo ovos que serão eliminados juntamente com as fezes (ZAJAC, 2006). No ambiente, ocorre o embrionamento dos ovos e a eclosão das larvas de 1º estágio. Estas larvas se desenvolvem para os estádios L2 e L3, sendo o L3 a forma infectante. As larvas de 3º estágio apresentam dupla cutícula sendo a mais externa chamada de bainha protetora, com função de promover maior resistência às condições ambientais, e também dificultando a penetração dos anti-helmínticos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005); estas larvas deixam as fezes e direcionam-se às pastagens, onde realizam o geotropismo negativo nas horas mais frescas do dia, facilitando a ingestão pelos hospedeiros. No trato gastrintestinal dos animais, a larva L3 perde a bainha e a depender da espécie migra para o abomaso ou intestino, podendo realizar ou não a fase histiotrófica (*Haemonchus sp.* e *Trichostrongylus*

sp.), onde se desenvolvem para larvas L4, L5 e adultos, responsáveis pelas alterações patológicas nos animais (ZAJAC, 2006; TAYLOR, COOP e WALL, 2010).

Figura 2 - Ciclo biológico dos nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes.



Fonte: (ROEBER, JEX e GASSER, 2013) adaptado pelo autor.

4.3 Controle das principais parasitoses de ruminantes

Os antiparasitários sintéticos ainda são a principal ferramenta utilizada para o controle de parasitos em ruminantes. O controle das infestações por *R. microplus* é realizado, principalmente, através da utilização de uma ampla variedade de carrapaticidas comerciais. No Brasil, os grupos químicos mais frequentemente utilizados no controle do carrapato bovino de aptidão leiteira são os piretroides, organofosforados e formamidinas (amitraz) (BRITO et al., 2015), embora, classes de compostos mais recentes como lactonas macrocíclicas, fenilpirazol e benzoilfenilureias também sejam empregadas com frequência no gado de corte (RECK JÚNIOR et al., 2014; SOUZA et al., 2014; CASTRO-JANER et al., 2015). Assim como para os carrapatos, o controle das nematodioses gastrintestinais em pequenos ruminantes também é baseado na utilização de anti-helmínticos químicos comerciais (SANTOS et al., 2019). As principais classes de compostos anti-helmínticos utilizados no controle das nematodioses gastrintestinais de pequenos ruminantes incluem, os

benzimidazóis (albendazol), lactonas macrocíclicas (ivermectina e moxidectina), imidatiázóis (levamisol), salicilanilidas (closantel) e tetrahidropirimidinas (pirantel) (LANUSSE e PRICHARD, 1993) e mais recentemente, os derivados da aminoacetnitrila (monepantel) (KAMINSKY et al., 2008).

A utilização indiscriminada desses produtos tem acelerado a seleção de populações de carrapatos e helmintos com resistência parasitária (ROEBER, JEX e GASSER, 2013), a qual pode ser definida como o fenômeno que impede que um fármaco mantenha a mesma eficácia contra parasitas após um determinado período de tempo, quando utilizados nas mesmas condições (CAVALCANTE et al., 2009). De acordo com Crampton, Baxter e Barker (1999), a resistência ocorre quando uma população de parasitos desenvolve a capacidade de sobreviver a uma dose geralmente letal do antiparasitário. Os parasitos sobreviventes se reproduzem e contribuem com genes resistentes para as novas gerações (CASTILHO et al., 2017). O processo de resistência envolve mais de um mecanismo, e está associado a mutações em genes relacionados à suscetibilidade a medicamentos (insensibilidade do alvo molecular), aumento do metabolismo e/ou redução da capacidade do carrapaticida em penetrar através das camadas protetoras externas do corpo do carrapato (MANJUNATHACHAR et al., 2014). Outro problema relevante relacionado ao uso excessivo destes produtos é a presença de resíduos no ambiente e nos alimentos de origem animal (BANUMATHI et al., 2017), além de intoxicação dos animais e seres humanos.

De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), um carrapaticida é considerado efetivo quando o percentual de eficácia é igual ou superior a 95%. Para os produtos anti-helmínticos destinados aos ruminantes, o percentual de eficácia deve ser igual ou superior a 90% (BRASIL, 1997).

No Brasil, resistência aos principais carrapaticidas sintéticos empregados no controle de *R. microplus* tem sido frequentemente documentada utilizando testes *in vitro*. No Estado da Bahia, a ocorrência de cepas de *R. microplus* resistentes ao amitraz, piretroides, organofosforados e associações entre estes, já foram relatadas em diversas localidades, incluindo as Regiões Sul (CAMPOS JÚNIOR e OLIVEIRA, 2005; RAYNAL et al., 2018), Centro-Norte (RAYNAL et al., 2013; RAYNAL et al., 2018), Centro-Sul, Extremo Oeste e Nordeste do Estado (RAYNAL et al., 2018). No município de Ilhéus, Campos Júnior e Oliveira (2005) observaram baixos percentuais médios de eficiência para o amitraz (30,95%), piretroide (65,04%) e associações organofosforado/piretroide (75,13%), e organofosforado/organofosforado/piretroide (75,73%). Em municípios da Região Centro-Norte da Bahia, os percentuais médios de eficiência foram de 32,35% para o amitraz, 23,18%

para organofosforado, 12,67 e 11,13% para os piretroides cipermetrina e deltametrina, respectivamente, e 23,18% para associação organofosforado/piretroide (RAYNAL et al., 2013). Posteriormente, Raynal e colaboradores (2018), também observaram resistência a estes mesmos grupos químicos nas Regiões Centro-Sul, extremo Oeste, Nordeste e Sul do Estado com percentuais de eficácia de 13,37%, 15,74%, 24,50% e 23,12% para cipermetrina, deltametrina, amitraz e diclorvós/clorpirifós, respectivamente.

A resistência de *R. microplus* aos carrapaticidas dos grupos químicos organofosforados, piretroides e formamidinas (amitraz) também tem sido relatada em outros Estados, tais como Rio Grande do sul (SANTOS et al., 2008; CAMILLO et al., 2009; RECK JÚNIOR et al., 2014), São Paulo (PEREIRA, 2006; MENDES et al., 2011), microrregião de Goiânia/Goiás (SILVA et al., 2000), Pernambuco (SANTANA et al., 2015), Mato Grosso do Sul (GOMES et al., 2011), região semiárida da Paraíba (SILVA et al., 2005) e Sergipe (OLIVEIRA e AZEVEDO, 2002). Classes de compostos carrapaticidas mais recentes como as lactonas macrocíclicas (ivermectina), fenilpirazol (fipronil) e benzoilfenilureias (fluazurom) também tem apresentado baixa eficácia no controle de carrapatos no Brasil (RECK JÚNIOR et al., 2014; SOUZA et al., 2014; CASTRO-JANER et al., 2015).

Resistência anti-helmíntica a diferentes compostos químicos comerciais também tem sido descrita em diversos Estados do País. Na Bahia, esta resistência foi avaliada em rebanhos de caprinos do bioma caatinga e mata atlântica, onde observou-se baixa eficácia para os compostos albendazol (33,3%), ivermectina (29,6%), levamisol (54,6%), closantel (49,33%) e moxidectina (82%) no bioma caatinga, e para albendazol (20,8%) e ivermectina (30,8%) no bioma mata atlântica (BORGES et al., 2015). Resistência ao levamisol (87%) em caprinos também já foi encontrada na região centro norte da Bahia (SILVA et al., 2016).

Resultados de pesquisas realizadas em outros Estados também demonstram a presença de NGI resistentes em rebanhos caprinos e ovinos, incluindo Alagoas com resistência ao albendazol (80%) e ivermectina (87%) (AHID et al., 2007); Pernambuco com parasitos resistentes ao albendazol (LIMA et al., 2010); Rio Grande do Norte com 90 e 43,3% das propriedades estudadas apresentando parasitas resistentes ao albendazol e ivermectina, respectivamente (COELHO et al., 2010); Paraíba com baixa eficácia para ivermectina (24,6-30,9%) e levamisol (86,7%) (MELO et al., 2013); São Paulo com resistência ao albendazol e ivermectina em todas as propriedades estudadas e com 50% destas propriedades resistentes a moxidectina e levamisol (KANETO et al., 2016), e Rio Grande do Sul com resistência anti-helmíntica para abamectina, albendazol, closantel, levamisol, monepantel e triclorfon (OLIVEIRA et al., 2017).

O avanço das discussões sobre questões relacionadas à proteção ambiental, saúde animal e pública tem incentivado a busca por produtos naturais eficientes e ecologicamente corretos para o controle de parasitos (CORRÊA e SALGADO, 2011). Pesquisas com derivados vegetais têm favorecido a descoberta de moléculas bioativas contra várias espécies de patógenos (MCGAW e ELLOF, 2008). Os produtos naturais têm sido uma fonte inesgotável de recursos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de enfermidades humanas e animais (TURNER et al., 2008).

Estudos com a avaliação da atividade antiparasitária de plantas têm crescido notavelmente nos últimos anos. As investigações têm sido realizadas utilizando óleos essenciais, extratos, frações e compostos isolados de diferentes espécies de plantas. As atividades antiparasitárias de plantas e compostos isolados contra *R. microplus* e NGI de pequenos ruminantes estão relacionadas nos quadros 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1 – Atividade carrapaticida *in vitro* de plantas e compostos isolados contra *R. microplus*.

Família	Planta	Óleo/extrato/fração/ composto isolado	Estágio do carrapato	Autor
Amaryllidaceae	<i>Allium sativum</i>	Óleo essencial	Larvas	MARTINEZ-VELÁZQUEZ et al., 2011
Araceae	<i>Arisaema anurans</i>	Óleo essencial, Asarona (fenilpropanoide) e Cubenol (terpeno)	Larvas e fêmeas ingurgitadas	JIA et al., 2018
Bromeliaceae	<i>Neoglaziovia variegata</i>	Extratos acetato de etila, clorofórmio, etanólico e hexânico	Fêmeas ingurgitadas	DANTAS et al., 2015
Fabaceae	<i>Amburana cearensis</i>	Extrato etanólico	Larvas	DANTAS et al., 2016
	<i>Prosopis juliflora</i>	Extrato metanólico e fração de alcaloides	Larvas e fêmeas ingurgitadas	LIMA et al., 2020

Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Óleo essencial	Larvas	MARTINEZ-VELÁZQUEZ et al., 2011
Lauraceae	<i>Ocotea aciphylla</i>	Extrato etanólico Frações	Larvas e fêmeas ingurgitadas	CONCEIÇÃO et al., 2017
	<i>Ocotea spixiana</i>	Extrato acetato de etila Boldina (alcaloide)	Larvas	CONCEIÇÃO et al., 2020
Meliaceae	<i>Carapa guianensis</i>	Óleo essencial	Larvas e fêmeas ingurgitadas	CHAGAS et al., 2012
Myrtaceae	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Eugenol (fenilpropanoide) extraído do óleo essencial	Larvas e fêmeas ingurgitadas	VALENTE et al., 2014
Piperaceae	<i>Piper aduncum</i>	Extratos acetato de etila, etanólico e hexânico Óleo essencial	Larvas e fêmeas ingurgitadas	SILVA et al., 2009
	<i>Piper tuberculatum</i>	Extratos acetato de etila, etanólico, hexânico e metanólico Piperina e Piplartina (alcaloides)	Larvas e fêmeas ingurgitadas	CHAGAS et al., 2012; LIMA et al., 2014
		Extratos acetato de etila, butanólico,	Fêmeas	

Poaceae	<i>Digitaria insularis</i>	hexânico e hidroetanólico Frações	ingurgitadas	SANTOS, F et al., 2018
	<i>Cymbopogon martinii</i>	Óleo essencial	Larvas e fêmeas ingurgitadas	CHAGAS et al., 2012
	<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Óleo essencial	Larvas e fêmeas ingurgitadas	CHAGAS et al., 2012
Rutaceae	<i>Ruta graveolens</i>	Extrato hidroalcolico	Adultos	SUÁREZ e CARRILLO, 2013
Verbenaceae	<i>Lippia gracilis</i>	Carvacrol e timol (terpenos) extraídos do óleo essencial	Larvas e fêmeas ingurgitadas	OLIVEIRA-CRUZ et al., 2013
	<i>Lippia graveolens</i>	Óleo essencial	Larvas	MARTINEZ- VELÁZQUEZ et al., 2011
	<i>Verbena officinalis</i>	Extrato hidroalcolico	Adultos	SUÁREZ e CARRILLO, 2013
-	-	Carvacrol, Timol, Citral e p-Cimeno (Sigma-Aldrich)	Larvas	SENRA et al., 2013; CARDOSO et al., 2020

Quadro 2 - Atividade anti-helmíntica *in vitro* de plantas e compostos isolados contra NGI de pequenos ruminantes.

Família	Planta	Extrato/fração/composto isolado	Estádio do NGI	Autor
Agavaceae	<i>Agave sisalana</i>	Extratos aquoso e acetato de etíla Frações de saponina e flavonoides	Ovos e larvas	BOTURA et al., 2013
Amaranthaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Extrato aquoso	Ovos e larvas	SILVA et al., 2016
Fabaceae	<i>Acacia farnesiana</i>	Frações ricas em flavonoides naringina, naringenina Ácido gálico (composto fenólico)	Ovos e larvas	ZARZA-ALBARRÁN et al., 2019
	<i>Acacia nilotica</i>	Extrato aquoso e acetônico	Ovos, larvas e adultos	ZABRÉ et al., 2017
	<i>Acacia raddiana</i>	Extrato aquoso e acetônico	Ovos, larvas e adultos	ZABRÉ et al., 2017
	<i>Bowdichia virgilioides</i>	Isocordoína e Cordoína (flavonoides)	Ovos e larvas	SANTOS, A et al., 2018
	<i>Hedysarum carnosum</i>	Extrato acetônico	Larvas	AISSA et al., 2016
	<i>Prosopis juliflora</i>	Extrato acetato de etíla Fração de alcaloides	Ovos e larvas	LIMA et al., 2017
Grossulariaceae	<i>Ribes nigrum</i>	Fração de taninos condensados	Larvas	KLONGSIRIWET et al., 2015
	<i>Ribes rubrum</i>	Fração de taninos condensados	Larvas	KLONGSIRIWET et al., 2015
	<i>Persea americana</i>	Extratos aquoso, etanólico, metanólico, hexânico, clorofórmio e acetato de	Larvas	SOLDERA-SILVA et al., 2018

Lauraceae		etila Fração de taninos condensados		
	<i>Persea willdenovii</i>	Extratos etanólico, hexânico, acetato de etila, butanólico e hidroetanólico Frações	Ovos e larvas	SANTA-ROSA et al., 2018
Malvaceae	<i>Tilia europaea</i>	Fração de taninos condensados	Larvas	KLONGSIRIWET et al., 2015
Moringaceae	<i>Moringa oleifera</i>	Lectina hidrossolúvel extraída das sementes	Larvas	MEDEIROS et al., 2018
Poaceae	<i>Digitaria insulares</i>	Extratos hidroetanólico, acetato de etila e butanólico Frações	Ovos e larvas	SANTOS et al., 2017
Rhamnaceae	<i>Zizyphus joazeiro</i>	Extratos aquoso, hidroetanólico, hexânico Frações de saponinas	Ovos e larvas	GOMES et al., 2016
Salicaceae	<i>Salix caprea</i>	Fração de taninos condensados	Larvas	KLONGSIRIWET et al., 2015
-	-	Digitonina e Aescina (saponinas) Acetato de hecogenina (sapogenina) Catequina e Hesperidina (flavonoides) (Sigma-Aldrich)	Ovos e larvas	SANTOS, A et al., 2018

4.4 Metabólitos secundários de plantas

As plantas apresentam capacidade de produzir metabólitos secundários como mecanismo de defesa em condições de estresse, aumentando sua probabilidade de sobrevivência e reprodução (JING et al., 2014, RUNGSUNG et al., 2015). A síntese destes compostos podem conferir proteção contra herbívoros, bactérias, fungos, vírus, insetos (FUMAGALI et al., 2008) e a irradiação solar (LI et al., 1993). Podem ainda atuar inibindo ou retardando o crescimento, desenvolvimento e a reprodução de parasitas (BENELLI et al., 2017). Estas características, tornam estes metabólitos secundários, compostos promissores no

desenvolvimento de novos medicamentos, incluindo os antiparasitários, a serem utilizados inclusive para o controle de parasitos, de forma sustentável, prevenindo a contaminação de alimentos e do meio ambiente (ADENUBI et al., 2018).

A produção desses metabólitos pelas plantas pode variar amplamente, de acordo com vários fatores, incluindo o hábitat, época do ano, estágio de desenvolvimento (ÇIRAK et al., 2007) e partes da planta (PARMAR et al., 1997), podendo influenciar sobre a concentração desses metabólitos nas mesmas (MAITHANI, PARCHA e KUMAR, 2014). Estes compostos são geralmente classificados de acordo com suas vias biossintéticas, sendo consideradas três grandes famílias de moléculas: fenólicos, terpenos e esteroides, e alcaloides, os quais vêm sendo utilizados na medicina tradicional, e como fonte de matérias-primas para a indústria farmacêutica (BALANDRIN et al., 1985; BOURGAUD et al., 2001). Os alcaloides merecem destaque por se mostrarem, em sua grande variedade, como compostos farmacologicamente ativos (RHARRABE et al., 2007; FUMAGALI et al., 2008; HUSSAIN et al., 2012).

4.4.1 Alcaloides

Os alcaloides são compostos constituídos por bases orgânicas nitrogenadas e que apresentam na sua estrutura química um anel heterocíclico com um ou mais átomos de nitrogênio (ROBERTS e WINK, 1998; ANISZEWSKI, 2007). Podem estar presentes em diferentes partes das plantas, como raízes, caule, folhas, frutos e sementes (JING et al., 2014). Desempenham importante função como defesas químicas da planta e alguns deles, apresentam ação tóxica para insetos, repelente para herbívoros, e produzem uma grande variedade de efeitos biológicos nos animais (FUMAGALI et al., 2008).

4.4.1.1 Berberina

4.4.1.1.1 Características gerais e estrutura química

A berberina (Figura 3) é um alcaloide isoquinolínico amplamente distribuído no reino vegetal (ASAI et al., 2007) e disponibilizado comercialmente. É uma molécula de natureza hidrofílica (ZHANG et al., 2014), o que dificulta sua absorção intestinal e biodisponibilidade (WANG et al., 2017), embora estudos utilizando nanocarreadores tenham demonstrado melhora na sua biodisponibilidade nos tecidos alvos (LOHAN et al., 2017). As plantas que contem este alcaloide são bastante utilizadas na medicina tradicional chinesa, indiana

(KULKARNI e DHIR, 2010) e indígena (SHANBHAG, KULKARNI e GAITONDE, 1970). A berberina é encontrada principalmente nas raízes, rizomas e casca do caule (ANDOLA et al., 2010; MAITHANI, PARCHA e KUMAR, 2014) de espécies do gênero *Berberis* (Ordem: Ranunculales, Família Berberidaceae) como, *B. vulgaris*, *B. asiatica*, *B. aristata*, *B. lycium*, *B. aquifolium*, *B. thunbergii* (ANDOLA et al., 2010; KULKARNI e DHIR 2010) e espécies de outros gêneros, incluindo, *Rhizoma coptidis* (TARRAGO et al., 2007), *Coptis chinensis* (DURAIRAJAN et al., 2012), *Corydalis speciosa* (KIM et al., 2004), *Hydrastis canadensis* (ELSHEIKH et al., 2018). Como indicação clínica, é geralmente apresentada comercialmente sob a forma de cloreto ou sulfato de berberina (KULKARNI e DHIR 2010). Este alcaloide tem sido intensamente investigado quanto às diversas propriedades terapêuticas, especialmente neuroprotetoras, com perspectivas de utilização para o tratamento de enfermidades que afetam o sistema nervoso central (SNC) em humanos, incluindo a doença de Alzheimer (HE et al., 2017) e depressão (KULKARNI e DHIR, 2008).

4.4.1.1.2 Atividades biológicas

Diversas atividades biológicas e aplicações clínicas têm sido descritas e sugeridas para este alcaloide, incluindo antifúngica (SINGH et al., 2001); nefroprotetora (BASHIR e GILANI, 2011); antiviral (CHIN et al., 2010; ROBINSON et al., 2018; LUGANINI et al., 2019); cardiovasculares (MARIN-NETO et al., 1988; RICCIOPPO-NETO 1993; LAU et al., 2001); antibacteriana (BANDYOPADHYAY et al., 2013; CHU et al., 2014; WOJTEJCZKA et al., 2014; DZIEDZIC, WOJTYCZKA e KUBINA, 2015); antidiabética e antihiperlipidêmica (CHENG et al., 2006; LEE et al., 2006; TURNER et al., 2008; EL-WAHAB et al., 2013; CHANDIRASEGARAN et al., 2017); hepatoprotetora (KONG et al., 2004; WANG et al., 2004; BRUSQ et al., 2006; JIANG et al., 2017; XU et al., 2018) e neuroprotetora (SHANBHAG, KULKARNI e GAITONDE, 1970; ASAI et al., 2007; TARRAGO et al., 2007; KULKARNI e DHIR, 2008; BHUTADA et al., 2010; DURAIRAJAN et al., 2012; JIANG, LI e LI, 2015; VAZIRI et al., 2015; ZHANG et al., 2016; HE et al., 2017; LIANG et al., 2017; HUSSIEN et al., 2018).

Atividade antiparasitária

Estudos relacionados à atividade antiparasitária da berberina são escassos, não havendo até o momento, nenhum relato sobre o efeito carrapaticida deste alcaloide. Os

estudos disponíveis têm sido relacionados à sua ação contra protozoários e nematoides de ratos. Efeito amebicida *in vitro* foi investigado por Kulkarni, Dandiya e Varandani (1972), os quais observaram alterações morfológicas, como ausência de desenvolvimento de trofozoitos, degeneração e lise de amebas após 48 horas de incubação com a berberina (1-3 mg/mL). Neste estudo, 80% dos ratos com amebíase induzida experimentalmente e tratados com 100 mg/Kg de berberina por via oral, apresentaram redução do nível de infecção. Contra *Trichomonas vaginalis*, a berberina interferiu no crescimento do parasito, apresentando eficácia semelhante ao metronidazol (SOFFAR et al., 2001). A administração intraperitoneal de berberina (100 mg/Kg) reduziu em 60% a carga parasitária no fígado de hamsters infectados por *Leishmania donovani*, e em cultura de macrófagos de hamsters, este alcaloide (2,5 µg/mL) inibiu 75% a multiplicação de amastigotas de *L. donovani*. Neste estudo, os autores sugerem que a inibição da respiração endógena e estimulada por glicose em amastigotas possa ser o possível mecanismo de ação antileishmania da berberina (GHOSH, BHATTACHARYYA e GHOSH, 1985). A atividade anti-helmíntica da berberina têm sido avaliada apenas sobre a fase de larvas. Satou e colaboradores (2002), observaram eficácia larvicida da berberina contra larvas de terceiro estágio dos nematoides *Strongyloides ratti* (CE₅₀ = 60 µM) e *S. venezuelensis* (CE₅₀ = 32 µM) responsáveis pela infecção em roedores.

Efeito anticolinesterásico

A atividade anticolinesterásica da berberina vem sendo investigada em diferentes espécies animais, especialmente em estudos que têm por objetivo a busca de tratamentos para a doença de Alzheimer, e que têm a enzima acetilcolinesterase (AChE) como um dos principais alvos moleculares. No entanto, a ação anticolinesterásica deste alcaloide sobre a AChE de *R. microplus* ainda não foi avaliada. Ratos tratados com berberina (50 mg/Kg/dia v.o) por 30 dias apresentaram redução da atividade desta enzima no soro (73,17%) e cérebro (61,89%) (HUSSIEN et al., 2018). Resultados de estudos *in vitro* utilizando a AChE do peixe-elétrico (*Electrophorus electricus*) também revelaram que o tratamento com este alcaloide reduziu a atividade desta enzima com CI₅₀ variáveis de 0,374 a 2,8 µM (HUANG et al., 2010a, 2010b; SU et al., 2013; JUNG et al., 2009; ROSELLI et al., 2016; BALKRISHNA et al., 2019). Da mesma forma, resultados de estudos *in vitro* utilizando a AChE de roedores demonstraram redução desta atividade enzimática no fígado (EL-WAHAB et al., 2013) e cérebro (CI₅₀ = 3,3 µM - KIM et al., 2004), (CI₅₀ = 2,3 µM - KONG et al., 2019) destes animais.

Efeitos tóxicos

Há apenas um relato sobre o efeito citotóxico da berberina ($CI_{50} = 9,80 \mu\text{g/mL}$) em células Vero (NCHU et al., 2011) descrito na literatura. A maior parte dos estudos sobre a toxicidade deste alcaloide tem sido relacionado à sua atividade antitumoral, e demonstram inclusive, a sua reduzida citotoxicidade para células saudáveis (MURTHY, JAYAPRAKASHA e PATIL, 2012; EL-WAHAB et al., 2013; YIP e HO, 2013). Este é um dos poucos compostos naturais que apresentam resultados bem-sucedidos sobre a inibição da proliferação de diferentes linhagens de células tumorais (MURTHY, JAYAPRAKASHA e PATIL, 2012). Esta atividade antitumoral é observada em diversas linhagens de células, incluindo células de câncer de cólon (SW480) onde a berberina ($50 \mu\text{M}$) inibiu mais de 80% a proliferação celular e apresentou reduzida citotoxicidade ($< 20\%$) para as células saudáveis do cólon (CCD-CON112) na concentração de $200 \mu\text{M}$ (MURTHY, JAYAPRAKASHA e PATIL, 2012); carcinoma hepatocelular (Huh7) ($CI_{50} = 10 \mu\text{M}$) e células hepáticas saudáveis (WRL68) ($CI_{50} = 100 \mu\text{M}$) (YIP e HO, 2013); células de câncer de mama (MCF-7) ($CI_{50} = 1,95 \mu\text{g/mL}$), carcinoma hepatocelular (HepG-2) ($CI_{50} = 1,73 \mu\text{g/mL}$) e cólon (Caco-2) ($CI_{50} = 1,83 \mu\text{g/mL}$) e cultura de células saudáveis de sangue periférico (PBMC), onde a berberina estimulou ligeiramente a proliferação das células saudáveis (EL-WAHAB et al., 2013). Outros estudos relacionados aos efeitos citotóxicos da berberina incluem: aumento na taxa de apoptose em linhagens de células promonocíticas humanas (U937) (JANTOVA, CIPAK e LETASIOVA, 2007); inibição da migração celular em diferentes linhagens de melanoma humano A375 e Hs294 (SINGH et al., 2011) e de câncer de cólon humano, SW480 e HCT116 (PARK et al., 2012); supressão do crescimento de neuritos em cultura primária de neurônios corticais de ratos (LU et al., 2015); inibição da proliferação celular ($CI_{50} = 25 \mu\text{M}$) de câncer de mama humano, T47D e MCF-7 (BARZEGAR et al., 2015) e células MCF-7 (82,19%) tratadas com $12 \mu\text{M}$ de berberina (KAUR et al., 2016).

Resultados de estudos *in vivo* revelaram que este alcaloide ($30 \text{ mg/kg v.o. por } 60 \text{ dias}$) reduziu significativamente o aumento na peroxidação lipídica, induziu o sistema de defesa antioxidante e apoptose em ratos *Wistar* com câncer de cólon induzido (THIRUPURASUNDARI, PADMINI e DEVARAJ, 2009).

A berberina induz a morte celular por apoptose através de uma série de eventos bioquímicos tais como: perda do potencial de membrana mitocondrial, ativação de caspases-3 e 9, e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (JANTOVA, CIPAK e LETASIOVA, 2007). A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) está envolvida na

regulação da progressão e metástase tumoral e sua ativação por este alcaloide reduz a migração de células tumorais (PARK et al., 2012). A migração celular também é estimulada pela superexpressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), seu metabólito prostaglandina E2 (PGE2) e os receptores de PGE2. Logo, a redução nos níveis da COX-2, PGE2 e seus receptores pela berberina inibe a migração de células, a qual é um passo essencial na invasão e metástase de tumores (SINGH et al., 2011). Outro importante alvo da berberina é a proteína p21, conhecida por regular a progressão do ciclo celular na fase G1. O tratamento com este alcaloide aumenta a expressão do gene p21 levando a parada do ciclo celular e diminuição na proliferação do tumor (YIP e HO, 2013). A berberina também pode interagir diretamente com o DNA, alterando sua conformação espacial, suprimindo a transcrição gênica na célula (WANG et al., 2011).

4.4.1.2 Harmalina

4.4.1.2.1 Características gerais e estrutura química

Harmalina (Figura 3) é um alcaloide β -carbolina fluorescente encontrado nas sementes e frutos da espécie *Peganum harmala* (Ordem: Sapindales, Família Nitrariaceae), planta vastamente distribuída no norte da África, mar Mediterrâneo, Oriente Médio, Paquistão e Índia (HERRAIZ et al., 2010; BOURNINE et al., 2017). Nas sementes, tem sido encontrado como alcaloide majoritário na fração total de alcaloides (NENAAH, 2010). Sua estrutura química é composta pelos grupos benzil, indol e piridol (BENAROUS et al., 2015). É um composto altamente lipofílico, podendo facilmente atravessar a barreira hematoencefálica (BENSALEM et al., 2014). Resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* tem evidenciado os efeitos deste alcaloide sobre o SNC, incluindo atividades ansiolítica e antidepressiva (HERRAIZ et al., 2010; EBRAHIMI-GHIRI, NASEHI e ZARRINDAST, 2019), com potencial para o tratamento em humanos.

4.4.1.2.2 Atividades biológicas

As atividades biológicas da harmalina têm sido relacionadas aos efeitos anti-inflamatório (BENSALEM et al., 2014); herbicida (DENG et al., 2014); antibacteriano e antifúngico (NENAAH, 2010; BENAROUS et al., 2015); inseticida (RHARRABE et al., 2007; RIZWAN-UL-HAQ et al., 2009; NENAAH, 2011; RIZWAN-UL-HAQ et al., 2011) e

neuroprotetor (HERRAIZ et al., 2010; YALCIN e BAYRAKTAR, 2010; YANG et al., 2015a; EBRAHIMI-GHIRI, NASEHI e ZARRINDAST, 2019).

Efeito antiparasitário

Informações sobre a atividade antiparasitária da harmalina ainda são escassas na literatura. Sobre a ação carrapaticida, apenas um relato foi descrito, não havendo nenhuma referência para a atividade anti-helmíntica. Resultados de estudo *in vitro* obtidos por Shang e colaboradores (2016), revelaram que após 24 horas do tratamento, este alcaloide (2,5 mg/mL) causou mortalidade de 90% de *Psoroptes cuniculi*, um ácaro que parasita ouvido de coelhos. A atividade anti-*Leishmania* também foi averiguada *in vitro* em culturas de macrófagos de camundongos infectados com *Leishmania mexicana amazonenses*. Neste estudo, a harmalina suprimiu 65% da infecção nas células (EVANS e CROFT, 1987). Di Giorgio e colaboradores (2004), estudaram esta mesma atividade em culturas de monócitos humanos infectadas com *L. infantum* e observaram uma potente atividade anti-*Leishmania* ($CI_{50} = 1,16 \mu M$) contra a forma amastigota, sugerindo que este efeito pode ser decorrente da capacidade da harmalina em impedir a internalização do parasito na célula.

Efeito anticolinesterásico

Até o momento, a atividade anticolinesterásica da harmalina foi demonstrada apenas sobre a AChE de peixe-elétrico ($CI_{50} = 1,95 \mu M$) (YANG et al., 2015a), em estudos que objetivam a identificação de novos compostos com potencial de utilização para a doença de Alzheimer em humanos.

Efeitos tóxicos

Os efeitos tóxicos da harmalina estão relacionados à sua ação citotóxica para células tumorais e sadias. Reduções significativas na viabilidade celular foram observadas em linhagens de células tumorais e sadias, incluindo carcinoma do colo do útero (HeLa e C33A), (SW480) e células epiteliais de pulmão (CCD18Lu) após o tratamento com este alcaloide (34,3 μM) (JIMÉNEZ et al., 2008). Estudo realizado por Nafisi e colaboradores (2010) demonstrou que a harmalina se liga ao DNA das células, interagindo principalmente com as bases guanina e adenina.

Resultados de estudos *in vivo* revelaram que a harmalina reduz significativamente o processo de aprendizagem e memória de camundongos tratados com este alcaloide (2 e 4 mg/Kg i.p.), devido a sua interação com receptores GABA na região do hipocampo, onde ocorre a modulação da memória (NASEHI et al., 2017). Nasehi e colaboradores (2015), também observaram bloqueio da aprendizagem associativa e motora em camundongos tratados com 1 mg/Kg deste alcaloide. O tratamento intraperitoneal de ratos Wistar com dose elevada da harmalina (30 mg/Kg) resultou na indução de tremores (VAZIRI et al., 2015).

4.4.1.3 Piperina

4.4.1.3.1 Características gerais e estrutura química

A Piperina (Figura 3) é um alcaloide piperidínico (SEMLER e GROSS, 1988), e principal componente ativo presente em diferentes espécies de pimentas do gênero *Piper* sp. (Ordem: Piperales, Família Piperaceae), utilizadas mundialmente como temperos e ingredientes na medicina alternativa (PAMAR et al., 1997). Dentre as espécies que contêm este alcaloide incluem-se: *P. betle*, *P. cutisleginum* (BOLL et al., 1994), *P. tuberculatum* (CHAGAS et al., 2012; LIMA et al., 2014), *P. nigrum* (CARDOSO et al., 2005; YOON et al., 2015) e *P. longum* (GHOSHAL, KRISHNA PRASAD e LAKSHMI, 1996; LIU et al., 2015). A estrutura química da piperina é constituída por três subunidades: anel piperidínico, anel metilenodioxifenila e cadeia lateral de carbono com dupla ligação (MU et al., 2012), sendo um composto altamente lipofílico (KHAJURIA, ZUTSHI e BEDI, 1998). A metabolização hepática *in vitro* deste alcaloide é semelhante em mamíferos e aves, com formação dos mesmos metabólitos (THIEL et al., 2015). Inibe enzimas do Citocromo P450, responsáveis pela biotransformação de drogas, cujo metabolismo exige esta via ativa, melhorando consequentemente a biodisponibilidade de alguns medicamentos administrados por via oral (PATEL et al., 2019). A piperina atravessa facilmente a barreira hematoencefálica (EIGENMANN et al., 2016) e por apresentar efeitos sobre o SNC tem sido objeto de intensas investigações relacionadas especialmente à sua ação neuroprotetora em estudos sobre doenças neurodegenerativas em humanos, destacando-se a doença de Alzheimer (DAHIYA et al., 2018) e Parkinson (YANG et al., 2015b).

4.4.1.3.2 Atividades biológicas

Diversas atividades terapêuticas têm sido reportadas para a piperina, incluindo, ação antibacteriana (ZARAI et al., 2013); antifúngica (CACERES et al., 2017); hepatoprotetora (JWA et al., 2012); antidiabética (ARCARO et al., 2014; SAMRA et al., 2016); antidiarréica (TAQVI, SHAH e GILANI, 2009; PONGKORPSAKOL et al., 2015); inseticida (PARK et al., 2002; QU et al., 2013; SAMUEL et al., 2016); anti-inflamatória (KIM et al., 2012; GUPTA et al., 2015; EL-GHAZALY et al., 2016; WANG-SHENG et al., 2017; EL-GHAZALY et al., 2019); antioxidante (VIJAYAKUMAR, SURYA e NALINI, 2004; BANJI et al., 2013; UMAR et al., 2013; KUMAR e SHARMA, 2015; KUMAR, SASMAL e SHARMA, 2015); imunomoduladora (SHENOY et al., 2013; SHARMA et al., 2014; HUANG et al., 2014; SHENOY et al., 2014; DOUCETTE et al., 2015; RODGERS et al., 2016) e neuroprotetora (LEE et al., 2005; WATTANATHORN et al., 2008; CHONPATHOMPIKUNLERT, WATTANATHORN e MUCHIMAPURA, 2010; AL-BAGHDADI et al., 2012; CHEN et al., 2013; CRUZ et al., 2013; KHOM et al., 2013; SHRIVASTAVA et al., 2013; GILHOTRA e DHINGRA, 2014; MAO et al., 2014a; 2014b; PRAGNYA, KAMESHWARI e VEERESH, 2014; BI et al., 2015; MISHRA et al., 2015; YANG et al., 2015b; AZAB et al., 2018; DAHIYA et al., 2018; REN et al., 2019).

Efeito antiparasitário

Estudos relacionados à atividade antiparasitária da piperina são escassos, havendo apenas algumas citações sobre sua ação contra alguns protozoários, ectoparasitas, helmintos de vida livre e parasitos que infestam peixes. Em ratos infectados com *Entamoeba histolytica*, o tratamento oral com a piperina (100 mg/Kg) reduziu a carga parasitária em 40% dos ratos com amebíase cecal (GHOSHAL, PRASAD e LAKSHMI, 1996). Este alcaloide apresentou efeito *in vitro* contra as formas evolutivas epimastigotas ($IC_{50} = 7,36 \mu M$) e amastigotas ($CI_{50} = 4,91 \mu M$) de *Trypanosoma cruzi* (RIBEIRO et al., 2004). De acordo com Freire-Lima e colaboradores (2008), a piperina reduz o crescimento e altera a morfologia de epimastigotas de *T. cruzi*. Contra *Leishmania amazonensis* 50 μM de piperina inibe o crescimento das formas promastigota e amastigota em 96% e 56%, respectivamente (FERREIRA et al., 2011). Também inibiu o crescimento de promastigotas ($CI_{50} = 3,03 \mu g/mL$) e amastigotas ($CI_{50} = 23,98 \mu g/mL$) de *L. infantum* (VIEIRA-ARAÚJO et al., 2018). *In vivo*, 200 mg/Kg i.p. deste alcaloide, reduziu a carga parasitária no fígado e baço de camundongos infectados com *L.*

donovani sem causar efeitos tóxicos (CHOUHAN et al., 2015). Apenas um relato sobre a ação carrapaticida *in vitro* da piperina a 5% (50 mg/mL) contra teleóginas de *R. microplus* (32,54%) (CHAGAS et al., 2012). A ação anti-helmíntica da piperina (10 mg/mL) foi investigada *in vitro* contra *Pheretima posthuma*, uma espécie de helminto de vida livre. Neste estudo, os autores observaram paralisia e morte de helmintos adultos comparado ao albendazol (SUDHAKAR et al., 2013). A piperina também demonstrou efeito *in vitro* e *in vivo* contra *Argulus spp.*, um tipo de crustáceo parasita conhecido como “carrapato ou piolho de peixe”. Contra esse parasita de peixes, a piperina (9 mg/L) causou 100% de mortalidade (KUMAR et al., 2012).

Efeito anticolinesterásico

A atividade anticolinesterásica da piperina tem sido avaliada *in vivo* utilizando roedores como modelo para doença de Alzheimer. Resultados de estudos com outros alcaloides piperidínicos já evidenciaram este mesmo efeito *in vitro* utilizando AChE do peixe-elétrico (CHOUDHARY et al., 2005). O tratamento com este alcaloide (5, 10 e 20 mg/Kg v.o.) reverteu o comprometimento da memória e a neurodegeneração no hipocampo de ratos utilizados como modelo para a doença de Alzheimer, sendo evidenciado aumento da densidade de neurônios, diminuição dos níveis de peroxidação lipídica e redução na atividade da AChE dos animais, em todas as doses avaliadas (CHONPATHOMPIKUNLERT, WATTANATHORN e MUCHIMAPURA, 2010). Dahiya e colaboradores (2018) também observaram redução na atividade da AChE em camundongos com déficits cognitivos e amnesia induzida pela escopolamina e tratados com a piperina (5 mg/Kg). O potencial anticolinesterásico da piperina ainda não foi, no entanto, avaliado sobre a AChE de carrapatos.

Efeitos tóxicos

Resultados de estudos de toxicidade da piperina têm demonstrado baixa toxicidade *in vivo* para camundongos e frangos de corte. Em camundongos Balb/c tratados com piperina (2 mg/Kg i.p.), não foram observadas alterações histopatológicas no fígado e rins (CARDOSO et al., 2005); o tratamento de frangos de corte da linhagem CobbAvian48 nas doses de 1,12; 2,25 e 4,5 mg/Kg v.o. desse alcaloide, também resultou em baixa toxicidade, observando-se

alterações hepáticas graves, apenas no grupo tratado com a maior dose (CARDOSO et al., 2009).

Camundongos tratados por via oral com 50 mg/Kg de piperina apresentaram redução de 66,7% de carcinoma espinocelular induzido (VELLAICHAMY et al.; 2009). Da mesma forma, ratos Wistar portadores de carcinoma hepatocelular e tratados com concentração dez vezes menor (5 mg/Kg), também apresentaram melhora na arquitetura do fígado e redução dos níveis das enzimas AST e ALT no soro (GUNASEKARAN, ELANGO VAN e DEVARAJ, 2017).

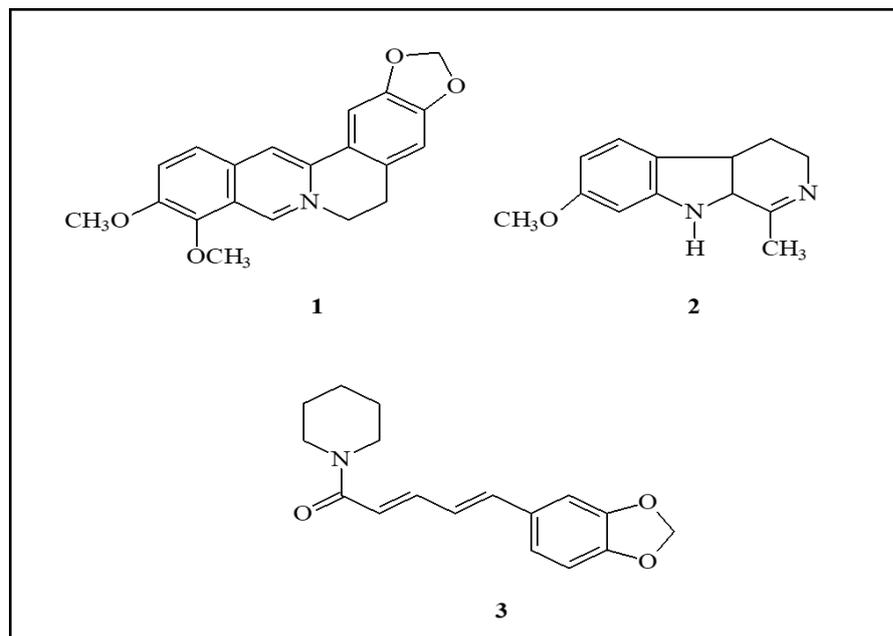
A ação citotóxica *in vitro* da piperina contra células tumorais tem sido relatada em diferentes linhagens de tumores, como: linhagens de câncer de próstata humano, DU145 ($CI_{50} = 226,6 \mu\text{M}$), PC-3 ($CI_{50} = 111 \mu\text{M}$) e LNCaP ($CI_{50} = 74,4 \mu\text{M}$), sem apresentar toxicidade para células da próstata sadias (OUYANG et al., 2013); células de adenocarcinoma retal humano (HRT-18), com inibição do crescimento celular (YAFFE et al., 2013); linhagens de células de câncer de mama, SKBR3 (TRUONG DO et al., 2013), T-47D e MCF-7, incluindo linhagens resistentes à terapia sistêmica, MDA-MB-231 e MDA-MB-468 (GREENSHIELDS et al., 2015); linhagens de osteossarcoma humano, HOS ($CI_{50} = 72 \mu\text{M}$) e U2OS ($CI_{50} = 126 \mu\text{M}$) (ZHANG et al., 2015); células de carcinoma hepatocelular (HepG2) ($CI_{50} = 30 \mu\text{M}$) (GUNASEKARAN, ELANGO VAN e DEVARAJ, 2017); linhagens de carcinoma do colo de útero (HeLa), pulmão (A-549) e carcinoma epidermóide de boca (KB) com inibição de 90% da apoptose (PACHAURI, GUPTA e GHOSH, 2015). Além disso, têm sido demonstrado que a piperina inibe o processo de angiogênese na aorta de ratos, o qual exerce importante função na progressão de tumores (DOUCETTE et al., 2013).

A piperina pode potencializar o efeito anticâncer de alguns quimioterápicos padrão *in vitro*, como a doxorubicina e mitoxantrona em células de câncer de mama (MCF-7) e pulmão (A-549) (LI et al., 2011); e o paclitaxel em células de adenocarcinoma de ovário humano (SKOV-3) (PAL et al., 2016).

Este alcaloide ainda apresenta a capacidade de proteger alguns linhagens de células contra a morte celular induzida por agentes tóxicos, como demonstrado por Lee, Han e Kim (2006), onde a piperina (1 μM) inibiu 55% a morte celular induzida por MPP (1-metil-4-fenilpiridínio) em linhagem de células de glândula adrenal de ratos (PC12). O pré-tratamento de células atriais de coelhos expostas a baixas concentrações de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), com 7 μM de piperina, aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase, reduzindo peroxidação lipídica e estresse oxidativo (MA et al., 2014).

A ação da piperina no DNA também já foi investigada por Doucette e colaboradores (2013), os quais observaram a ocorrência de inibição de 87% da síntese de DNA em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs). A genotoxicidade da piperina foi avaliada *in vitro* e *in vivo* através do teste de micronúcleos, o qual revelou ausência de ação genotóxica para camundongos (574 mg/Kg) e para células ovarianas de hamsters (1 mM) (THIEL et al., 2014).

Figura 3- Estrutura química dos alcaloides berberina (1), harmalina (2) e piperina (3).



4.5 Mecanismos de ação dos carrapaticidas

As principais classes de carrapaticidas disponíveis e utilizadas no Brasil para o controle de *R. microplus* têm o sistema nervoso dos artrópodes como principal órgão alvo. Dentre estas classes, incluem-se os organofosforados e carbamatos, os quais atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase do parasito (TAN et al., 2011); formamidinas (amitraz), cujo mecanismo de ação proposto está relacionado a receptores de octopamina, α -2 adrenérgicos e monoamina oxidase (JONSSON e HOPE, 2007); fenilpirazol (fipronil), potente bloqueador dos receptores GABA e glutamato, interferindo na passagem de íons cloreto através destes receptores (TINGLE et al., 2003; ZHAO et al., 2004); lactonas macrocíclicas (Ivermectina), as quais, assim como o fenilpirazol, também apresentam os canais de cloreto dependente de GABA e glutamato como alvo molecular (GUERRERO, LOVIS e MARTINS, 2012) e os

piretroides, que atuam sobre os canais de sódio e como inibidores do GABA (VIJVERBERG e BERCKEN, 1990).

Outros compostos carrapaticidas atuam como inibidores do crescimento, interferindo no processo de desenvolvimento dos parasitos sem causar a morte direta dos mesmos. Destaca-se nesse grupo, a classe dos benzoilfenilureias, composta por moléculas que inibem a síntese e deposição de quitina nos artrópodes, sendo o fluazuron, uma das principais moléculas pertencentes a esta classe utilizadas no controle de *R. microplus* (VASUKI e RAJAVEL, 1992; GRAF, 1993).

De acordo com Santos e colaboradores (2019), estudos sobre os mecanismos de ações para estabelecer as interações entre os metabólitos secundários de plantas e os diferentes estágios e espécies de parasitos se fazem necessários.

4.5.1 Acetilcolinesterase (AChE)

Colinesterase é uma família de enzimas que catalisam a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e acetato. Esta hidrólise é fundamental para que o neurônio colinérgico retorne ao seu estado de repouso após a passagem do estímulo nervoso (COLOVIC et al., 2013).

A acetilcolinesterase é encontrada em bactérias, plantas e animais, o que sugere a existência de outras funções além do seu papel sináptico (WESSLER, KIRKPATRICK e RACKE, 1998). Nos vertebrados, a AChE é caracterizada como um único gene codificando esta enzima (MASSOULIÉ et al., 1998), enquanto que nos invertebrados, múltiplos genes codificam AChEs (TEMEYER et al., 2004; TEMEYER et al., 2013). No *R. microplus* já foram identificados três genes que expressam AChEs, *RmAChE 1* (BAXTER e BARKER, 1998), *RmAChE 2* (HERNANDEZ et al., 1999) e *RmAChE 3* (TEMEYER et al., 2004). Resultados de estudo realizados por Temeyer e colaboradores (2010) demonstraram a expressão de formas recombinantes das três AChEs de *R. microplus*. Os autores ainda observaram que estas três enzimas apresentam diferentes propriedades cinéticas, ratificando a hipótese de que as *RmAChE 1*, *RmAChE 2* e *RmAChE 3* podem desempenhar diferentes funções no carrapato.

Esta enzima é essencial para o funcionamento do sistema nervoso dos artrópodes e portanto, sua inibição por praguicidas organofosforados e carbamatos leva à paralisia neuromuscular e conseqüente morte do parasita (TAN et al., 2011). Além disso, funções

diferentes entre as três AChEs pode representar uma oportunidade para o desenvolvimento de carrapaticidas seletivos para uma ou mais das *RmAChEs* (TEMEYER et al., 2010).

4.5.1.1 Estudo da atividade anticolinesterásica

Atualmente estudos tem utilizado metodologias computacionais (*in silico*) para prever a afinidade de ligação entre as diversas classes de compostos químicos, incluindo os alcaloides e seus alvos moleculares no planejamento e desenvolvimento de novos fármacos (JIN e SHEN, 2012). Um método computacional bastante empregado para investigar compostos com ação anticolinesterásica (HUANG et al., 2010b; JIN e SHEN, 2012; SU et al., 2013; SWALE et al., 2013; CONCEIÇÃO et al., 2020) é o acoplamento (*docking*) molecular que visa estabelecer as características de interação entre as estruturas tridimensionais (3D) de um ligante (micromolécula) e um alvo biológico (biomacromolécula) (KITCHEN et al., 2004; GOHLKE e KLEBE, 2002), além de estimar sua afinidade de ligação (KUMAR et al., 2015). O processo de acoplamento envolve duas etapas: a predição de conformações e orientações do ligante no sítio de ligação do alvo biológico e a atribuição de valores de energia de interação entre eles (MENG et al., 2011).

Uma outra ferramenta utilizada para estudar o complexo proteína-inibidor *in silico* é a dinâmica molecular (DM). Esta metodologia é fundamentada nos princípios da mecânica clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico (movimento físico) dos átomos que compõem o sistema receptor-ligante em função do tempo. A DM incorpora flexibilidade ao ligante e receptor, melhorando suas interações e reforçando a complementariedade entre eles. Além disso, a habilidade de incorporar moléculas de solvente no sistema é importante para o entendimento do papel da água e seus efeitos sobre a estabilidade de complexos proteína-inibidor (NAMBA, SILVA e SILVA, 2008; WANG, SING e LI, 2021).

5 CAPÍTULO I: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN SILICO* DAS ATIVIDADES LARVICIDA E ANTICOLINESTERÁSICA DOS ALCALOIDES BERBERINA, HARMALINA E PIPERINA SOBRE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*

5.1 RESUMO

Rhipicephalus microplus é responsável por grandes perdas econômicas na pecuária e seu controle tem se tornado difícil devido ao estabelecimento de carrapatos resistentes a carrapaticidas comerciais. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito larvicida *in vitro* dos alcaloides berberina, harmalina e piperina, e também investigar seus mecanismos inibitórios contra a enzima acetilcolinesterase. Os efeitos dos alcaloides nas larvas foram observados empregando o teste de imersão larvar. Berberina e piperina apresentaram atividade larvicida maior que 95%, não diferindo do fipronil (controle positivo, 100%, $p > 0,05$) e piperina, o alcaloide mais ativo, teve menor CE_{50} (concentração efetiva 50%) de 6,04 mM. O tratamento com a harmalina (24 mM) resultou em reduzida atividade larvicida com percentual de mortalidade de apenas 32,75%. A enzima acetilcolinesterase foi obtida de larvas de *R. microplus* (*RmAChE*) e a atividade anticolinesterásica foi determinada espectrofotometricamente. A maior atividade anticolinesterásica foi observada para a berberina ($CI_{50} = 88,13 \mu\text{M}$), enquanto a piperina apresentou baixa atividade ($CI_{50} > 200 \mu\text{M}$). Os estudos de acoplamento na *RmAChE* 1, seguidos por simulação de dinâmica molecular de 10 ns, sugerem que a berberina estabiliza a *RmAChE* 1 em um desvio quadrático médio (RMSD) menor do que a proteína *Apo*. Poucas interações de ligações de hidrogênio entre berberina e resíduos de *RmAChE* 1 foram equilibradas por interações hidrofóbicas e do tipo π . A berberina preenche preferencialmente o sítio aniônico periférico (PAS), o que se correlaciona com seu mecanismo não competitivo. Esses resultados sugerem que os alcaloides berberina e piperina têm ação carrapaticida *in vitro* sobre as larvas de *R. microplus*, e o provável mecanismo de ação da berberina está relacionado à inibição da *RmAChE* 1 no acesso aos resíduos de PAS. Esses dados poderão auxiliar no estudo de novos produtos naturais que possam inibir o *RmAChE* 1 auxiliando no desenvolvimento de novos carrapaticidas.

Palavras-chave: carrapato bovino, acetilcolinesterase, piperina, harmalina e berberina

5.2 ABSTRACT

Rhipicephalus microplus is responsible for high economic losses in livestock and its control has become difficult due to the establishment of tick's resistant to commercial acaricides. This study aimed to evaluate the *in vitro* larvicidal effect of the alkaloids berberine, harmaline and piperine, and also to investigate their inhibitory mechanisms against the acetylcholinesterase enzyme. The effects of alkaloids on the larvae were observed using the larval immersion test. Berberine and piperine showed larvicidal activity greater than 95%, not differing from fipronil (positive control, 100%, $p > 0.05$) and piperine, the most active alkaloid, had a lower EC_{50} (effective concentration 50%) of 6.04 mM. The treatment with harmaline (24 mM) resulted in reduced larvicidal activity with a mortality rate of only 32.75%. The acetylcholinesterase enzyme was obtained from *R. microplus* larvae (*RmAChE*) and the anticholinesterase activity was spectrophotometrically determined. The highest anticholinesterase activity was observed for berberine ($IC_{50} = 88.13 \mu\text{M}$), while piperine showed low activity ($IC_{50} > 200 \mu\text{M}$). Docking studies in *RmAChE* 1, followed by 10 ns molecular dynamics simulation, suggest that berberine stabilizes the *RmAChE* at lower Root-Mean-Square Deviation (RMSD) than *Apo* protein. Few hydrogen-bond interactions between berberine and *RmAChE* 1 residues were balanced by hydrophobic and π -type interactions. Berberine fills preferentially the peripheral anionic site (PAS), which correlates with its non-competitive mechanism. These results suggested that berberine and piperine alkaloids have an *in vitro* acaricidal action on *R. microplus* larvae, and the likely mechanism of action of berberine is related to *RmAChE* 1 inhibition when accessing the PAS residues. These data could help the study of new natural products that could inhibit *RmAChE* 1 aiding the development of new acaricides.

Key-words: cattle tick, acetylcholinesterase, piperine, harmaline and berberine

5.3 INTRODUÇÃO

O carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita hematófago responsável por elevadas perdas na pecuária bovina (BANUMATHI et al., 2017). A infestação dos animais por esta espécie de carrapato tem ocasionado diversos efeitos negativos na produtividade, incluindo redução no ganho de peso, diminuição da produção de leite e má qualidade do couro. No Brasil, estas perdas econômicas anuais são estimadas em 3,2 bilhões de dólares (GRISI et al., 2014).

A utilização de carrapaticidas químicos comerciais, ainda é o principal método de controle das infestações por *R. microplus*. Entretanto, a utilização indiscriminada destes produtos tem favorecido o desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes aos carrapaticidas comerciais (DANTAS et al., 2015), e aumentado o risco de contaminação dos produtos de origem animal e do meio ambiente (GONÇALVES, HUERTA e FREITAS, 2016). Dentre as diversas classes de compostos antiparasitários frequentemente comercializados e utilizados em medicina veterinária, destacam-se os organofosforados e carbamatos, os quais têm como alvo molecular, a inibição da enzima acetilcolinesterase (GUERREIRO, LOVIS e MARTINS, 2012).

O emprego de novas moléculas com atividade carrapaticida obtidas ou sintetizadas a partir de produtos naturais tem sido proposto como alternativa de tratamento com o objetivo de minimizar os riscos sobre os alimentos de origem animal e ambiente (TORRES et al., 2014; CHAGAS et al., 2016).

Dentre os metabólitos secundários das plantas, os alcaloides representam uma classe amplamente estudada para a descoberta de novos protótipos de inibidores da enzima acetilcolinesterase (DEMBITSKY et al., 2020), especialmente a berberina, a harmalina e a piperina. A berberina é um alcaloide isoquinolínico amplamente distribuído no reino vegetal (ASAI et al., 2007) com ações antiprotozoária (SOFFAR et al., 2001), antibacteriana (DZIEDZIC, WOJTYCZKA e KUBINA, 2015), antiviral (LUGANINI et al., 2019), antifúngica (SINGH et al., 2001), antitumoral (LU et al., 2015; KAUR et al., 2016), neuroprotetora (HE et al., 2017) e anticolinesterásica (KIM et al., 2004; JUNG et al., 2009; EL-WAHAB et al., 2013; ROSELLI et al., 2016; HUSSIEN et al., 2018; KONG et al., 2019). A harmalina é um alcaloide β -carbolina encontrado nas sementes e frutos da espécie *Peganum harmala* (HERRAIZ et al., 2010; BOURNINE et al., 2017). Para este composto já foram relatadas atividades antibacteriana e antifúngica (NENAAH, 2010), inseticida (RIZWAN-UL-HAQ et al., 2009; NENAAH, 2011), herbicida (DENG et al., 2014), antiparasitária (DI

GIORGIO et al., 2004; SHANG et al., 2016), antitumoral (JIMÉNEZ et al., 2008; NAFISI et al., 2010), ansiolítica e antidepressiva (EBRAHIMI-GHIRI, NASEHI e ZARRINDAST, 2019) e anticolinesterásica (YANG et al., 2015). O alcaloide piperidínico piperina é o principal componente ativo presente nos frutos de diferentes espécies de pimenta do gênero *Piper* (SEMLER e GROSS, 1988; BOLL et al., 1994; CHAGAS et al., 2012; YOON et al., 2015; LIU et al., 2015). As principais atividades biológicas deste alcaloide são relacionadas a suas ações imunomoduladora (SHENOY et al., 2014; DOUCETTE et al., 2015), inseticida (SAMUEL et al., 2016), antitumoral (GREENSHIELDS et al., 2015; GUNASEKARAN, ELANGOVAN e DEVARAJ, 2017), carrapaticida (CHAGAS et al., 2012) e anticolinesterásica (CHONPATHOMPIKUNLERT, WATTANATHORN e MUCHIMAPURA, 2010; DAHIYA et al., 2018).

A berberina, a harmalina e a piperina apresentaram atividade inibitória contra as enzimas acetilcolinesterase de peixes e/ou roedores (DAHIYA et al., 2018; KONG et al., 2019; YANG et al., 2015). No entanto, até o momento, a atividade anticolinesterásica não foi ainda investigada em larvas de *R. microplus*. A atividade contra carrapatos foi relacionada apenas à piperina (CHAGAS et al., 2012). O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito larvicida *in vitro* desses alcaloides sobre *R. microplus* e investigar a sua correlação com o mecanismo de inibição da acetilcolinesterase. Além disso, o perfil de inibição molecular do alcaloide mais ativo na acetilcolinesterase do carrapato (*RmAChE 1*) foi investigado *in silico* através do acoplamento e simulação de dinâmica molecular.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Todo o delineamento experimental foi previamente submetido e aprovado pelo comitê de Ética no uso de animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (**Protocolo nº74 /2018**) (Anexo 1).

5.4.1 Obtenção dos alcaloides

Os alcaloides berberina chloride, harmalina e piperina foram adquiridos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich® (USA) e apresentam pureza > 95%.

5.4.2 Obtenção de *Rhipicephalus microplus*

Foram utilizadas teleóginas de *R. microplus* coletadas manualmente de bovinos leiteiros naturalmente infestados e livres de exposição a carrapaticidas por um período mínimo de 30 dias. Estes animais foram mantidos na Fazenda Experimental da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), localizada no município de São Gonçalo dos Campos-BA. Após a coleta, as teleóginas foram acondicionadas em recipientes plásticos perfurados e transportadas para o Laboratório de Toxicologia e Fitoterapia (LATOX) da UFBA, em caixa térmica sob refrigeração (4° C) por 2 horas.

As teleóginas foram colocadas em placas de petri e mantidas à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar superior a 80% até o término da ovipostura (15 dias). As massas de ovos foram coletadas e acondicionadas em tubos de ensaio devidamente fechados com algodão e mantidos sob as mesmas condições da ovipostura por 18 dias, período necessário para a eclosão das larvas, as quais foram utilizadas nos testes larvicida e anticolinesterásico.

5.4.3 Estudos *in vitro*

5.4.3.1 Avaliação da atividade carrapaticida: Teste de imersão de larvas

No teste de imersão larvar foram utilizadas larvas de *R. microplus* com idade entre sete e 21 dias. Os testes foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita por Souza et al. (2008) e modificado por Silva et al. (2009). Aproximadamente 100 larvas de *R. microplus* foram acondicionadas em seringas plásticas de 3mL, previamente preparadas pelo corte da extremidade do bico e fechada com tecido voal preso com elástico.

As concentrações dos alcaloides foram determinadas a partir de resultados obtidos em estudo piloto utilizando os compostos na maior concentração possível abaixo do nível de saturação (24 mM). Os compostos que apresentaram eficácia igual ou superior a 95%, foram avaliados em diferentes concentrações. Foram utilizadas as concentrações de 1,5; 3; 6; 12; 16 e 24 mM para a piperina e berberina, e somente a maior concentração para a harmalina (24 mM). Os alcaloides foram diluídos em etanol a 70%. Água destilada e etanol a 70% foram utilizados como controles negativos; e fipronil (TopLine®) (fenilpirazole 10 mg/mL- CONCEIÇÃO et al., 2017) como controle positivo.

As seringas contendo as larvas foram imersas nas soluções contendo os diferentes tratamentos e controles durante 5 minutos. Após a imersão, o excesso de líquido foi removido e as seringas com as larvas foram incubadas a 26 ± 2 °C com umidade relativa $\geq 80\%$ por 24 horas. Em seguida, as larvas foram estimuladas por meio da exposição a uma fonte de luz, e as larvas imóveis foram registradas como mortas. As larvas vivas e mortas foram contadas usando uma lupa, e os percentuais de mortalidade foram calculados nas diferentes concentrações testadas.

5.4.3.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica

A enzima acetilcolinesterase foi extraída de larvas de *R. microplus* com 1 semana de idade, conforme descrito por Wright e Ahrens (1988). As larvas foram mortas por exposição a vapor de clorofórmio por 30 minutos, e 50 mg de larvas foram então lisadas mecanicamente em água deionizada (2 mL) por 3 minutos utilizando um homogeneizador *potter elvehjem* (tritador de tecido). O lisado foi centrifugado por 5 minutos a $1.000 \times g$ e o sobrenadante contendo as enzimas solúveis foi recuperado e armazenado a 4 °C até a realização dos ensaios da atividade enzimática.

A absorbância das proteínas sobrenadantes foi medida espectrofotometricamente a 595 nm (modelo Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, EUA) e a concentração de proteína solúvel total foi estimada com o método de Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão.

A atividade anticolinesterásica dos alcaloides foi determinada espectrofotometricamente a 412 nm de acordo com o método de Ellman (1961) modificado por Wright e Ahrens (1988). A concentração ideal do substrato (iodeto de acetiltiocolina) foi estabelecida com base no valor da constante aparente de Michaelis-Menten (K_M). Resumidamente, alíquotas do sobrenadante (concentração de proteína total = 638 µg/mL) foram misturadas com concentrações crescentes de substrato (10, 21, 42, 84, 168, 335 e 670 µM) e a curva de absorção foi rastreada. A relação entre a taxa de reação (inclinação da curva de absorção) e a concentração do substrato foi utilizada para calcular o K_M aparente por regressão não linear (JOHNSON e GOODY, 2011).

As concentrações dos alcaloides foram determinadas a partir dos resultados obtidos em estudo piloto, em que os alcaloides mais ativos no teste carrapaticida foram avaliados na concentração de 200 µM. Alíquotas do sobrenadante contendo acetilcolinesterases de *R. microplus* (638 µg/mL) foram misturadas com os alcaloides nas seguintes concentrações:

piperina (apenas 200 μM diluída em etanol 70%) e berberina (12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 μM diluída em água deionizada). Em seguida, 200 μL de 5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB 0,1 M) foram adicionados. Em seguida, o iodeto de acetilcolina (35 μM) foi usado como substrato para iniciar a reação. Para este ensaio enzimático, dois controles negativos foram usados (água deionizada e etanol 70%) e a eserina (50 μM) como controle positivo.

Todos os testes foram realizados em triplicata e o percentual de inibição da atividade enzimática foi calculado através da seguinte equação: % de inibição = (Controle negativo – Branco) – (Experimento – Branco do experimento) $\times 100$ / (Controle negativo – Branco).

5.4.3.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando software GraphPadPrism® (versão 5.0 para Windows). A diferença entre grupos foi avaliada por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, considerando o nível de significância $\geq 95\%$ ($p < 0,05$). A CE_{50} (concentração efetiva 50%) foi estimada através da análise de regressão linear e a CI_{50} (concentração inibitória 50%) por regressão não-linear.

5.4.4 Estudos *in silico*

5.4.4.1 Estudos de acoplamento molecular na enzima acetilcolinesterase de *Rhipicephalus microplus* 1 (*RmAChE* 1)

O modelo 3D da *RmAChE* 1 (resíduos 51 a 528, código UniProt: A0A0F6P2D6) foi previamente construído por modelagem comparativa (LIMA et al, 2020). As estruturas 3D e os principais resíduos dos sítios catalítico e aniônico periférico foram analisados visualmente com o software PyMOL™ 1.8 (SCHRODINGER, 2015). A estrutura 3D da berberina foi preparada para o ensaio de acoplamento no modelo *RmAChE* 1 usando GOLD 5.7.3 (CCDC, Cambridge, UK) conforme descrito por Lima e colaboradores (2020).

5.4.4.2 Simulação de dinâmica molecular do complexo alcaloide – *RmAChE* 1

Os sistemas foram simulados usando o programa GROMACS 4.6.3 de dupla precisão em um conjunto NPT (VAN DER SPOEL et al., 2005; HESS et al., 2008). O campo de força GROMOS96 54A7 (SCHMID et al., 2011) foi usado para simulação. O modelo de solvente

de água, modelo *Extended Simple Point Charge* (SPC/E) (BERENDSEN et al., 1987), foi inserido em uma caixa dodecaédrica a uma distância de 1,0 nm da superfície da proteína. Essa distância garante que a distância mínima entre as moléculas e sua imagem periódica seja maior do que o ponto de corte usado para as interações de Lennard-Jones (0,9 nm). Para neutralizar os sistemas, algumas moléculas de água foram substituídas por íons positivos (Na^+), distribuídos aleatoriamente dentro da caixa. Este sistema possui aproximadamente 64.534 partículas (*RmAChE*, berberina, água, Na^+).

Parâmetros de campo de força para berberina foram extraídos do servidor ATB (Automated Topology Builder, <https://atb.uq.edu.au>, STROET et al., 2018), parâmetros de *van der Waals* e geométricos (ligações, ângulos, diédricos impróprios e torções) foram baseados no campo de força GROMOS 54A7 (SCHMID et al., 2011). As cargas atômicas parciais foram baseadas no ajuste do potencial eletrostático (ESP) usando o esquema Merz-Kollmann-Singh (SINGH e KOLLMAN, 1984) no nível de teoria B3LYP/6-31G*.

Após preparação da proteína e do ligante, a minimização de energia foi realizada em três etapas (10.000 etapas cada) para evitar artefatos nas trajetórias atômicas, por causa da conversão de energia potencial em energia cinética (LINDAHL, HESS e VAN DER SPOEL, 2001). Primeiramente, um algoritmo *steepest descent* foi aplicado, restringindo harmonicamente os átomos (não-hidrogênio) da proteína às suas posições iniciais; Em seguida, uma nova etapa de minimização por *steepest descent* foi realizada sem restrições para a posição dos átomos. Posteriormente, um algoritmo de gradiente conjugado foi aplicado a todo o sistema para maior minimização de energia. As ligações envolvendo átomos de hidrogênio foram restringidas usando o algoritmo LINCS (BERK et al., 1997) para proteínas/ligantes e SETTLE (MIYAMOTO e KOLLMAN, 1992) para moléculas de água, permitindo o uso de um tempo de integração de 2 fentossegundos. Condições periódicas de contorno (*periodic boundary conditions* – PBC) foram aplicadas e os pontos de corte, para átomos não ligados diretamente, foram fixados em 0,9 nm para ambas as interações de Coulomb e van der Waals. As interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas usando o método *Particle-Mesh-Ewald* (PME) (DARDEN, YORK e PEDERSEN, 1993).

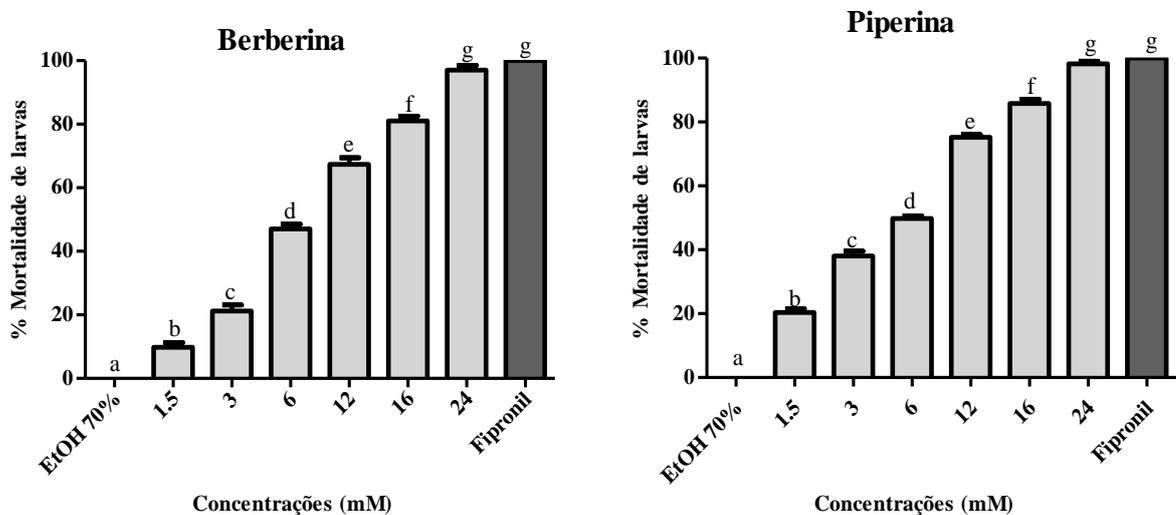
Em seguida, o sistema foi equilibrado durante 1 ns, a 25°C (298 K), com posições dos átomos (não-hidrogênio) restringida da proteína. A temperatura e a pressão foram mantidas constantes em 25°C (298 K) e 1 atm, empregando a abordagem de *V-redescale* (BUSSI, DONADIO e PARRINELLO, 2007) e acoplamento de Berendsen (BERENDSEN, POSTMA e VANGUNSTEREN, 1984), respectivamente. Em seguida, uma simulação de 10 ns sem restrições foram realizados para obtenção dos dados.

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Atividade carrapaticida *in vitro*

No teste de imersão de larvas de *R. microplus* (Figura 1) os alcaloides avaliados promoveram a morte das larvas de carrapatos em todas as concentrações testadas e de forma concentração-dependente, exceto a harmalina. A berberina e a piperina apresentaram elevada eficácia larvicida (97 e 98%, respectivamente) apenas na maior concentração (24 mM), não diferindo do controle positivo (100%, $p > 0,05$). A CE_{50} da berberina foi 6,76 mM ($R^2 = 0,98$), enquanto a piperina apresentou valor de 6,04 mM ($R^2 = 0,98$). O tratamento com a harmalina na concentração de 24 mM demonstrou reduzida atividade larvicida, com 32,75% de mortalidade das larvas.

Figura 1- Percentual de mortalidade (média \pm desvio padrão) *in vitro* de larvas de *Rhipicephalus microplus* expostas aos alcaloides berberina e piperina. (Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$).

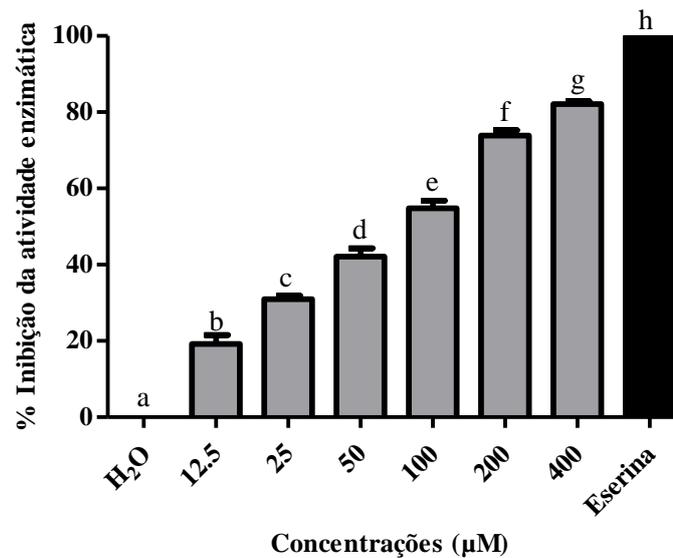


5.5.2 Atividade anticolinesterásica *in vitro*

Primeiramente, foi determinada a constante aparente de Michaelis-Menten da acetilcolina ($K_M = 17,83 \pm 1,55 \mu\text{M}$) (Apêndice A). Na concentração de 200 μM a piperina inibiu apenas 24% da atividade enzimática, enquanto a berberina apresentou um nível de inibição de 74%, diferindo do controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 2). Inibição dependente da

concentração foi observada para a berberina ($CI_{50} = 88,13 \mu\text{M}$, $R^2 = 0,99$). Devido a reduzida atividade larvicida da harmalina (32,75%), verificada neste estudo, a avaliação da atividade anticolinesterásica não foi realizada com este alcaloide.

Figura 2 – Percentual de inibição (média \pm desvio padrão) *in vitro* da atividade da acetilcolinesterase exposta ao alcaloide berberina. (Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significante, $p < 0,05$).



5.5.3 Ensaios de acoplamento e dinâmica molecular *in silico*

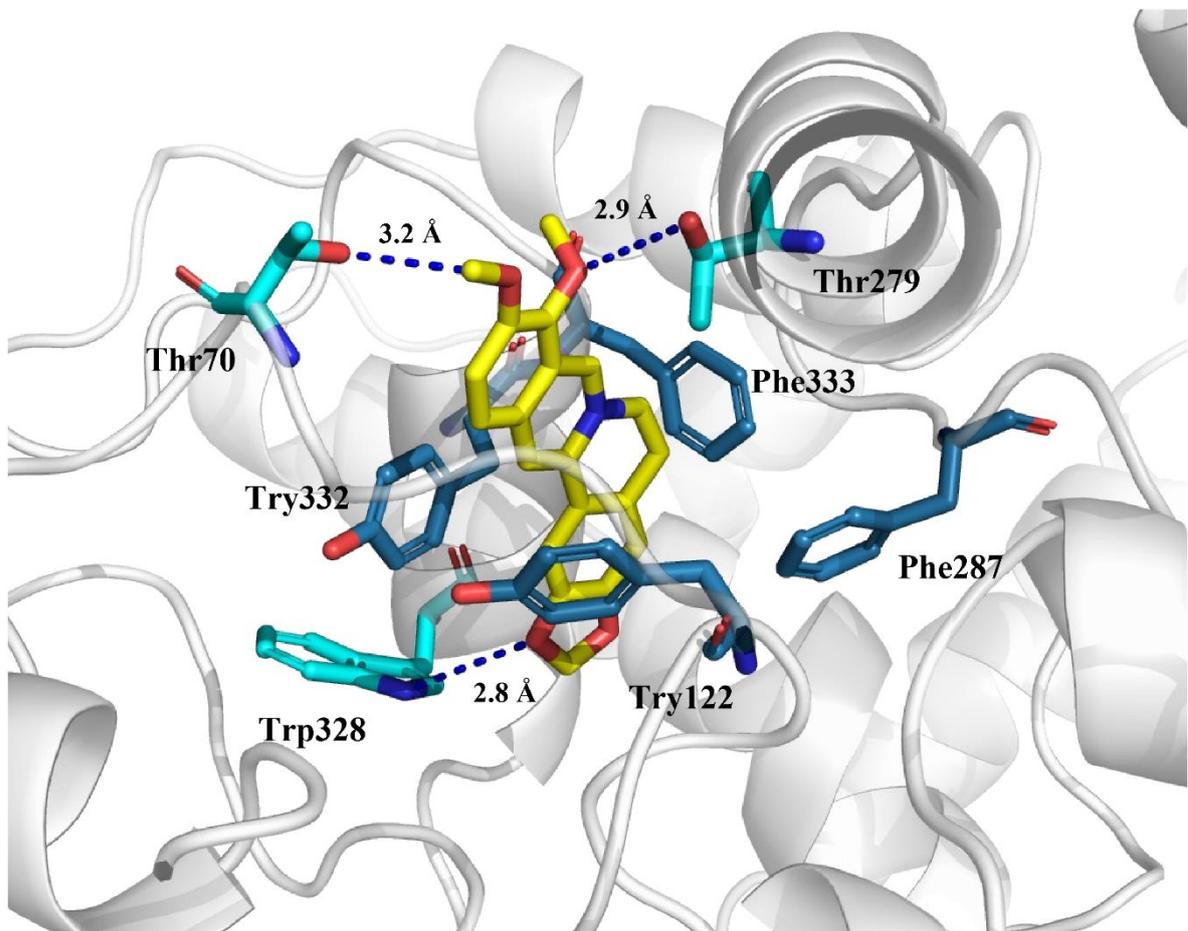
Inicialmente, a evolução temporal da *RmAChE 1* em sua forma isolada (*apo*) e complexada com berberina foram avaliadas por meio do desvio médio padrão (RMSD) e sugere que todos os sistemas estabilizaram após 3 ns (Apêndice C).

As análises realizadas de 3 a 10 ns mostram que o sistema do complexo berberina-*RmAChE 1* é mais estável ($0,299 \pm 0,02 \text{ nm}$) do que o sistema *apo* ($0,332 \pm 0,03 \text{ nm}$). Os sistemas também foram analisados quanto à sua compactação ao longo da trajetória através do raio de giro (R_g) e não revelaram nenhuma mudança conformacional significativa durante a simulação (Apêndice C). Juntos, os dados RMSD e R_g garantiram que nossas simulações fossem estáveis e úteis para outras análises.

Os dados de flutuação dos resíduos (*Root Mean Square Fluctuation*, RMSF) sugerem que a região entre os resíduos 274 e 287 do complexo, pertencente ao Sítio Aniônico Periférico (*Peripheral Anionic Site*, PAS) e sítio catalítico, tem amplitude menor que a *apo*

proteína (Apêndice D). A maior estabilização dessa região pode estar relacionada ao perfil de interação da berberina com a *RmAChE* 1. Para entender esse comportamento, as interações das ligações de hidrogênio foram primeiro mapeadas durante a simulação. Esta análise mostra que o nitrogênio indólico do resíduo triptofano 328 interagiu com a porção benzodioxol da berberina (5,85%). De maneira semelhante, os átomos de oxigênio do núcleo de dimetoxibenzeno atuam como aceptores de ligações de hidrogênio frente às hidroxilas da cadeia lateral dos resíduos treonina 279 (3,57%) e 70 (0,29%) (Figura 3).

Figura 3 – Principais interações da *RmAChE* 1 complexada com a berberina. A estrutura *RmAChE* 1 é mostrada em *cartoon* (branco) e seus resíduos interagentes e a berberina estão representados em bastões e coloridos da seguinte forma: sítio interação (ciano), sítio aniônico periférico (PAS, azul escuro) e berberina (amarelo). Esta imagem foi gerada pelo Pymol 2.1.0 (Schrödinger, 2013).



De modo geral, existe uma baixa influência das interações de ligações de hidrogênio (< 10%) que parece ser complementada por interações hidrofóbicas e outras interações eletrostáticas, como os tipos empilhamento π e cátion- π , realizadas com os resíduos aromáticos do PAS: tirosinas 122 e 332, fenilalaninas 287 e 333 (Figura 3 e Apêndice E).

Além disso, vários outros resíduos pertencentes ao PAS e ao sítio catalítico fizeram contatos com a berberina: Valina 67, Leucina 68, Aspartato 69, Glicina 120, fenilalanina 329 e Histidina 438 (Apêndice E).

5.6 DISCUSSÃO

A utilização de testes *in vitro* é muito importante para a identificação e seleção de compostos para avançar no desenvolvimento de novos produtos para o controle de *R. microplus* (ROSADO-AGUILAR et al., 2017). Resultados de estudos *in vitro* têm demonstrado a utilização de compostos isolados de plantas contra diferentes estágios de desenvolvimento de *R. microplus* (OLIVEIRA-CRUZ et al., 2013; SENRA et al., 2013; VALENTE et al., 2014; JIA et al., 2018; CARDOSO et al., 2020; CONCEIÇÃO et al., 2020). O presente estudo demonstrou elevada (> 95%) eficácia carrapaticida contra larvas de *R. microplus* para os alcaloides berberina e piperina. Este é o primeiro relato da atividade larvicida da berberina para carrapatos.

A ação da piperina sobre larvas de *R. microplus* foi investigada por Chagas e colaboradores (2012). Nesta avaliação, os autores não observaram mortalidade das larvas ao testarem a piperina isolada das folhas de *Piper tuberculatum* numa concentração 1,8 vezes maior (1,25% = 44,11mM) do que a utilizada no presente estudo. Essa divergência de resultados pode ser atribuída a vários fatores como: diferença entre as cepas de carrapatos utilizadas, metodologias de bioensaio variáveis e grau de pureza do alcaloide. Neste estudo, as larvas foram imersas na solução de piperina durante 5 minutos, enquanto Chagas e colaboradores (2012) colocaram as larvas entre papéis de filtro impregnados com a solução de piperina por 24 horas. A imersão na solução contendo o alcaloide no presente estudo pode ter resultado em maior absorção da piperina pelas larvas e contribuído para a maior mortalidade larvar. No entanto, diferenças na pureza da piperina ($\geq 97\%$ no presente estudo) também podem ter contribuído para a divergência nos resultados entre os estudos.

Neste estudo, nenhuma atividade anticolinesterásica considerável foi observada para piperina ($CI_{50} > 200 \mu M$), o que sugere que a atividade larvicida desse alcaloide pode estar relacionada a outro mecanismo de ação, embora a inibição da acetilcolinesterase tenha sido previamente descrita em roedores (DAHIYA et al., 2018).

O tratamento das larvas de *R. microplus* com a harmalina apresentou baixa atividade larvicida (32,75%), contudo, em estudos com *Psoroptes cuniculi*, ácaro que infesta o ouvido de coelhos, este alcaloide apresentou elevada ação carrapaticida, com percentual de

mortalidade de 90% na concentração de 2,5mg/mL (SHANG et al., 2016). No presente estudo, foi utilizado o dobro (24 mM = 5mg/mL) da concentração empregada por Shang e colaboradores (2016), e não foram obtidos resultados satisfatórios com este alcaloide. Por se tratar de duas espécies distintas de ácaros, é possível que diferenças morfológicas e fisiológicas existentes entre as espécies possam explicar estes resultados.

Apesar de já existirem relatos sobre a atividade anticolinesterásica da harmalina, em peixe-elétrico ($CI_{50} = 195 \mu\text{M}$) (YANG et al. 2015), esta atividade não foi avaliada em larvas de *R. microplus*, em virtude do reduzido efeito larvicida observado para este alcaloide neste estudo.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a elevada atividade larvicida da berberina (97% de mortalidade) a 24 mM esteve correlacionada com o elevado potencial de inibição à 400 μM (82%) da enzima acetilcolinesterase de larvas de carrapatos. O uso de compostos derivados de plantas com mecanismos de ligação à enzima acetilcolinesterase tem sido descrito na literatura. Recentemente, Conceição e colaboradores (2020) conseguiram estabelecer uma correlação entre a atividade larvicida (*in vitro*) com o alvo biológico dos anticolinesterásicos (*in silico*) a partir do alcaloide boldine extraído dos galhos de *Ocotea spixiana* (família Lauraceae) contra *R. microplus*. A atividade anticolinesterásica (*in vitro*) também foi o principal mecanismo de ação atribuído ao terpeno carvacrol na mortalidade de larvas de *R. microplus* suscetíveis e resistentes a organofosforados e carbamatos (CARDOSO et al., 2020). Estes estudos, somados aos nossos resultados, reforçam à ideia de que, embora o alvo biológico seja o mesmo (acetilcolinesterase), novos compostos podem interagir de maneira diferente com a enzima, até mesmo em cepas resistentes de carrapatos. Este mecanismo de inibição da acetilcolinesterase corresponde ao mecanismo de ação dos carrapaticidas organofosforados e carbamatos disponíveis comercialmente e frequentemente utilizados na Medicina Veterinária (GUERRERO, LOVIS e MARTINS, 2012).

Os resultados com a berberina sugerem que a inibição da enzima acetilcolinesterase é o mecanismo de ação pelo qual este alcaloide causa a morte das larvas. A atividade anticolinesterásica da berberina foi determinada em alguns modelos animais, incluindo peixes (JUNG et al., 2009; HUANG et al., 2010a; SU et al., 2013; ROSELLI et al., 2016; BALKRISHNA et al., 2019) e roedores (KIM et al., 2004; EL-WAHAB et al., 2013; HUSSIEN et al., 2018; KONG et al., 2019). O valor de CI_{50} da berberina no presente estudo (88,13 μM) permite classificá-la como uma molécula preliminar no desenvolvimento de antiparasitários, embora esteja longe dos valores descritos para as acetilcolinesterases de peixe elétrico (*Electrophorus electricus*) (0,374 - 2,8 μM) (HUANG et al., 2010a;

BALKRISHNA et al., 2019) e roedores (2,33 - 3,3 μM) (KIM et al., 2004; KONG et al., 2019). Esta diferença pode estar relacionada ao ensaio de modelo biológico empregado neste estudo, que começa a partir de uma matriz complexa, ou seja, sobrenadante de lisado de larvas de *R. microplus*. No presente estudo, a concentração de *RmAChEs* era desconhecida, e a concentração de proteína total no sobrenadante foi padronizada (638 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Devido a essas peculiaridades, é aceitável atingir diferenças maiores que 10 vezes em comparação à enzima isolada (SCOTT e WILLIAMS, 2012). Então, o valor de berberina CI_{50} é aceitável nas condições estabelecidas.

Além disso, outras acetilcolinesterases (*RmAChE* 2, HERNANDEZ et al., 1999 e *RmAChE* 3, TEMEYER et al., 2004) podem potencialmente interferir nos valores estimados de atividade biológica da berberina no ensaio porque essas enzimas competem com *RmAChE* 1. Assim, para reduzir o efeito de outras enzimas neste estudo, a concentração de substrato foi fixada em 35 μM a partir do valor de K_M aparente (17,83 μM , Apêndice A). Essa concentração de substrato usada nos ensaios enzimáticos é 7 vezes o valor do K_M de *RmAChE* 1 (5 μM - TEMEYER et al., 2010) e também corresponde a 0,7 vezes K_M de *RmAChE* 2 (50 μM) e 0,38 vezes K_M de *RmAChE* 3 (90 μM) (TEMEYER et al., 2010). Com base nesses resultados, considera-se que apenas *RmAChE* 1 pode estar em uma condição catalítica adequada para avaliação da atividade biológica. Apesar disso, esta condição não evita a interação da berberina com outras *RmAChEs* ou sua adsorção por proteínas presentes na matriz complexa (lisado).

Dessa forma, com o objetivo de quantificar o nível de interação com múltiplos sítios de ligação dos ensaios de inibição da berberina, foi calculado o coeficiente de Hill (nH) (GESZTELYI et al., 2012; STEFAN e NOVÈRE, 2013). De acordo com o valor de nH para a berberina ($0,89 \pm 0,14$; $R^2 = 0,99$, Apêndice B), apenas um local (possivelmente de uma enzima) está envolvido na inibição observada neste estudo, sugerindo, com base nos dados de K_M , que pode ser a *RmAChE* 1, o que valida a abordagem cinética definida pela equação de Michaelis-Mentem (ALON, 2007).

Com base nesses resultados bioquímicos, foi investigado o mecanismo molecular que governa as interações da berberina com a *RmAChE* 1, empregando alguns métodos computacionais como acoplamento e simulação por Dinâmica Molecular (DM). Como nenhuma estrutura experimental de *RmAChE* 1 em complexo com a berberina está disponível, a berberina foi encaixada na estrutura do modelo *RmAChE* 1, considerando seu mecanismo de inibição não-competitivo frente outras AChEs, como descrito por Huang e colaboradores (2010b). A modelagem *RmAChE* 1 foi recentemente descrita por Lima e colaboradores

(2020). Posteriormente, o complexo berberina-*RmAChE* 1 foi submetido a 10 ns de simulação de DM em solvente explícito para estudar seu comportamento em relação a enzima isolada (*apo*). Após essas simulações, ambos os sistemas estabilizaram a partir de 3 ns, permitindo a investigação dos principais aspectos estruturais que suportam a inibição da enzima observada *in vitro* (Apêndice C). Isso porque a trajetória utilizada nas análises reflete estruturas pertencentes a um estágio mais estável da simulação, reduzindo assim os artefatos devido às diferenças entre condições periódicas da caixa de simulação e os ambientes cristalinos (BATISTA et al., 2010).

A partir de dados de simulação por DM, foi observado que a berberina se acomodou preferencialmente entre os resíduos do sítio aniônico periférico com pouca interação no sítio catalítico (Figura 3), o que pode explicar o modo de inibição não-competitivo da berberina descrito anteriormente (HUANG et al., 2010b) e que está bem relacionado com os ensaios bioquímicos do presente estudo (Figura 2). As principais interações são: empilhamento π , cátion- π e contatos hidrofóbicos, especialmente com resíduos aromáticos em torno da berberina (Figura 3). Este modelo de interação é semelhante ao observado em outras acetilcolinesterases (HUANG et al., 2010a, 2010b; HUANG et al., 2012).

Além disso, foi analisado o padrão de interação por ligação de hidrogênio entre berberina e resíduos de *RmAChE* 1, a partir de dados de DM. Essas análises sugeriram que essas ligações de hidrogênio tem pouca influência sobre a estabilidade do complexo (< 10% do tempo de simulação). No entanto, o oxigênio do grupo dimetoxi-benzeno atua como acceptor de ligações de hidrogênio frente à hidroxila da cadeia lateral treonina 279. Este resíduo substitui o triptofano 286 da acetilcolinesterase humana (*hAChE*) e é a principal causa das quedas de atividade dos derivados contendo o grupo dimetoxi-benzeno da *RmAChE* 1, como o donepezil (3% de inibição a 0,1 mM, SWALE et al., 2013). Além disso, a cadeia lateral indólica do triptofano 328 de *RmAChE* 1 realizou ligações de hidrogênio com o núcleo de benzodioxola da berberina (Figura 3). Este padrão de interação do grupo benzodioxola se assemelha ao observado frente a tirosina 337 da *hAChE*, que é um resíduo frequentemente descrito como um porta de entrada do sítio ativo e que tem grande mobilidade e capacidade de interagir com o núcleo de benzodioxola de outros compostos (KRYGER, SILMAN e SUSSMAN, 1999; CHEUG et al., 2012).

5.7 CONCLUSÃO

A berberina e a piperina têm ação larvicida *in vitro* sobre *R. microplus*, e a berberina atua inibindo a enzima acetilcolinesterase das larvas. A harmalina tem reduzida ação larvicida *in vitro* sobre *R. microplus*. Estudos *in silico* sugerem que a inibição pela berberina resulta de interações com os resíduos do sítio aniônico periférico de *RmAChE1*. Esses resultados demonstram o alto potencial da berberina e piperina na pesquisa para o desenvolvimento de novos carrapaticidas eficazes e seguros.

5.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALON, U. An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits ([Nachdr.] ed.). 2007. Boca Raton, FL: Chapman & Hall. ISBN 978-1-58488-642-6.

ASAI, M.; IWATA, N.; YOSHIKAWA, A.; AIZAKI, Y.; ISHIURA, S.; SAIDO, T.C.; MARUYAMA, K. Berberine alters the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein to decrease A β secretion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, n. 2, p. 498–502, 2007.

BALKRISHNA, A., POKHREL, S., TOMER, M., VERMA, S., KUMAR, A., NAIN, P., ABHISHEK GUPTA, A., VARSHNEY, A. Anti-acetylcholinesterase activities of mono-herbal extracts and exhibited synergistic effects of the phytoconstituents: A biochemical and computational study. **Molecules** v. 24, p.4175, 2019.

BANUMATHI, B.; VASEEHARAN, B.; PERIYANNAN, R.; PRABHU, N.M.; RAMASAMY, P.; MURUGAN, K.; CANALE, A.; BENELLI, G. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*- A review. **Veterinary Parasitology**, v.244, p. 102-110, 2017.

BATISTA, P.R., ROBERT, C.H., MARECHAL, J.D., HAMIDA-REBAI, M.B., PASCUTTI, P.G., BISCH, P.M., PERAHIA, D. Consensus modes, a robust description of protein collective motions from multiple-minima normal mode analysis-application to the HIV-1 protease. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 2850-2859, 2010.

BERENDSEN, H. J. C., GRIGERA, J. R., STRAATSMA, T. P. The missing term in effective pair potentials. **Journal of Physical Chemistry**, v. 91, p. 6269–6271, 1987.

BERENDSEN, H.J.C., POSTMA, J.P.M., VANGUNSTEREN, W.F., DINOLA, A., HAAK, J.R. Molecular-dynamics with coupling to an external bath. **Journal of Physical Chemistry**, v. 81, p.3684-3690, 1984.

BERK, H., HENK, B., HERMAN, J.C.B., JOHANNES, G.E.M.F. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, p. 1463-1472, 1997.

BOLL, P.M.; PARMAR, V.S.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.; JESPER WENGEL, J.; OLSENG, A.E. Some recent isolation studies from potential insecticidal *Piper* species. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n.10/11, p. 2339-2342, 1994.

BOURNINE, L. BENSALÉM, S.; FATMI, S.; BEDJOU, F.; MATHIEU, V.; IGUER-OUADA, M.; KISS, R.; DUEZ, P. Evaluation of the cytotoxic and cytostatic activities of alkaloid extracts from different parts of *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae). **European Journal of Integrative Medicine**, v. 9, p. 91–96, 2017.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BUSSI, G., DONADIO, D., PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, p. 014101, 2007.

CARDOSO, A.S., SANTOS, E.G.G., LIMA, A.S., TEMEYER, K.B., LEÓN, A.A.P., COSTA JUNIOR, L.M., SOARES, A.M.S. Terpenes on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. **Veterinary Parasitology**, v. 280, p. 109090, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109090>

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**, v.110, p. 295-303, 2012.

CHAGAS, A.C.S.; OLIVEIRA, M.C.S.; GIGLIOTI, R.; SANTANA, R.C.M.; BIZZO, H.R.; GAMA, P.E.; CHAVES, F.C.M. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 427-432, 2016.

CHEUG, J., RUDOLPH, M.J., BURSHTEYN, F., CASSIDY, M.S., GARY, E.N., LOVE, J., FRANKLIN, M.C., HEIGHT, J.J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 10282-10286, 2012.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 798–802, 2010.

CONCEIÇÃO, R.S.; CARNEIRO, M.M.A.A.; REIS, I.M.A.R.; BRANCO, A.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; BOTURA, M.B. *In vitro* acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fraction. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, p. 275–282, 2017.

CONCEIÇÃO, R.S., REIS, I.M.A., CERQUEIRA, A.P.M., PEREZ, C.J., SANTOS JUNIOR, M.C., BRANCO, A., IFA, D.R., BOTURA, M.B. Rapid structural characterisation of benzyloquinoline and aporphine alkaloids from *Ocotea spixiana* acaricide extract by HPTLC-DESI-MSⁿ. **Wiley**, 2020. DOI: 10.1002/pca.2935.

DAHIYA, S.; RANI, R.; DHINGRA, D.; SANDEEP KUMAR, S.; DILBAGHI, N. Potentiation of nootropic activity of EGCG loaded nanosuspension by piperine in swiss male albino mice. **Future Journal of Pharmaceutical sciences**, v.4, p. 296–302, 2018.

DANTAS, A.C.S.; MACHADO, D.M.R., ARAUJO, A.C.; OLIVEIRA-JUNIOR, R.G.; LIMA-SARAIVA, S.R.G.; RIBEIRO, L.A.A.; ALMEIDA, J.R.G.S.; HORTA, M.C. Acaricidal activity of extracts from the leaves and aerial parts of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 165-168, 2015.

DARDEN, T., YORK, D., PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: an N·log (N) method for Ewald sums in large systems. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 10089-10092, 1993.

DEMBITSKY, V.M., DZHEMILEVA, L., GLORIOZOVA, T., D'YAKONOV, V. Natural and synthetic drugs used for the treatment of the dementia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, V. 524, p. 772-783, 2020.

DENG, C. SHAO, H.; PAN, X.; WANG, S.; ZHANG, D. Herbicidal effects of harmaline from *Peganum harmala* on photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa*: Probed by chlorophyll fluorescence and thermoluminescence. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 23–31, 2014.

DI GIORGIO, C.; DELMAS, F.; OLLIVIER, E.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; TIMON-DAVID, P. In vitro activity of the β -carboline alkaloids harmaline, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 106, p. 67–74, 2004.

DOUCETTE, C.D.; GREENSHIELDS, A.L.; LIWSKI, R.; HOSKIN, D.W. et al. Piperine blocks interleukin-2-driven cell cycle progression in CTLL-2 T lymphocytes by inhibiting multiple signal transduction pathways. **Toxicology Letters**, v. 234, n. 1, p. 1–12, 2015.

DZIEDZIC, A.; WOJTYCZKA, R.D.; KUBINA, R. Inhibition of Oral Streptococci Growth Induced by the Complementary Action of Berberine Chloride and Antibacterial Compounds. **Molecules**, v. 20, p. 13705–13724, 2015.

EBRAHIMI-GHIRI, M.; NASEHI, M.; ZARRINDAST, M. Anxiolytic and antidepressant effects of ACPA and harmaline co-treatment. **Behavioural Brain Research**, v. 364, n. November 2018, p. 296–302, 2019.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; JUNIOR, V.A.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemistry Pharmacology**, v.7, p.88-95, 1961.

EL-WAHAB, A.E.A.; GHAREEB, D.A.; SARHAN, E.E.M.; ABU-SERIE, M.M.; DEMELLAWY, M.A. In vitro biological assessment of *berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidants, anticancer effects. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1–12, 2013.

GONÇALVES, V.M.; HUERTA, M.M.; FREITAG, R.A. Potencial de plantas acaricidas no controle de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 014-022, 2016.

GREENSHIELDS, A.L.; DOUCETTE, C.D.; SUTTON, K.M.; MADERA, L.; ANNAN, H.; YAFFE, P.B.; KNICKLE, A.F.; DONG, Z.; HOSKIN, D.W. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 129–140, 2015.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUERRERO, F.D.; LOVIS, L.; MARTINS, J.R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012.

GUNASEKARAN, V.; ELANGO VAN, K.; DEVARAJ, S.N. Targeting hepatocellular carcinoma with piperine by radical-mediated mitochondrial pathway of apoptosis: An *in vitro* and *in vivo* study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 106–118, 2017.

HERRAIZ, T.; GONZÁLEZ, D.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; ARÁN, V.J.; GUILLÉN, H. β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 839–845, 2010.

HESS, B., KUTZNER, C., VAN DER SPOEL, D., LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, p.435–447, 2008.

HE, W.; WANG, C.; CHEN, Y.; HE, Y.; CAI, Z. Berberine attenuates cognitive impairment and ameliorates tau hyperphosphorylation by limiting the self-perpetuating pathogenic cycle between NF- κ B signaling, oxidative stress and neuroinflammation. **Pharmacological Reports**, v. 69, p. 1341–1348, 2017.

HUANG, L., LUO, Z., HE, F., LU, J., LI, X. Synthesis and biological evaluation of a new series of berberine derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 4475–4484, 2010a.

HUANG, L.; SHI, A.; FENG HE, F.; LI, X. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of berberine derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1244–1251, 2010b.

HUANG, L., SU, T., SHAN, W., LUO, Z., SUN, Y., HE, F., LI, X. Inhibition of cholinesterase activity and amyloid aggregation by berberine-phenyl benzoheterocyclic and tacrine-phenylbenzoheterocyclic hybrids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 3038–3048, 2012.

HUSSIEN, H.M.; ABD- ELMEGIED, A.; GHAREEB, D.A.; HAFEZ, H.S.; AHMED, H.E.A.; EL-MONEAM, N.A. Neuroprotective effect of berberine against environmental heavy metals- induced neurotoxicity and Alzheimer's-like disease in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 432–444, 2018.

JIA, M.; HE, Q.; WANG, W.; DAI, J.; ZHU, L. Chemical composition and acaricidal activity of *Arisaema anurans* essential oil and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 261, p. 59–66, 2018.

JIMÉNEZ, J.; RIVERÓN-NEGRETTE, L.; ABDULLAEV, F.; ESPINOSA-AGUIRRE, J.; RODRÍGUEZ-ARNAIZ, R. Cytotoxicity of the β -carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays *in vitro*. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 60, p. 381–389, 2008.

JOHNSON, K.A., GOODY, R.S. The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. **Biochemistry**, v.50, p. 8264–8269, 2011.

JUNG, H.; MIN, B.S.; YOKOZAWA, T.; LEE, J.H.; KIM, Y.S.; CHOI, J.S. Anti-Alzheimer and Antioxidant Activities of *Coptidis Rhizoma* Alkaloids. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 1433–1438, 2009.

KAUR, J.; YADAV, D.K.; SHARMA, S.; HASAN, M.; TYAGI, P.K.; SINGH, M.R. Isolation and characterization of berberine hcl and cytotoxic effect on the cell line of breast cancer. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 4, p. 1297–1307, 2016.

KIM, D.K.; LEE, K.T.; BAEK, N.I.; KIM, S.H.; PARK, H.W.; LIM, J.P.; SHIN, T.Y.; EOM, D.O.; YANG, J.H.; EUN, J.S. Acetylcholinesterase Inhibitors from the Aerial Parts of *Corydalis speciosa*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 11, p. 1127–1131, 2004.

KONG, X.P., LIU, E.Y.L., CHEN, Z.C., XU, M.L., YU, A.X.D., WU, Q.Y., XIA, Y.J., DUAN, R., DONG, T.T.X., TSIM, K.W.K. Synergistic inhibition of acetylcholinesterase by alkaloids derived from *Stephaniae tetrandrae radix*, *Coptidis rhizoma* and *Phellodendri chinensis cortex*. **Molecules** v. 24, p.4567, 2019.

KRYGER, G., SILMAN, I., SUSSMAN, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. **Structure**, v.7, p. 297-307, 1999.

LIMA, H.G., SANTOS, F.O., SANTOS, A.C.V., SILVA, G.D., SANTOS, R.J., CARNEIRO, K.O., REIS, I.M.A., ESTRELA, I.O., FREITAS, H.F., BAHIENSE, T.C., PITA, S.S.R., UZEDA, R.S., BRANCO, A., COSTA, S.L., BATATINHA, M.J.M., BOTURA, M.B. Antitick effect and cholinesterase inhibition caused by *Prosopis juliflora* alkaloids: *in vitro* and *in silico* studies. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.29, e019819, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020036>

LINDAHL, E., HESS, B., VAN DER SPOEL, D., 2001. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v.7, p.306–317, 2001.

LIU, H.L.; LUO, R.; CHEN, X.Q.; BA, Y.Y.; ZHENG, L.; GUO, W.W.; WU, X. Identification and simultaneous quantification of five alkaloids in *Piper longum* L. by HPLC-ESI-MSn and UFLC-ESI-MS/MS and their application to *Piper nigrum* L. **Food Chemistry**, v. 177, p. 191–196, 2015.

LUGANINI, A.; MERCORELLI, B.; MESSA, L.; PALÙ, G.; GRIBAUDO, G.; LOREGIAN, A. The isoquinoline alkaloid berberine inhibits human cytomegalovirus replication by interfering with the viral Immediate Early-2 (IE2) protein transactivating activity . **Antiviral Research**, v. 164, n. October 2018, p. 52–60, 2019.

LU, J.; CAO, Y.; CHENG, K.; XU, B.; WANG, T.; YANG, Q.; YANG, Q.; FENG, X.; XIA, Q. Berberine regulates neurite outgrowth through AMPK-dependent pathways by lowering energy status. **Experimental Cell Research**, v. 334, p. 194–206, 2015.

MIYAMOTO, S., KOLLMAN, P.A. Settle – an analytical version of the shake and rattle algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v.13, p. 952-962, 1992.

NAFISI, S.; BONSAII, M.; MAALI, P.; KHALILZADEH, M.A.; MANOUCHEHRI, F. b - Carboline alkaloids bind DNA. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 100, n. 2, p. 84–91, 2010.

NENAAH, G. Antibacterial and antifungal activities of (beta) -carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 779–782, 2010.

NENAAH, G. Toxicity and growth inhibitory activities of methanol extract and the b - carboline alkaloids of *Peganum harmala* L . against two coleopteran stored-grain pests. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n. 3, p. 255–261, 2011.

OLIVEIRA - CRUZ, L.M.; COSTA-JUNIOR, L.M.; PINTO, J.A.O.; SANTOS, D.A.; ARAUJO, S.A.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BACCI, L.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H.; BLANK, A.F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, p. 198– 202, 2013.

RIZWAN-UL-HAQ, M.; HU, Q.B.; HU, M.Y.; LIN, Q.S.; ZHANG, W.L. Biological impact of harmaline , ricinine and their combined effects with *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae). **Journal of Pest Science**, v. 82, p. 327–334, 2009.

ROSADO-AGUILAR, J.A., ARJONA-CAMBRANES, K., TORRES-ACOSTA, J.F.J., RODRÍGUES-VIVAS, R.I., BOLIO-GONZÁLEZ, M.E., ORTEGA-PACHECO, A., ALZINA-LÓPEZ, A., GUTIÉRREZ-RUIZ, E.J., GUTIÉRREZ-BLANCO, E., AGUILAR-CABALLERO, A.J. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 66-76, 2017.

ROSELLI, M.; CAVALLUZZI, M.M.; BRUNO, C.; LOVECE, A.; CAROCCI, A.; FRANCHINI, C.; HABTEMARIAM, S.; LENTINI, G. Synthesis and evaluation of berberine derivatives and analogs as potential antiacetylcholinesterase and antioxidant agents. **Phytochemistry Letters**, v. 18, p. 150–156, 2016.

SAMUEL, M.; CAVALLUZZI, M.M.; BRUNO, C.; LOVECE, A.; CAROCCI, A.; FRANCHINI, C.; HABTEMARIAM, S.; LENTINI, G. The larvicidal effects of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine against insecticide resistant and susceptible strains of *Anopheles malaria* vector mosquitoes. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2016.

SCHMID, N., EICHENBERGER, A.P., CHOUTKO, A., RINIKER, S., WINGER, M., MARK, A.E., VAN GUNSTEREN, W.F., 2011. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. **European Biophysics Journal**, v. 40, p. 843-856, 2011.

SCOTT, J.E., WILLIAMS, K.P. Validating Identity, Mass Purity and Enzymatic Purity of Enzyme Preparations. 2012 May 1 [Updated 2012 Oct 1]. In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91995/pdf/Bookshelf_NBK91995.pdf (Acesso em: 10 Abril 2020).

SEMLER, U.; GROSS, G.G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1566–1567, 1988.

SENRA, T.O.S.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; CALMON, F.; MATURANO, R.; GOMES, G.A.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.112, p. 1461–1466, 2013.

SHANG, X.; GUO, X.; LI, B.; PAN, H.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; MIAO, X. Microwave-assisted extraction of three bioactive alkaloids from *Peganum harmala* L. and their acaricidal activity against *Psoroptes cuniculi* *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 350–361, 2016.

SHENOY, P.A.; NIPATE, S.S.; SONPETKAR, J.M.; SALVI, N.C.; WAGHMARE, A.B.; CHAUDHARI, P.D. Production of high titre antibody response against Russell's viper venom in mice immunized with ethanolic extract of fruits of *Piper longum* L. (Piperaceae) and piperine. **Phytomedicine**, v. 21, n. 2, p. 159–163, 2014.

SILVA, W.C.S.; MARTINS, J.R.S.; SOUZA, H.E.M.; HEINZEN, H.; CESIO, M.V.; MATO, M.; ALBRECHT, F.; AZEVEDO, J.L.; BARROS, N.M. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 267-274, 2009.

SINGH, U.C., KOLLMAN, P.A. An approach to computing electrostatic charges for molecules. **Journal of Computational Chemistry**, v.5, p. 129-145, 1984.

SINGH, B.; SRIVASTAVA, J.S.; KHOSA, R.L.; SINGH, U.P. Individual and Combined Effects of Berberine and Santonin on Spore Germination of Some Fungi. **Folia Microbiologica**, v. 46, n. 2, p. 137–142, 2001.

SOFFAR, S.A.; METWAIL, D.M.; ABDEL-AZIZ, S.S.; EL-WAKIL, H.S.; SAAD, G.A. Evaluation of the effect of a plant alkaloid (berberine derived from *Berberis aristata*) on *Trichomonas vaginalis* *in vitro*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 31, n. 3, p. 893-904, 2001.

SOUZA, A.P., VEIGA, L.P.H.N., BELLATO, V., SARTOR, A.A., CARDOSO, C.P., NUNES, A.P.O. Proposta para teste acaricida por imersão de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: avaliação em cipermetrina e amitraz. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 242-245, 2008.

STEFAN, M.I., NOVÈRE, N.L. Cooperative Binding. **PLOS Computational Biology**, v. 9, p. 1003106, 2013.

STROET, M., CARON, B., VISSCHER, K.M., GEERKE, D.P., MALDE, A.K., MARK, A.E. Automated Topology Builder Version 3.0: Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 14, p. 5834-5845, 2018.

SU, T.; XIE, S.; WEI, H.; YAN, J.; HUANG, L.; LI, X. Synthesis and biological evaluation of berberine–thiophenyl hybrids as multi-functional agents: Inhibition of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and Ab aggregation and antioxidant activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 5830–5840, 2013.

SWALE, D. R., TONG, F., TEMEYER, K. B., LI, A., LAM, P.C.H., TOTROV, M. M., CARLIER, P.R., LEÓN, A.A.P., BLOOMQUIST, J.R. Inhibitor profile of bis(n)-tacrine and N-methylcarbamates on acetylcholinesterase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Phlebotomus papatasi*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, p. 85–92, 2013.

TORRES, R. C.; GARBO, A. G.; WALDE, R. Z. M. L. Larvicidal activity of *Persea americana* Mill. Against *Aedes aegypti*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.7, S. 1, p. S167-S170, September 2014.

VALENTE, P.P.; AMORIM, J.M.; CASTILHO, R.O.; LEITE, R.C.; RIBEIRO, M.F.B. *In vitro* acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 113, p. 417–423, 2014.

VAN DER SPOEL, D., LINDAHL, E., HESS, B., GROENHOF, G., MARK, A.E., BERENDSEN, H.J.C. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, p. 1701–1718, 2005.

WRIGHT, F.C.; AHRENS, E.H. Cholinesterase Insensitivity: A Mechanism of Resistance in Mexican Strains of *Boophilus microplus* (Acari; Ixodidae) Against Coumaphos. **Journal Medical Entomology**, v. 25, n. 4, p. 234-239, 1988.

YANG, Y.; CHENG, X.; LIU, W.; CHOU, G.; WANG, Z.; WANG, C. Potent AChE and BChE inhibitors isolated from seeds of *Peganum harmala* Linn by a bioassay-guided fractionation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.168, p. 279–286, 2015a.

YOON, Y.C.; KIM, S.H.; KIM, M.J.; YANG, H.J.; RHYU, M.R.; PARK, J.H. Piperine, a component of black pepper, decreases eugenol-induced Camp and calcium levels in non-chemosensory 3T3-L1 cells. **FEBS Open Bio**, v. 5, p. 20–25, 2015.

6 CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA *IN VITRO* DOS ALCALOIDES BERBERINA, HARMALINA E PIPERINA SOBRE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE CAPRINOS E CITOTOXICIDADE

6.1 RESUMO

As infecções por nematoides gastrintestinais (NGI) representam impactos negativos na criação de caprinos, tanto pela redução na produção, quanto pelo aumento nos custos com o tratamento dos animais. Os anti-helmínticos comerciais têm sido cada vez mais ineficazes no tratamento das nematodioses, devido ao desenvolvimento de parasitos resistentes a estes produtos. A utilização de compostos bioativos derivados de plantas vem sendo pesquisados como alternativa para o controle de parasitos. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade anti-helmíntica *in vitro* dos alcaloides berberina, harmalina e piperina sobre NGI de caprinos e seus possíveis efeitos citotóxicos em células Vero. A avaliação anti-helmíntica foi realizada utilizando os testes de eclosão de ovos (TEO) e motilidade larvar (TML) nas seguintes concentrações: berberina 0,17; 0,34; 0,67; 1,34 e 2,69 mM, harmalina 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 e 4,8 mM e piperina 0,00687; 0,01375; 0,0275; 0,055 e 0,110 mM – TEO e 0,22; 0,44; 0,88; 1,76 e 3,5 mM – TML. A citotoxicidade foi determinada utilizando o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-defenitetrázólio (MTT). Somente os alcaloides berberina (2,69 mM) e piperina (0,110 mM) inibiram a eclosão dos ovos de NGI superior a 90%. A piperina foi o composto mais ativo contra ovos de NGI de caprinos com CE_{50} (concentração efetiva 50%) de 0,0074 mM, enquanto que a CE_{50} da berberina foi de 1,32 mM. A harmalina ($CE_{50} = 1,6$ mM) apresentou moderada ação ovicida (80,30%). No TML, a piperina e harmalina demonstraram reduzido (2,75 e 25,29%) efeito sobre a motilidade de larvas, respectivamente. Eficácia larvicida foi evidenciada apenas com o alcaloide berberina que apresentou percentual de inibição da motilidade larvar de 98,17% (2,69 mM). No teste de MTT todos os alcaloides apresentaram reduzida toxicidade para células Vero, com efeito citotóxico inferior a 50% em todas as concentrações testadas. Estes resultados sugerem que a berberina e piperina apresentam potencial anti-helmíntico sobre ovos e larvas infectantes de NGI de caprinos com reduzida toxicidade para células de mamíferos.

Palavras-chave: Nematoides gastrintestinais, pequenos ruminantes, alcaloides e células Vero

6.2 ABSTRACT

Infections with gastrointestinal nematodes (GIN) have negative impacts on the creation of goats, both due to the reduction in production and the increase in the costs of treating animals. Commercial anthelmintics have been increasingly ineffective in the treatment of nematodes, due to the development of parasites resistant to these products. The use of bioactive compounds derived from plants has been researched as an alternative for the control of parasites. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* anthelmintic activity of the alkaloids berberine, harmaline and piperine on goat GIN and their possible cytotoxic effects in Vero cells. The anthelmintic evaluation was performed using the egg hatch (EHA) and larval motility (LMA) assay in the following concentrations: berberine 0.17; 0.34; 0.67; 1.34 and 2.69 mM, harmaline 0.3; 0.6; 1.2; 2.4 and 4.8 mM and piperine 0.00687; 0.01375; 0.0275; 0.055 and 0.110 mM - EHA and 0.22; 0.44; 0.88; 1.76 and 3.5 mM - LMA. Cytotoxicity was determined using the 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Only the alkaloids berberine (2,69 mM) and piperine (0,110 mM) inhibited the hatching of GIN eggs greater than 90%. Piperine was the most active compound against goat GIN eggs with an EC₅₀ (effective concentration 50%) of 0.0074 mM, while the EC₅₀ of berberine was 1.32 mM. Harmaline (EC₅₀ = 1.6 mM) showed moderate ovicidal action (80.30%). In LMA, piperine and harmaline showed a reduced (2.75 and 25.29%) effect on larval motility, respectively. Larvicidal efficacy was evidenced only with the berberine alkaloid, which showed a percentage of inhibition of larval motility of 98.17% (2.69 mM). In the MTT assay, all alkaloids showed reduced toxicity to Vero cells, with a cytotoxic effect of less than 50% in all tested concentrations. These results suggest that berberine and piperine have anthelmintic potential on eggs and infective larvae of goat GIN with reduced toxicity to mammalian cells.

Keywords: gastrointestinal nematodes, small ruminants, alkaloids and Vero cells.

6.3 INTRODUÇÃO

Nematoides gastrintestinais (NGI) são frequentemente encontrados em pequenos ruminantes e com ampla distribuição mundial (ZAJAC e GARZA, 2020). Em caprinos, os NGI são responsáveis pela diminuição na ingestão de alimentos resultando em reduções do crescimento, ganho de peso, desempenho reprodutivo e produções de carne e leite, causando impactos negativos no setor pecuário (VAN HOUTERT e SYKES, 1996; SANTOS et al., 2019). Dentre os principais NGI que infectam pequenos ruminantes no Brasil, *Haemonchus* é um dos o gêneros mais prevalentes (BORGES et al., 2015; KANETO et al., 2016).

O principal método de controle de NGI é realizado por meio da utilização de produtos anti-helmínticos químicos comerciais (SANTOS et al., 2019). A fácil aquisição destes anti-helmínticos, acrescida à sua utilização indiscriminada, têm favorecido a seleção de parasitos resistentes aos compostos comerciais, comprometendo a sua eficácia no tratamento dos animais (SINGH et al., 2017). Pesquisas sobre métodos alternativos para o controle de parasitos, incluindo a utilização de metabólitos secundários de planta, têm sofrido avanços e se tornado mais frequentes (HOSTE e TORRES-ACOSTA, 2011). As plantas são fontes de diversos compostos químicos ativos com variadas ações farmacológicas. Dentre estes constituintes ativos, incluem-se os alcaloides, metabólitos secundários vastamente reportados como detentores de elevado potencial terapêutico (DEY et al., 2020).

Berberina, harmalina e piperina são alcaloides amplamente estudados, especialmente quanto às suas diversas atividades biológicas, incluindo ação antiparasitária. Para a berberina, um alcaloide isoquinolínico (ASAI et al., 2007), já foram demonstrados efeitos antifúngicos (SINGH et al., 2001), antiprotozoários (SOFFAR et al., 2001), anti-helmíntico (SATOUE et al., 2002), antibacterianos (DZIEDZIC, WOJTYCZKA e KUBINA, 2015) e antivirais (LUGANINI et al., 2019). As principais atividades biológicas descritas para o alcaloide β -carbolina harmalina (HERRAIZ et al., 2010) estão relacionadas com sua ação antiprotozoária (DI GIORGIO et al., 2004), antibacteriana e antifúngica (NENAAH, 2010), inseticida (NENAAH, 2011) e carrapaticida (SHANG et al., 2016). A piperina, um alcaloide piperidínico (SEMLER e GROSS, 1988) apresenta propriedades carrapaticida (CHAGAS et al., 2012), anti-helmíntica (SUDHAKAR et al., 2013), inseticida (SAMUEL et al., 2016) e antiprotozoária (VIEIRA-ARAÚJO et al., 2018).

Nenhum relato sobre a atividade anti-helmíntica da berberina, harmalina e piperina sobre NGI de caprinos tem sido descrito até o momento, embora atividade anti-helmíntica da piperina e berberina já tenha sido demonstrada em *Pheretima posthuma*, um helminto de vida

livre (SUDHAKAR et al., 2013), e em duas espécies de *Strongyloides* spp. (SATOU et al., 2002), respectivamente. A escassez de informações sobre a ação anti-helmíntica destes alcaloides e a necessidade de investigações relacionadas ao desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o controle de NGI em pequenos ruminantes, incentivou a realização deste estudo, que teve por objetivo, avaliar a atividade anti-helmíntica *in vitro* dos alcaloides berberina, harmalina e piperina sobre ovos e larvas infectantes de nematoides gastrintestinais de caprinos. Além disso, a citotoxicidade dos alcaloides foram avaliadas em cultivo de células Vero.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

Todo o delineamento experimental foi previamente submetido e aprovado pelo comitê de Ética no uso de animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil (**Protocolo nº38/2018**) (Anexo 2).

6.4.1 Obtenção dos alcaloides

Os alcaloides berberina chloride, harmalina e piperina foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil) e apresentam pureza > 95%.

6.4.2 Avaliação anti-helmíntica *in vitro*

Foram utilizadas amostras de fezes obtidas de caprinos naturalmente infectados com nematoides gastrintestinais e sem tratamento prévio com anti-helmínticos por 60 dias, oriundos da Fazenda Experimental de Entre Rios (FEER) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), e mantidos no Hospital de Medicina Veterinária Prof. Renato Rodenburg de Medeiros Neto - HOSPMEV/UFBA.

Para obtenção da suspensão de ovos, foi adotada a metodologia descrita por Hubert e Kerbeoef (1992), em que aproximadamente 10g de fezes foram homogeneizadas com água destilada e filtradas em tamis de 1mm, 100, 75, 55 e 25µm. Os ovos retidos no último tamis, foram coletados com água destilada e, em seguida, centrifugado por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e então, adicionada solução de cloreto de sódio saturada, seguindo-se de nova centrifugação pelo mesmo período. O sobrenadante foi então filtrado no tamis de 25µm e lavado com água destilada para a coleta dos ovos.

A suspensão de larvas infectantes (L3) foi obtida de acordo com Ueno e Gonçalves (1998), através de coproculturas cultivadas em estufa B.O.D a 27°C, no período de 7 dias. As larvas foram identificadas por microscopia, indicando que esta população de nematoides utilizadas no estudo foi composta pelos gêneros *Haemonchus* spp. (56,4%), *Trichostrongylus* spp. (25,7%), *Oesophagostomum* spp. (14,5%) e *Strongyloides* spp. (3,4%).

As concentrações dos alcaloides obtidas neste estudo foram determinadas em estudo piloto utilizando os compostos nas maiores concentrações possíveis abaixo do nível de saturação: 2,69 mM para a berberina, 4,8 mM para a harmalina e 3,5 mM para a piperina. Foram testadas as seguintes concentrações: berberina 0,17; 0,34; 0,67; 1,34 e 2,69 mM (diluído em água destilada), harmalina 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 e 4,8 mM e piperina 0,00687; 0,01375; 0,0275; 0,055 e 0,110 mM (TEO) e 0,22; 0,44; 0,88; 1,76 e 3,5 mM (TML) (diluídos em DMSO 2,5%). Dois controles negativos foram preparados: a água destilada e DMSO 2,5%. Albendazol (0,05 mg/mL) e levamisol (0,25 mg/mL) foram utilizados como controles positivos para os testes de inibição da eclosão de ovos e motilidade larvar, respectivamente.

6.4.2.1 Teste de eclosão de ovos (TEO)

O ensaio de inibição da eclosão de ovos foi realizado conforme metodologia preconizada por Coles e colaboradores (1992). Para tanto, o volume da solução de ovos foi ajustado numa concentração média de 100 ovos/100µL e colocado em microplacas de 96 poços (100 ovos/100µL/poço) onde também foram adicionados 100µL dos tratamentos: os alcaloides nas diferentes concentrações, controles negativos (água destilada e DMSO 2,5%) e o controle positivo (albendazol). Os cultivos foram incubados em estufa B.O.D. a 27° C e umidade relativa 80% durante 48 horas. Após esse período, acrescentou-se lugol para interromper a reação. Em seguida, foi realizada a contagem de larvas eclodidas (L1) e ovos em cada poço. Para determinar o percentual de inibição da eclosão de ovos, utilizou-se a seguinte relação: número de ovos/ (número de ovos + número de L1) x 100. O teste foi realizado em três experimentos independentes com o mínimo de três replicatas.

6.4.2.2 Teste de motilidade larvar (TML)

O teste de motilidade larvar foi desenvolvido de acordo com Ferreira e colaboradores (2013), no qual utilizou-se a solução de larvas infectantes (L3) ajustada na concentração de 50 larvas/100µL, distribuída em microplacas de 24 poços e tratadas com os alcaloides nas

diferentes concentrações, controles negativos (água destilada e DMSO 2,5%), bem como o controle positivo (levamisol). As placas foram incubadas a 27°C em B.O.D. durante 24 horas. Após este período, foram contadas as larvas móveis e imóveis. O movimento das larvas foi estimulado antes da contagem por meio da agitação das placas e exposição a uma fonte de luz. Para determinar o percentual de inibição da motilidade larvar, utilizou-se a seguinte relação: número de larvas imóveis/ (número de larvas móveis + número de larvas imóveis) x 100. O teste foi realizado em três experimentos independentes com o mínimo de três replicatas.

6.4.3 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

6.4.3.1 Cultivos de células Vero

Foram utilizadas células da linhagem Vero (ATCC CCL81), provenientes de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) mantidas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% de soro fetal equino e antibióticos (100 UI/mL penicilina G, 100 mg/mL estreptomicina) a 37 °C em incubadora de CO₂. As células foram cultivadas em frascos de cultivo com 25 cm² contendo 5 mL de meio, que foi substituído três vezes por semana. A escolha dessa linhagem celular foi realizada em função da sua ampla utilização como modelo de triagem para testes de citotoxicidade de compostos isolados de plantas, fácil disponibilidade e utilização na avaliação de outros compostos associados a estudos anti-helmínticos em ruminantes (ADAMU, NAIDOO e ELOFF, 2013; SANTOS et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

6.4.3.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-defenitetrazólio (MTT) segundo Hansen, Nielsen e Berg (1989). É um método colorimétrico baseado no princípio da conversão do MTT (coloração amarela) em cristais de formazan de cor violácea por uma enzima mitocondrial (succinato desidrogenases) de células vivas. As concentrações dos alcaloides avaliados no teste de citotoxicidade foram determinadas a partir das maiores concentrações utilizadas nos testes anti-helmínticos.

As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços, obedecendo a concentração de 3,5 x 10⁴ células/poço. Em seguida, a placa incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, foi removido o meio de cultivo, e as células foram tratadas com os

alcaloides (100 µL) nas concentrações de 0,02; 0,04; 0,08; 0,17; 0,34; 0,67; 1,34 e 2,69 mM para a berberina, 0,075; 0,15; 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 e 4,8 mM para harmalina e 0,055; 0,11; 0,22; 0,44; 0,88; 1,76 e 3,5 mM para a piperina. DMSO 0,1% e meio RPMI foram utilizados como controles. Após 24 horas o meio de cultivo contendo os tratamentos foram removidos e adicionado aos poços 100 µL de solução de MTT em meio RPMI (1 mg/mL), seguido de incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por duas horas. Após esta incubação, foram adicionados 100 µL/poço de um tampão de lise, contendo 20% de SDS (duodecil sulfato de sódio) e 50% de DMF (dimetilformamida) (pH = 4,7), mantendo-se a placa a 37 °C por 12 horas consecutivas. A absorbância óptica foi medida utilizando leitor de placas de comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram apresentados como o percentual de viabilidade celular (média e desvio padrão) em relação ao controle, considerado como 100%.

6.4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando software GraphPadPrism® (versão 5.0 para Windows). A diferença entre grupos foi avaliada por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, considerando o nível de significância $\geq 95\%$ ($p < 0,05$). Os cálculos da CE₅₀ (ensaios parasitológicos) e CC₅₀ (teste de viabilidade celular) foram realizados através da análise de regressão não-linear.

6.5 RESULTADOS

6.5.1 Atividade ovicida

Os alcaloides berberina, harmalina e piperina inibiram significativamente ($p < 0,05$) a eclosão de ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos em relação ao controle negativo, e de forma concentração-dependente. Apenas a berberina (2,69 mM) e piperina (0,110 mM) mostraram eficácia ovicida com percentuais de inibição da eclosão de ovos superior a 90%, correspondendo respectivamente a 90,57 e 92,63%. A harmalina inibiu 80,30% a eclosão de ovos na maior concentração (4,8 mM), não diferindo ($p > 0,05$), no entanto, do controle positivo (albendazol). As médias dos percentuais de inibição variaram de 21,28 a 90,57% para berberina; 8,37 a 80,30% para harmalina; e 37,50 a 92,63% para piperina (Figura 1). A piperina foi o alcaloide que apresentou maior potencial ovicida (CE₅₀ = 0,0074 mM, $R^2 =$

0,96), seguido da berberina ($CE_{50} = 1,32 \text{ mM}$, $R^2 = 0,99$) e harmalina ($CE_{50} = 1,6 \text{ mM}$, $R^2 = 0,99$) (Tabela 1).

Figura 1 - Percentual de inibição da eclosão de ovos (média \pm desvio padrão) *in vitro* de nematoides gastrintestinais de caprinos tratados com alcaloides. (Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$).

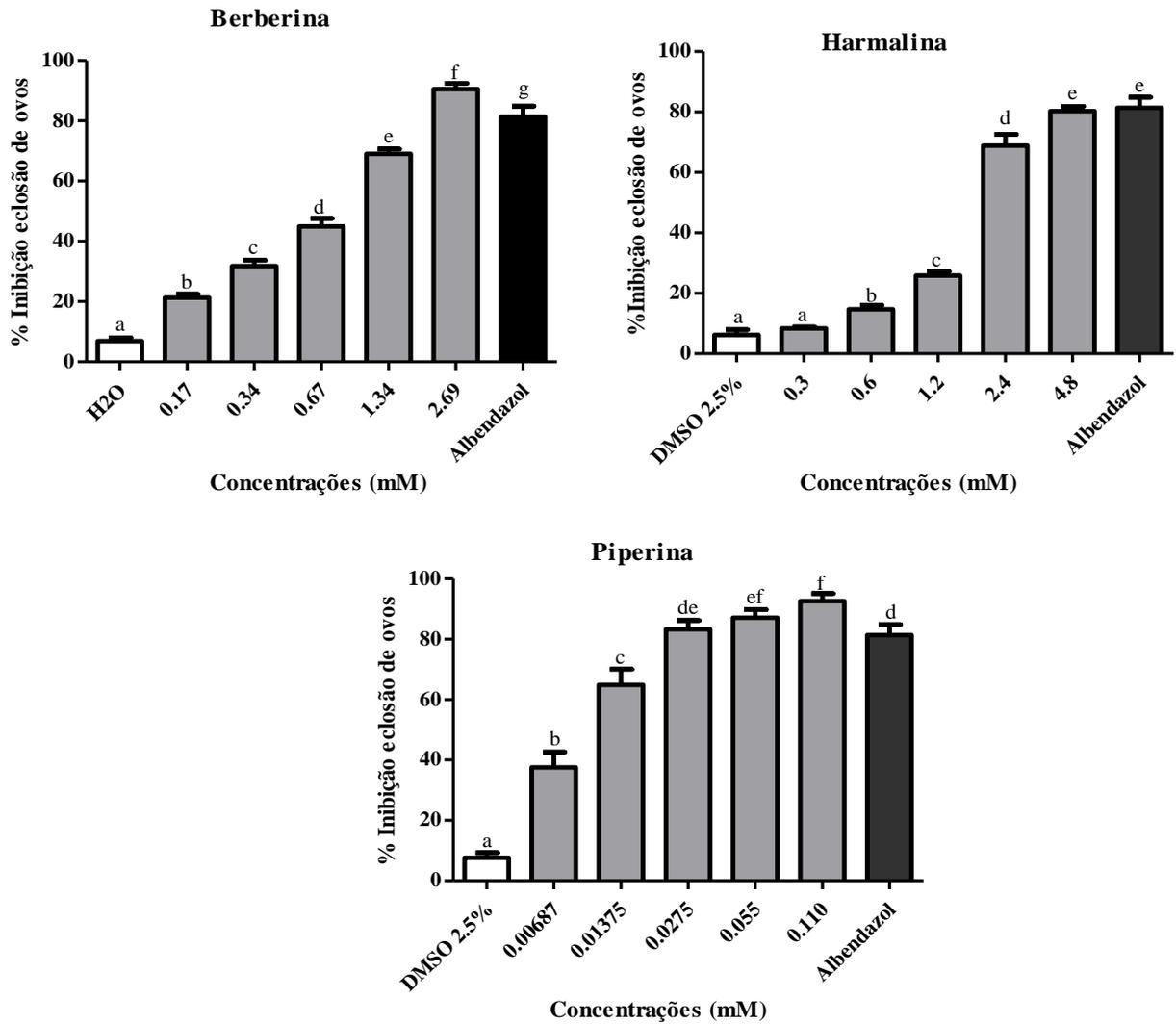


Tabela 1 – Valores da concentração efetiva 50% (CE₅₀) para inibir a eclosão de ovos ou motilidade de larvas, e para matar 50% (CC₅₀) de células Vero após o tratamento com alcaloides.

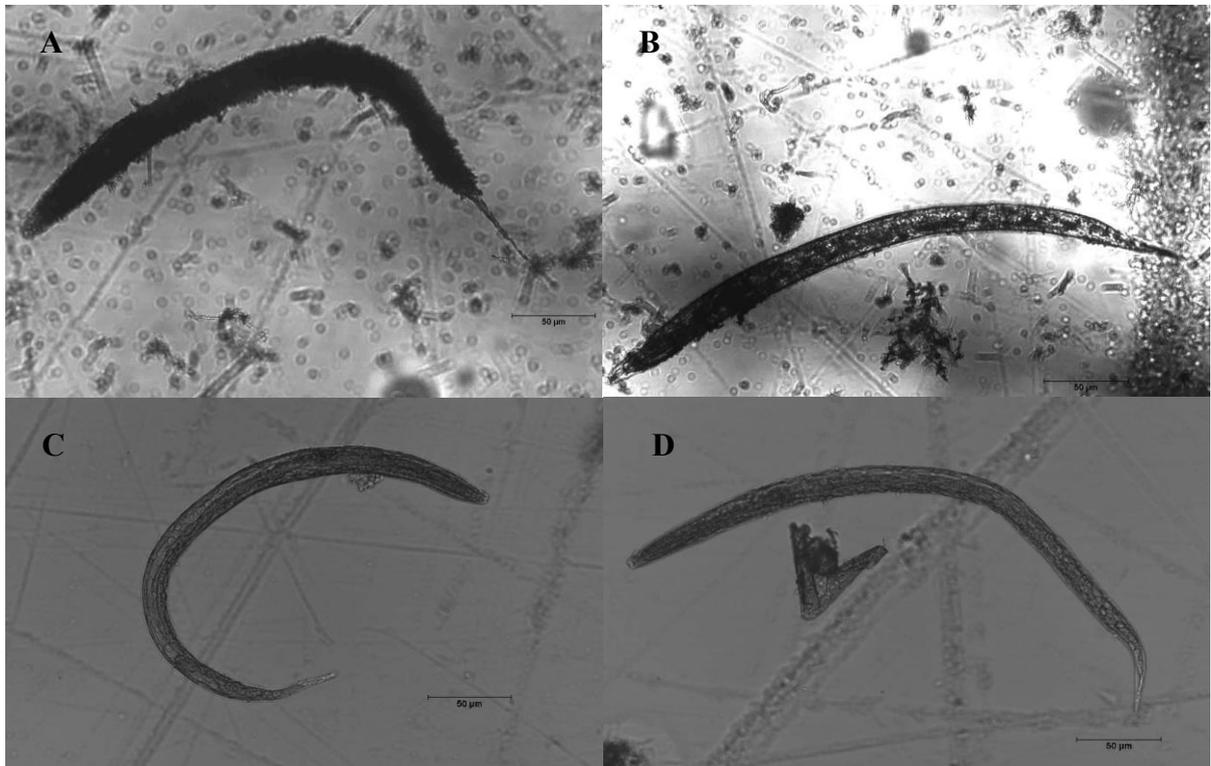
Composto	Teste <i>in vitro</i> ^b	CE ₅₀ /CC ₅₀ (mM)
Berberina	TEO	1.32
	TML	0.31
	TC	> 2.7
Harmalina	TEO	1.6
	TML	a
	TC	> 4.8
Piperina	TEO	0,0074
	TML	a
	TC	> 3.5

^a Não foi possível estimar devido à ausência e/ou reduzida atividade

^b TEO-Teste de eclosão de ovos; TML-Teste de motilidade de larvas; TC- Teste de citotoxicidade.

As larvas de primeiro estágio (L1), que eclodiram após o tratamento dos ovos com a berberina (2,69 mM) e piperina (0,110 mM) apresentaram alterações morfológicas como subdesenvolvimento (redução de comprimento e diâmetro) e deposição de agregados na superfície das larvas (Figura 2).

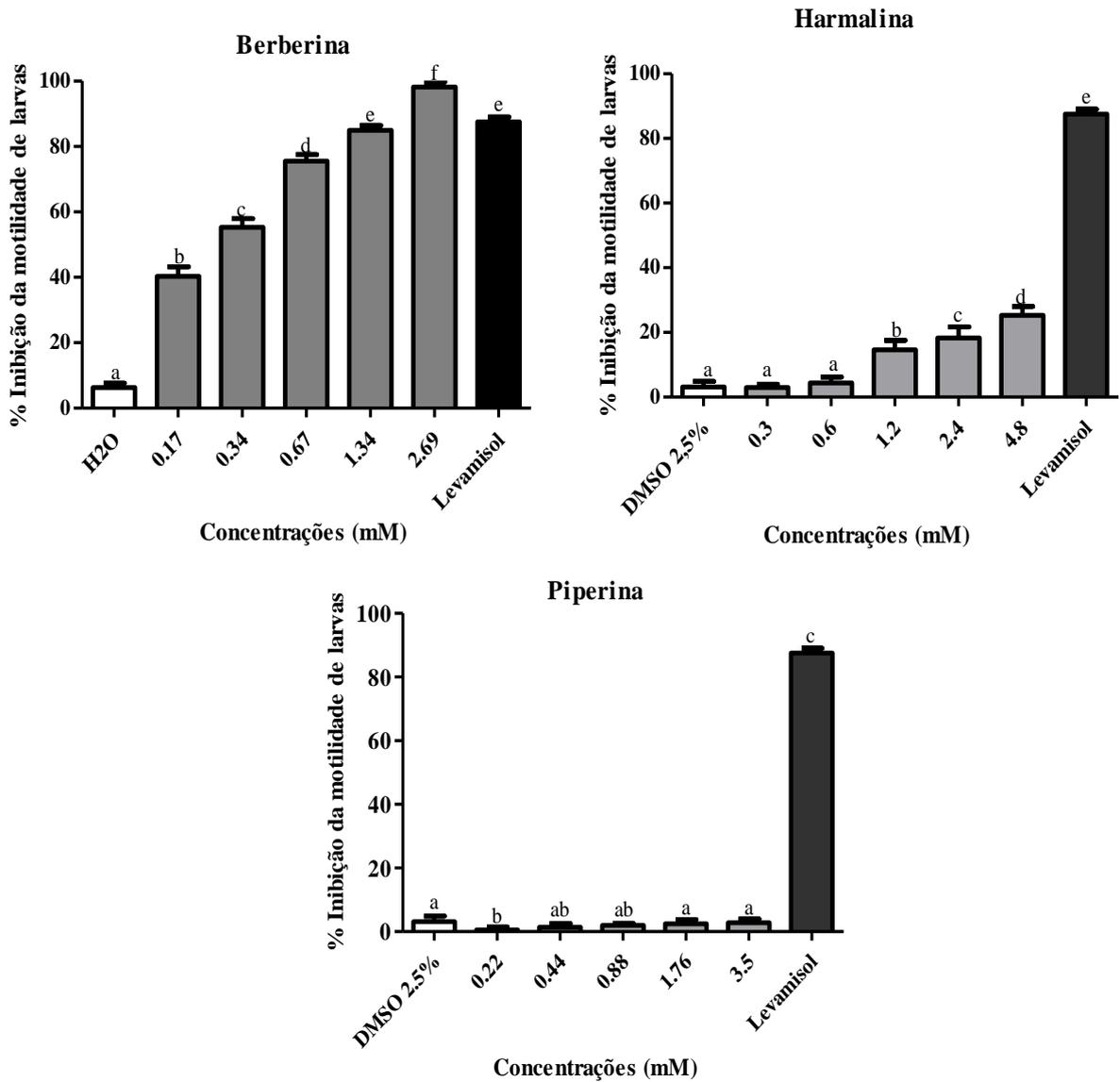
Figura 2 – Deposição de agregados na superfície de larvas de primeiro estágio (L1) expostas ao tratamento com berberina (A) e piperina (B). Controles: água destilada (C) e DMSO 2,5% (D).



6.5.2 Atividade larvicida

A berberina demonstrou atividade larvicida de forma concentração-dependente, diferindo significativamente ($p < 0,05$) do controle negativo em todas as concentrações testadas. Os percentuais de inibição da motilidade larvar variaram entre 40,26 a 98,17%. Para este alcaloide, o valor de CE_{50} correspondeu a 0,31 mM ($R^2 = 0,98$). O tratamento com a harmalina resultou em reduzida atividade larvicida, com percentuais de larvas imóveis variando de 2,69 a 25,29% nas concentrações testadas. Somente nas três maiores concentrações (1,2; 2,4 e 4,8 mM) a harmalina diferiu estatisticamente do controle negativo. O tratamento com a piperina não afetou (0,55 a 2,75%) a motilidade das larvas infectantes de nematoides gastrintestinais em nenhuma das concentrações testadas, não diferindo do controle negativo ($p > 0,05$) (Figura 3).

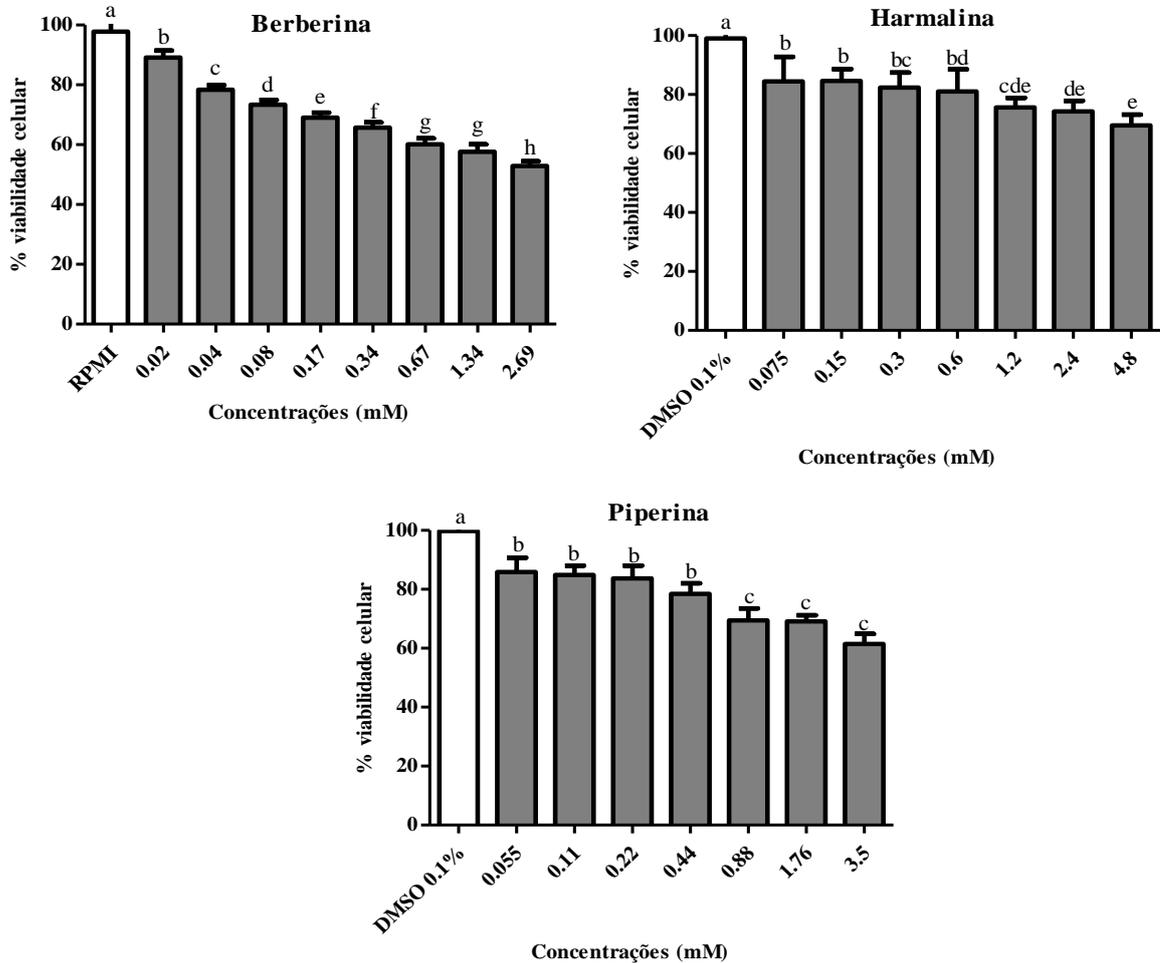
Figura 3 - Percentual de inibição (média \pm desvio padrão) da motilidade de larvas *in vitro* de terceiro estágio de nematoides gastrintestinais após o tratamento com alcaloides. (Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$).



6.5.3 Atividade citotóxica

Os alcaloides avaliados exibiram reduzida toxicidade para culturas de células Vero no ensaio de MTT após 24 horas do tratamento. Os percentuais de viabilidade celular variaram entre 53 e 89% para a berberina, 69 e 84% para a harmalina e 61 e 86% para a piperina, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos grupos controles RPMI (98%) e DMSO 0,1% (99%) (Figura 4). Os alcaloides apresentaram elevados valores de CC_{50} , sendo $> 2,7$ mM para a berberina, $> 4,8$ mM para a harmalina e $> 3,5$ mM para a piperina (Tabela 1).

Figura 4 - Percentual de viabilidade celular de células Vero (média \pm desvio padrão) após o tratamento com alcaloides. (Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$).



6.6 DISCUSSÃO

Os três alcaloides avaliados neste estudo, apresentaram atividade anti-helmíntica *in vitro* contra NGI de caprinos. Apenas berberina e piperina foram eficazes segundo as diretrizes internacionais de eficácia anti-helmíntica, a qual define que um produto anti-helmíntico é eficaz quando apresenta efetividade igual ou superior a 90% (VERCRUYSSSE et al., 2001).

A berberina foi eficaz contra diferentes estádios de desenvolvimento do parasito, com inibição de 90,57% da eclosão de ovos e 98,17% da motilidade de larvas infectantes de NGI. Este alcaloide tem sido bastante estudado quanto à suas variadas atividades biológicas como, antifúngica (SINGH et al., 2001), antiprotozoária (SOFFAR et al., 2001), antibacteriana

(DZIEDZIC, WOJTYCZKA e KUBINA, 2015) e antiviral (LUGANINI et al., 2019). Eficácia anti-helmíntica da berberina foi evidenciada por Satou e colaboradores (2002) contra larvas L3 de espécies do gênero *Strongyloides*. Neste estudo, a berberina interferiu na motilidade de larvas infectantes de *Strongyloides ratti* ($CE_{50} = 0,06$ mM) e *S. venezuelensis* ($CE_{50} = 0,032$ mM). A propriedade larvicida da berberina ($CE_{50} = 0,31$ mM) observada no presente estudo corrobora com os achados de Satou e colaboradores 2002. Estas variações entre os valores de CE_{50} encontrados neste estudo e os de Satou e colaboradores (2002), podem ser explicadas pela diferença entre gêneros e espécies de helmintos estudados. Este é o primeiro relato sobre a ação anti-helmíntica da berberina sobre ovos e larvas de NGI de caprinos.

A piperina (0,110 mM) apresentou elevada atividade ovicida (92,63%), mas não interferiu no estágio de larvas infectantes (L3). Efeitos antiparasitários deste alcaloide já foram descritos contra protozoários (FREIRE-DE-LIMA et al., 2008; VIEIRA-ARAÚJO et al., 2018), carrapatos (CHAGAS et al., 2012) e helmintos de vida livre (SUDHAKAR et al., 2013) porém, nenhum relato sobre sua ação contra NGI de caprinos foram descritos até o momento. A ação anti-helmíntica da piperina isolada dos frutos de *Piper nigrum* e descrita por Sudhakar e colaboradores (2013) foi observada sobre o estágio adulto de *Pheretima posthuma*, um helminto de vida livre presente no solo e bastante semelhante a helmintos parasitas intestinais de humanos. Estes autores observaram que a piperina (10 mg/mL) causou paralisia seguida por morte de *P. posthuma* sem diferir estatisticamente do albendazol. No presente estudo a piperina (3,5 mM = 1 mg/mL) não interferiu na motilidade das larvas de terceiro estágio de NGI de caprinos. Essa divergência de resultados pode ser atribuída a diferença entre as espécies de helmintos estudadas, além de diferenças morfológicas entre os estádios de desenvolvimento dos parasitas. Segundo Camurça-Vasconcelos e colaboradores (2005) larvas infectantes (L3) de NGI, ao contrário de outros estádios de desenvolvimento de NGI, apresentam dupla cutícula dificultando a penetração de compostos anti-helmínticos. Além disso, a cutícula de NGI é composta por colágeno (80%) e proteínas insolúveis que são sintetizadas e secretadas pela epiderme do parasito, podendo variar nos diferentes estádios larvais do nematoide (KINGSTON, 1991; HALTON, 2004). A diferença entre as concentrações da piperina utilizada no estudo de Sudhakar e colaboradores (2013) e no presente estudo, também podem ter influenciado sobre os resultados obtidos. Ao contrario desses autores, neste estudo foi utilizada uma concentração 10 vezes menor. A piperina é um composto de difícil solubilidade, o que dificultou o aumento da sua concentração utilizada neste estudo. Concentrações superiores a 2,5% do diluente utilizado (DMSO), interferiram na

viabilidade de ovos e larvas L3 de NGI, impedindo que concentrações acima de 1 mg/m fossem avaliadas.

A ausência de efeito da piperina sobre larvas infectantes, mesmo em concentrações superiores às aquelas empregadas na avaliação ovicida sugerem que o alcaloide possa estar atuando em componentes estruturais da membrana dos ovos de nematoides. O processo de eclosão dos ovos de nematoides pode ocorrer resultante de eventos enzimáticos (MANSFIELD, GAMBLE e FETTERER, 1992). De acordo com Young, Mancuso and Bowles (1999), a eclosão dos ovos é iniciada por uma sinalização do meio ambiente, que estimula o embrião a secretar enzimas responsáveis por degradar a membrana do ovo. É possível que a ação ovicida observada para a piperina esteja relacionada à inibição dessas enzimas, o que justificaria a ocorrência da atividade anti-helmíntica apenas na fase de ovo e não no estágio de larvas infectantes. Este é o primeiro relato sobre a ação anti-helmíntica da piperina sobre ovos de NGI de caprinos.

A harmalina na maior concentração utilizada (4,8 mM), apresentou moderada atividade ovicida (80,30%) e reduzida ação larvicida (25,29%). Embora a harmalina tenha apresentado atividade ovicida < 90%, esse é um importante resultado biológico, uma vez que a ação antiparasitária deste alcaloide tem sido pouco investigada, sendo descrita apenas contra protozoários (DI GIORGIO et al., 2004) e ácaros (SHANG et al., 2016) não havendo nenhuma referência sobre a sua ação anti-helmíntica. Alcaloides β -carbolina, grupo ao qual pertence a harmalina, vêm sendo investigados quanto a seus efeitos anti-helmínticos. Satou e colaboradores (2005) investigaram a ação anti-helmíntica *in vitro* de diferentes alcaloides β -carbolina extraídos de plantas contra larvas de segundo estágio de *Toxocara canis*. Estes autores observaram elevada, moderada, reduzida ou nenhuma ação nematocida para estes alcaloides, sugerindo que, esta ação está relacionada com os diferentes tipos de radicais ligados à estrutura química básica que caracteriza o grupo dos alcaloides β -carbolina. Verificaram também que, o composto que apresentava estrutura química mais semelhante à harmalina, não demonstrou efeito anti-helmíntico contra larvas L2 de *T. canis*, o que está de acordo com o reduzido efeito larvicida sobre NGI de caprinos observado para a harmalina no presente estudo.

Alterações morfológicas observadas em larvas L1 expostas ao tratamento com berberina e piperina, também foram relatadas por Martínez-Ortiz-de-Montellano e colaboradores (2013) ao identificarem alterações estruturais em parasitos adultos de *H. contortus* expostos a extratos de plantas contendo taninos. Segundo estes autores, a presença

de agregados ao redor do corpo do parasito pode afetar a nutrição, reprodução e motilidade dos mesmos.

As diferenças morfológicas e estruturais observadas entre os diferentes estádios larvares, como a presença de dupla cutícula nas larvas infectantes (L3) de NGI podem contribuir para o aumento do período de sua sobrevivência no ambiente (CAMURÇA-VASCONCELOS, et al., 2005; YOSHIARA, 2013). Essas variações estruturais entre os estádios larvares podem estar relacionadas a ocorrência das alterações encontradas apenas em larvas L1 expostas a piperina, mas não nas larvas infectantes (L3), nas quais nenhuma alteração foi evidenciada.

Os metabólitos secundários de plantas podem afetar os helmintos de várias maneiras a depender dos diferentes estágios de desenvolvimento do parasito. Estes compostos podem agir causando danos à cutícula, interferindo na motilidade e alimentação (inanição), e perturbando o crescimento e reprodução dos helmintos (SYMEONIDOU et al., 2018).

Alcaloides podem atuar no sistema nervoso dos helmintos causando paralisia. Segundo Zajícková e colaboradores (2020), alcaloides piperidínicos, como peletibina e arecolina são responsáveis pela inibição dos receptores de acetilcolina levando à paralisia do helminto. Os parasitos imóveis não conseguem permanecer aderidos à parede intestinal do hospedeiro, sendo removidos pelo peristaltismo, ou morrem por inanição (SYMEONIDOU et al., 2018).

Os controles positivos utilizados neste estudo, albendazol (81,38%) e levamisol (87,15%) apresentaram eficácia inferior a 90%, o que demonstra a presença de NGI resistentes na população de parasitos estudada a pelo menos duas classes diferentes de anti-helmínticos. Relatos frequentes de resistência parasitária à diversos anti-helmínticos convencionais vem sendo descritos (SINGH et al., 2017).

No intuito de avaliar a toxicidade dos alcaloides, foi utilizado o teste de citotoxicidade *in vitro* em células Vero. De acordo com a norma internacional ISO 10993-5 (2009), um composto é considerado tóxico no teste de MTT quando causa percentual de inviabilidade celular acima de 30%. Embora os resultados obtidos nesse estudo tenham evidenciado valores acima deste percentual, variando entre 31 a 47% e apenas nas maiores concentrações da berberina (0,17 - 2,69 mM), harmalina (4,8 mM) e piperina (0,88 - 3,5 mM), verificou-se que, nas concentrações testadas, estes alcaloides apresentaram reduzida toxicidade, com percentuais de inviabilidade celular menores que 50%, o que não permitiu a obtenção da concentração citotóxica 50% (CC₅₀) dos mesmos.

Um composto anti-helmíntico promissor deve apresentar reduzida toxicidade para o hospedeiro (SANTOS et al., 2017). No presente estudo, as mais elevadas concentrações utilizadas dos alcaloides berberina (2,69 mM), harmalina (4,8 mM) e piperina (3,5 mM) foram respectivamente 2, 3 e 473 vezes superiores aos valores de CE_{50} obtidos na avaliação anti-helmíntica, onde foram alcançados 1,32 mM (berberina), 1,6 mM (harmalina) e 0,0074 mM (piperina), sugerindo o perfil de segurança destes compostos nestas condições experimentais.

A toxicidade da berberina em células Vero utilizando o teste de MTT também foi descrita por Nchu e colaboradores (2011), revelando elevada toxicidade deste alcaloide ($CC_{50} = 9,80 \mu\text{g/mL} - 0,0242 \text{ mM}$). Nesse estudo, as células Vero foram expostas ao tratamento com a berberina por um período bem mais extenso (120 horas) que o período de 24 horas utilizado no presente estudo. O prolongado período de exposição das células à berberina empregado por estes autores pode ter contribuído para a elevação dessa toxicidade. Reduções na viabilidade de células Vero expostas a compostos de plantas em períodos superiores a 24 horas já foram verificadas por outros autores (SANTA ROSA et al., 2018).

6.7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os alcaloides berberina e piperina apresentam potencial anti-helmíntico *in vitro*, sobretudo a berberina por sua eficácia sobre ovos e larvas infectantes de NGI de caprinos. A harmalina apresenta moderada atividade ovicida sobre estes parasitos. Os alcaloides avaliados apresentam baixa citotoxicidade para células Vero no período de 24 horas.

6.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMU, M., NAIDOO, V., ELOFF, J.N. Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in ethnoveterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 01–08, 2013.
- ASAI, M.; IWATA, N.; YOSHIKAWA, A.; AIZAKI, Y.; ISHIURA, S.; SAIDO, T.C.; MARUYAMA, K. Berberine alters the processing of Alzheimer’s amyloid precursor protein to decrease A β secretion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, n. 2, p. 498–502, 2007.
- BORGES, S. L.; OLIVEIRA, A.O.; MENDONÇA, L.R.; LAMBERT, S.M.; VIANA, J.M.; NISHI, S.M.; JULIÃO, F.S.; ALMEIDA, M.A.O. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos nos biomas Caatinga e Mata Atlântica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 643–648, 2015.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MORAIS, S.M.; SANTOS, L.F.L.; ROCHA, M.F.G.; BEVILAQUA, C.M.L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.7, n.3, p. 97-106, 2005.
- CHAGAS, A.C.S.; BARROS, L.D.; COTINGUIBA, L.; 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**, v. 110, n. 1, p. 295–303, 2012.
- COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.H.M.; GEERTS, S.; KLEI, T.R.; TAYLOR, M.A.; WALLER, P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary parasitology**, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, 1992.
- DEY, P.; KUNDU, A.; KUMAR, A.; GUPTA, M.; LEE, B.M.; BHAKTA, T.; DASH, S.; KIM, H.S. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). Capítulo 15 In: **Recent Advances in Natural Products Analysis**, p. 505-567, 2020.
- DI GIORGIO, C.; DELMAS, F.; OLLIVIER, E.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; TIMON-DAVID, P. *In vitro* activity of the b -carboline alkaloids harmine , harmine , and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 106, p. 67–74, 2004.
- DZIEDZIC, A.; WOJTYCZKA, R.D.; KUBINA, R. Inhibition of Oral Streptococci Growth Induced by the Complementary Action of Berberine Chloride and Antibacterial Compounds. **Molecules**, v. 20, p. 13705–13724, 2015.
- FERREIRA, L.E.; CASTRO, P.M.N.; CHAGAS, A.C.S.; FRANÇA, S.C.; BELEBONI, R.O. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental Parasitology**, v.134, p.327-332, 2013.

FREIRE-DE-LIMA, L.; RIBEIRO, T.S.; ROCHA, G.M.; BRANDÃO, B.A.; ROMEIRO, A.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J.O.; LIMA, M.E.F.; CARVALHO, T.M.U.; HEISE, N. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 1059–1067, 2008.

HALTON, D.W. Microscopy and the helminth parasite. **Micron**, v. 35, p. 361–390, 2004.

HANSEN, M.B., NIELSEN, S.E., BERG, K. Re-examination and further Top of the development needs and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, p. 203–210, 1989.

HERRAIZ, T.; GONZÁLEZ, D.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; ARÁN, V.J.; GUILLÉN, H. β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 839–845, 2010.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **The veterinary record**, v. 130, n. 20, p. 442–446, 1992.

International standard, ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices -part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity, 2009.

KANETO, C.N.; CARDIA, D.F.F.; GOMES, J.F.; MATOS, L.V.S.; PIERUCCI, J.C.; BRESCIANI, K.D.S. Anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal nematodes in the Northwest region São Paulo state. **Acta Veterinária Brasília**, v. 10, n. 3, p. 229-232, 2016.

KINGSTON, I.B. Nematode Collagen Genes. **Parasitology Today**, v. 7, n. 1, p. 11-15, 1991.

LUGANINI, A.; MERCORELLI, B.; MESSA, L.; PALÙ, G.; GRIBAUDO, G.; LOREGIAN, A. The isoquinoline alkaloid berberine inhibits human cytomegalovirus replication by interfering with the viral Immediate Early-2 (IE2) protein transactivating activity . **Antiviral Research**, v. 164, n. October 2018, p. 52–60, 2019.

MANSFIELD, L.S.; GAMBLE, H.R.; FETTERER, R.H. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus* - I. Structural components. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 103B, n. 3, p. 681-686, 1992.

MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO, C.; ARROYO-LÓPEZ, C.; FOURQUAUX, I.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; HOSTE, H. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. **Experimental Parasitology**, v. 133, n.3, p. 281-286, 2013.

NCHU, F.; GITHIORI, J.B.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N. Anthelmintic and cytotoxic activities of extracts of *Markhamia obtusifolia Sprague* (Bignoniaceae). **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 184–188, 2011.

NENAAH, G. Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 779-782, 2010.

NENAAH, G. Toxicity and growth inhibitory activities of methanol extract and the b-carboline alkaloids of *Peganum harmala* L. against two coleopteran stored-grain pests. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n. 3, p. 255–261, 2011.

SAMUEL, M.; CAVALLUZZI, M.M.; BRUNO, C.; LOVECE, A.; CAROCCI, A.; FRANCHINI, C.; HABTEMARIAM, S.; LENTINI, G. The larvicidal effects of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine against insecticide resistant and susceptible strains of *Anopheles malaria* vector mosquitoes. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2016.

SANTA ROSA, S.S.; SANTOS, F.O.; LIMA, H.G.; REIS, I.M.A.; CASSIANO, D.S.A.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; UZEDA, R.S.; BOTURA, M.B.; BRANCO, A.; BATATINHA, M.J.M. *In vitro* anthelmintic and cytotoxic activities of extracts of *Persea willdenovii* Kosterm (Lauraceae). **Journal of Helminthology**, v. 92, p.674-680, 2018.

SANTOS, A.C.V.; SANTOS, F.O.; LIMA, H.G.; SILVA, G.D.; UZÊDA, R.S.; DIAS, E.R.; BRANCO, A.; CARDOSO, K.V.; DAVID, J.M.; BOTURA, M.B.; COSTA, S.L.; BATATINHA, M.J.M. *In vitro* ovicidal and larvicidal activities of some saponins and flavonoids against parasitic nematodes of goats. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 1884–1889, 2018.

SANTOS, F.O.; LIMA, H.G.; SANTOS, N.S.S.; SERRA, T.M.; UZÊDA, R.S.; REIS, I.M.A.; BOTURA, M.B.; BRANCO, A.; BATATINHA, M.J.M. *In vitro* anthelmintic and cytotoxicity activities the *Digitaria insularis* (Poaceae). **Veterinary Parasitology**, v. 245, p. 48–54, 2017.

SANTOS, F.O.; CERQUEIRA, A.P.M.; BRANCO, A.; BATATINHA, M.J.M.; BOTURA, M.B. Anthelmintic activity of plants against gastrointestinal nematodes of goats: a review. **Parasitology**, v. 146, n. 10, p. 1233-1246, 2019.

SATOU, T.; HORIUCHI, A.; AKAO, N.; KOIKE, K.; FUJITA, K.; NIKAIDO, T. *Toxocara canis*: Search for a potential drug amongst b-carboline alkaloids - *in vitro* and mouse studies. **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 134–139, 2005.

SATOU, T.; KOGA, M.; MATSUHASHI, R.; KOIKE, K.; TADA, I.; NIKAIDO, T. Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 104, p.131–138, 2002.

SEMLER, U.; GROSS, G.G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1566–1567, 1988.

SHANG, X.; GUO, X.; LI, B.; PAN, H.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; MIAO, X. Microwave-assisted extraction of three bioactive alkaloids from *Peganum harmala* L. and their acaricidal activity against *Psoroptes cuniculi in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 350–361, 2016.

SINGH, B.; SRIVASTAVA, J.S.; KHOSA, R.L.; SINGH, U.P. Individual and Combined Effects of Berberine and Santonin on Spore Germination of Some Fungi. **Folia Microbiologica**, v. 46, n. 2, p. 137–142, 2001.

SINGH, R.; BAL, M.S.; SINGLA, L.D.; KAUR, P. Detection of anthelmintic resistance in sheep and goat against fenbendazole by faecal egg count reduction test. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 2, p. 463-466, 2017.

SOFFAR, S.A.; METWAIL, D.M.; ABDEL-AZIZ, S.S.; EL-WAKIL, H.S.; SAAD, G.A. Evaluation of the effect of a plant alkaloid (berberine derived from *Berberis aristata*) on *Trichomonas vaginalis* *in vitro*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 31, n. 3, p. 893-904, 2001.

SUDHAKAR, S.; CHAND BASHA, S.; SAMPATH KUMAR, K.; HAJIVALLI, S.; SINGOTAM, M.; ANIL KUMAR, B. Anthelmintic Activity of Piperine from Black Pepper. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1013-1017, 2013.

SYMEONIDOU, I.; BONOS, E.; MOUSTAKIDIS, K.; FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKI, E.; PAPAZHARIADOU, M. Botanicals: a natural approach to control ascaridiosis in poultry. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 69, n. 1, p.711-722, 2018.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. In: Ueno, H., Gonçalves, P.C. (Eds.), Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes, fourth ed. JICA, Tokyo, Japan International Cooperation Agency (p. 150), 1998.

VAN HOUTERT, M. F. J.; SYKES, A. R. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 11, p. 1151–1167, 1996.

VERCRUYSSSE, J.; HOLDSWORTH, P.; LETONJA, T.; BARTH, D.; CONDER, G.; HAMAMOTO, K.; OKANO, K. Anthelmintic efficacy of international harmonisation guidelines. **Veterinary Parasitology**, v, 96, p. 171–193, 2001.

VIEIRA-ARAÚJO, F.M.; RONDON, F.C.M.; VIEIRA, I.G.P.; MENDES, F.N.P.; FREITAS, J.C.C.; MORAIS, S.M. Experimental Parasitology Sinergism between alkaloids piperine and capsaicin with meglumine antimoniate against *Leishmania infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 188, p. 79–82, 2018.

YOSHIHARA, E.; MINHO, A.P.; YAMAMURA, M.H. Efeito anti-helmíntico de taninos condensados em nematódeos gastrintestinais de ovinos (*Ovis aries*). Semina: **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, 2013.

YOUNG, A.R; MANCUSO, N; BOWLES, V.M. Biochemical aspects of egg hatch in endo and ectoparasites: potential for regional drug desing. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.861-867, 1999.

ZAJAC, A.M.; GARZA, J. Biology, Epidemiology, and Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 36, p. 73-87, 2020.

ZAJÍCKOVÁZ, M.; NGUYENZ, L.T.; SKÁLOVÁ, L.; STUHLÍKOVÁ, L.R.; MATOUŠKOVÁ, P. Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 2, p. 430-437, 2020.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os alcaloides avaliados neste estudo apresentam atividade carrapaticida e anti-helmíntica *in vitro*. Em especial a berberina, cuja eficácia antiparasitária foi verificada para todos os parasitos e fases evolutivas investigadas no presente estudo. Além disso, estudos *in vitro* e *in silico* sugerem que a inibição da enzima acetilcolinesterase seja o mecanismo de ação carrapaticida deste alcaloide.

A piperina foi o alcaloide mais ativo contra larvas de *R. microplus* e ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos apresentando os menores valores de CE₅₀.

O alcaloide menos ativo foi a harmalina com reduzida ação larvicida contra *R. microplus* e moderada ação anti-helmíntica contra ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos.

No presente estudo, os alcaloides avaliados podem ser considerados seguros nas condições experimentais utilizadas, pois apresentaram reduzido efeito citotóxico para células de mamíferos (Vero).

Estes resultados poderão contribuir com as pesquisas para o desenvolvimento de novos produtos antiparasitários eficazes e seguros.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIOLA, F.A.; KARIMOU, M.; HOUETO, P. Étude de l'activité cholinestérasique chez les tiques du bétail et son inhibition *in vitro* par des acaricides organophosphorés. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 142, n. 2, p. 147-152, 1991.
- ADAMU, M., NAIDOO, V., ELOFF, J.N. Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in ethnoveterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 01–08, 2013.
- ADENUBI, O.T.; AHMED, A.S.; FASINA, F.O.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N.; NAIDOO, V. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis. **Industrial Crops & Products**, v. 123, p. 779-806, 2018.
- AHID, S.M.M.; CAVALCANTE, M.D.A.; BEZERRA, A.C.D.S.; SOARES, H.S.; PEREIRA, R.H.M.A. Eficácia anti-helmíntica em rebanho caprino no Estado de Alagoas, Brasil. **Acta Veterinária Brasílica**, v.1, n.2, p. 56-59, 2007.
- AISSA, A.; MANOLARAKI, F.; BEN SALEM, H.; HOSTE, H.; KRAIEM, K. *In vitro* assessment of the anthelmintic activity of *Hedysarum carnosum* Desf. at different phenological stages and from six locations in Tunisia. **Parasitology**, v. 143, n. 06, p. 778 - 786, 2016.
- AL-BAGHDADI, O.B; PRATER, N.I.; VAN DER SCHYF, C.J.; GELDENHUYS, W.J. Inhibition of monoamine oxidase by derivatives of piperine, an alkaloid from the pepper plant *Piper nigrum*, for possible use in Parkinson's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 23, p. 7183–7188, 2012.
- ALBERTI, E.G.; ZANZANI, S.A.; GAZZONIS, A.L.; ZANATTA, G.; BRUNI, G.; VILLA, M.; RIZZI, R.; MANFREDI, M.T. Effects of gastrointestinal infections caused by nematodes on milk production in goats in a mountain ecosystem: Comparison between a cosmopolite and a local breed. **Small Ruminant Research**, v. 120, n. 1, p. 155–163, 2014.
- ALON, U. An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits ([Nachdr.] ed.). 2007. Boca Raton, FL: Chapman & Hall. ISBN 978-1-58488-642-6.
- ANDOLA, H.; RAWAL, R.S.; RAWAT, M.S.M.; BHATT, I.D.; PUROHIT, V.K. Analysis of Berberine Content using HPTLC Fingerprinting of Root and Bark of Three Himalayan Berberis Species. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 239–245, 2010.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. - Brasília, DF: Embrapa, 2019. 240p.
- ANGUS, B.M. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 12, p. 1341-1355, 1996.
- ANISZEWSKI, T. **Alkaloids - Secrets of Life. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role**. 1ª edição, Elsevier, 2007. 335pgs.

ARCARO, C.A.; GUTIERRES, V.O.; ASSIS, R.P.; MOREIRA, T.F.; COSTA, P.I.; BAVIERA, A.M.; BRUNETTI, I.L. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. **Plos One**, v.9, n.12, p. 1-21, 2014.

ASAI, M.; IWATA, N.; YOSHIKAWA, A.; AIZAKI, Y.; ISHIURA, S.; SAIDO, T.C.; MARUYAMA, K. Berberine alters the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein to decrease A β secretion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, n. 2, p. 498–502, 2007.

AZAB, S.S.; EL-SABBAGH, W.A.; ABDEL-DAIM, M.M.; RASHED, E.R. Beneficial effects of piperine in global cerebral ischemia/reperfusion model in irradiated rats. **Egyptian Journal of Radiation Sciences and Applications**, v.30, n.1 p.161-170, 2018.

BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER, W.H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science** v. 228, 1154–1159, 1985.

BALKRISHNA, A.; POKHREL, S.; TOMER, M.; VERMA, S.; KUMAR, A.; NAIN, P.; ABHISHEK GUPTA, A.; VARSHNEY, A. Anti-acetylcholinesterase activities of mono-herbal extracts and exhibited synergistic effects of the phytoconstituents: A biochemical and computational study. **Molecules**, v. 24, p. 4175, 2019.

BANDYOPADHYAY, S.; PATRA, P.H.; MAHANTI, A.; MONDAL, D.K.; DANDAPAT, P.; BANDYOPADHYAY, S.; SAMANTA, I.; LODH, C.; BERA, A.K.; BHATTACHARYYA, D.; SARKAR, M.; BARUAH, K.K. Potential antibacterial activity of berberine against multi drug resistant enterovirulent *Escherichia coli* isolated from yaks (*Poephagus grunniens*) with haemorrhagic diarrhoea. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 4, p. 315–319, 2013.

BANJI, D.; BANJI, O.J.F.; DASAROJU, S.; CH, K.K. Curcumin and piperine abrogate lipid and protein oxidation induced by D-galactose in rat brain. **Brain Research**, v.15, n.15, p. 1-11, 2013.

BANUMATHI, B.; VASEEHARAN, B.; PERIYANNAN, R.; PRABHU, N.M.; RAMASAMY, P.; MURUGAN, K.; CANALE, A.; BENELLI, G. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – A review. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 102–110, 2017.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, VOX/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223pgs.

BARZEGAR, E.; FOULADDEL, S.; MOVAHHED, T.K.; ATASHPOUR, S.; GHAREMANI, M.H.; OSTAD, S.N.; AZIZI, E. Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 334–342, 2015.

BASHIR, S.; GILANI, A.H. Antiuro lithic effect of berberine is mediated through multiple pathways. **European Journal of Pharmacology**, v. 651, p. 168–175, 2011.

BATISTA, P.R., ROBERT, C.H., MARECHAL, J.D., HAMIDA-REBAI, M.B., PASCUTTI, P.G., BISCH, P.M., PERAHIA, D. Consensus modes, a robust description of protein collective motions from multiple-minima normal mode analysis-application to the HIV-1 protease. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 2850-2859, 2010.

BAXTER, G. D.; BARKER, S. C. Comparison of acetylcholinesterase genes from cattle ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 11, p. 1765–1774, 1999.

BENAROUS, K.; BOMBARDA, I.; IRIEPA, I.; MORALEDA, I.; GAETAN, H.; LINANI, A.; TAHRI, D.; SEBAA, M.; YOUSFI, M. Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase : *In silico* and *in vitro* studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 62, p. 1–7, 2015.

BENELLI, G.; MAGGI, F.; PAVELA, R.; MURUGAN, K.; GOVINDARAJAN, M.; VASEEHARAN, B.; PETRELLI, R.; CAPPELLACCI, L.; KUMAR, S.; HOFER, A.; YOUSSEFI, M.R.; ALARFAJ, A.; HWANG, J.S.; HIGUCHI, A. Mosquito control with green nanopesticides: towards the One Health approach? A review of non-target effects. **Environmental Science and Pollution Research**, 2017. 24p.

BENSALEM, S. SOUBHYE, J.; ALDIB, I.; BOURNINE, L.; NGUYEN, A.T.; VANHAEVERBEEK, M.; ROUSSEAU, A.; BOUDJELTIA, K.Z.; SARAKBI, A.; KAUFFMANN, J.M.; NÈVE, J.; PRÉVOST, M.; STÉVIGNY, C.; MAIZA-BENABDESSELAM, F.; BEDJOU, F.; ANTWERPEN, P.V.; DUEZ, P. Inhibition of myeloperoxidase activity by the alkaloids of *Peganum harmala* L . (Zygophyllaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 361–369, 2014.

BERENDSEN, H. J. C., GRIGERA, J. R., STRAATSMA, T. P. The missing term in effective pair potentials. **Journal of Physical Chemistry**, v. 91, p. 6269–6271, 1987.

BERENDSEN, H.J.C., POSTMA, J.P.M., VANGUNSTEREN, W.F., DINOLA, A., HAAK, J.R. Molecular-dynamics with coupling to an external bath. **Journal of Physical Chemistry**, v. 81, p.3684-3690, 1984.

BERK, H., HENK, B., HERMAN, J.C.B., JOHANNES, G.E.M.F. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, p. 1463-1472, 1997.

BHUTADA, P. MUNDHADA, Y.; BANSOD, K.; DIXIT, P.; UMATHE, S.; MUNDHADA, D. Epilepsy & Behavior Anticonvulsant activity of berberine, an isoquinoline alkaloid in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 18, n. 3, p. 207–210, 2010.

BI, Y.; QU, P.C.; WANG, Q.S.; ZHENG, L.; LIU, H.L.; LUO, R.; CHEN, X.Q.; BA, Y.Y.; WU, Y.; YANG, H. Neuroprotective effects of alkaloids from *Piper longum* in a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 10, p. 1516–1524, 2015.

BOLL, P.M.; PARMAR, V.S.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.; JESPER WENGEL, J.; OLSENG, A.E. Some recent isolation studies from potential insecticidal *Piper* species. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n.10/11, p. 2339-2342, 1994.

BORGES, S. L.; OLIVEIRA, A.O.; MENDONÇA, L.R.; LAMBERT, S.M.; VIANA, J.M.; NISHI, S.M.; JULIÃO, F.S.; ALMEIDA, M.A.O. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos nos biomas Caatinga e Mata Atlântica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 643–648, 2015.

BOTURA, M. B.; SANTOS, J.D.G.; SILVA, G.D.; LIMA, H.G.; OLIVEIRA, J.V.A.; ALMEIDA, M.A.O.; MARIA JOSÉ M. BATATINHA, M.J.M.; ALEXSANDRO BRANCO, A. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1–3, p. 211–217, 2013.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839–851, 2001.

BOURNINE, L. BENSALÉM, S.; FATMI, S.; BEDJOU, F.; MATHIEU, V.; IGUER-OUADA, M.; KISS, R.; DUEZ, P. Evaluation of the cytotoxic and cytostatic activities of alkaloid extracts from different parts of *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae). **European Journal of Integrative Medicine**, v. 9, p. 91–96, 2017.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Normas para registros de parasiticidas de uso pecuário no Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura, 19p. 1997.

BRITO, L.B.; BARBIERI, F.S.; FUNES-HUACCA, M.E.; NÉRY, L.O.; SILVA, R.R.; SANTOS, A.P.L.; GONÇALVES, A.E.; RABELO, M.D.; OLIVEIRA, M.C.S. Identificação de alvos moleculares para o diagnóstico quantitativo da resistência a pesticidas organofosforados em populações do carrapato-dos-bovinos. Brasília, DF: **Embrapa Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2015. 20p.

BRUSQ, J.M.; ANCELLIN, N.; GRONDIN, P.; GUILLARD, R.; MARTIN, S.; SAINTILLAN, Y.; ISSANDOU, M. Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase : an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine. **Journal of Lipid Research**, v. 47, p. 1281–1288, 2006.

BUSSI, G., DONADIO, D., PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, p. 014101, 2007.

CACERES, I.; KHOURY, R.E.; BAILLY, S.; OSWALD, I.P.; PUEL, O.; BAILLY, J.D. Piperine inhibits aflatoxin B1 production in *Aspergillus flavus* by modulating fungal oxidative stress response. **Fungal Genetics and Biology**, v.107, p. 77–85, 2017.

CAMILLO, G.; VOGEL, F.F.; SANGIONI, L.A.; CADORE, G.C.; FERRARI, R. Eficiência *in vitro* de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 490-495, 2009.

CAMPOS JUNIOR, D.L.; OLIVEIRA, P.R. Avaliação *in vitro* da eficácia de carrapaticidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrine, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1386-1392, 2005.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MORAIS, S.M.; SANTOS, L.F.L.; ROCHA, M.F.G.; BEVILAQUA, C.M.L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p. 97-106, 2005.

CANTACESSI, C.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. Key strongylid nematodes of animals - Impact of next-generation transcriptomics on systems biology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 469–488, 2012.

CARDOSO, A.S.; SANTOS, E.G.G.; LIMA, A.S.; TEMEYER, K.B.; LEÓN, A.A.P.; COSTA JUNIOR, L.M.; SOARES, A.M.S. Terpenes on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. **Veterinary parasitology**, v. 280, 109090, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109090>

CARDOSO, J.F.R.; WARDINI, A.B.; EVANGELISTA, D.W.; VIANA, E.B.; DE LIMA, M.E.F.; SOARES, B.A.; BARRETO JUNIOR, C.B.; BRITO, M.F.; CARLOS MAZUR, C.; DANELLI, M.G.M. Avaliação do Efeito tóxico da piperina isolada da pimenta do reino (*Piper nigrum* L) em camundongos **Revista Universitária Rural, Série Ciências da Vida**, v. 25, n. 1, p.85-91, 2005.

CARDOSO, V.S.; LIMA, C.A.R.; LIMA, M.E.F.; DORNELES, L.E.G.; FILHO, W.L.T.; LISBOA, R.S.; JUNIOR, D.S.G.; DIREITO, G.M.; DANELLI, M.G.M. Administração oral de piperina em frangos de corte. **Ciencia Rural**, v. 39, n. 5, p. 1521–1526, 2009.

CASTILHO, C.V.V., FANTATTO, R.R., GAÍNZA, Y.A., BIZZO, H.R., BARBI, N.S., LEITÃO, S.G., CHAGAS, A.C.S. *In vitro* activity of the essential oil from *Hesperozygis myrtooides* on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 70–76, 2017.

CASTRO-JANER, E.; KLAFKE, G.M.; CAPURRO, M.L.; SCHUMAKER, T.T.S. Cross-resistance between fipronil and lindane in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 210, p. 77-83, 2015.

CAVALCANTE, C.R.C.; VIEIRA, L.S.; CHAGAS, A.C.S.; MOLENTO, M. B. **Doenças parasitárias de ovinos e caprinos: epidemiologia e controle**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 603p.

CHAGAS, A.C.S.; BARROS, L.D.; COTINGUIBA, L.; 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**, v. 110, n. 1, p. 295–303, 2012.

CHAGAS, A.C.S.; OLIVEIRA, M.C.S.; GIGLIOTI, R.; SANTANA, R.C.M.; BIZZO, H.R.; GAMA, P.E.; CHAVES, F.C.M. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 427-432, 2016.

CHANDIRASEGARAN, G.; ELANCHEZHIAN, C.; GHOSH, K.; SETHUPATHY, S. Berberine chloride ameliorates oxidative stress , in fl ammation and apoptosis in the pancreas of Streptozotocin induced diabetic rats. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 95, p. 175–185, 2017.

CHEN, C.Y.; LI, W.; QU, K.P.; CHEN, C.R. Piperine exerts anti-seizure effects via the TRPV1 receptor in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.714, p. 288–294, 2013.

CHENG, Z. PANG, T.; GU, M.; GAO, A.H.; XIE, C.M.; LI, J.Y.; NAN, F.J.; LI, J. Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 1682–1689, 2006.

CHEUG, J., RUDOLPH, M.J., BURSHTEYN, F., CASSIDY, M.S., GARY, E.N., LOVE, J., FRANKLIN, M.C., HEIGHT, J.J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 10282–10286, 2012.

CHIN, L.W. CHENG, Y.W.; LIN, S.S.; LAI, Y.Y.; LIN, L.Y.; CHOU, M.Y.; CHOU, M.C.; YANG, C.C. Anti-herpes simplex virus effects of berberine from *Coptidis rhizoma*, a major component of a Chinese herbal medicine, Ching-Wei-San. **Archives of Virology**, v. 155, p. 1933–1941, 2010.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 798–802, 2010.

CHOUHAN, G.; ISLAMUDDIN, M.; WANT, M.Y.; OZBAK, H.A.; HEMEG, H.A.; SAHAL, D.; AFRIN, F. Leishmanicidal activity of *Piper nigrum* bioactive fractions is interceded via apoptosis *in vitro* and substantiated by Th1 immunostimulatory potential *in vivo*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1–19, 2015.

CHU, M.; DING, R.; CHU, Z.Y.; ZHANG, M.B.; LIU, X.Y.; XIE, S.H.; ZHAI, Y.J.; WANG, Y.D. Role of berberine in anti-bacterial as a high-affinity LPS antagonist binding to TLR4 / MD-2 receptor. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 89, p. 1–9, 2014.

ÇIRAK, C.; RADUSIENE, J.; JANULIS, V.; IVANAUSKAS, L. Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: Variation among plant parts and phenological stages. **Botanica Helvetica**, v. 117, n. 1, p. 29–36, 2007.

COELHO, W.A.C.; AHID, S.M.M.; VIEIRA, L.S.; FONSECA, Z.A.A.S.; SILVA, I.P. Resistência anti-helmíntica em caprinos no Município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira, Goiânia**, v.11, n.3, p. 589-599, 2010.

COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.H.M.; GEERTS, S.; KLEI, T.R.; TAYLOR, M.A.; WALLER, P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary parasitology**, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, 1992.

COLOVIC, M.B.; KRSTIC, D.Z.; LAZAREVIC-PASTIC, T.D.; BONDZIC, A.M.; VASIC, V.M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v.11, p.315-335, 2013.

CONCEIÇÃO, R.S.; CARNEIRO, M.M.A.A.; REIS, I.M.A.R.; BRANCO, A.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; BOTURA, M.B. *In vitro* acaricide activity of *Ocotea aciphylla*

(Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fraction. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, p. 275–282, 2017.

CONCEIÇÃO, R.S.; REIS, I.M.A.; CERQUEIRA, A.P.M.; PEREZ, C.J.; SANTOS JUNIOR, M.C.; BRANCO, A.; IFA, D.R.; BOTURA, M.B. Rapid structural characterisation of benzyloquinoline and aporphine alkaloids from *Ocotea spixiana* acaricide extract by HPTLC-DESI-MSⁿ. **Wiley**, 2020. DOI: [10.1002/pca.2935](https://doi.org/10.1002/pca.2935)

CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.500-506, 2011.

COSTA, V.M.M.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1, p. 65-71, 2011.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L.O.; BOLZANI, V.S.; DEBONSI, H.M.; PASSERINI, G.D.; CICALI, R.M.B.; KATO, M.J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, p. 703-711, 2009.

CRAMPTON, A. L.; BAXTER, G. D.; BARKER, S. C. A new family of cytochrome P450 genes (CYP41) from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 9, p. 829–834, 1999.

CRUZ, G.M.P.; FELIPE, C.F.B.; SCORZA, F.A.; COSTA, M.A.C.; TAVARES, A.F.; MENEZES, M.L.F.; ANDRADE, G.M.; LEAL, L.K.A.M.; BRITO, G.A.C.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; CAVALHEIRO, E.A.; VIANA, G.S.B. Piperine decreases pilocarpine-induced convulsions by GABAergic mechanisms. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.104, p. 144–153, 2013.

DAHIYA, S.; RANI, R.; DHINGRA, D.; SANDEEP KUMAR, S.; DILBAGHI, N. Potentiation of nootropic activity of EGCG loaded nanosuspension by piperine in swiss male albino mice. **Future Journal of Pharmaceutical sciences**, v.4, p. 296–302, 2018.

DANTAS, A.C.S.; ARAÚJO, A.C.; PACHECO, A.G.M.; BRANCO, A.; SANGIONI, L.A.; ALMEIDA, J.R.G.S.; HORTA, M.C. Acaricidal activity of *Amburana cearensis* on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 46, n. 3, p. 536-541, 2016.

DANTAS, A.C.S.; MACHADO, D.M.R., ARAUJO, A.C.; OLIVEIRA-JUNIOR, R.G.; LIMA-SARAIVA, S.R.G.; RIBEIRO, L.A.A.; ALMEIDA, J.R.G.S.; HORTA, M.C. Acaricidal activity of extracts from the leaves and aerial parts of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 165-168, 2015.

DARDEN, T., YORK, D., PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: an N-log (N) method for Ewald sums in large systems. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 10089-10092, 1993.

DEMBITSKY, V.M., DZHEMILEVA, L., GLORIOZOVA, T., D'YAKONOV, V. Natural and synthetic drugs used for the treatment of the dementia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, V. 524, p. 772-783, 2020.

DENG, C. SHAO, H.; PAN, X.; WANG, S.; ZHANG, D. Herbicidal effects of harmaline from *Peganum harmala* on photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa*: Probed by chlorophyll fluorescence and thermoluminescence. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 23–31, 2014.

DEY, P.; KUNDU, A.; KUMAR, A.; GUPTA, M.; LEE, B.M.; BHAKTA, T.; DASH, S.; KIM, H.S. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). Capitulo 15 In: **Recent Advances in Natural Products Analysis**, p. 505-567, 2020.

DI GIORGIO, C.; DELMAS, F.; OLLIVIER, E.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; TIMON-DAVID, P. *In vitro* activity of the β -carboline alkaloids harmaline, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 106, p. 67–74, 2004.

DOUCETTE, C.D.; HILCHIE, A.L.; LIWSKI, R.; HOSKIN, D.W. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 231–239, 2013.

DOUCETTE, C.D.; GREENSHIELDS, A.L.; LIWSKI, R.; HOSKIN, D.W. et al. Piperine blocks interleukin-2-driven cell cycle progression in CTLL-2 T lymphocytes by inhibiting multiple signal transduction pathways. **Toxicology Letters**, v. 234, n. 1, p. 1–12, 2015.

DURAIRAJAN, K.S.S.; LIU, L.F.; LU, J.H.; CHEN, L.L.; YUAN, Q.; CHUNG, S.K.; HUANG, L.; LI, X.S.; HUANG, J.D.; LI, M. Berberine ameliorates β -amyloid pathology, gliosis, and cognitive impairment in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. **Neurobiology of Aging**, v. 33, p. 2903–2919, 2012.

DZIEDZIC, A.; WOJTYCZKA, R.D.; KUBINA, R. Inhibition of oral Streptococci growth induced by the complementary action of berberine chloride and antibacterial compounds. **Molecules**, v. 20, p. 13705–13724, 2015.

EBRAHIMI-GHIRI, M.; NASEHI, M.; ZARRINDAST, M. Anxiolytic and antidepressant effects of ACPA and harmaline co-treatment. **Behavioural Brain Research**, v. 364, n. November 2018, p. 296–302, 2019.

EIGENMANN, D.E.; DÜRIG, C.; JÄHNE, E.A.; SMIESKO, M.; CULOT, M.; GOSSELET, F.; CECHELLI, R.; HELMS, H.C.C.; BRODIN, B.; WIMMER, L.; MIHOVILOVIC, M.D.; HAMBURGER, M.; OUFIR, M. *In vitro* blood-brain barrier permeability predictions for GABAA receptor modulating piperine analogs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 103, p. 118–126, 2016.

EL-GHAZALY, M.A.; FADEL, N.A.; ABDEL-NABY, D.H.; EL-REHIM, H.A.A.; ZAKI, H.F.; KENAWY, S.A. Potential anti-inflammatory action of resveratrol and piperine in adjuvant-induced arthritis: Effect on pro-inflammatory cytokines and oxidative stress biomarkers. **The Egyptian Rheumatologist**, 2019.

EL-GHAZALY, M.A.; FADEL, N.A.; RASHED, E.R.; KENAWY, S.A. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of piperine in gamma-irradiated rats. **Egyptian Journal of Radiation Sciences and Applications**, v.9, n.1-2, p. 1-16, 2016.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; JUNIOR, V.A.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemistry Pharmacology**, v.7, p.88-95, 1961.

EL-WAHAB, A.E.A.; GHAREEB, D.A.; SARHAN, E.E.M.; ABU-SERIE, M.M.; DEMELLAWY, M.A. *In vitro* biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidants, anticancer effects. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1–12, 2013.

ELSHEIKH, M.A.; ELNAGGAR, Y.S.R.; HAMDY, D.A.; ABDALLAH, O.Y. Novel cremochylomicrons for improved oral bioavailability of the antineoplastic phytochemistry berberine chloride: Optimization and pharmacokinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 316–324, 2018.

EVANS, A.T.; CROFT, S.L. Antileishmanial Activity of Harmaline and other Tr ypt amine Derivatives. **Phytotherapy Research**, v. 1, n. 1, p. 25–27, 1987.

FARIAS, N.A.; STOBBE, N.S.; CHRISTOVÃO, M.L.; PERRI, S.H.V.; COSTA, A.J. Influência das condições climáticas da Região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil, sobre os estágios não-parasitários do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, n.2, p. 67-77, 1995.

FERREIRA, C.; SOARES, D.C.; BARRETO-JUNIOR, C.B.; NASCIMENTO, M.T.; FREIRE-DE-LIMA, L.; DELORENZI, J.C.; LIMA, M.E.F.; ATELLA, G.C.; FOLLY, E.; CARVALHO, T.M.U.; SARAIVA, E.M.; PINTO-DA-SILVA, L.H. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 17, p. 2155–2164, 2011.

FERREIRA, L.E.; CASTRO, P.M.N.; CHAGAS, A.C.S.; FRANÇA, S.C.; BELEBONI, R.O. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental Parasitology**, v.134, p.327-332, 2013.

FREIRE-DE-LIMA, L.; RIBEIRO, T.S.; ROCHA, G.M.; BRANDÃO, B.A.; ROMEIRO, A.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J.O.; LIMA, M.E.F.; CARVALHO, T.M.U.; HEISE, N. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 1059–1067, 2008.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.J.B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GHOSHAL, S.; KRISHNA PRASAD, B.N.; LAKSHMI, V. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, n. 3, p. 167–170, 1996.

GHOSH, K.; BHATTACHARYYA, K. *Leishmania donovani*: Amastigote Inhibition of Berberine and Mode of Action of Berberine. **Experimental Parasitology**, v. 60, p. 404–413, 1985.

GILHOTRA, N.; DHINGRA, D. Possible involvement of GABAergic and nitriergic systems for antianxiety-like activity of piperine in unstressed and stressed mice. **Pharmacological Reports**, v. 66, p. 885–891, 2014.

GOHLKE, H.; KLEBE, G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 41, n. 15, p. 2644–2676, 2002.

GOMES, A.; KOLLER, W.W.; BARROS, A.T.M. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a acaricidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1447-1452, 2011.

GOMES, D. C.; LIMA, H.G.; VAZ, A.V.; SANTOS, N.S.; SANTOS, F.O.; DIAS, E.R.; BOTURA, M.B.; BRANCO, A.; BATATINHA, M.J.M. *In vitro* anthelmintic activity of the *Zizyphus joazeiro* bark against gastrointestinal nematodes of goats and its cytotoxicity on Vero cells. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 10–16, 2016.

GONÇALVES, V.M.; HUERTA, M.M.; FREITAG, R.A. Potencial de plantas acaricidas no controle de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 014-022, 2016.

GRAF, J.F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today**, v.9, n.12, p. 471-474, 1993.

GREENSHIELDS, A.L.; DOUCETTE, C.D.; SUTTON, K.M.; MADERA, L.; ANNAN, H.; YAFFE, P.B.; KNICKLE, A.F.; DONG, Z.; HOSKIN, D.W. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 129–140, 2015.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

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

GUERRERO, F.D.; LOVIS, L.; MARTINS, J.R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012.

GUNASEKARAN, V.; ELANGOVA, K.; DEVARAJ, S.N. Targeting hepatocellular carcinoma with piperine by radical-mediated mitochondrial pathway of apoptosis: An *in vitro* and *in vivo* study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 106–118, 2017.

GUPTA, R.A.; MOTIWALA, M.N.; DUMORE, N.G.; DANA, K.R.; GANJARE, A.B. Effect of piperine on inhibition of FFA induced TLR4 mediated inflammation and amelioration of acetic acid induced ulcerative colitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.164, p. 239–246, 2015.

HALTON, D.W. Microscopy and the helminth parasite. **Micron**, v. 35, p. 361–390, 2004.

HANSEN, M.B., NIELSEN, S.E., BERG, K. Re-examination and further Top of the development needs and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, p. 203–210, 1989.

HERNANDEZ, R.; HE, H.; CHEN, A.C.; IVIE, G.W.; GEORGE, J.E.; WAGNER, G.G. Cloning and sequencing of a putative acetylcholinesterase cDNA from *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 36, n. 6, p. 764–770, 1999.

HERRAIZ, T.; GONZÁLEZ, D.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; ARÁN, V.J.; GUILLÉN, H. β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 839–845, 2010.

HESS, B., KUTZNER, C., VAN DER SPOEL, D., LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, p.435–447, 2008.

HE, W.; WANG, C.; CHEN, Y.; HE, Y.; CAI, Z. Berberine attenuates cognitive impairment and ameliorates tau hyperphosphorylation by limiting the self-perpetuating pathogenic cycle between NF- κ B signaling, oxidative stress and neuroinflammation. **Pharmacological Reports**, v. 69, p. 1341–1348, 2017.

HITCHCOCK, L.F. Studies on the non-parasitic stages on the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). **Australian Journal of Zoology**, v.3, p. 295-311, 1955.

HUANG, J.; ZHANG, T.; HAN, S.; CAO, J.; CHEN, Q.; WANG, S. The inhibitory effect of piperine from *Fructus piperis* extract on the degranulation of RBL-2H3 cells. **Fitoterapia**, v. 99, n. 1, p. 218–226, 2014.

HUANG, L.; LUO, Z.; HE, F.; LU, J.; LI, X. Synthesis and biological evaluation of a new series of berberine derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p. 4475–4484, 2010a.

HUANG, L.; SHI, A.; FENG HE, F.; LI, X. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of berberine derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1244–1251, 2010b.

HUANG, L., SU, T., SHAN, W., LUO, Z., SUN, Y., HE, F., LI, X. Inhibition of cholinesterase activity and amyloid aggregation by berberine-phenyl benzoheterocyclic and tacrine-phenylbenzoheterocyclic hybrids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 3038–3048, 2012.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **The veterinary record**, v. 130, n. 20, p. 442-446, 1992.

HUSSIEN, H.M.; ABD- ELMEGIED, A.; GHAREEB, D.A.; HAFEZ, H.S.; AHMED, H.E.A.; EL-MONEAM, N.A. Neuroprotective effect of berberine against environmental heavy metals- induced neurotoxicity and Alzheimer's-like disease in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 432–444, 2018.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal**. 2019. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>> Acesso em: 15 de dezembro de 2020.

International standard, ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices -part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity, 2009.

JANTOVA, S.; CIPAK, L.; LETASIOVA, S. Berberine induces apoptosis through a mitochondrial / caspase pathway in human promonocytic U937 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 25–31, 2007.

JIA, M.; HE, Q.; WANG, W.; DAI, J.; ZHU, L. Chemical composition and acaricidal activity of *Arisaema anurans* essential oil and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 261, p. 59–66, 2018.

JI, H.; SHEN, L. Molecular Basis of Inhibitory Activities of Berberine against Pathogenic Enzymes in Alzheimer ' s Disease. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 4, 2012.

JING, H.; LIU, J.; LIU, H.; XIN, H. Histochemical Investigation and Kinds of Alkaloids in Leaves of Different Developmental Stages in *Thymus quinquecostatus*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

JIANG, W.X.; LI, S.H.; LI, X.J. Therapeutic potential of berberine against neurodegenerative diseases. **Science China Life Science**, v.58, n.6, p. 564–569, 2015.

JIANG, B.; MENG, L.; ZHANG, F.; JIN, X.; ZHANG, G. Enzyme-inducing effects of berberine on cytochrome P450 1A2 *in vitro* and *in vivo*. **Life Sciences**, v. 189, p. 1–7, 2017.

JIMÉNEZ, J.; RIVERÓN-NEGRETE, L.; ABDULLAEV, F.; ESPINOSA-AGUIRRE, J.; RODRÍGUEZ-ARNAIZ, R. Cytotoxicity of the b-carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays *in vitro*. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 60, p. 381–389, 2008.

JOHNSON, K.A., GOODY, R.S. The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. **Biochemistry**, v.50, p. 8264–8269, 2011.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. SUPPL., 2004.

JONSSON, N. N.; HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 3–4, p. 193–198, 2007.

JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 1–10, 2006.

JUNG, H.; MIN, B.S.; YOKOZAWA, T.; LEE, J.H.; KIM, Y.S.; CHOI, J.S. Anti-Alzheimer and Antioxidant Activities of *Coptidis Rhizoma* Alkaloids. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 1433–1438, 2009.

- JWA, H.; CHOI, Y.; PARK, U.H.; UM, S.J.; YOON, S.K.; PARK, T. Piperine, an LXR α antagonist, protects against hepatic steatosis and improves insulin signaling in mice fed a high-fat diet. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 11, p. 1501–1510, 2012.
- KAMINSKY, R.; DUCRAY, P.; JUNG, M.; CLOVER, R.; RUFENER, L.; BOUVIER, J.; WEBER, S.S.; WENGER, A.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.; GOEBEL, T.; GAUVRY, N.; PAUTRAT, F.; SKRIPSKY, T.; FROELICH, O.; KOMOIN-OKA, C.; WESTLUND, B.; SLUDER, A.; MASER, P. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. **Nature**, v. 452, n. 7184, p. 176–180, 2008.
- KANETO, C.N.; CARDIA, D.F.F.; GOMES, J.F.; MATOS, L.V.S.; PIERUCCI, J.C.; BRESCIANI, K.D.S. Anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal nematodes in the Northwest region São Paulo state. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 229-232, 2016.
- KAUR, J.; YADAV, D.K.; SHARMA, S.; HASAN, M.; TYAGI, P.K.; SINGH, M.R. Isolation and characterization of berberine hcl and cytotoxic effect on the cell line of breast cancer. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 4, p. 1297–1307, 2016.
- KHAJURIA, A.; ZUTSHI, U.; BEDI, K.L. Permeability characteristics of piperine on oral absorption - An active alkaloid from peppers and a bioavailability enhancer. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 36, n. 1, p. 46–50, 1998.
- KHOM, S.; STROMMER, B.; SCHÖFFMANN, A.; HINTERSTEINER, J.; BABURIN, I.; ERKER, T.; SCHWARZ, T.; SCHWARZER, C.; ZAUGG, J.; HAMBURGER, M.; HERING, S. GABAA receptor modulation by piperine and a non-TRPV1 activating derivative. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 12, p. 1827–1836, 2013.
- KIM, D.K.; LEE, K.T.; BAEK, N.I.; KIM, S.H.; PARK, H.W.; LIM, J.P.; SHIN, T.Y.; EOM, D.O.; YANG, J.H.; EUN, J.S. Acetylcholinesterase Inhibitors from the Aerial Parts of *Corydalis speciosa*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 11, p. 1127–1131, 2004.
- KIM, H.G.; HAN, E.H.; JANG, W.S.; CHOI, J.H.; KHANAL, T.; PARK, B.H.; TRAN, T.P.; CHUNG, Y.C.; JEONG, H.G. Piperine inhibits PMA-induced cyclooxygenase-2 expression through downregulating NF- κ B, C/EBP and AP-1 signaling pathways in murine macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2342–2348, 2012.
- KINGSTON, I.B. Nematode Collagen Genes. **Parasitology Today**, v. 7, n. 1, p. 11-15, 1991.
- KITCHEN, D.B.; DECORNEZ, H.; FURR, J.R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.
- KLONGSIRIWET, C.; QUIJADA, J.; WILLIAMS, A.R.; MUELLER-HARVEY, I.; WILLIAMSON, E.M.; HOSTE, H. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, p. 127-134, 2015.
- KONG, L.D.; CHENG, C.H.K.; TAN, R.X. Monoamine Oxidase Inhibitors from Rhizoma of *Coptis chinensis*. **Planta Medica**, v. 67, p. 74–76, 2001.

KONG, X.P.; LIU, E.Y.L.; CHEN, Z.C.; XU, M.L.; YU, A.X.D.; WU, Q.Y.; XIA, Y.J.; DUAN, R.; DONG, T.T.X.; TSIM, K.W.K. Synergistic inhibition of acetylcholinesterase by alkaloids derived from *Stephaniae tetrandrae radix*, *Coptidis rhizoma* and *Phellodendri chinensis cortex*. **Molecules**, v. 24, p. 4567, 2019.

KONG, W.; WEI, J.; ABIDI, P.; LIN, M.; INABA, S.; LI, C.; WANG, Y.; WANG, Z.; SI, S.; PAN, H.; WANG, S.; WU, J.; WANG, Y.; LI, Z.; LIU, J.; JIANG, J.D. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1344–1351, 2004.

KRYGER, G., SILMAN, I., SUSSMAN, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept[®]): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. **Structure**, v.7, p. 297-307, 1999.

KULKARNI, S.K.; DANDIYA, P.C.; VARANDANI, N.L. Pharmacological Investigations of Berberine Sulphate. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 22, p. 11–16, 1972.

KULKARNI, S.K.; DHIR, A. On the mechanism of antidepressant-like action of berberine chloride. **European Journal of Pharmacology**, v. 589, p. 163–172, 2008.

KULKARNI, S.K.; DHIR, A. Berberine : A Plant Alkaloid with Therapeutic Potential for Central Nervous System Disorders. **Phytotherapy Research**, v. 324, p. 317–324, 2010.

KUMAR, A.; RAMAN, R.P.; KUMAR, K.; PANDEY, P.K.; KUMAR, V.; MOHANTY, S.; KUMAR, S. Antiparasitic efficacy of piperine against *Argulus spp.* on *Carassius auratus* (Linn. 1758): *In vitro* and *in vivo* study. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 2071–2076, 2012.

KUMAR, A.; SASMAL, D.; SHARMA, N. Immunomodulatory role of piperine in deltamethrin induced thymic apoptosis and altered immune functions. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 504-514, 2015.

KUMAR, A.; SHARMA, N. Comparative efficacy of piperine and curcumin in deltamethrin induced splenic apoptosis and altered immune functions. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 119, n. 1, p. 16–27, 2015.

LANUSSE, C. E.; PRICHARD, R. K. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. **Veterinary Parasitology**, v. 49, n. 2–4, p. 123–158, 1993.

LAU, C.W.; YAO, X.Q.; CHEN, Z.Y.; KO, W.H.; HUANG, Y. Cardiovascular Actions of Berberine. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 19, n. 3, p. 234–244, 2001.

LEE, C.S.; HAN, E.S.; KIM, Y.K. Piperine inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial dysfunction and cell death in PC12 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 537, p. 37–44, 2006.

LEE, S.A.; HONG, S.S.; HAN, X.H.; HWANG, J.S.; OH, G.J.; LEE, K.S.; LEE, M.K.; HWANG, B.Y.; RO, J.S. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 7, p. 832–835, 2005.

LEE, Y.S.; KIM, W.S.; KIM, K.H.; YOON, M.J.; CHO, H.J.; SHEN, Y.; YE, J.M.; LEE, C.H.; OH, W.K.; KIM, C.T.; HOHNEN-BEHRENS, C.; GOSBY, A.; KRAEGER, E.W.; JAMES, D.E.; KIM, J.B. Berberine, a Natural Plant Product, Activates AMP-Activated Protein Kinase With Beneficial Metabolic Effects in Diabetic and Insulin-Resistant States. **Diabetes**, v. 55, p. 2256–2264, 2006.

LIANG, Y.; HUANG, M.; JIANG, X.; LIU, Q.; CHANG, X.; GUO, Y. The neuroprotective effects of Berberine against amyloid β -protein-induced apoptosis in primary cultured hippocampal neurons via mitochondria-related caspase pathway. **Neuroscience Letters**, v. 655, n. 1017, p. 46–53, 2017.

LI, J.; OU-LEE, T.; RABA, R.; ROBERT G. AMUNDSON, R.G.; LASTATBI, R.L. Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-6 Irradiation. **The Plant Cell**, v. 5, p. 171-179, 1993.

LIMA, A.S.; FILHO, J.G.N.S.; PEREIRA, S.G.; GUILLON, G.M.S.P.; SANTOS, L.G.; JÚNIOR, L.M.C. Acaricide activity of different extracts from *Piper tuberculatum* fruits against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 1, p. 107–112, 2014.

LIMA, H.G.; SANTOS, F.O.; SANTOS, A.C.V.; SILVA, G.D.; SANTOS, R.J.; CARNEIRO, K.O.; REIS, I.M.A.; ESTRELA, I.O.; FREITAS, H.F.; BAHIANSE, T.C.; PITA, S.S.R.; UZEDA, R.S.; BRANCO, A.; COSTA, S.L.; BATATINHA, M.J.M.; BOTURA, M.B. Antitick effect and cholinesterase inhibition caused by *Prosopis juliflora* alkaloids: *in vitro* and *in silico* studies. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 29, e019819, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020036>

LIMA, M.M.; FARIAS, M.P.O.; ROMEIRO, E.T.; FERREIRA, D.R.A.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. Eficácia da Moxidectina, Ivermectina e Albendazole contra helmintos gastrintestinais em propriedades de criação caprina e ovina no Estado de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira, Goiânia**, v.11, n.1, p. 94-100, 2010.

LIMA, W.S. Controle de endo e ectoparasitos e relação custo/benefício em novilhas de rebanhos leiteiros em Minas Gerais. **A Hora Veterinária**, v. 15, n. 85, p. 44-49, 1995.

LINDAHL, E., HESS, B., VAN DER SPOEL, D., 2001. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v.7, p.306–317, 2001.

LI, S.; LEI, Y.; JIA, Y.; LI, N.; WINKC, M.; MA, Y. Piperine, a piperidine alkaloid from *Piper nigrum* re-sensitizes P-gp, MRP1 and BCRP dependent multidrug resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 19, p. 83– 87, 2011.

LIU, H.L.; LUO, R.; CHEN, X.Q.; BA, Y.Y.; ZHENG, L.; GUO, W.W.; WU, X. Identification and simultaneous quantification of five alkaloids in *Piper longum* L. by HPLC-ESI-MSn and UFLC-ESI-MS/MS and their application to *Piper nigrum* L. **Food Chemistry**, v. 177, p. 191–196, 2015.

LOHAN, S.; RAZA, K.; MEHTA, S.K.; BHATTI, G.K.; SAINI, S.; SINGH, B. Anti-Alzheimer's potential of berberine using surface decorated multi-walled carbon nanotubes : A preclinical evidence. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 530, n. 1–2, p. 263–278, 2017.

LUGANINI, A.; MERCORELLI, B.; MESSA, L.; PALÙ, G.; GRIBAUDO, G.; LOREGIAN, A. The isoquinoline alkaloid berberine inhibits human cytomegalovirus replication by interfering with the viral Immediate Early-2 (IE2) protein transactivating activity . **Antiviral Research**, v. 164, n. October 2018, p. 52–60, 2019.

LU, J.; CAO, Y.; CHENG, K.; XU, B.; WANG, T.; YANG, Q.; YANG, Q.; FENG, X.; XIA, Q. Berberine regulates neurite outgrowth through AMPK-dependent pathways by lowering energy status. **Experimental Cell Research**, v. 334, p. 194–206, 2015.

MAITHANI, A.; PARCHA, V.; KUMAR, D. Quantitative estimation of berberine content of *Berberis asiatica* from different altitude of Garhwal Himalaya. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, p. 7–9, 2014.

MANJUNATHACHAR, H. V.; SARAVANAN, B.C.; KESAVAN, M.; KARTHIK, K.; RATHOD, P.; GOPI, M.; TAMILMAHAN, P.; BALARAJU, B.L. Economic importance of ticks and their effective control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. S2, p. S770–S779, 2014.

MANSFIELD, L.S.; GAMBLE, H.R.; FETTERER, R.H. Characterization of the eggshell of *Hemonchus contortus* – I. Structural components. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.103B, n.3, p.681-686, 1992.

MARIN-NETO, J.A.; MACIEL, B.C.; SECCHES, A.L.; GALLO, L. Cardiovascular Effects of Berberine in Patients with Severe Congestive Heart Failure”. **Clinical Cardiology**, v. 11, p. 253–260, 1988.

MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO, C.; ARROYO-LÓPEZ, C.; FOURQUAUX, I.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; HOSTE, H. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. **Experimental Parasitology**, v. 133, n.3, p. 281-286, 2013.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; CASTILLO-HERRERA, G.; FLORES-FERNANDEZ, J.M.; ALVAREZ, A.H.; LUGO-CERVANTES, E. Acaricidal Effect of Essential Oils From *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 4, p. 822–827, 2011.

MASSOULIÉ, J.; PERRIER, N.L.; NOUREDDINE, H.; LIANG, D.; BON, S. Old and new questions about cholinesterases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, n. 1–3, p. 30–44, 2008.

MA, Y.; TIAN, M.; LIU, P.; WANG, Z.; GUAN, Y.; LIU, Y.; WANG, Y.; SHAN, Z. Piperine effectively protects primary cultured atrial myocytes from oxidative damage in the infant rabbit model. **Molecular Medicine Reports**, v.10, p. 2627-2632, 2014.

MAO, Q.Q.; HUANG, Z.; ZHONG, X.M.; XIAN, Y.F.; IP, S.P. Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates the antidepressant-like effects of Piperine in chronically stressed mice. **Behavioural Brain Research**, v.261, p. 140– 145, 2014b.

MAO, Q.Q.; HUANG, Z.; ZHONG, X.M.; XIAN, Y.F.; IP, S.P. Piperine reverses the effects of corticosterone on behavior and hippocampal BDNF expression in mice. **Neurochemistry International**, v.74, p. 36–41, 2014a.

MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 559–574, 2008.

MEDEIROS, M. L. S.; MOURA, M.C.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; BEZERRA, A.C.D.S.; SILVA, M.D.C. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 782–789, 2018.

MELO, L. R. B.; VILELA, V.L.R.; FEITOSA, T.F.; ALMEIDA NETO, J.L.; MORAIS, D.F. Anthelmintic resistance in small ruminants from the semiarid of Paraíba state, Brazil. **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 2, p. 104, 2013.

MENDES, M.C.; LIMA, C.K.P.; NOGUEIRA, A.H.C.; YOSHIHARA, E.; CHIEBAO, D.P.; GABRIEL, F.H.L.; UENO, T.E.H.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G.M. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 383-388, 2011.

MENG, X.Y.; ZHANG, H.X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer - Aided Drug Design**, v.7, n.2, p. 146–157, 2011.

MIRHADI, E.; REZAEI, M.; MALAEKEH-NIKOUEI, B. Nano strategies for berberine delivery , a natural alkaloid of Berberis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 104, n. March, p. 465–473, 2018.

MISHRA, A.; PUNIA, J.K.; BLADEN, C.; ZAMPONI, G.W.; GOEL, R.K. Anticonvulsant mechanisms of piperine, a piperidine alkaloid. **Channels**, v. 9, n. 5, p. 317–323, 2015.

MIYAMOTO, S., KOLLMAN, P.A. Settle – an analytical version of the shake and rattle algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v.13, p. 952-962, 1992.

MU, L.H.; WANG, B.; REN, H.Y.; LIU, P.; GUO, D.H.; WANG, F.M.; BAI, L.; GUO, Y.S. Synthesis and inhibitory effect of piperine derivatives on monoamine oxidase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 9, p. 3343–3348, 2012.

MURTHY, K.N.C.; JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. The natural alkaloid berberine targets multiple pathways to induce cell death in cultured human colon cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 688, n. 1–3, p. 14–21, 2012.

NAFISI, S.; BONSAI, M.; MAALI, P.; KHALILZADEH, M.A.; MANOUCHEHRI, F. b - Carboline alkaloids bind DNA. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 100, n. 2, p. 84–91, 2010.

NAMBA, A.M.; SILVA, V.B.; SILVA, C.H.T.P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

NASEHI, M.; KETABCHI, M.; KHAKPAI, F.; ZARRINDAST, M.R. The effect of CA1 dopaminergic system in harmaline-induced amnesia. **Neuroscience**, v. 285, p. 47–59, 2015.

NASEHI, M.; SAADATI, N.; KHAKPAI, F.; ZARRINDAST, M.R. Possible involvement of the CA1 GABAergic system on harmaline induced memory consolidation deficit. **Brain Research Bulletin**, v. 130, p. 101–106, 2017.

NCHU, F.; GITHIORI, J.B.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N. Anthelmintic and cytotoxic activities of extracts of *Markhamia obtusifolia* Sprague (Bignoniaceae). **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1–2, p. 184–188, 2011.

NENAAH, G. Antibacterial and antifungal activities of (beta) -carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 779–782, 2010.

NENAAH, G. Toxicity and growth inhibitory activities of methanol extract and the b -carboline alkaloids of *Peganum harmala* L . against two coleopteran stored-grain pests. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n. 3, p. 255–261, 2011.

NETO, F.R. Electropharmacological effects of berberine on canine cardiac Purkinje fibres and ventricular muscle and atrial muscle of the rabbit. **British Journal of Pharmacology**, v. 108, p. 534–537, 1993.

OLIVEIRA, A.A.; AZEVEDO, H.C. Resistência do carrapato *Boophilus microplus* a acaricidas em bovinos de leite na região dos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. **Revista Científica Rural**, v. 7, n. 2, p. 64-71, 2002.

OLIVEIRA - CRUZ, L.M.; COSTA-JUNIOR, L.M.; PINTO, J.A.O.; SANTOS, D.A.; ARAUJO, S.A.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BACCI, L.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H.; BLANK, A.F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, p. 198– 202, 2013.

OLIVEIRA, P.A.; RIET-CORREA, B.; ESTIMA-SILVA, P.; COELHO, A.C.B.; SANTOS, B.L.; COSTA, M.A.P.; RUAS, J.L.; SCHILD, A.L. Multiple anthelmintic resistance in Southern Brazil sheep flocks. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, Jaboticabal**, v. 26, n. 4, p. 427-432, 2017.

OUYANG, D.Y.; ZENG, L.H.; PAN, H.; XU, L.H.; WANG, Y.; LIU, K.P.; HE, X.H. Piperine inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell cycle arrest and autophagy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 424–430, 2013.

PACHAURI, M.; GUPTA, E.D.; GHOSH, P.C. Piperine loaded PEG-PLGA nanoparticles: Preparation, characterization and targeted delivery for adjuvant breast câncer chemotherapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.29, p. 269-282, 2015.

PAL, M.K.; JAISWAR, S.P.; SRIVASTAV, A.K.; GOYAL, S.; DWIVEDI, A.; VERMA, A.; SINGH, J.; PATHAK, A.K.; SANKHWAR, P.L.; RAY, R.S. Synergistic effect of piperine and paclitaxel on cell fate via cyt-c, Bax/Bcl-2 caspase-3 pathway in ovarian adenocarcinomas SKOV-3 cells. **European Journal of Pharmacology**, v.791, p. 751-762, 2016.

PARK, I.K.; LEE, S.G.; SHIN, S.C.; PARK, J.D.; AHN, Y.J. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1866–1870, 2002.

PARK, J.J.; SEO, S.M.; KIM, E.J.; LEE, Y.J.; KO, Y.G.; HA, J.; LEE, M. Berberine inhibits human colon cancer cell migration via AMP-activated protein kinase-mediated downregulation of integrin $\beta 1$ signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 426, n. 4, p. 461–467, 2012.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 591–673, 1997.

PATEL, H.B.; PATEL, U.D.; MATHAPATI, B.S.; MODI, C.M. Effect of piperine and quercetin alone or in combination with marbofloxacin on CYP3A37 and MDR1 mRNA expression levels in broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, v.126, p. 178-183, 2019.

PEREIRA, J.R. Eficácia *in vitro* de formulações comerciais de acaricidas em teleóginas de *Boophilus microplus* coletadas de bovinos leiteiros do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 2, p.45-48, 2006.

PONGKORPSAKOL, P.; WONGKRASANT, P.; KUMPUN, S.; CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Inhibition of intestinal chloride secretion by piperine as a cellular basis for the anti-secretory effect of black peppers. **Pharmacological Research**, v.100, p. 271-280, 2015.

PRAGNYA, B.; KAMESHWARI, J.S.L.; VEERESH, B. Ameliorating effect of piperine on behavioral abnormalities and oxidative markers in sodium valproate induced autism in BALB/C mice. **Behavioural Brain Research**, v.270, p. 86-94, 2014.

QU, H.; YU, X.; ZHI, X.; LV, M.; XU, H. Natural-product-based insecticidal agents 14. Semisynthesis and insecticidal activity of new piperine-based hydrazone derivatives against *Mythimna separata* Walker *in vivo*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 20, p. 5552–5557, 2013.

RAYNAL, J.T.; BORGES, A.A.; BASTOS, B.L.; BAHIENSE, T.C.; MEYER, R.; PORTELA, R.W. Avaliação da eficiência de acaricidas sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no estado da Bahia. **PUBVET Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 12, p.1-8, 2018.

RAYNAL, J.T.; SILVA, A.A.B.; SOUSA, T.J.; BAHIENSE, T.C.; MEYER, R.; PORTELA, R.W. Eficiência de acaricidas sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* na região Centro-Norte, Bahia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v. 22, n. 1, p.71-77, 2013.

RECK JUNIOR, 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. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary parasitology**, v. 201, n. 1, p. 128-136, 2014.

REN, T.; HU, M.; CHENG, Y.; SHEK, T.L.; XIAO, M.; HO, N.J.; ZHANG, C.; LEUNG, S.S.Y.; ZUO, Z. Piperine-loaded nanoparticles with enhanced dissolution and oral bioavailability for epilepsy control. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.137, p. 1-8, 2019.

RHARRABE, K.; BAKRIM, A.; GHAILANI, N.; SAYAH, F. Bioinsecticidal effect of harmaline on *Plodia interpunctella* development (Lepidoptera: Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 89, p. 137–145, 2007.

RIBEIRO, T.S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; HEISE, N.; LIMA, M.E.F. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 13, p. 3555–3558, 2004.

RIZWAN-UL-HAQ, M.; HU, Q.B.; HU, M.Y.; LIN, Q.S.; ZHANG, W.L. Biological impact of harmaline, ricinine and their combined effects with *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, v. 82, p. 327–334, 2009.

RIZWAN-UL-HAQ, M.; GONG, L.; HU, M.; LOU, J. Apolipoprotein III and transmission electron microscopy as toxicity indicators for harmaline and tea saponin in *Spodoptera exigua* (Noctuidae: Lepidoptera). **Chemosphere**, v. 85, n. 6, p. 995–1001, 2011.

ROBERTS, M.F.; WINK, M. **Alkaloids Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications**. New York, 1st edition, Springer Science, 1998. 492pgs.

ROBINSON, C.L.; CHONG, A.C.N.; ASHBROOK, A.W.; JENG, G.; JIN, J.; CHEN, H.; TANG, E.I.; MARTIN, L.A.; KIM, R.S.; KENYON, R.M.; DO, E.; LUNA, J.M.; SAEED, M.; ZELTSER, L.; RALPH, H.; DUDLEY, V.L.; GOLDSTEIN, M.; RICE, C.M.; CHENG, C.Y.; SEANDEL, M.; CHEN, S. Male germ cells support long-term propagation of Zika virus. **Nature Communications**, v. 2090, p. 1–11, 2018.

ROBINSON, T. The metabolism and biochemical actions of Alkaloids in animals. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 22, p.3-54, 2000.

RODGERS, G.; DOUCETTE, C.D.; SOUTAR, D.A.; LIWSKI, R.S.; HOSKIN, D.W. Piperine impairs the migration and T cell-activating function of dendritic cells. **Toxicology Letters**, v.242, p. 23-33, 2016.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1570–1572, 2013.

ROEBER, F.; JEX, A. R.; GASSER, R. B. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - An Australian perspective. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013.

SOLDERA-SILVA, A.; SEYFRIED, M.; CAMPESTRINI, L.H.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; MINHO, A.P.; MOLENTO, M.B.; MAURER, J.B.B. Assessment of anthelmintic activity and bio-guided chemical analysis of *Persea americana* seed extracts. **Veterinary Parasitology**, v. 251, p. 34 - 43, 2018.

ROSADO-AGUILAR, J.A., ARJONA-CAMBRANES, K., TORRES-ACOSTA, J.F.J., RODRÍGUES-VIVAS, R.I., BOLIO-GONZÁLEZ, M.E., ORTEGA-PACHECO, A., ALZINA-LÓPEZ, A., GUTIÉRREZ-RUIZ, E.J., GUTIÉRREZ-BLANCO, E., AGUILAR-CABALLERO, A.J. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 66-76, 2017.

ROSELLI, M.; CAVALLUZZI, M.M.; BRUNO, C.; LOVECE, A.; CAROCCI, A.; FRANCHINI, C.; HABTEMARIAM, S.; LENTINI, G. Synthesis and evaluation of berberine derivatives and analogs as potential antiacetylcholinesterase and antioxidant agents. **Phytochemistry Letters**, v. 18, p. 150–156, 2016.

RUNGSUNG, W.; RATHA, K.K.; DUTTA, S.; DIXIT, A.K.; HAZRA, J. Secondary metabolites of plants in drugs Discovery. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 7, p. 604-613, 2015.

SÁ, C.O.; SÁ, J.L. Controle Orgânico de Endo e Ectoparasitas em Ruminantes: Revisão. **Anais... ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO**, 6. 2004.

SAMRA, Y.A.; SAID, H.S.; ELSHERBINY, N.M.; LIOU, G.I.; EL-SHISHTAWY, M.M.; EISSA, L.A. Cepharanthine and Piperine ameliorate diabetic nephropathy in rats: role of NF- κ B and NLRP3 inflammasome. **Life Sciences**, v.157, p. 187-199, 2016.

SAMUEL, M.; CAVALLUZZI, M.M.; BRUNO, C.; LOVECE, A.; CAROCCI, A.; FRANCHINI, C.; HABTEMARIAM, S.; LENTINI, G. The larvicidal effects of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine against insecticide resistant and susceptible strains of *Anopheles malaria* vector mosquitoes. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2016.

SANTANA, B.B.; RAMOS, R.A.N.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C.; CARVALHO, G.A. Evaluation of the efficacy of cypermethrin and amitraz against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, in the State of Pernambuco, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-4, 2015.

SANTA ROSA, S.S.; SANTOS, F.O.; LIMA, H.G.; REIS, I.M.A.; CASSIANO, D.S.A.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; UZEDA, R.S.; BOTURA, M.B.; BRANCO, A.; BATATINHA, M.J.M. *In vitro* anthelmintic and cytotoxic activities of extracts of *Persea willdenovii* Kosterm (Lauraceae). **Journal of Helminthology**, v. 92, p.674-680, 2018.

SANTOS, A.C.V.; SANTOS, F.O.; LIMA, H.G.; SILVA, G.D.; UZÊDA, R.S.; DIAS, E.R.; BRANCO, A.; CARDOSO, K.V.; DAVID, J.M.; BOTURA, M.B.; COSTA, S.L.; BATATINHA, M.J.M. *In vitro* ovicidal and larvicidal activities of some saponins and flavonoids against parasitic nematodes of goats. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 1884–1889, 2018.

SANTOS, F.O.; CERQUEIRA, A.P.M.; BRANCO, A.; BATATINHA, M.J.M.; BOTURA, M.B. Anthelmintic activity of plants against gastrointestinal nematodes of goats: a review. **Parasitology**, v. 146, n. 10, p. 1233-1246, 2019.

SANTOS, F.O.; LIMA, H.G.; SANTA ROSA, S.S.; MERCÊS, N.B.; SERRA, T.M.; UZEDA, R.S.; REIS, I.M.A.; BOTURA, M.B.; BRANCO, A.; BATATINHA, M.J.M. *In vitro* acaricide and anticholinesterase activities of *Digitaria insularis* (Poaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 255, p. 102–106, 2018.

SANTOS, F. O.; LIMA, H.G.; SANTOS, N.S.S.; SERRA, T.M.; UZEDA, R.S.; REIS, I.M.A.; BOTURA, M.B.; BRANCO, A.; BATATINHA, M.J.M. *In vitro* anthelmintic and cytotoxicity activities the *Digitaria insularis* (Poaceae). **Veterinary Parasitology**, v. 245, n. August, p. 48–54, 2017.

SANTOS, S.C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. Cap. 24, p. 615- 656.

SANTOS, T.R.B.; FARIAS, N.A.R.; CUNHA FILHO, N.A.; VAZ JUNIOR, I.S. Uso de acaricidas em *Rhipicephalus (B.) microplus* de duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n. 1, p. 25-30, 2008.

SATOU, T.; HORIUCHI, A.; AKAO, N.; KOIKE, K.; FUJITA, K.; NIKAIDO, T. *Toxocara canis*: Search for a potential drug amongst b-carboline alkaloids - *in vitro* and mouse studies. **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 134–139, 2005.

SATOU, T.; KOGA, M.; MATSUHASHI, R.; KOIKE, K.; TADA, I.; NIKAIDO, T. Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 104, p.131–138, 2002.

SCHMID, N., EICHENBERGER, A.P., CHOUTKO, A., RINIKER, S., WINGER, M., MARK, A.E., VAN GUNSTEREN, W.F., 2011. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. **European Biophysics Journal**, v. 40, p. 843-856, 2011.

SCOTT, J.E., WILLIAMS, K.P. Validating Identity, Mass Purity and Enzymatic Purity of Enzyme Preparations. 2012 May 1 [Updated 2012 Oct 1]. In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91995/pdf/Bookshelf_NBK91995.pdf (Accessed 10 April 2020).

SEMLER, U.; GROSS, G.G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1566–1567, 1988.

SENRA, T.O.S.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C.M.O.; CALMON, F.; MATURANO, R.; GOMES, G.A.; FAZA, A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res.**, v.112, p. 1461–1466, 2013.

SHANBHAG, S.M.; KULKARNI, H.J.; GAITONDE, B.B. Pharmacological Actions of Berberine on the Central Nervous System. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 20, p. 8–13, 1970.

SHARMA, P.; KALIA, N.P.; SUDEN, P.; CHAUHAN, P.S.; KUMAR, M.; RAM, A.B.; KHAJURIA, A.; BANI, S.; KHAN, I.A. Protective efficacy of piperine against *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v.94, p. 389-396, 2014.

SHANG, X.; GUO, X.; LI, B.; PAN, H.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; MIAO, X. Microwave-assisted extraction of three bioactive alkaloids from *Peganum harmala* L. and their acaricidal activity against *Psoroptes cuniculi* *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 350–361, 2016.

SHENOY, P.A.; NIPATE, S.S.; SONPETKAR, J.M.; SALVI, N.C.; WAGHMARE, A.B.; CHAUDHARI, P.D. Anti-snake venom activities of ethanolic extract of fruits of *Piper longum* L. (Piperaceae) against Russell's viper venom: Characterization of piperine as active principle. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 373–382, 2013.

SHENOY, P.A.; NIPATE, S.S.; SONPETKAR, J.M.; SALVI, N.C.; WAGHMARE, A.B.; CHAUDHARI, P.D. Production of high titre antibody response against Russell's viper venom in mice immunized with ethanolic extract of fruits of *Piper longum* L. (Piperaceae) and piperine. **Phytomedicine**, v. 21, n. 2, p. 159–163, 2014.

SHRIVASTAVA, P.; VAIBHAV, K.; TABASSUM, R.; KHAN, A.; ISHRAT, T.; KHAN, M.M.; AHMAD, A.; ISLAM, F.; SAFHI, M.M.; ISLAM, F. Anti-apoptotic and Anti-inflammatory effect of Piperine on 6-OHDA induced Parkinson's Rat model. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 680–687, 2013.

SILVA, G. D.; BOTURA, M.B.; LIMA, H.G.; OLIVEIRA, J.V.A.; MOREIRA, E.L.T.; SANTOS, F.O.; SOUZA, T.S.; ALMEIDA, M.A.O.; MARIA JOSÉ MOREIRA BATATINHA, M.J.M. Evaluation of the anthelmintic activity and toxicity of an aqueous extract of *Chenopodium ambrosioides* in goats. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, p. 156–162, 2016.

SILVA, M.C.L.; SOBRINHO, R.N.; LINHARES, G.F.C. Avaliação *in vitro* da eficácia do Clorfenvinfós e da Cialotrina sobre *Boophilus microplus*, colhidos em bovinos da bacia leiteira da microrregião de Goiânia-Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 143-148, 2000.

SILVA, W.C.S.; MARTINS, J.R.S.; SOUZA, H.E.M.; HEINZEN, H.; CESIO, M.V.; MATO, M.; ALBRECHT, F.; AZEVEDO, J.L.; BARROS, N.M. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 267-274, 2009.

SILVA, W.W.; ATHAYDE, A.C.R.; ARAÚJO, G.M.B.; SANTOS, V.D.; SILVA NETO, A.B. Resistência de Fêmeas Ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) a acaricidas no Semi-árido Paraibano: Efeito da Cipermetrina e do Amitraz. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, v.1, p.59-62, 2005.

SINGH, B.; SRIVASTAVA, J.S.; KHOSA, R.L.; SINGH, U.P. Individual and Combined Effects of Berberine and Santonin on Spore Germination of Some Fungi. **Folia Microbiologica**, v. 46, n. 2, p. 137–142, 2001.

SINGH, R.; BAL, M.S.; SINGLA, L.D.; KAUR, P. Detection of anthelmintic resistance in sheep and goat against fenbendazole by faecal egg count reduction test. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 2, p. 463-466, 2017.

SINGH, T.; VAID, M.; KATIYAR, N.; SHARMA, S.; KATIYAR, S.K. Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits melanoma cancer cell migration by reducing the expressions of cyclooxygenase-2, prostaglandin E 2 and prostaglandin E 2 receptors. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 1, p. 86–92, 2011.

SINGH, U.C., KOLLMAN, P.A. An approach to computing electrostatic charges for molecules. **Journal of Computational Chemistry**, v.5, p. 129-145, 1984.

SOFFAR, S.A.; METWAIL, D.M.; ABDEL-AZIZ, S.S.; EL-WAKIL, H.S.; SAAD, G.A. Evaluation of the effect of a plant alkaloid (berberine derived from *Berberis aristata*) on *Trichomonas vaginalis in vitro*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 31, n. 3, p. 893-904, 2001.

SOUZA, A.P.; PAIM, F.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A.; MOURA, A.B.; ROSA, L.D.; MIQUELLUTI, D.J. Avaliação da eficácia do fipronil em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em tratamentos consecutivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 55-60, 2014.

SOUZA, A.P., VEIGA, L.P.H.N., BELLATO, V., SARTOR, A.A., CARDOSO, C.P., NUNES, A.P.O. Proposta para teste acaricida por imersão de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: avaliação em cipermetrina e amitraz. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 242-245, 2008.

STEFAN, M.I., NOVÈRE, N.L. Cooperative Binding. **PLOS Computational Biology**, v. 9, p. 1003106, 2013.

STROET, M., CARON, B., VISSCHER, K.M., GEERKE, D.P., MALDE, A.K., MARK, A.E. Automated Topology Builder Version 3.0: Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 14, p. 5834-5845, 2018.

SUÁREZ, N.J.P.; CARRILLO, A.C. Eficacia de los extractos hidroalcohólicos de dos plantas sobre garrapatas adultas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 14, n. 1, p. 91, 2013.

SUDHAKAR, S.; CHAND BASHA, S.; SAMPATH KUMAR, K.; HAJIVALLI, S.; SINGOTAM, M.; ANIL KUMAR, B. Anthelmintic Activity of Piperine from Black Pepper. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1013-1017, 2013.

SU, T.; XIE, S.; WEI, H.; YAN, J.; HUANG, L.; LI, X. Synthesis and biological evaluation of berberine–thiophenyl hybrids as multi-functional agents: Inhibition of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and Ab aggregation and antioxidant activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 5830–5840, 2013.

SWALE, D. R., TONG, F., TEMEYER, K. B., LI, A., LAM, P.C.H., TOTROV, M. M., CARLIER, P.R., LEÓN, A.A.P., BLOOMQUIST, J.R. Inhibitor profile of bis(n)-tacrine and N-methylcarbamates on acetylcholinesterase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Phlebotomus papatasi*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, p. 85–92, 2013.

SYMEONIDOU, I.; BONOS, E.; MOUSTAKIDIS, K.; FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKI, E.; PAPAZHARIADOU, M. Botanicals: a natural approach to control ascaridiosis in poultry. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 69, n. 1, p.711-722, 2018.

TAN, F.; WANG, L.; WANG, J.; WU, X.; ZHU, H.; JIANG, L.; TAO, S.; ZHAO, K.; YANG, Y.; TANG, X. Enhanced pesticide sensitivity of novel housefly acetylcholinesterases: a new tool for the detection of residual pesticide contamination. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 305-314, 2011.

TAQVI, S.I.H.; SHAH, A.J.; GILANI, A.H. Insight into the possible mechanism of antidiarrheal and antispasmodic activities of Piperine. **Pharmaceutical Biology**, v.47, n.8, p. 660-664, 2009.

TARRAGO, T.; KICHIK, N.; SEGUÌ, J.; GIRALT, E. The Natural Product Berberine is a Human Prolyl Oligopeptidase Inhibitor. **ChemMedChem**, v. 2, p. 354–359, 2007.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. Parasitos de caprinos e ovinos. In: _____. **Parasitologia Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap.3. p.133-156

TEMEYER, K. B.; DAVEY, R. B.; CHEN, A. C. Identification of a Third *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cDNA Presumptively Encoding an Acetylcholinesterase . **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 259–268, 2004.

TEMEYER, K. B.; OLAFSON, P.U.; BRAKE, D.K.; TUCKOW, A.P.; LI, A.Y.; LEÓN, A.A.P. Acetylcholinesterase of *Rhipicephalus (boophilus) microplus* and *Phlebotomus papatasi*: Gene identification, expression, and biochemical properties of recombinant proteins. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 3, p. 118–123, 2013.

TEMEYER, K. B.; PRUETT, J. H.; OLAFSON, P. U. Baculovirus expression, biochemical characterization and organophosphate sensitivity of rBmAChE1, rBmAChE2, and rBmAChE3 of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 1–2, p. 114–121, 2010.

THIEL, A.; BUSKENS, C.; WOHRLE, T.; ETHEVE, S.; SCHOENMAKERS, A.; FEHR, M.; BEILSTEIN, P. Black pepper constituent piperine: Genotoxicity studies *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v.66, p. 350–357, 2014.

THIEL, A.; ETHEVE, S.; FABIAN, E.; LEEMAN, W.R.; PLAUTZ, J.R. Using *in vitro/in silico* data for consumer safety assessment of feed flavoring additives-A feasibility study using Piperine. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.73, p. 73-84, 2015.

THIRUPURASUNDARI, C.J.; PADMINI, R.; DEVARAJ, S.N. Effect of berberine on the antioxidant status , ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-induced colon cancer in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 177, p. 190–195, 2009.

TINGLE, C.C.D.; ROTHER, J.A.; DEWHURST, C.F.; LAUER, S.; KING, W.J. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 176, p. 1–66, 2003.

TORRES, R.C.; GARBO, A.G.; WALDE, R.Z.M.L. Larvicidal activity of *Persea americana* Mill. against *Aedes aegypti*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.7, S. 1, p. S167-S170, 2014.

TRUONG DO, M.; KIM, H.G.; CHOI, J.H.; KHANAL, T.; PARK, B.H.; TRAN, T.P.; JEONG, T.C.; JEONG, H.G. Antitumor efficacy of piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. **Food Chemistry**, v.141, p. 2591–2599, 2013.

TURNER, N.; LI, J.Y.; GOSBY, A.; TO, S.W.C.; CHENG, Z.; MIYOSHI, H.; TAKETO, M.M.; COONEY, G.J.; KRAEGEN, E.W.; JAMES, D.E.; HU, L.H.; LI, J.; YE, J.M. Berberine and Its More Biologically Available Derivative, Dihydroberberine, Inhibit Mitochondrial Respiratory Complex I A Mechanism for the Action of Berberine to Activate. **Diabetes**, v. 57, n. May, p. 1414–1418, 2008.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. In: Ueno, H., Gonçalves, P.C. (Eds.), Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes, fourth ed. JICA, Tokyo, Japan International Cooperation Agency (p. 150), 1998.

UMAR, S.; SARWAR, A.H.M.G.; UMAR, K.; AHMAD, N.; SAJAD, M.; AHMAD, S.; KATIYAR, C.K.; KHAN, H.A. Piperine ameliorates oxidative stress, inflammation and histological outcome in collagen induced arthritis. **Cellular Immunology**, v.284, p. 51–59, 2013.

VALENTE, P.P.; AMORIM, J.M.; CASTILHO, R.O.; LEITE, R.C.; RIBEIRO, M.F.B. *In vitro* acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 113, p. 417–423, 2014.

VAN DER SPOEL, D., LINDAHL, E., HESS, B., GROENHOF, G., MARK, A.E., BERENDSEN, H.J.C. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, p. 1701–1718, 2005.

VAN HOUTERT, M. F. J.; SYKES, A. R. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 11, p. 1151–1167, 1996.

VASUKI, V.; RAJAVEL, A.R. Influence of short time exposure to na insect growth regulator, hexaflumuron, on mortality and adult emergence of vector mosquitões. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, n.2, p. 275-283, 1992.

VAZIRI, Z.; ABBASSIAN, H.; SHEIBANI, V.; HAGHANI, M.; NAZERI, M.; AGHAEI, I.; SHABANI, M. The therapeutic potential of Berberine chloride hydrate against harmaline-induced motor impairments in a rat model of tremor. **Neuroscience Letters**, v. 590, p. 84–90, 2015.

VELLAICHAMY, L.; BALAKRISHNAN, S.; PANJAMURTHY, K.; MANOHARAN, S.; ALIAS, L.M. Chemopreventive potential of piperine in 7,12 dimethylbenz[a]anthracene-induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.28, p. 11–18, 2009.

VERCRUYSSSE, J.; HOLDSWORTH, P.; LETONJA, T.; BARTH, D.; CONDER, G.; HAMAMOTO, K.; OKANO, K. Anthelmintic efficacy of international harmonisation guidelines. **Veterinary Parasitology**, v, 96, p. 171–193, 2001.

VIEIRA-ARAÚJO, F.M.; RONDON, F.C.M.; VIEIRA, I.G.P.; MENDES, F.N.P.; FREITAS, J.C.C.; MORAIS, S.M. Experimental Parasitology Sinergism between alkaloids piperine and capsaicin with meglumine antimoniate against *Leishmania infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 188, p. 79–82, 2018.

VIJAYAKUMAR, R.S.; SURYA, D.; NALINI, N. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. **Redox Report**, v.9, n.2, p. 105-110, 2004.

VIJVERBERG, H.P.M.; BERCKEN, J.V.D. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. **Toxicology**, v.21, n. 2, p. 105-126, 1990.

WALLER, P. J.; ECHEVARRIA, F.; EDDI, C.; MACIEL, S.; NARI, A.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 3–4, p. 181–187, 1996.

WANG, F.; ZHOU, H.Y.; ZHAO, G.; FU, L.Y.; CHENG, L.; CHEN, J.G.; YAO, W.X. Inhibitory effects of berberine on ion channels of rat hepatocytes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 19, p. 2842–2845, 2004.

WANG, K.; FENG, X.; CHAI, L.; CAO, S.; QIU, F. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. **Drug Metabolism Reviews**, v. 49, n. 2, p. 139–157, 2017.

WANG-SHENG, C.; JIE, A.; JIAN-JUN, L.; LAN, H.; ZENG-BAO, X.; CHANG-QING, L. Piperine attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v.42, p. 44–48, 2017.

WANG X.; SINGH, N.; LI, W. Molecular dynamics simulation of biomolecular interactions. **Integrative, Qualitative and Computational Approaches**, v.1, p. 182-189, 2021.

WANG, Y.; KHEIR, M.M.; CHAI, Y.; HU, J.; XING, D.; LEI, F.; DU, L. Comprehensive Study in the Inhibitory Effect of Berberine on Gene Transcription , Including TATA Box. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–11, 2011.

WATTANATHORN, J.; CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; MUCHIMAPURA, S.; PRIPREM, A.; TANKAMNERDTHAI, O. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 3106–3110, 2008.

WESSLER, I., KIRKPATRICK, C.J., RACKE, K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. **Pharmacology & Therapeutics**, v.77, p. 59–79, 1998.

WOJTYCZKA, R.D.; DZIEDZIC, A.; KEPA, M.; KUBINA, R.; KABALA-DZIK, A.; MULARZ, T.; IDZIK, D. Berberine Enhances the Antibacterial Activity of Selected Antibiotics against Coagulase-Negative Staphylococcus Strains. **Molecules**, v. 19, p. 6583–6596, 2014.

WRIGHT, F.C.; AHRENS, E.H. Cholinesterase Insensitivity: A Mechanism of Resistance in Mexican Strains of *Boophilus microplus* (Acari; Ixodidae) Against Coumaphos. **Journal of Medical Entomology**, v. 25, n. 4, p. 234-239, 1988.

XIANG, J.; YU, C.; YANG, F.; YANG, L.; DING, H. Conformation-activity studies on the interaction of berberine with acetylcholinesterase : Physical chemistry approach. **Progress in Natural Science**, v. 19, n. 12, p. 1721–1725, 2009.

XU, L.; ZHENG, X.; WANG, Y.; FAN, Q.; ZHANG, M.; LI, R.; YE, J.; WU, X.; ZHAO, W.; ZHANG, Y. Berberine protects acute liver failure in mice through inhibiting inflammation and mitochondria-dependent apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 819, n. June 2017, p. 161–168, 2018.

YAFFE, P.B.; DOUCETTE, C.D.; WALSH, M.; HOSKIN, D.W. et al. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 94, n. 1, p. 109–114, 2013.

YALCIN, D.; BAYRAKTAR, O. Inhibition of catechol- O -methyltransferase (COMT) by some plant-derived alkaloids and phenolics. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 3–4, p. 162–166, 2010.

YANG, Y.; CHENG, X.; LIU, W.; CHOU, G.; WANG, Z.; WANG, C. Potent AChE and BChE inhibitors isolated from seeds of *Peganum harmala* Linn by a bioassay-guided fractionation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.168, p. 279–286, 2015a.

YANG, W.; CHEN, Y.H.; LIU, H.; QU, H.D. Neuroprotective effects of piperine on the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease mouse model. **International Journal of Molecular Medicine**, v.36, p. 1369-1376, 2015b.

YIP, N.K.Y.; HO, W.S. Berberine induces apoptosis via the mitochondrial pathway in liver cancer cells. **Oncology Reports**, v. 30, p. 1107–1112, 2013.

YOON, Y.C.; KIM, S.H.; KIM, M.J.; YANG, H.J.; RHYU, M.R.; PARK, J.H. Piperine, a component of black pepper, decreases eugenol-induced Camp and calcium levels in non-chemosensory 3T3-L1 cells. **FEBS Open Bio**, v. 5, p. 20–25, 2015.

YOSHIHARA, E.; MINHO, A.P.; YAMAMURA, M.H. Efeito anti-helmíntico de taninos condensados em nematódeos gastrintestinais de ovinos (*Ovis aries*). Semina: **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, 2013.

YOUNG, A.R; MANCUSO, N; BOWLES, V.M. Biochemical aspects of egg hatch in endo and ectoparasites: potential for retional drug desing. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.861-867, 1999.

ZABRÉ, G.; KABORÉ, A.; BAYALA, B.; KATIKI, L.M.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; TAMBOURA, H.H.; BELEM, A.M.G.; ABDALLA, A.L.; NIDERKORN, V.; HOSTE, H.; LOUVANDINI, H. Comparison of the *in vitro* anthelmintic effects of *Acacia nilotica* and *Acacia raddiana*. **Parasite**, v. 24, n. 44, p. 1-11, 2017.

ZAJAC, A.M.; GARZA, J. Biology, Epidemiology, and Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 36, p. 73-87, 2020.

ZAJAC, A.M. Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics and diagnosis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.22, p.529-541, 2006.

ZAJÍCKOVÁZ, M.; NGUYENZ, L.T.; SKÁLOVÁ, L.; STUHLÍKOVÁ, L.R.; MATOUŠKOVÁ, P. Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 2, p. 430-437, 2020.

ZARAI, Z.; BOUJELBENE, E.; SALEM, N.B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **Food Science and Technology**, v.50, p. 634-641, 2013.

ZARZA-ALBARRÁN, M.A.; OLMEDO-JUÁREZ, A.; ROJO-RUBIO, R.; GIVES, P.M.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; TAPIA-MARURI, D.; MONDRAGÓN-ANCELMO, J.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, C.; BLÉ-GONZÁLEZ, E.A.; ZAMILPA, A. Galloyl flavonoids from *Acacia farnesiana* pods possess potent anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae. **Journal of Ethnopharmacology**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112402>

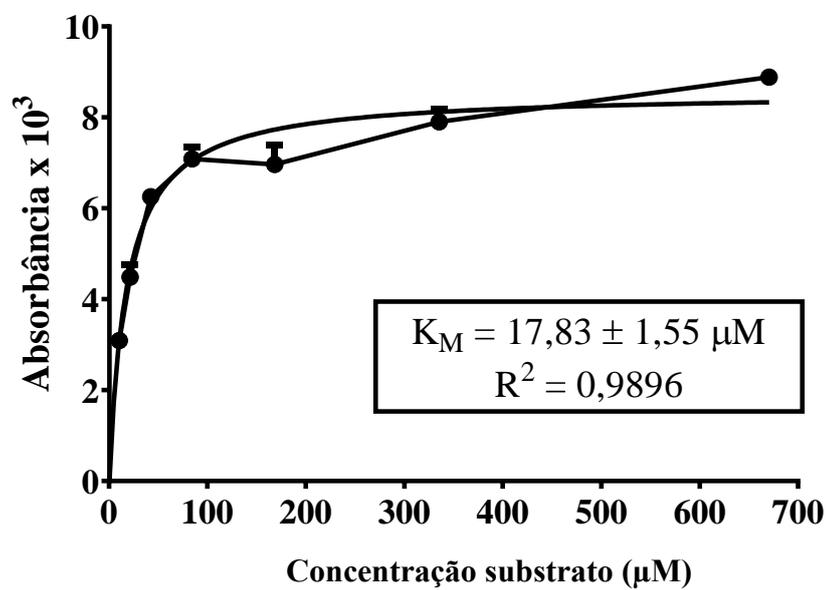
ZHANG, J.; ZHU, X.; LI, H.; LI, B.; SUN, L.; XIE, T.; ZHU, T.; ZHOU, H.; YE, Z. Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2 / M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. **International Immunopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 50–58, 2015.

ZHANG, Z.; CHEN, Y.; DENG, J.; JIA, X.; ZHOU, J.; LV, H. Solid dispersion of berberine – phospholipid complex / TPGS 1000 / SiO₂: preparation, characterization and *in vivo* studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 465, n. 1–2, p. 306–316, 2014.

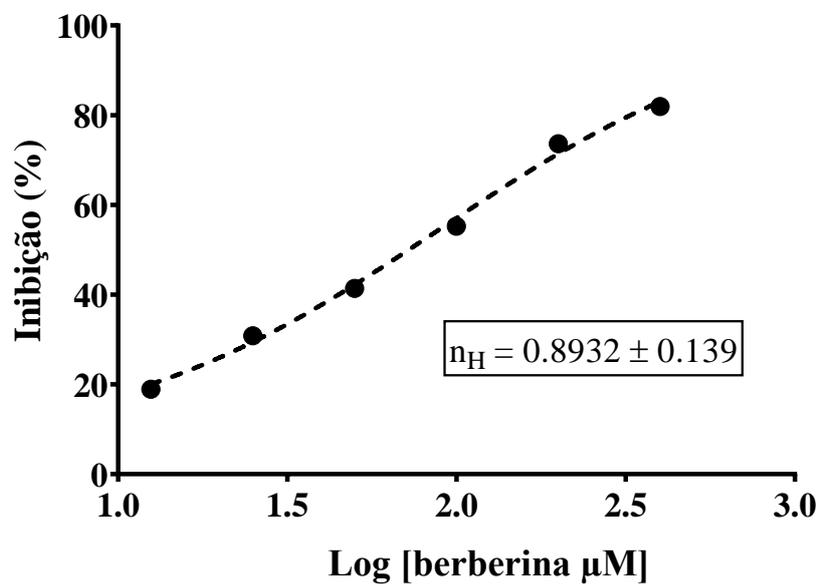
ZHANG, Z.; LI, X.; LI, F.; AN, L. Berberine alleviates postoperative cognitive dysfunction by suppressing neuroinflammation in aged mice. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 426–433, 2016.

ZHAO, X.; YEH, J.Z.; SALGADO, V.L.; NARAHASHI, T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 192–201, 2004.

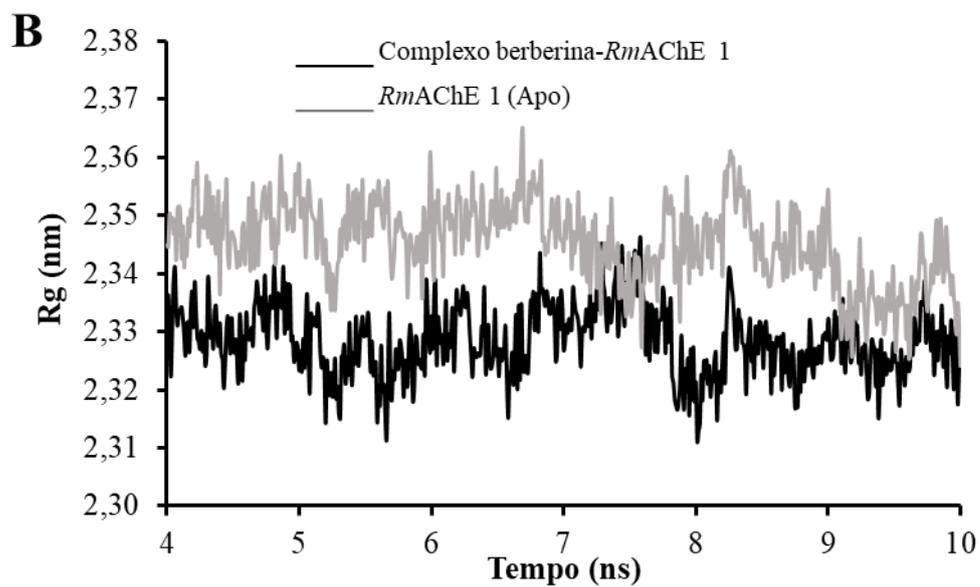
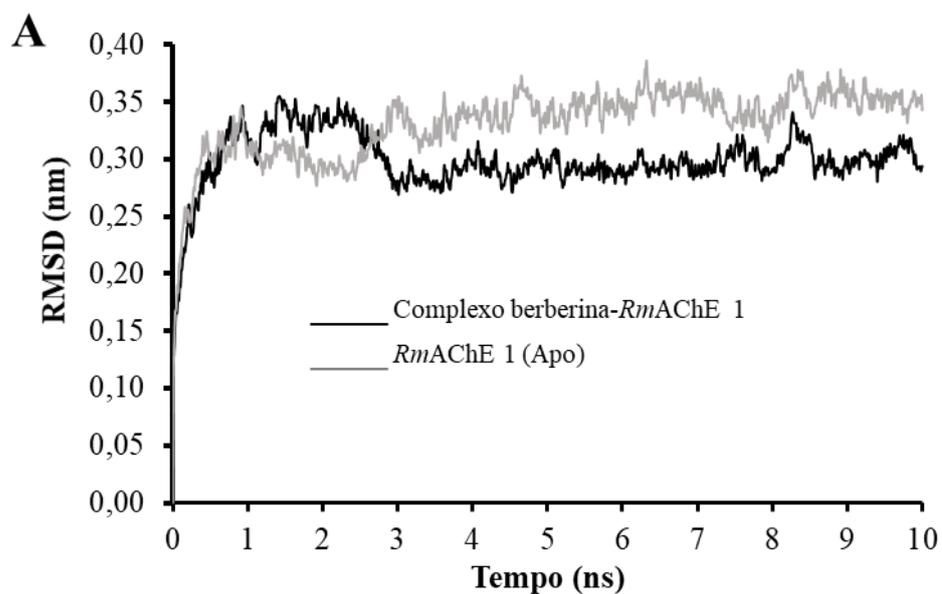
APÊNCICE A – Curva de absorção à 412 nm versus concentração do substrato (acetilticolina μM).



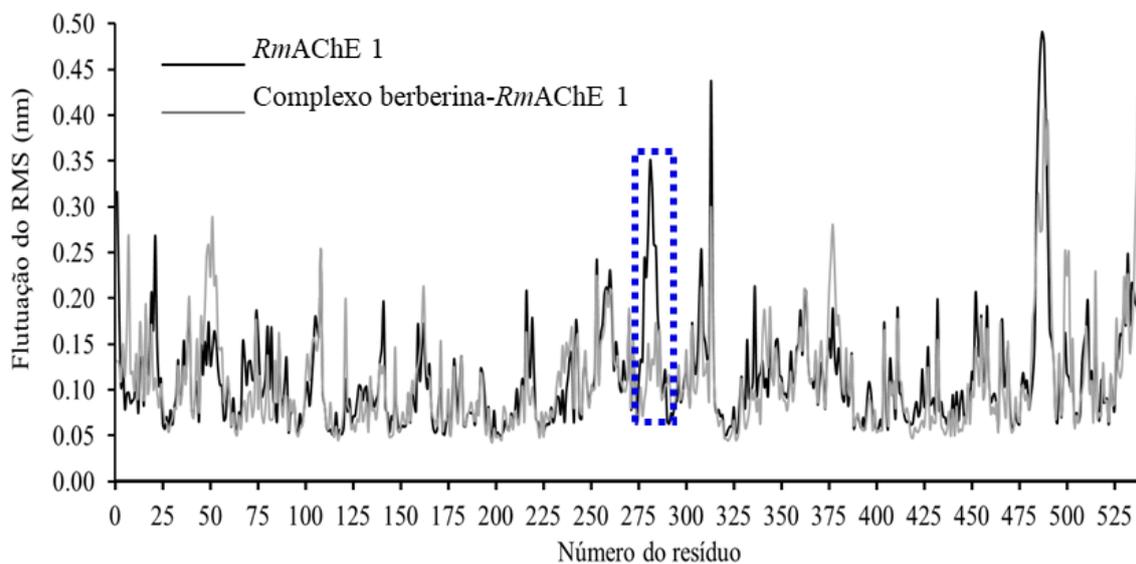
APÊNDICE B – Log da concentração do inibidor (berberina μM) em função do percentual de inibição (%).

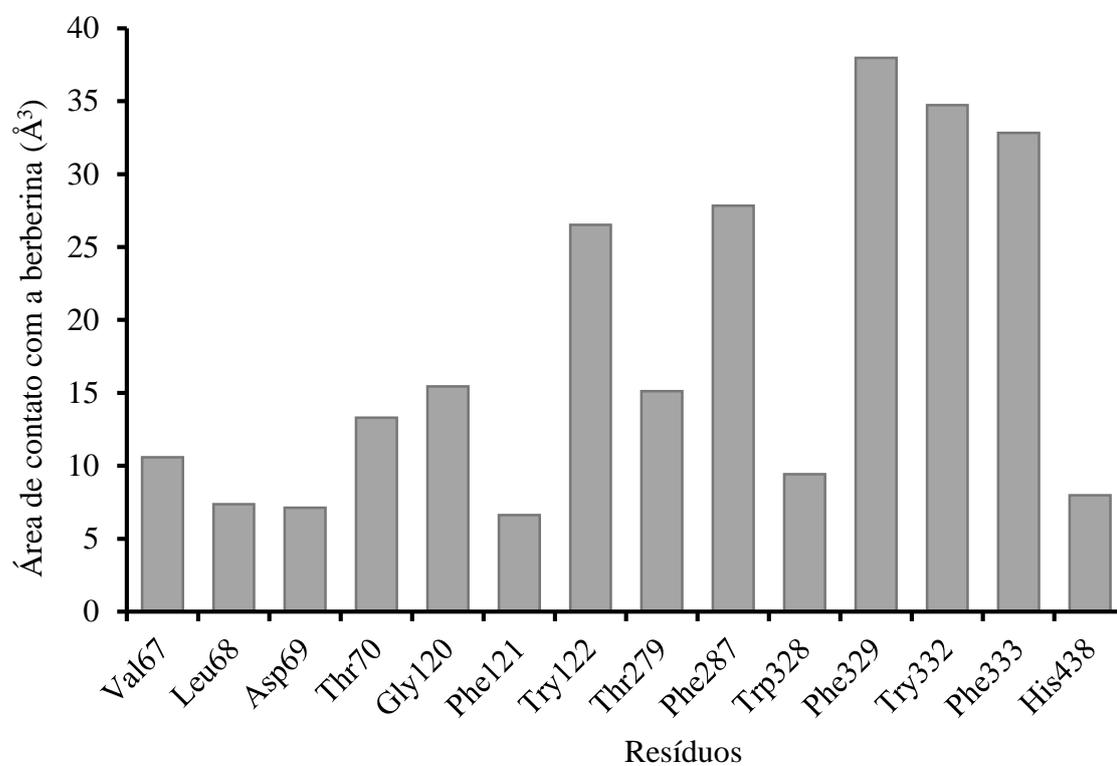


APÊNDICE C – Valores de desvio médio padrão (RMSD) na simulação de 10 ns (A) e valores do raio de giro (Rg) na simulação de 4-10 ns (B) para *RmAChE 1* (*apo*) e o complexo com a berberina.



APÊNDICE D – Flutuação Média (RMSF) de resíduos de *RmAChE* 1 (*apo*) e do complexo com berberina.



APÊNDICE E - Área de contato (Å³) entre resíduos da *RmAChE 1* e berberina.

ANEXO 1 – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) PARA OS ESTUDOS CARRAPATICIDA E ANTICOLINESTERÁSICO



Universidade Federal da Bahia
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comitê de Ética no Uso de Animais

Av. Ademar de Barros, 500 – Ondina-40170-110 Salvador-BA
Fone: (071) 3283-6704/6708/ - Fax: 3283-6718
E-mail: escmev@ufba.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Atividade acaricida e anticolinesterásica de alcaloides sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Estudos *in vitro* e *in silico*.**”, registrada com o nº **74/2018**, sob a responsabilidade do **Profa. Maria José Moreira Batatinha**, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, **em reunião de 04.09.2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/09/2018 à 01/10/2020
Espécie/linhagem/raça	Bovinos/SRD
Nº de animais	4
Peso/Idade	200kg/12 meses
Sexo	Macho
Origem	Fazenda experimental da UFBA, São Gonçalo-BA.

Salvador, 17/09/2018.


Prof. Claudio de Oliveira Romão
Coordenador CEUA/EMEVZ-UFBA

ANEXO 2 – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) PARA OS ESTUDOS ANTI-HELMÍNTICOS



Universidade Federal da Bahia
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comitê de Ética no Uso de Animais
 Av. Ademar de Barros, 500 – Ondina-40170-110 Salvador-BA
 Fone: (071) 3283-6704/6708/ - Fax: 3283-6718
 E-mail: escmev@ufba.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação in vitro da atividade anti-helmíntica dos alcaloides harmalina e piperina sobre nematoides gastrintestinais de caprinos**”, registrada com o nº **38/2018**, sob a responsabilidade do (a) **Prof. Maria José Moreira Batatinha**, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, **em reunião de 06.06.2018**.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2018 à 31/07/2019
Especie/linhagem/raça	<i>Caprina</i>
Nº de animais	02
Peso/Idade	15 Kg / 1 Ano
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda Experimental de Entre Rios – EMEVZ - UFBA

Salvador, 06 / 06 / 2018


 Prof. Lucio Leopoldo Aragão da Silva
 -Coordenador-

P/ Prof. Cláudio de Oliveira Romão
 Coordenador CEUA/EMEVZ-UFBA