



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020008095-4 A2



(22) Data do Depósito: 23/04/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 03/11/2021

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO ACARICIDA, USO DESSA COMPOSIÇÃO, USO DE PELO MENOS UM INIBIDOR DE PROTEÍNA DO METABOLISMO DE COLESTEROL DE CARRAPATO E PROCESSO DE CONTROLE DE UMA POPULAÇÃO DE CARRAPATOS

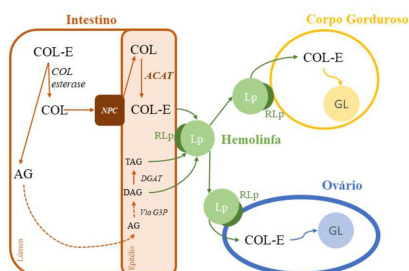
(51) **Int. Cl.:** A01N 43/34; A01N 41/04; A01P 7/02.

(52) **CPC:** A01N 43/34; A01N 41/04.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

(72) **Inventor(es):** ITABAJARA DA SILVA VAZ JUNIOR; MARINA AMARAL XAVIER; CARLOS TERMIGNONI.

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO ACARICIDA, USO DESSA COMPOSIÇÃO, USO DE PELO MENOS UM INIBIDOR DE PROTEÍNA DO METABOLISMO DE COLESTEROL DE CARRAPATO E PROCESSO DE CONTROLE DE UMA POPULAÇÃO DE CARRAPATOS. A presente invenção refere-se a uma composição acaricida e a um processo para o controle seletivo de carrapatos, de forma a substituir ou complementar o uso de outros acaricidas pelo uso de inibidores de proteínas do metabolismo de colesterol, mais especificamente pelo uso de inibidores das proteínas Niemann-Pick C (NPC) ou acil-CoA aciltransferase (ACAT), especificamente de ezetimiba e avasimiba. A presente invenção se situa nos campos da Química, Agropecuária e Veterinária.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSIÇÃO ACARICIDA, USO DESSA COMPOSIÇÃO, USO DE PELO MENOS UM INIBIDOR DE PROTEÍNA DO METABOLISMO DE COLESTEROL DE CARRAPATO E PROCESSO DE CONTROLE DE UMA POPULAÇÃO DE CARRAPATOS

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção refere-se a uma composição acaricida e a um processo para o controle seletivo de carrapatos, de forma a substituir ou complementar o uso de outros acaricidas pelo uso de inibidores de proteínas do metabolismo de colesterol, mais especificamente pelo uso de inibidores das proteínas Niemann-Pick C (NPC) ou acil-CoA aciltransferase (ACAT), especificamente de ezetimiba e avasimiba. A presente invenção se situa nos campos da Química, Agropecuária e Veterinária.

Antecedentes da Invenção

[0002] Juntamente com os mosquitos, os carrapatos são os principais vetores de agentes de doenças humanas e animais. Os mosquitos são os vetores de patógenos que infectam mais pessoas e que causam as infecções mais severas humanas e animais (como malária, dengue e febre amarela). Por outro lado, os carrapatos transmitem uma variedade ainda maior de agentes patogênicos, incluindo vírus, bactérias e protozoários.

[0003] O impacto dos carrapatos na pecuária está relacionado tanto ao parasitismo quanto às doenças causadas pelos patógenos que transmitem. Mesmo se não for considerado o papel dos carrapatos como vetores de patógenos, somente os efeitos diretos causados pela infestação destes parasitos são prejudiciais para os animais e suficientes para afetar economicamente a produção pecuária. As infestações por carrapatos afetam a produção animal principalmente nas regiões subtropicais do globo, como África, Ásia, América Latina e Oceania.

[0004] Especificamente, a infestação pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* é um dos principais problemas econômicos que afetam a produção bovina no Brasil. Estima-se que as potenciais perdas econômicas devido a esta espécie de carrapato, considerando bovinos de corte e de leite não-tratados, seriam de 3,24 bilhões de dólares no Brasil. As características climáticas brasileiras são um dos fatores que favorecem o desenvolvimento deste parasito e, apesar da diversidade no clima entre os estados, o *R. microplus* está presente em todos eles.

[0005] A maioria dos acaricidas, atualmente disponíveis, atua sobre o sistema nervoso em sítios de sinapse ou axônios, como por exemplo, na acetilcolinesterase, nos canais de sódio controlados por voltagem, nos canais de cloro controlados por glutamato ou ácido gama-aminobutírico, nos receptores de acetilcolina e nos receptores de octopamina. Ao atingir seu alvo, a droga causa, de maneira geral, um estímulo exacerbado ou interrupção do impulso nervoso e, conseqüentemente, a morte do organismo. Outro alvo é o crescimento dos ácaros, com uso de inibidores da biossíntese de quitina. Para insetos, não para carrapato, existem também análogos do Hormônio Juvenil.

[0006] Atualmente, o uso de acaricidas químicos é o método mais usado para o controle do carrapato *R. microplus*. As principais classes de acaricidas usadas são piretroides, organofosfatos, amidinas, fenilpirazoles, reguladores de crescimento e lactonas macrocíclicas. No entanto, resíduos químicos derivados desses acaricidas contaminam o ambiente e os produtos destinados ao consumo humano e demais animais provenientes de animais tratados com essas moléculas. Além disso, o uso extensivo de acaricidas químicos é fator importante na seleção de populações de carrapato resistentes a essas drogas, e essa resistência torna o controle químico ineficaz como a única estratégia para um programa sustentável de controle de carrapatos e das doenças transmitidas por carrapatos. Assim, é crescente a necessidade de estudos que levem ao aprimoramento dos métodos de controle que incluem a busca de acaricidas químicos que causem menores efeitos colaterais aos hospedeiros.

[0007] Os avanços nas tecnologias “ômicas” (como genômica, transcritômica e proteômica) oferecem uma abordagem na busca de componentes de vias fisiológicas que são cruciais para o desenvolvimento do parasito e que podem ser úteis para o desenvolvimento de métodos de controle do carrapato.

[0008] Oôgenese é o termo utilizado para o processo de desenvolvimento das células sexuais femininas (oócitos) nos ovários, sendo que a formação dos oócitos é a etapa inicial do processo de embrionário. Por outro lado, vitelogênese é o processo em que o ovário e tecidos extraovarianos produzem precursores proteicos e outras moléculas que são transportados e acumulados dentro dos oócitos.

[0009] O ovário do *R. microplus* é uma estrutura em formato de U, localizado na região posterior, contendo um par de ovidutos, útero, tubo muscular, vagina, receptáculo seminal, glândulas acessórias tubulares e lobulares, e abertura genital. Em 1972, o pesquisador Balashov propôs uma categorização da oôgenese de carrapatos de acordo com o desenvolvimento individual de cada oócito, considerando aparência do citoplasma, presença de vesícula germinal, grânulos de vitelo e córion. No entanto, após a fertilização, o ovário apresenta oócitos em todos os estágios de desenvolvimento e que são processados simultaneamente, o que caracteriza um desenvolvimento assincrônico. Por isso, utilizando como modelo o carrapato *Amblyomma hebraeum*, foi proposto uma categorização que inclui o grau de desenvolvimento do oócito e o tamanho do ovário.

[0010] Durante o período de pré-postura, mudanças significativas ocorrem no trato genital da fêmea. As contrações peristálticas dos músculos cervicais da vagina empurram o ovo até o vestíbulo da vagina, enquanto secreções das glândulas lobulares são depositadas na casca do ovo. Quando o ovo encontra-se no vestíbulo da vagina, há a expansão e prolapso deste pelo poro genital e o ovo é imediatamente entregue ao órgão de Gené, o qual finaliza a postura do ovo recobrando-o com uma camada de cera que é essencial para o desenvolvimento dos ovos. O órgão de Gené é uma estrutura exclusiva de

carrapatos Ixodidae e Argasidae, não estando presente em outros artrópodes.

[0011] A importância do órgão de Gené para a postura dos ovos é conhecida desde as primeiras descrições sobre postura de ovos de carrapatos, no ano de 1848 por Gené, possivelmente em estudo com o carrapato *Ixodes ricinus*. O fato de estar ausente em machos também evidencia a relevância deste órgão para a postura de ovos. Gené observou (1848) que ao espetar o GO com uma agulha os ovos liberados murchavam em seguida. Também, observou-se que ao evitar o contato entre GO e os ovos liberados pelo poro genital, por meio do toque ao órgão com um bastão de vidro, o GO retraía rapidamente e os ovos murchavam. Assim, a secreção de cera pelo GO é essencial para a viabilidade dos ovos no ambiente, mas não para que ocorra a postura destes.

[0012] Os ovos de carrapato só se desenvolvem no ambiente quando estão recobertos pela camada de cera secretada pelo GO. Esta cera, além de protegê-los da perda de água e das condições de humidade e temperatura do ambiente, também possui propriedade antimicrobiana. Ainda, a viscosidade da cera permite que os ovos se mantenham agrupados, o que reduz a superfície de exposição ao ambiente e possivelmente aumenta as demais propriedades protetoras.

[0013] A cera dos ovos é composta principalmente por alcanos de cadeia longa, ésteres de ácidos graxos (AG) insaturados, ésteres de colesterol (COL-E) e colesterol livre (COL). Em estudo comparativo entre a composição da cera dos ovos e do GO, foi observado que os componentes lipídicos são os mesmos, porém diferem na quantidade de alguns dos componentes. Por exemplo, o GO apresenta uma maior proporção de ésteres de AG insaturados do que a cera dos ovos, indicando que estes lipídeos podem ser oxidados durante ou logo após a postura dos ovos. A insaturação desses lipídeos diminui a viscosidade da cera, e assim a função dos braços do GO em recobrir o ovo com cera seria facilitada. Logo após a postura, os lipídeos seriam oxidados, assim diminuindo o grau de insaturação e aumentando o ponto de fusão da cera, tornando-a mais viscosa para a aglomeração dos ovos. No entanto, há possibilidade de que esta diferença

na proporção de lipídeos entre GO e cera seja devido à também extração dos lipídeos das membranas das células. Este mesmo estudo utilizou a injeção de C¹⁴-acetato em fêmeas durante a postura de ovos para analisar a biossíntese de lipídeos da cera do ovo. Foi sugerido que a síntese de alcanos ocorre no GO pela elongação de AG seguida por descarboxilação, devido a incorporação do acetato em AG e alcanos, juntamente com a alta proporção de alcanos de cadeia longa recuperados da cera do ovo comparado ao GO.

[0014] Uma atividade antimicrobiana em extrato de ovos de carrapato foi inicialmente descrita em *R. microplus*. Foi identificada uma molécula que consiste em uma unidade de COL com um resíduo de *L*-isoleucina ligado via ligação amina ao C25 (cadeia lateral do COL) e um grupamento sulfato substituindo a hidroxila no C3 (porção polar do COL). O composto foi denominado boophilina, e possui atividade antimicrobiana contra fungos (*Cladosporium cucumerinum*) e contra bactérias por inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Posteriormente, foi extraída a boophilina da cera dos ovos de *R. microplus* e identificada uma atividade antibiofilme (biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*) e bactericida sobre *Staphylococcus epidermidis*, ambos patógenos oportunistas frequentemente associados a infecções hospitalares. O mecanismo de ação dessa molécula em inibir a formação de biofilme de *P. aeruginosa* envolve diminuição na transcrição dos genes *cdrA* e *fliC*. Enquanto *fliC* codifica para flagelina, uma proteína estrutural do filamento flagelar, *cdrA* codifica para uma proteína extracelular envolvida na formação do molde de matriz de biofilme. Por outro lado, o mecanismo de ação da boophilina sobre *S. epidermidis* é bactericida. Ainda, outras frações do extrato de cera de ovos de *R. microplus* possuem atividade antibacteriana, por inibição do crescimento de *Micrococcus luteus*, e atividade antifúngica (*C. albicans*). No entanto, os compostos responsáveis por estas atividades não são conhecidos.

[0015] A cera de ovos de outras espécies de Ixodidae também possui atividade antimicrobiana. Atividade antiviral (vírus influenza e pirconavírus) foi identificada em extrato da cera dos ovos de *A. cajennense*. Em *A. hebraeum*, o ovo íntegro

possui atividade antibacteriana que inibe o crescimento de bactérias Gram negativas (*E. coli*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia vietnamiensis*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*). Por outro lado, o extrato da cera inibe o crescimento de bactérias Gram positivas (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *M. luteus*). O efeito antibacteriano da fase aquosa do extrato da cera foi estudado usando como modelo *S. epidermidis*. A atividade bactericida identificada possivelmente deve-se a um aumento na permeabilidade da membrana celular, já que a membrana se torna mais fina, porém não é rompida. O componente da fase aquosa responsável por esta atividade não foi identificado, mas sabe-se que é resistente ao aquecimento e a mudanças de pH. Na fase orgânica do extrato de cera foi identificado que AG estão associados a atividade de inibição de crescimento bacteriano. Os AG C16:1 e C18:2, ou lipídeos que os contenha, são ativos principalmente contra bactérias Gram positivas, sendo que em maiores concentrações também possuem atividade contra algumas bactérias Gram negativas. Nenhuma atividade antibacteriana foi identificada em frações contendo COL-E ou COL.

[0016] Foi proposto que a atividade antibacteriana de AG ocorre principalmente por alvejarem as membranas celulares bacterianas e interromperem processos cruciais para a proteção e função celular. Devido a sua característica anfipática, os AG provocam desestabilização de membrana e formação de poros e, conseqüentemente, um aumento na permeabilidade e lise celular. Dentre os processos vitais para as células bacterianas que podem ser interrompidos pelos AG estão a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa, os quais são essenciais para produção de energia pelas aeróbias. Como ambos processos são interconectados, os AG podem interromper a cadeia transportadora de elétrons por ligar-se a carreadores de elétrons ou alterar a integridade da membrana, assim como interferir na fosforilação oxidativa por diminuir o potencial de membrana e o gradiente de prótons. Ainda, AG podem diretamente inibir enzimas das membranas, como glicosiltransferases. Para compreender a formação da cera e sua função biológica, é fundamental expandir

os conhecimentos do metabolismo de lipídeos em carrapatos.

[0017] O metabolismo de lipídeos é mais bem conhecido nos organismos vertebrados do que nos invertebrados. Lipídeos constituem a bicamada que compõe as membranas celulares, as quais formam organelas especializadas dentro da célula e regulam o transporte entre os ambientes intra e extracelular. Além desta função estrutural, também tem função de armazenamento, por exemplo, os AG e os triacilgliceróis (TAG) são fontes de energia para a musculatura cardíaca e esquelética, enquanto os esteroides são fontes para produção de hormônios pelas gônadas e adrenais. Mais especificamente, lipídeos fazem parte do surfactante pulmonar (fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, COL e COL-E) que funciona reduzindo a tensão superficial entre a interface ar-líquido; formam a bile (COL, fosfolipídeos e sais biliares) para facilitar a excreção de metabólitos; fazem parte da mielina (majoritariamente COL, galactocerebrosideo e plasmalogênio de etanolamina) garantindo a condução da transmissão nervosa. Ainda, os lipídeos são também moléculas sinalizadoras, servindo como alvo das cinases lipídicas que perpetuam cascatas sinalizadoras, substrato para ciclooxigenases e enzimas relacionadas a geração de prostaglandinas.

[0018] Assim como nos vertebrados, os lipídeos têm papéis diversificados nos invertebrados, como constituintes das estruturas celulares, hormonais, armazenamento de energia, produção de ovos e metamorfose. No entanto, o metabolismo lipídico nestes organismos é menos complexo do que em vertebrados. Como a maioria dos estudos de metabolismo e transporte de lipídeos foi realizado em insetos, este conhecimento é extrapolado e utilizado para embasar os estudos nas demais classes de artrópodes.

[0019] O metabolismo de lipídeos em carrapatos é ainda menos conhecido do que em insetos e insetos hematófagos. Assim como em outros aspectos fisiológicos, os estudos de metabolismo de lipídeos em carrapatos são baseados no conhecimento em insetos. Contudo, da mesma forma que há diferenças importantes no metabolismo de lipídeos entre os insetos e os insetos

hematófagos, possivelmente isto também se aplica com relação aos carrapatos.

[0020] Um dos fatores que podem influenciar no metabolismo de lipídeos em carrapatos é a infecção por patógenos. No corpo gorduroso do carrapato *R. microplus*, o metabolismo de lipídeos pode ser modulado por infecção pelo fungo *M. anisopliae*. Enquanto a infecção aumenta a síntese de TAG, apenas a presença física do fungo (morto por calor) é suficiente para aumentar os níveis de AG. Este mecanismo está relacionado com a ativação das vias AMPK (proteína quinase ativada por AMP), que promove a inibição da síntese de TAG por fosforilar (ativando) a ACC, e ERK (proteína quinase regulada por sinalização extracelular), que é um regulador geral de vias metabólicas, inclusive lipídica. Ao passo que a inoculação do fungo morto aciona as vias AMPK e ERK, a infecção pelo fungo ativado leva à inibição destas vias. Possivelmente, isto ocorre devido a um mecanismo do fungo que possibilita infectar com eficiência o hospedeiro.

[0021] A análise do lipidoma da superfície de carrapatos *Amblyomma americanum* revelou a presença semioquímicos de baixa volatilidade em carrapatos (machos e fêmeas) em diferentes estados de alimentação. Alguns componentes lipídicos estão apenas em fêmeas que se alimentaram ao lado de machos, como desidrodesoxiecdisona, um feromônio sexual derivado da ecdisona; um ácido graxo 20:4 (possivelmente ácido araquidônico), um feromônio sexual; e decosenamida, que não tem uma função conhecida na fisiologia de carrapatos. COL-E estão na superfície de fêmeas e machos alimentados lado a lado, possivelmente são componentes de feromônios para acasalamento, assim como ésteres de ceras, que podem ser componentes da cutícula para dar maior elasticidade, ou serem componentes da cera que recobre os ovos nas fêmeas. Em machos e fêmeas não alimentados, destaca-se a presença de dehidrocolesterol esterificado, possivelmente relacionado a sobrevivência dos carrapatos na busca por hospedeiro. Por outro lado, exclusivamente em machos alimentados sem a presença de fêmeas, há esfingolipídeos e glicerofosfolipídeos, possivelmente derivados do desenvolvimento espermático.

[0022] A captação, incorporação e conversão de lipídios simples em lipídios complexos foi estudada durante a postura de ovos de *R. microplus* pela injeção de ácido graxo radioativo ([9,10-³H] ácido palmítico) na hemolinfa de fêmeas um dia após o término da hematofagia. Após 30 minutos da injeção, houve uma diminuição da radioatividade na hemolinfa e aumento no corpo gorduroso, sugerindo uma alta atividade metabólica neste órgão devido a digestão do sangue e preparo para o início da postura. Em menor proporção (duas a quatro vezes menor), ocorreu aumento de radioatividade no intestino, ovário e GO. No segundo dia de postura de ovos, ou seja, no quarto dia após o fim da hematofagia, ocorreu um pico de radioatividade no corpo gorduroso e no GO, enquanto a máxima radioatividade no ovário ocorre no quarto dia de oviposição. Isso sugere a existência de um tráfego direto de lipídeos do corpo gorduroso para o ovário.

[0023] Logo no início da postura (segundo dia) há uma alta conversão de [9,10-³H] ácido palmítico em lipídeos mais complexos (FL, MAG, DAG e TAG) no corpo gorduroso, sendo FL e TAG em maior concentração. Isso leva à proposição da hipótese que estes lipídeos são usados como fonte de energia e como componentes de membranas durante o desenvolvimento dos ovos. No ovário, o pico de conversão ocorre no quarto dia de postura, quando além da conversão para esses mesmos lipídeos mais complexos, também COL-E estão presentes. Assim como em insetos hematófagos, é possível que os FL sejam usados como suporte estrutural e metabólico para a formação de ovos, e os DAG como fonte de energia. Por outro lado, no GO o AG radioativo incorporado permaneceu na forma AG livre, com pico de detecção no sexto dia de postura. Possivelmente, estes AG livres sejam usados para a formação da cera secretada pelo GO.

[0024] Proteínas transportadoras presentes na hemolinfa de carrapatos foram descritas em *R. microplus* (HeLp, Heme Lipoprotein), *Dermacentor variabilis* e *Ornithodoros parkeri*. HeLp, presente em machos e fêmeas adultas, contém 3% de carboidratos e 33% de lipídeos (55% lipídeos neutros e 44% FL) e carrega o heme obtido na dieta aos tecidos dos carrapatos. CP de *D. variabilis*, presente

em machos e fêmeas adultas, é uma lipo- glico- heme-proteína que também transporta o heme da dieta, e contém COL, FL, MAG, TAG e AG livres. Uma proteína carreadora de lipídeos na hemolinfa de carrapato foi identificada em *R. microplus* (RmLCP), a qual contém COL (~40%), FL, hidrocarbonetos e DAG. Esta proteína carreadora parece estar envolvida no transporte de AG e COL para o ovário e o GO.

[0025] Tendo em vista que o entendimento sobre o metabolismo de lipídeos em carrapatos ainda é limitado e que estes não sintetizam COL e, portanto, obtém o COL precursor de moléculas como hormônios e antimicrobianos exclusivamente através da dieta, o metabolismo do COL em insetos (Fig. 2) e insetos hematófagos serve como modelo para extrapolar as informações em carrapatos.

[0026] Em mamíferos, a proteína transmembrana Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) tem papel chave na absorção do COL da dieta e na reabsorção de ácidos biliares, sendo expressa nos enterócitos e, em humanos, também nos hepatócitos. No lúmen intestinal, o COL-E é emulsificado pelos sais biliares, formando micelas. As lipases intestinais hidrolisam COL-E em COL, o qual é endocitado pelo enterócito via NPC1L1. Uma vez internalizado nos enterócitos, o COL é entregue ao retículo endoplasmático e pode ser enviado de volta ao lúmen via esterolinas (transportadores ABC, que usam ATP para executar o transporte) ou ser re-esterificado a COL-E pela acil-CoA aciltransferase (ACAT). O COL-E é então armazenado em gotículas de lipídeos ou empacotado em quilomícrons juntamente com TAG. A ACAT é uma proteína de membrana integral presente em pequenas quantidades no retículo endoplasmático, a qual é alostericamente ativada pelo COL, esterificando-o à um AG-acil-CoA de cadeia longa.. A atividade da ACAT está implicada em vários processos fisiológicos, como (i) no armazenamento de COL-E nas gotículas de lipídeos, o qual quando em excesso leva a formação de arterosclerose no endotélio; (ii) os COL-E formados estão envolvidos na montagem e secreção de lipoproteínas; (iii) durante a absorção do COL da dieta no intestino delgado, a formação de COL-

E intracelular cria um gradiente de difusão de COL pela membrana do enterócito.

[0027] NPC1L1 é inibido por ezetimiba e, assim, a absorção de COL é prejudicada . Ezetimiba liga no segundo loop extracelular de NPC1L1 (WEINGLASS et al., 2008). Após ser administrado *in vivo*, ezetimiba sofre glicuronidação e é reciclado até o local alvo no intestino, e este metabólito glicuronídeo é pelo menos tão potente quanto a própria ezetimiba em relação à inibição da captação de COL. Como resultado da inibição de NPC1L1 por ezetimiba há redução na formação e secreção de quilomícrons (lipoproteínas) e a inibição da reabsorção de COL biliar, assim esgotando os estoques de COL no fígado. A ezetimiba foi aprovada para uso no tratamento de hipercolesterolemia humana e é geralmente usado em conjunto com estatinas (inibidores de hidroximetilglutaril-CoA redutase, enzima da via de síntese de COL).

[0028] Uma proteína similar à NPC1L1 foi identificada em *D. melanogaster* e uma mutação no gene *npc1b* provoca uma baixa na absorção de COL no intestino das moscas, bem como a morte das larvas nos primeiros estágios de desenvolvimento. Por outro lado, uma mutação combinada dos genes *npc1a* e *npc1b* não leva a alteração na absorção de COL, sugerindo uma via alternativa de absorção de COL.

[0029] O efeito da inibição do metabolismo de COL por ezetimiba foi estudado em protozoários. Em *Cryptosporidium parvum*, o tratamento com ezetimiba diminuiu o crescimento do parasito de forma dose-dependente. Foi demonstrado que *C. parvum* desvia o COL micelar internalizado por NPC1L1 nos enterócitos e, assim, o COL da dieta contribui em certa medida para o desenvolvimento do parasita. Foi proposta uma hipótese sugerindo que, além de NPC1L1, outros receptores estão envolvidos na absorção de COL e são sensíveis a inibição pelo ezetimiba. O potencial da ezetimiba em ter atividade anti-*Giardia lamblia* foi estudado *in silico*, usando *docking* (atracamento) molecular. Foi proposto que um possível alvo da ezetimiba seria a região entre os aminoácidos 149 e 150 da LCAT (lecitina-colesterol aciltransferase), enzima que participa do transporte reverso de COL (de tecidos periféricos para o fígado) e está presente na

superfície de lipoproteínas (principalmente as de alta densidade), onde há esterificação de COL. No entanto, essa hipótese ainda não foi validada experimentalmente. O tratamento com ezetimiba causa alterações morfológicas em promastigotas de *Leishmania amazonensis*, que parecem ocorrer por efeito na interferência no metabolismo de esteroides, especificamente da C14-desmetilase. Quando testado *in vivo*, a ezetimiba além de diminuir a carga parasitária de *L. amazonensis*, também diminuiu as lesões cutâneas causadas pelo parasitismo, um efeito similar ao que ocorre com o tratamento da leishmaniose cutânea usando cetoconazol.

[0030] O inibidor avasimiba tem como alvo a ACAT. Efeitos como, por exemplo, (i) a redução de macrófagos espumosos (macrófagos ricos em conteúdo lipídico) *in vitro* por diminuir a captação de LDL oxidada e aumentar o efluxo de COL; (ii) redução da secreção de apolipoproteína B (apolipoproteína primária do LDL) pelo fígado; (iii) sua alta biodisponibilidade oral e; (iv) baixa toxicidade, justificaram a realização de ensaios clínicos com este inibidor. No entanto, os efeitos da avasimiba em baixar os níveis de COL só foram observados quando coadministrado com estatinas, o que foi considerado insatisfatório para fins terapêuticos. Por outro lado, o efeito inibitório da ACAT pela avasimiba vem sendo estudado na doença de Alzheimer, por reduzir a deposição de placas amiloides; na terapia antitumoral por reduzir a proliferação celular e induzir apoptose; e na terapia da hepatite C, por impedir a montagem das partículas do vírus.

[0031] O efeito da inibição de ACAT pela avasimiba também foi estudado em protozoário, no *Trypanosoma cruzi*, que obtém COL do hospedeiro ou do meio de cultivo. Em condições de suprimento lipídico, epimastigotas de *T. cruzi* usam os estoques intracelulares de COL para manter o funcionamento basal celular, enquanto quando há disponibilidade de lipídeos, estes usam a esterificação de COL para armazenamento de COL-E em compartimentos específicos (reservossomos). Esta atividade de esterificação foi demonstrada ser sensível ao tratamento com avasimibe, de modo dose-dependente, sugerindo que *T. cruzi*

possui uma enzima semelhante a ACAT.

[0032] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0033] Existe uma busca constante por novas substâncias com ação acaricida que possam controlar com eficácia os carrapatos, que tenham alvos mecanismos diferentes dos acaricidas em uso, e ao mesmo tempo, possam ser aplicados em baixas dosagens. A identificação de novos alvos e drogas é essencial para conseguir validar moléculas que tenham mecanismos de ação diferentes e com isto serem eficazes em carrapatos resistentes a drogas já em uso.

Sumário da Invenção

[0034] Dessa forma, a presente invenção resolve os problemas do estado da técnica a partir de um processo de controle seletivo de populações de carrapato usando inibidores das enzimas do metabolismo de colesterol, como a ezetimiba e avasimiba. Em modalidades não restritivas da invenção, o uso dos referidos inibidores pode ser: na fabricação de uma composição carrapaticida de uso tópico, diretamente sobre carrapato ou de uso oral, pelo hospedeiro a ser parasitado pelo carrapato.

[0035] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma composição acaricida compreendendo 5 mg/mL a 50 mg/mL de pelo menos um inibidor de proteína do metabolismo de colesterol de carrapato.

[0036] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta o uso de pelo menos um inibidor de proteína do metabolismo de colesterol de carrapato na preparação de uma composição acaricida.

[0037] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta o uso de uma composição acaricida no controle de uma população de carrapatos, em que a composição compreendendo 5 mg/mL a 50 mg/mL de pelo menos um inibidor

de proteína do metabolismo de colesterol de carrapato.

[0038] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta um processo de controle de uma população de carrapatos compreendendo uma etapa de aplicação de uma composição compreendendo pelo menos um inibidor de proteína do metabolismo de colesterol do carrapato.

[0039] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e serão descritos detalhadamente a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0040] São apresentadas as seguintes figuras:

[0041] Figura 1: Absorção do colesterol da dieta em insetos. O éster de colesterol (COL-E) obtido pela hematofagia é convertido a colesterol (COL) e ácido graxo (AG) pela enzima colesterol esterase. A proteína transmembrana Niemann-Pick C (NPC) transporta o COL para dentro do enterócito, onde é reconvertido a COL-E pela acil-CoA aciltransferase (ACAT). O COL-E é transportado pelas lipoforinas (Lp) através da hemolinfa para os demais tecidos, onde é armazenado em gotículas de lipídeo (GL). RLp: receptor de lipoforina; Lp: lipoforina; DAG: diacilglicerol; TAG: triacilglicerol; G3P: glicerol 3-fosfato; DGAT: diacilglicerol aciltransferase.

[0042] Figura 2: Efeito dos inibidores do metabolismo de colesterol nos parâmetros biológicos do carrapato. Fêmeas parcialmente alimentadas de *R. microplus* foram alimentadas com sangue contendo os inibidores avasimiba (AVS) (7,5 nmol por fêmea) ou ezetimiba (EZT) (9,2 nmol por fêmea). (A) Ganho de peso dos carrapatos (diferença em porcentagem entre o peso da fêmea depois e antes da alimentação). (B) Índice reprodutivo dos carrapatos (razão entre o peso dos ovos postos e o peso final da fêmea). (C) Índice de eclosão das larvas (razão entre o peso das larvas e o peso dos ovos). Análise estatística feita pelo teste ANOVA.

[0043] Figura 3: Efeito da avasimiba nos parâmetros fisiológicos do carrapato. O inibidor avasimiba (AVS) (15 nmol por fêmea) foi adicionado ao sangue usando

alimentação artificial de fêmeas parcialmente alimentadas de *R. microplus*. (A) Ganho de peso dos carrapatos (diferença em porcentagem entre o peso da fêmea depois e antes da alimentação). (B) Índice reprodutivo dos carrapatos (razão entre o peso dos ovos postos e o peso final da fêmea). (C) Índice de eclosão das larvas (razão entre o peso das larvas e o peso dos ovos). (D) Ovos postos por fêmeas de cada grupo (Sangue, DMSO e AVS). Análise estatística feita pelo teste ANOVA, * $p=0.01$, ** $p<0.005$, *** $p=0.0003$.

[0044] Figura 4: Suscetibilidade dos ovos à adesão e formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos ovos postos por carrapatos alimentados com sangue contendo: (A) Sangue. (B) DMSO (1%). (C) EZT (9,2 nmol por fêmea). (D) AVS (7,5 nmol por fêmea). (E) AVS (15 nmol por fêmea).

Descrição Detalhada da Invenção

[0045] A presente invenção revela um processo de controle de carrapatos compreendendo o uso de inibidores de proteínas relacionadas ao metabolismo de colesterol em carrapatos. Em uma concretização essas proteínas são NPC e ACAT.

[0046] Ao realizar a inibição de proteínas do metabolismo de colesterol, os inibidores afetam seletivamente a fisiologia dos carrapatos, o que leva à diminuição da viabilidade de seus ovos.

[0047] Em uma concretização, os compostos inibidores podem ser utilizados na fabricação de uma composição acaricida de uso tópico, diretamente sobre o carrapato, ou de uso oral, pelo hospedeiro endotérmico a ser parasitado pelo carrapato.

[0048] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma composição acaricida compreendendo 5 mg/mL a 50 mg/mL de pelo menos um inibidor de proteína do metabolismo de colesterol de carrapato.

[0049] Em uma concretização, o inibidor é de uma proteína do metabolismo de colesterol selecionada do grupo consistindo de proteína Niemann-Pick C (NPC)

ou acil-CoA aciltransferase (ACAT).

[0050] Em uma concretização, o inibidor é selecionado do grupo consistindo de ezetimiba, avasimiba e combinações dos mesmos. Em uma concretização, o inibidor é um isômero ou sal dos compostos ezetimiba e avasimiba.

[0051] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta o uso de pelo menos um inibidor de proteína do metabolismo de colesterol de carrapato na preparação de uma composição acaricida.

[0052] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta o uso de uma composição acaricida no controle de uma população de carrapatos, em que a composição compreendendo 5 mg/mL a 50 mg/mL de pelo menos um inibidor de proteína do metabolismo de colesterol de carrapato.

[0053] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta um processo de controle de uma população de carrapatos compreendendo uma etapa de aplicação de uma composição compreendendo pelo menos um inibidor de proteína do metabolismo de colesterol do carrapato.

[0054] Em uma concretização, o controle de uma população de carrapatos compreende uma etapa de aplicação realizada: no carrapato; no hospedeiro ou um hospedeiro em potencial; em materiais, como madeira, couro, palha; ou em construções, como estábulos e casas.

[0055] Em uma concretização, a etapa de aplicação é realizada em um hospedeiro vertebrado infestado por carrapato.

[0056] Em uma concretização, a etapa de aplicação é realizada via oral, tópica ou injetável. Em uma concretização, a etapa de aplicação é realizada via tópica.

[0057] Em uma concretização, o inibidor é aplicado em uma concentração de 5 mg/mL a 50 mg/mL.

[0058] A presente invenção revela a importância do metabolismo de colesterol na fisiologia dos carrapatos e o uso de inibidores de proteínas deste metabolismo, tal como a ezetimiba e avasimiba outros inibidores da NPC e ACAT, para o controle de populações de carrapatos.

[0059] O metabolismo de lipídeos em carrapatos é pouco conhecido, se

comparado ao de em insetos e insetos hematófagos. Assim como em outros aspectos fisiológicos, os estudos de metabolismo de lipídeos em carrapatos são baseados no conhecimento em insetos. Não havia sido mostrado que o carrapato usava estas enzimas para absorção do colesterol, não havia sido testado se existia esta rota enzimática no carrapato, e não havia sido testado o uso destas drogas em carrapato.

[0060] Mesmo a existência das enzimas não era garantia que as drogas tivessem efeito, porque as enzimas de mamífero (alvo original da droga para controle do colesterol) não são idênticas as do carrapato. Sendo que a composição acaricida, compreendendo esses inibidores de proteína do metabolismo de colesterol, apresentou excelentes resultados no controle de população de carrapatos, diminuindo a viabilidade de ovos de carrapato.

Exemplo

[0061] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

[0062] Para comprovar o efeito obtido pelo processo da presente invenção na inibição de proteínas do metabolismo de colesterol na fisiologia dos carrapatos, foi utilizada a técnica de inibição das proteínas pelos inibidores avasimiba e ezetimiba. Atualmente ezetimiba e avasimiba são consideradas de baixa toxicidade para humanos e outros animais.

[0063] Soluções de avasimiba e ezetimiba foram solubilizadas em DMSO e então diluídas em sangue bovino nas concentrações finais de 600 μM e 350 μM . Fêmeas adultas parcialmente alimentadas de *R. microplus* foram alimentadas artificialmente com essas misturas. Carrapatos controle foram alimentados com sangue contendo o solvente dos inibidores. Os resultados do processo descrito nesse exemplo estão representados nas figuras 2, 3 e 4.

[0064] Conforme pode ser observado nas figuras 2 a 4, os inibidores de proteínas envolvidas no metabolismo do colesterol possuem atividade acaricida,

uma vez que reduziram significativamente o desenvolvimento dos ovos dos carrapatos após as referidas administrações.

[0065] Os resultados mostraram que inibidor do colesterol avasimiba tem efeito na fisiologia dos carrapatos. A avasimiba interferiu na postura e eclosão de ovos de fêmeas alimentadas com sangue contendo avasimiba, interferindo no ciclo de vida do carrapato.

[0066] Os inibidores do colesterol avasimiba e ezetimiba interferiram na fisiologia dos carrapatos. Os dois inibidores interferiram na formação da camada de cera protetora dos ovos de fêmeas alimentadas com sangue contendo inibidores. A alteração da camada de cera aumentou a susceptibilidade dos ovos a adesão bacteriana e formação de biofilmes bacterianos, diminuindo a viabilidade dos ovos e interferindo no ciclo de vida do carrapato.

[0067] Baseado nos resultados obtidos a partir das análises realizadas, os compostos químicos avasimiba e ezetimiba, separadamente ou em conjunto, assim como em conjunto com outros inibidores de proteínas de carrapatos, mostraram efeitos acaricidas, sendo uma nova alternativa para o controle de carrapatos. Além disso, o uso combinado destes compostos apresenta o potencial de reduzir a probabilidade de desenvolvimento de resistência pelos carrapatos.

[0068] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes e alternativas, abrangidas pelo escopo das reivindicações a seguir.

Reivindicações

1. Composição acaricida **caracterizada por** compreender 5 mg/mL a 50 mg/mL de pelo menos um inibidor de proteína do metabolismo de colesterol de carrapato.

2. Composição acaricida, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** inibidor ser de uma proteína do metabolismo de colesterol selecionada do grupo consistindo de proteína Niemann-Pick C (NPC) ou acil-CoA aciltransferase (ACAT).

3. Composição acaricida, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada pelo** inibidor ser selecionado do grupo consistindo de ezetimiba, avasimiba e combinações dos mesmos.

4. Uso de pelo menos um inibidor de proteína do metabolismo de colesterol de carrapato **caracterizado por** ser na preparação de uma composição acaricida conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5. Uso de uma composição, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** ser no controle de uma população de carrapatos.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado por** compreender uma etapa de aplicação em um hospedeiro vertebrado infestado por carrapato.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por** compreender uma etapa de aplicação via oral, tópica ou injetável.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pela** aplicação ser por via tópica.

9. Processo de controle de uma população de carrapatos **caracterizado por** compreender uma etapa de aplicação de uma composição acaricida conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

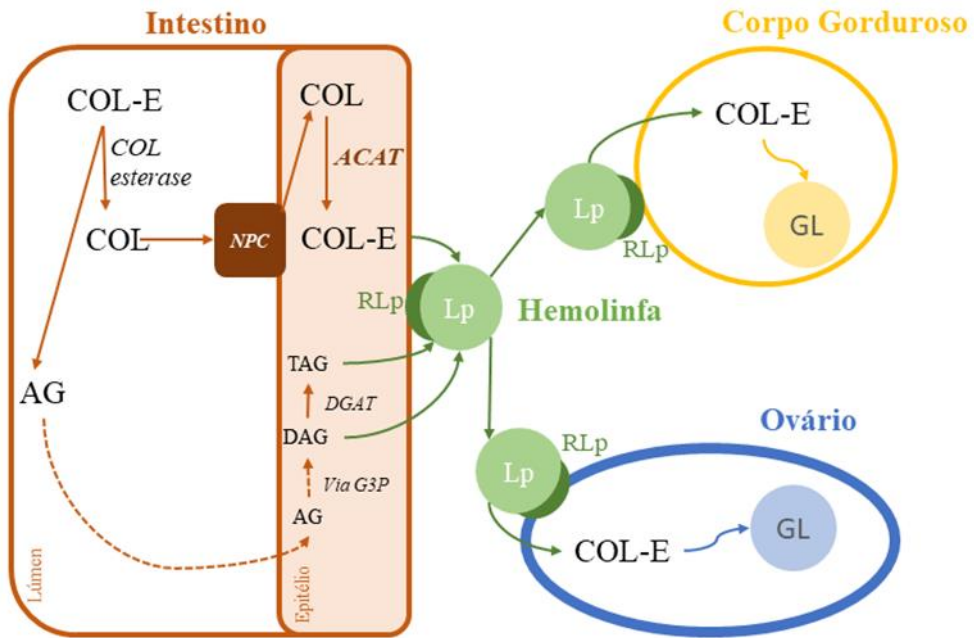
FIGURAS

Figura 1

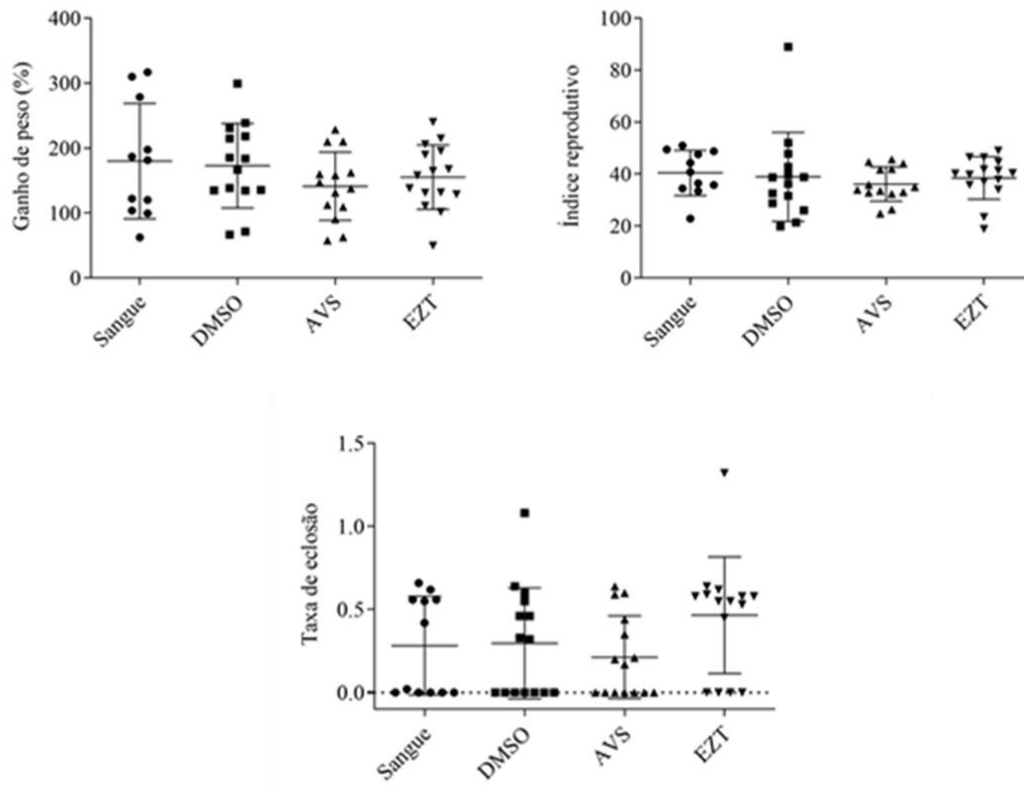


Figura 2

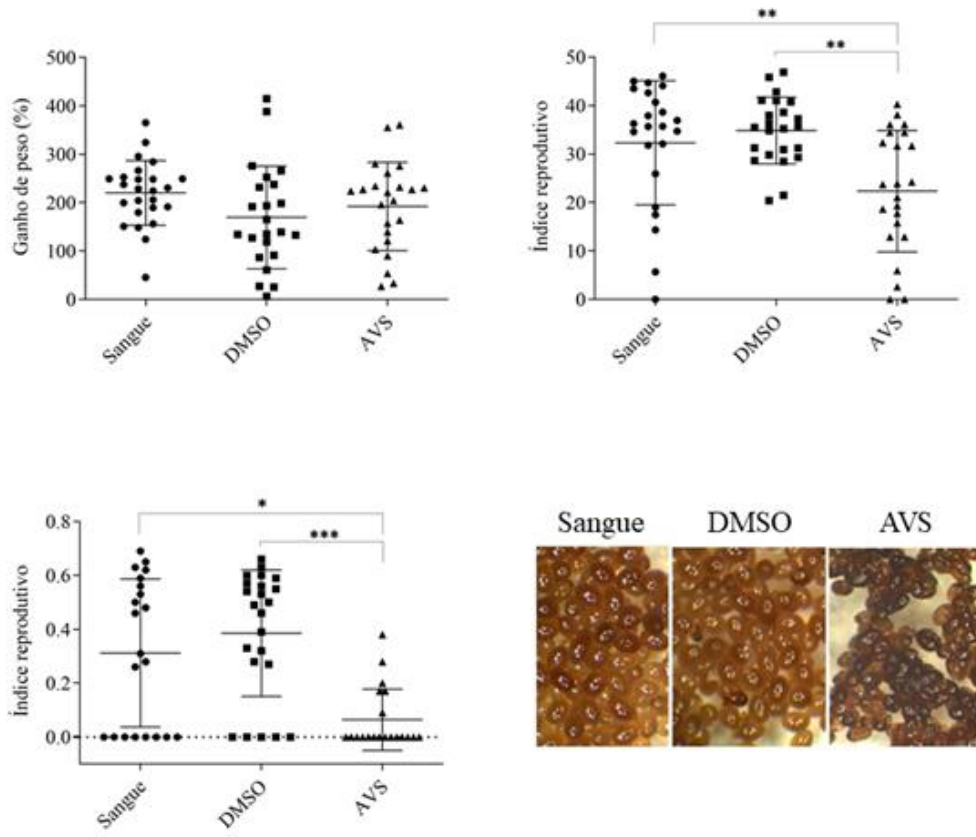


Figura 3

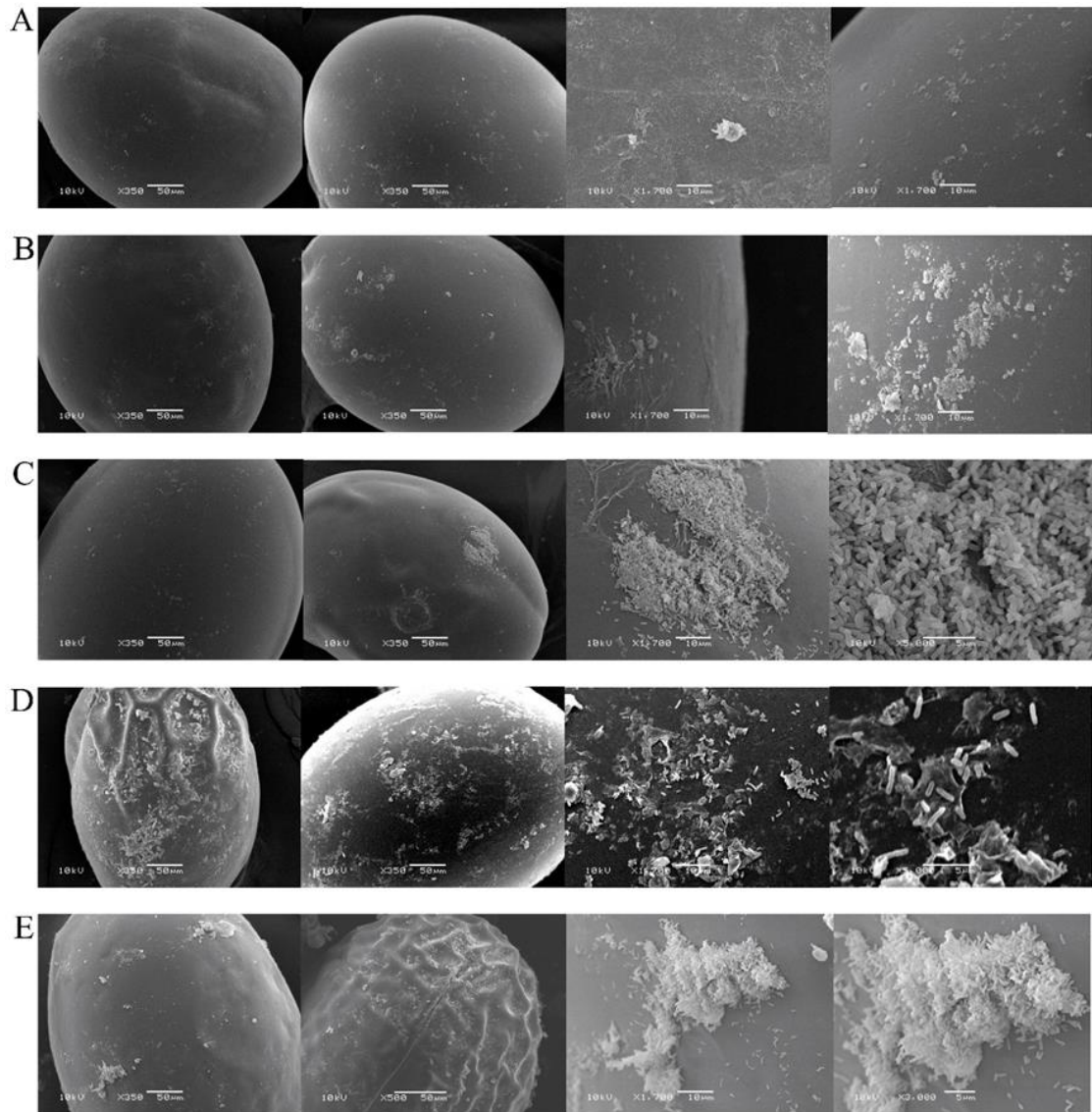


Figura 4

Resumo

COMPOSIÇÃO ACARICIDA, USO DESSA COMPOSIÇÃO, USO DE PELO MENOS UM INIBIDOR DE PROTEÍNA DO METABOLISMO DE COLESTEROL DE CARRAPATO E PROCESSO DE CONTROLE DE UMA POPULAÇÃO DE CARRAPATOS

A presente invenção refere-se a uma composição acaricida e a um processo para o controle seletivo de carrapatos, de forma a substituir ou complementar o uso de outros acaricidas pelo uso de inibidores de proteínas do metabolismo de colesterol, mais especificamente pelo uso de inibidores das proteínas Niemann-Pick C (NPC) ou acil-CoA aciltransferase (ACAT), especificamente de ezetimiba e avasimiba. A presente invenção se situa nos campos da Química, Agropecuária e Veterinária.