

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE FEROMÔNIOS DE
***Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE)**

Doutorando(a): Kennedy Kiriira Gachoka

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Lúgia Miranda Ferreira Borges

Goiânia

2010

KENNEDY KIRIIRA GACHOKA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE FEROMÔNIOS DE
Amblyomma cajennense (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE)**

Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Linha de Pesquisa:

Biologia, epidemiologia, taxonomia e controle de parasitos de animais domésticos

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Lígia Miranda Ferreira Borges – IPTSP/UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Pedro Henrique Ferri – IQ/UFG

Prof^a. Dr^a. Andréa Caetano da Silva – IPTSP/UFG

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

G121c Gachoka, Kennedy Kiriira.
Caracterização química e biológica de feromônios de
Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae)
[manuscrito] / Kennedy Kiriira Gachoka. - 2010.
79 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Lígia Miranda Ferreira Borges; Co-
orientadores: Prof. Dr. Pedro Henrique Ferri, Prof^ª Dr^ª Andréa
Caetano da Silva.

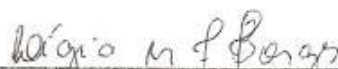
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária, 2010.
Bibliografia.

1. *Amblyomma cajennense* 2. Carrapato-estrela – controle.
3. Carrapato-estrela - feromônios. I.Título

CDU: 595.42

KENNEDY KIRIIRA GACHOKA

Tese defendida e aprovada em **13/08/2010** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Ligia Miranda Ferreira Borges
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. Mucio Flávio Barbosa Ribeiro - UFMG/MG



Prof. Dr. Wolf Christian Luz - IPTSP/UFG



Dra. Carla Cristina Braz Louly - Bolsista CAPES/PNPD/UFG



Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

DEDICATÓRIA

em memória do amado
JAMES NJOROGÉ GACHOKA
que partiu *ad eternitatis*

AGRADECIMENTOS

Há muitos a quem dizer muito obrigado com afeto e honestidade.

À Deus por iluminar o meu caminho.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Lúgia Miranda Ferreira Borges e verdadeira autora do projeto do qual este trabalho fez parte, por ter sido uma fonte enciclopédica de informação sobre carrapatos, incansável como pesquisadora, detalhista, crítica, e parceira de trabalho sem a qual este projeto jamais teria se realizado nem saído do papel sequer.

Ao Prof. Dr. Pedro Henrique Ferri, co-orientador deste trabalho, do Instituto de Química da UFG, que foi generoso ao compartilhar conhecimentos e absolutamente indispensável à realização deste projeto também. Eu considero um privilégio ter trabalhado com o senhor.

À Prof^a. Dr^a. Andréa Caetano da Silva e ao Prof. Francisco de Carvalho Dias Filho pelo aval e convivência tão fundamentais tanto quanto apoio técnico.

Dr^a. Carla Cristina Braz Louly e Sara Fernandes Soares foram de uma paciência de mestres ao me ensinar algumas técnicas básicas quando eu começava leigo em manuseio de carrapatos tendo pouca experiência prévia. Lorena Ferreira Lopes, minha estagiária de iniciação científica, esteve sempre ali pronta a me ajudar, às vezes por horas em pé, coisa que nenhuma máquina é capaz de fazer. Deomar Plácida da Costa foi quem me acompanhou de perto quando eu desenvolvia a parte química.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa e do Centro de Parasitologia Veterinária, minha verdadeira família no Brasil que sempre terei em grande estima, pela convivência dia a dia.

Ao estatístico Dr. Anthony Wanjoya que sempre esteve disposto a dar um auxílio cada vez que eu pedi-lhe socorro. Aos colegas pesquisadores no Quênia Dr. Wycliffe Wanzala e Dr. David Mwangi pelo entusiasmo com este projeto desde o começo até o seu fim.

Os acertos deste trabalho devem muito a todos vocês; os erros são todos meus.

Este trabalho não teria sido nada fácil sem a cooperação de todos na Secretaria de Pós-Graduação da Escola de Veterinária. São eles a coordenadora,

Prof^a. Dr^a. Maria Clorinda Soares Fioravanti, durante cuja gestão este trabalho se desenvolveu, e seus competentes técnicos administrativos Gerson Luis Barros e Tiago Martins Côrtes.

Meus agradecimentos especiais para a Coordenadoria de Assuntos Internacionais (CAI) da UFG pela oferta do curso 'português para estrangeiros', na época estreante e que para mim caiu do céu. Falando nisso dou com carinho meus muitos agradecimentos a Leandro Garibaldi e Eber Feliciano de Oliveira, os meus professores de português, por alimentar aos poucos um débil passarinho feito eu até conseguir bater as próprias asas. A CAI organizou excursões para melhor conhecer o estado também.

A todos da chácara São Domingos com qual mantínhamos uma parceria de produção e de troca de coelhos. Foi realmente um grande prazer ser associado com vocês.

À minha mulher por motivos inúmeros.

Aos meus pais, Phylis Wambui e Gerishon Gachoka, e toda família Gachoka por acreditar em mim e por ter apoiado as minhas 'aventuras' profissionais seja onde for numa demonstração de confiança que me deixa sempre motivado.

Ao Ng'ang'a Mwangi antigo colega de trabalho pelos empurrõezinhos de longe quando eu precisava. Meu primo Eric Njoroge Joram que com regularidade feito relógio mantinha contato com torpedos do início ao fim sempre me desejando sorte merece ser mencionado aqui também.

Aos amigos para sempre Levi Castro Braga, Paulo Reis Nunes e Túlio Caetano, verdadeiros exemplos de hospitalidade brasileira e representantes perfeitos de todas as amizades que eu fiz por aqui, sem esquecer a comunidade universitária africana em Goiânia pelos momentos especiais de convívio.

Por último que tanto caberia em primeiro ao CNPq e TWAS (Academia de Ciências para o Mundo em Desenvolvimento) pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto.

“Combati o bom combate,
completei a carreira,
gardei a fé.”

2 Timóteo 4: 7

RESUMO

Amblyomma cajennense, vulgarmente conhecido como carrapato-estrela, é um carrapato trioxeno que está amplamente difundido no território brasileiro e nos demais países da América Latina. Dada a sua baixa especificidade, assume um importante papel na transmissão de patógenos entre os animais e o homem. A comunicação química é um componente vital na biologia dos carrapatos, onde feromônios são majoritariamente responsáveis na regulação da busca pelo parceiro e a cópula. Compreendendo o comportamento de *A. cajennense* e os feromônios envolvidos, existem possibilidades práticas do uso destas substâncias como uma forma alternativa e satisfatória de controlá-los minimizando o uso de acaricidas. Diante disso, procurou-se neste trabalho, quantificar e elucidar comportamentos instigados por feromônio produzido por fêmeas bem como identificar e caracterizar qualitativa e biologicamente feromônio de machos. Fêmeas ingurgitadas de *A. cajennense* foram colhidas de equinos naturalmente infestados para estabelecimento de colônias no laboratório. Os feromônios foram obtidos por extração e sonicação em hexano de machos ou fêmeas de carrapatos alimentados. Quantificou-se o feromônio sexual, o 2,6-diclorofenol (2,6-DCF), em fêmeas pelas técnicas de padrão interno, com 5-bromo-4-hidróxi-3-metóxi-benzaldeído como referência interna, e adição padrão por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) através de construção de curvas de calibração. O extrato dos machos foi analisado quimicamente por CG/EM diante de padrões sintéticos. No que concerne aos testes biológicos, pérolas de vidro foram tratadas com dois equivalentes-fêmea de amostra de feromônio extraído de fêmeas e com 2,6-DCF em uma dose equivalente e expostas aos machos para observar comportamento(s) provocado(s). A atração diante do feromônio de machos foi avaliada pela liberação individual de fêmeas, machos e ninfas virgens, não alimentadas, frente a três concentrações (1, 5 e 10 equivalentes-macho) do extrato de machos, em um olfatômetro. As orientações à fonte de odor foram analisadas por teste de Kruskal-Wallis e os ângulos por Estatística Circular. A agregação foi avaliada pela aplicação de 10 equivalentes-macho do extrato em arenas de placas de Petri e os dados analisados por Chi-quadrado. Testes de fixação foram feitos *in vivo* em coelhos, *Oryctolagus cuniculus*, onde os carrapatos foram liberados e observados em intervalos determinados entre 20min e 24hs e suas respostas analisadas por testes de Wilcoxon e ANOVA Friedman. Os resultados mostraram que uma fêmea libera em média $2,15 \text{ ng mL}^{-1}$ de feromônio. O extrato de machos apresentou ácido benzóico, ácido nonanóico, ácido salicílico, benzaldeído, 2,6-DCF, limoneno e salicilato de metila. O extrato de fêmeas e o 2,6-DCF sintético estimularam a monta em até 73% de casos, respectivamente, confirmando que o composto é responsável por mediar a monta em *A. cajennense*. Não houve atração nem agregação estatisticamente maior dos machos e fêmeas diante do feromônio procedente de machos. Entretanto, uma fixação significativamente maior e mais rápida foi registrada dentro de 24 h em ambos os sexos. Os achados de respostas biológicas corresponderam com a composição química de feromônio de machos. Concluiu-se que o feromônio de machos não promove atração nem agregação, mas é responsável pela fixação de adultos de *A. cajennense*. O feromônio também possui diferenças na proporção e na presença de determinados compostos descritos em outras espécies do gênero *Amblyomma*. Os resultados estão discutidos como um ponto de partida para estudos avançados visando o desenvolvimento de novas estratégias de controle e de manejo desta espécie utilizando esses feromônios.

Palavras-chave: carrapato-estrela, comunicação química, feromônios, semioquímicos

SUMMARY

Amblyomma cajennense, commonly known as Cayenne tick, is a three-host tick widely distributed in Brazil and in the rest of Latin American countries. Owing to its low host specificity, it plays an important role in the transmission of pathogens in animals and man. Chemical communication is a vital component in tick biology whereby pheromones are largely responsible in the regulation of mating, recognition of sexual partner and copulation. By understanding the behaviour of *A. cajennense* and the pheromones involved, there exists practical possibility for the use of these substances as an additional method of control thereby reducing the use of acaricides. Based on this, the aims of this work were to quantify and elucidate behaviours induced by pheromones emitted by females *A. cajennense* as well as identify and characterize qualitatively and biologically the pheromone produced by males. Engorged females were collected from naturally-infested horses for the establishment of laboratory colonies for use in this study. The pheromones were obtained by extraction in hexane and sonication by ultra-sound of fed males and females. The female sex pheromone, 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP), was quantified by GC/MS using internal standard and standard addition methods through construction of calibration curves using 5-bromine-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde and 2,6-DCP, respectively. The male extract was analysed chemically by GC/MS in comparison with standards. As concerns biological tests, glass beads were treated with two female-equivalents of the female pheromone and 2,6-DCP in an equivalent concentration and exposed to males to observe the induced behaviour(s). Attraction to the male pheromone was evaluated by release of individual unfed, virgin females to three concentrations (1, 5 and 10 male-equivalents) of the extract in olfactometer bioassays. Orientations towards the odour source were analysed by Kruskal-Wallis and displacement angles by Circular Statistics. Aggregation was evaluated by releasing the tick stages in Petri dish bioassays shortly followed by introduction of filter paper strips impregnated with 10 male-equivalents of the extract and recording tick responses on camera. Data analysis was by Chi-square test. Tests for attachment were carried out in vivo in rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, and the released ticks observed in determined intervals between 20min and 24hrs. The data was analysed by Wilcoxon signed-ranked test and Friedman's repeated measures ANOVA. The results indicated that each female emits 2.15 ng ml^{-1} of pheromone on average. The male extract was positive for benzoic acid, nonanoic acid, salicylic acid, benzaldehyde, 2,6-DCP, limonene and methyl salicylate. The female extract and 2,6-DCP stimulated mounting in up to 80% and 73% of all cases, respectively, confirming that 2,6-DCP alone mediates mounting behaviour in *A. cajennense*. There was no statistically significant attraction or aggregation in males or females induced by the male pheromone. However, significantly faster and greater attachment was recorded in both. The behavioural responses corresponded with the pheromone's composition. It was concluded that the male pheromone promotes neither attraction nor aggregation but is responsible for faster fixation of *A. cajennense* adults. The pheromone also contains different proportions and differs from other *Amblyomma* species as far as the presence or absence of certain components is concerned. The results serve as a first step in advanced studies aimed at development of novel strategies for the management of this species using these pheromones.

Keywords: Cayenne tick, chemical communication, pheromones, semiochemicals

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Considerações gerais	1
Referências	13
CAPÍTULO 2: Comparação de dois métodos para quantificação de 2,6-diclorofenol do carrapato <i>Amblyomma cajennense</i> por CG/EM-MSI	20
Resumo.....	20
Palavras-chave	21
Introdução	22
Experimental	23
Resultados e discussão	26
Conclusão	31
Referências	31
Informação suplementar.....	34
CAPÍTULO 3: Indução de monta e reversão ventral em <i>Amblyomma cajennense</i> (Acari: Ixodidae) <i>in vitro</i> pelo 2,6-diclorofenol em quantidades iguais às liberadas naturalmente.....	39
Resumo.....	39
Palavras-chave	40
Introdução	40
Materiais e métodos.....	41
Resultados e discussão	43
Conclusão	44
Referências	47
CAPÍTULO 4: Composição química e caracterização biológica de extratos do feromônio produzido pelos machos de <i>Amblyomma cajennense</i> (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae).....	50
Resumo.....	50

Palavras-chave	51
Introdução	52
Materiais e métodos	53
Resultados	57
Discussão.....	65
Referências	69
CAPÍTULO 5: Considerações finais.....	72
Anexos.....	75

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Cromatograma típico através de CG/EMS de uma amostra de extrato de machos de *A. cajennense* após uma corrida cromatográfica com a região de picos de interesse aumentada58
- Figura 2: Percentuais de frequência e distribuição de ângulos de deslocamento de fêmeas de *A. cajennense* em ensaios de atração feitos *in vitro* diante de diferentes macho equivalentes e controle60
- Figura 3: Percentuais de frequência e distribuição de ângulos de deslocamento de machos e ninfas de *A. cajennense* em ensaios de atração feitos *in vitro* diante de 10 EM, respectivamente62
- Figura 4: Taxas de fixação de machos e fêmeas de *A. cajennense* nas costas de coelhos tratados com 20 EM de extratos de machos alimentados, uma mistura equivalente de padrões e controle, respectivamente, a vários intervalos após liberação64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Características analíticas de curvas de calibração de 2,6-DCF com os métodos de CG/EM-MIS	27
Tabela 2: Precisão e exatidão de 2,6-DCF com os métodos de CG/EM-MIS.....	28
Tabela 3: Concentração (média e desvio padrão) de 2,6-DCF avaliada por CG/EM-MIS em amostras dos extratos.....	29
Tabela 1S: Resultados do teste de Cochran na quantificação de 2,6-DCF pelo método padrão interno	35
Tabela 2S: Resultados do teste de Dixon na quantificação de 2,6-DCF pelo método padrão interno	35
Tabela 3S: Resultados do teste de Grubb na quantificação de 2,6-DCF pelo método padrão interno	36
Tabela 4S: Resultados do teste de Cochran na quantificação de 2,6-DCF pelo método adição padrão.....	36
Tabela 5S: Resultados do teste de Dixon na quantificação de 2,6-DCF pelo método adição padrão.....	37
Tabela 6S: Resultados do teste de Grubb na quantificação de 2,6-DCF pelo método adição padrão.....	37
Tabela 7S: Quantidade de 2,6-DCF (ng ml^{-1} por fêmea) em extratos feitos em hexano e analisados pelos métodos padrão interno e adição padrão de duas populações de <i>A. cajennense</i>	38
Tabela 4: Percentual de frequência e duração média de monta e reversão ventral de machos sobre pérolas de vidro impregnadas com o extrato de fêmeas ou o 2,6-DCF na concentração de 2.15 ng ml^{-1}	45
Tabela 5: Percentual de frequência e duração média de permanência na posição elevada e reversão ventral de machos sobre pérolas de vidro impregnadas com	

o extrato de fêmeas ou o 2,6-DCF na concentração de 2.15 ng ml^{-1}	45
Tabela 6: Composição química de extrato de machos de <i>A. cajennense</i> de três amostras analisadas por dois métodos complementares de CGEM (Scan e MIS) e suas outras propriedades	58
Tabela 7: Percentual de indivíduos de <i>A. cajennense</i> que alcançaram ou mostraram uma orientação à fonte de odor em ensaios de atração diante de concentrações específicas de extratos de machos e controles	59
Tabela 8: Percentual de agregação de adultos e ninfas não alimentados de <i>A. cajennense</i> nos lados tratados e não tratados (brancos) com extratos de fêmeas alimentadas ou hexano (controle) nas vários intervalos em ensaios em placas de Petri	63

CAPÍTULO 1: Considerações gerais

1.1 Introdução

Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) pertence à subclasse Acari, família Ixodidae, subfamília Amblyomminae e ao gênero *Amblyomma*. Este ixodídeo é vulgarmente conhecido como "carrapato estrela", "carrapato de cavalo" ou "rodoleiro", as larvas por sua vez, recebem o nome de "carrapatinhos" ou "micuins" e as ninfas de "vermelhinhos". Foi relatado pela primeira vez em Cayenne, Guiana Francesa, e descrito por Fabricius em 1787 (OLIVER, 1989). Dadas as diferenças temporais entre os diferentes estágios, é relativamente comum encontrar pessoas com anos de vivência no campo, que interpretam estes diferentes estágios de *A. cajennense* como se fossem três espécies distintas de carrapatos.

Os adultos de *A. cajennense* são de tamanho médio (cerca de 3 a 5 mm de comprimento) com as peças bucais compridas, projetando-se anteriormente. O escudo é ornamentado e de multicores brilhantes e estampas irradiantes. A cutícula tem pequenas dobras na sua superfície. Como na maioria dos artrópodes, os machos são comparativamente menores do que as fêmeas, mas o dimorfismo sexual é apenas aparente no estágio adulto (BARROS-BATTESTI et al., 2006). As ninfas e larvas são semelhantes aos adultos, mas são menores em tamanho e faltam os poros genitais externos e áreas porosas definidas que são características de adultos. BORGES et al. (2006) descreveram foveas dorsais em ninfas e adultos através de estudos por microscopia eletrônica de varredura. As larvas possuem três pares de patas enquanto que ninfas e adultos têm quatro.

1.2 Ocorrência e distribuição

A distribuição de *A. cajennense* abrange quase todo o continente sul-americano sendo amplamente difundido no território brasileiro como nos demais países da América Latina (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Com efeito, a área

de distribuição desta espécie se estende entre os paralelos 30° N e 30° S, ao longo das Américas do Norte, Central e Sul até o início do sul da Argentina, excetuando o Chile (STREY et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2000; SUCEN, 2004; BARROS-BATTESTI et al., 2006). STREY et al. (1996) sugerem que os limites da distribuição zoogeográfica de *A. cajennense* sejam resultado de sua intolerância ao frio, a despeito de sua baixa especificidade parasitária e da extensa capacidade de suportar outras adversidades ambientais. Entretanto, a distribuição desta espécie parece estar se estendendo continuamente para áreas previamente livres.

No Brasil, *A. cajennense* está entre as espécies predominantes nos biomas do Cerrado e Pantanal e tem nos últimos anos se expandido para a Floresta Tropical Atlântica devido à degradação massiva (LABRUNA et al., 2005). Já foram registrados espécimes de *A. cajennense* em todas as regiões e em quase todos os estados, incluindo Goiás (BORGES & SILVA, 1994; SUCEN, 2004).

1.3 Hospedeiros

Os eqüídeos constituem os principais hospedeiros desse carrapato, entretanto, populações de *A. cajennense* mantêm-se em áreas livres de eqüinos, parasitando várias espécies de animais. Este carrapato é um importante ectoparasito de diversos hospedeiros domésticos tais como bovinos, canídeos, caprinos, asininos, ovinos e suínos (MADEIRA et al., 2000; GRISI et al., 2002; SZABÓ et al., 2002; 2004), assim como animais silvestres como antas, búfalos, capivaras, cotias e gambás (LOPES et al., 1998; ROJAS et al., 1999; BARROS-BATTESTI et al., 2006; LABRUNA et al., 2009). Existem registros de infestação de aves domésticas como perus e galinhas, além de aves silvestres e alguns répteis, porém, o parasitismo nestes hospedeiros não é comum (BARROS-BATTESTI et al., 2006). As regiões de preferência para fixação de *A. cajennense* em eqüinos e bovinos são as axilas, região inguinal, peito, pescoço, face interna das orelhas e coxa (FALCE, 1986; SERRA-FREIRE & CUNHA, 1987).

A. cajennense também tem sido relatado parasitando humanos (GUGLIELMONE et al., 2006). Ele representa um incômodo às pessoas que entram em contato com os animais, instalações ou campos freqüentados por eqüinos. LABRUNA et al. (2001) mostraram que havia uma tendência crescente para a ocorrência de infestação de humanos pelos carrapatos à medida que o nível de infestação de *A. cajennense* em eqüinos aumentou. Além disto, ele é reconhecido por seus ataques em grandes números, especialmente nas formas jovens, aos humanos quando em caminhada por matas ou campos (SUCEN, 2004). Os seus estágios imaturos se caracterizam por parasitar humanos em maior intensidade do que qualquer outra espécie de carrapato no Neotrópico (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

1.4 Importância médica-veterinária

Dada a sua baixa especificidade, assume um importante papel na transmissão de patógenos entre os animais e o homem. *A. cajennense* é uma importante espécie vetora do agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira, *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), para humanos e animais, nas regiões neotropicais (CAMPOS & LABRUNA, 1998; GUGLIELMONE et al., 2006). Febre maculosa é uma das mais frequentes e conhecidas zoonoses transmitida por *A. cajennense* nas Américas, juntamente com *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) e *Amblyomma dubitatum* (Neumann, 1899). Em *A. cajennense*, *R. rickettsii* pode ser mantida entre diferentes gerações através de transmissão transovariana e sobrevivência transestadial (FONSECA, 1997; LABRUNA & MACHADO, 2006). Este carrapato também é vetor eficiente do vírus da Encefalite Eqüina Venezuelana, e pode estar envolvida na transmissão de um agente causal desconhecido, que provoca uma borreliose em humanos no Brasil, similar à doença de Lyme (MARTINS et al., 2006). Além disso, infestações por diferentes estágios deste carrapato são caracterizadas por alterações hematológicas, cutâneas e nervosas (potencialmente paralisantes) em animais domésticos (SERRA-FREIRE, 1983), além do incômodo e em casos

de altas infestações podem levar à morte do hospedeiro (SERRA-FREIRE, 1979; SONENSHINE, 1991; GRISI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003).

O Brasil possui o terceiro maior rebanho de eqüídeos do mundo, com cerca de 5,9 milhões de cabeças, um setor da economia que gera aproximadamente 500 mil empregos diretos (CNA, 2008). Em haras, hípicas, hipódromos entre outros locais relacionados à eqüinocultura a presença deste artrópode causa problemas clínicos aos animais, como anemias, lesões cutâneas e estresse por desconforto que podem resultar em significativas reduções nos ganhos dos criadores. A criação nas propriedades rurais de eqüídeos em conjunto com bovinos, caprinos e ovinos e o aumento da densidade desses animais promovem a oferta ao carrapato de boa alimentação, com conseqüente expansão de suas populações (LEITE et al., 1991). Daí surgem implicações econômicas relacionadas ao parasitismo por *A. cajennense* uma vez que este ixodídeo ocasiona perdas importantes, em decorrência da queda de produtividade dos animais através dos efeitos metabólicos do parasitismo e dos gastos com o uso de carrapaticidas e mão-de-obra para tentar controlá-los (FLECHTMANN, 1990; SUCEN, 2004).

1.5 Ciclo de vida

A. cajennense é um carrapato trioxeno o que facilita a sua dispersão (SERRA-FREIRE & CUNHA, 1987). Normalmente a reprodução é bissexual e a cópula acontece exclusivamente no hospedeiro (FREITAS et al., 2002), e apesar de a oviposição partenogenética já ter sido relatada, os ovos não eclodem (GUNN & HILBURN, 1991; FREITAS et al., 2002). Na natureza, as diferentes fases do ciclo biológico deste ixodídeo podem se estender por longos períodos, de acordo com as variações de temperatura, umidade relativa e precipitação pluviométrica (SANAVRIA & PRATA, 1996; OLIVEIRA, 2000; CABRERA & LABRUNA, 2009). A diapausa comportamental das larvas tem sido comprovada como o principal fator regulador primário do ciclo biológico de *A. cajennense* em condições naturais (OLIVEIRA et al., 2003). Ela se caracteriza em forma de redução razoável e até a ausência de alguns estágios nos animais em alguns

meses. Segundo os estudos feitos no Sudeste do Brasil e no Norte da Argentina, *A. cajennense* realiza uma geração por ano caracterizada por uma sucessão dinâmica de picos populacionais distribuídos durante todo o ano (OLIVEIRA, 2000; LABRUNA et al., 2009).

1.6 Controle e manejo

O estudo científico dos carrapatos intensificou-se a partir do final do século XIX quando foram percebidos os efeitos do parasitismo destes ácaros sobre seus hospedeiros, principalmente, em mamíferos e aves domésticas (FLECHTMANN, 1975), desde então, a biologia dos carrapatos passou a ser considerada importante sobre três aspectos principais: os efeitos diretos da espoliação sanguínea como anemia, letargia e lesão cutânea; os efeitos indiretos da inoculação de toxinas no hospedeiro que causam alterações metabólicas, e a transmissão de patógenos – vírus, bactérias e protozoários (FLECHTMANN, 1990; SUCEN, 2004). Em *A. cajennense*, a pesquisa da biologia básica parece ter ficado para trás de alguma forma, em comparação às outras espécies, talvez por causa de sua distribuição geográfica majoritariamente limitada em países em desenvolvimento onde a pesquisa ainda não tinha se intensificado tanto naquela época.

O objetivo para o controle de carrapatos é reduzir ao mínimo possível o número destes ixodídeos que infestam os humanos ou outros vertebrados (SONENSHINE, 2006). O controle dos carrapatos é um dos grandes desafios nas regiões tropicais devido à proliferação acentuada pelas condições climáticas favoráveis. Sendo os carrapatos um dos grandes males encontrados na pecuária como previamente caracterizado, o criador tem recorrido, principalmente, ao uso indiscriminado dos acaricidas tradicionais (IMAMURA et al., 2007). As limitações enfrentadas são a resistência que os parasitas demonstram aos produtos convencionais além do risco potencial de resíduos no leite e na carne. A necessidade de controlar os resíduos em gêneros alimentícios está se tornando cada vez mais importante (WILLADSEN, 2006). Além do mais, a confiança única nos acaricidas é associada com poluição química do meio ambiente e da cadeia

alimentar (NOLAN, 1990; TELLAM et al., 1992). Estes fatores negativos desfavorecem o uso desta prática e são motivos para a exigência de adoção de uma forma mais racional e menos agressiva no manejo de carrapatos.

Manejo integrado de pragas constitui no uso de vários métodos em combinação, visando reduzir tanto quanto possível uma população com grandes vantagens ecológicas, econômicas e sociológicas (IRAC, 2007). Medidas profiláticas tais como roçagem ocasional de pastagens, vigilância epidemiológica bem como conscientização e fiscalização são muito úteis para evitar carrapatos e doenças associadas a eles, antes que as populações aumentem. Ao longo dos anos, têm sido desenvolvidos acaricidas com baixa toxicidade para mamíferos tais como piretróides, avermectinas, fipronil e fluazuron para controle estratégico dos carrapatos. Ainda assim, sua utilização tem sido impedida pelo alto custo (SONENSHINE, 2006). Os produtos naturais (feromônios, hormônios, extratos de plantas) e os de controle biológico (*Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*) têm mostrado grande potencial para uso em combinação com as técnicas existentes, fornecendo base para uma abordagem do manejo integrado de carrapatos. Assim, feromônios estão entre as novas alternativas que podem ser usadas para se evitar problemas relacionados com a dependência única por acaricidas (SONENSHINE, 2006).

1.7 Feromônios na comunicação química em ixodídeos

Feromônios são compostos que carregam informações e fazem parte de uma classe conhecida como semioquímicos os quais servem para guiar o comportamento de organismos facilitando atividades como a agregação no meio ambiente, encontro da fonte de alimento, cópula e outras atividades vitais (SONENSHINE, 1991; 2006). Categorias diferentes de feromônios têm sido reconhecidas até agora. São eles: 1) feromônio de arrestamento/assembleia/reunião; 2) feromônio sexual de atração; 3) feromônio de atração-agregação-fixação – FAAF; 4) feromônio sexual de monta – FSM e 5) feromônio sexual genital – FSG. Substâncias diversas atuam como feromônios. Eles podem ser moléculas altamente voláteis, por exemplo 2,6-diclorofenol (2,6-

DCF), que atua como feromônio sexual de atração, ou não voláteis, por exemplo ésteres de colestril, que constitui o FSM (SONENSHINE, 2006). A comunicação química parece prevalecer sobre todas as outras formas de comunicação seja física, visual, auditiva ou tátil no reino animal.

1.7.1 Feromônio de arrestamento/assembléia/reunião

Feromônios de arrestamento induzem o agrupamento de carrapatos, por fazer cessar suas atividades locomotoras, em sua vida livre, no ambiente natural. Estas substâncias então concentram a população em ambientes satisfatórios para sua sobrevivência. Frequentemente, muitos indivíduos permanecem em contato um com o outro, conseqüentemente o nome reunião. As mais comuns são purinas comumente encontradas nas fezes de carrapatos e em lavados aquosos de carrapatos, mas substâncias voláteis também têm sido relatadas (DUSBABEK et al., 1997; ALLAN & SONENSHINE, 2002; SONENSHINE et al., 2003). Propõe-se que a assembléia seja um estímulo fraco, que é ultrapassado pelos estímulos mais fortes, tais como fome ou necessidades sexuais (PETNEY & BULL, 1981). O potencial destes feromônios para o controle de carrapatos deve-se ao fato de que os feromônios de arrestamento sejam estáveis, solúveis em água e de longa duração.

1.7.2 Feromônios sexuais

Feromônios sexuais, por sua vez, são substâncias ou misturas de substâncias que guiam fases diferentes no processo de procura de parceiro de monta, até a inseminação da fêmea. O processo de cópula tem sido detalhadamente estudado em *Anocentor variabilis* (Say, 1821) cuja ordem se considera padrão para várias outras espécies (HAMILTON & SONENSHINE, 1988). O composto mais relatado sob esta categoria em ixodídeos é o 2,6-DCF - uma substância altamente volátil que estimula os machos ixodídeos metastríatas a se desprenderem e começar a busca por fêmeas emissoras do feromônio. Por isso, ele é considerado o feromônio sexual de atração (SILVERSTEIN et al.,

1983). Recentes relatos mostram ele sendo capaz de conduzir mais respostas comportamentais comumente atribuídas às outras categorias de feromônios (BORGES & RIBEIRO 1999; BORGES et al., 2002; LOULY et al., 2008). Ao contrário, a presença de 2,6-DCF tem sido relatada no carrapato de bovino, *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888), durante todos os seus estágios mesmo que não haja evidência da sua atividade como um feromônio sexual (BRUYNE & GUERIN, 1998) bem como em *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (LOULY et al., 2008). Onde viável, o uso de feromônios sexuais (com ou sem acaricida) para o controle de carrapatos oferece um meio de suprimir a população por interferir na cópula e conseqüentemente no seu sucesso reprodutivo em longo prazo (SONENSHINE et al., 1985).

Após o contato sexual entre machos e fêmeas, o reconhecimento é facilitado quando os machos detectam ésteres de colestril no corpo da fêmea (HAMILTON et al., 1994, SOBBHY et al., 1994). O FSM e o FSG, respectivamente, estimulam o macho a montar a fêmea e a realizar a cópula. O primeiro é um feromônio sexual de contato, produzido pelas fêmeas, durante a alimentação e ajuda os machos a identificar as fêmeas emissoras como parceiras satisfatórias de cópula, enquanto o segundo é uma substância composta de ácidos graxos que ocorre em algumas poucas espécies de carrapatos muito próximas em filogenia (ALLAN et al., 1988). Em *A. variabilis* e *Anocentor andersoni* (Stiles, 1908), por exemplo, os dois feromônios são cruciais no último passo de inseminação (SONENSHINE, 2004). O reconhecimento deste fato tem levado a desenvolvimento de isca como mecanismo de controle de carrapatos. Ela é feita de “manequins” contendo feromônios e acaricida e é usada para atrair e matar os machos.

1.7.3 Feromônio de atração-agregação-fixação

FAAF é uma mistura de voláteis orgânicos que resultam na agregação e fixação de ninfas, fêmeas e machos no corpo do hospedeiro onde os machos emissoras estão fixados. A percepção destes é especialmente de interesse para os indivíduos em vida livre uma vez que sinaliza a presença de um hospedeiro

viável (SONENSHINE, 2006). No gênero *Amblyomma* a presença do FAAF produzido por machos alimentados tem sido amplamente descrita na literatura. O principal componente desta categoria de feromônio é o orto-nitrofenol (APPS et al., 1988). Este composto é produzido principalmente por glândulas dermais do tipo II já desenvolvidas e localizadas na região ventrolateral do carrapato. Em machos de *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794) e *Amblyomma hebraeum* (Koch, 1844) não alimentados estas glândulas têm apenas 60-80 µm de diâmetro enquanto que em machos alimentados podem atingir até 500 µm. Quanto ao seu uso, ele tem sido estudado em campo com bons resultados, atraindo e matando os carrapatos antes que eles se fixarem no hospedeiro, assim como em armadilhas contendo fungo e feromônio para o controle de *A. variegatum* (MARANGA et al., 2006; NCHU et al., 2010).

A duração de alimentação antes da liberação do feromônio varia de acordo com a espécie e é de aproximadamente quatro dias para *A. cajennense* e *Amblyomma maculatum* (Koch, 1844), cinco dias para *A. variegatum* e oito dias para *A. hebraeum*. Para indução completa de agregação em estas espécies, além de o-nitrofenol, salicilato de metila, ácido nonanóico e benzaldeído foram identificados como componentes secundários do FAAF potencializando a resposta a ele sem, no entanto, induzir uma resposta quando testados isoladamente. De acordo com SONENSHINE (2006), diferenças na proporção destes componentes assim como a presença ou ausência de determinados compostos secundários contribuem para a formação da especificidade dos feromônios de agregação.

Embora este tipo de feromônio tenha sido identificado em *A. cajennense* (RECHAV et al., 1997) a sua composição química não é conhecida. O único feromônio descrito nesta espécie é o atraente sexual, 2,6-DCF (LOULY et al., 2008) que atua também como um indutor da monta. Claramente, há necessidade de pesquisas adicionais para se entender a ecologia química desta importante espécie de *Amblyomma*. Estudos químicos e comportamentais podem providenciar informações relacionadas à sua ecologia química, cruciais para o subsequente desenvolvimento de novas estratégias de controle e de manejo desta espécie.

1.8 Cópula em ixodídeos

O comportamento que caracteriza a cópula nos ixodídeos metastriatas é diferente daquele observado na maioria dos insetos, onde um único feromônio sexual, ou um feromônio sexual em combinação com características físicas é a forma dominante de controle da maioria dos acasalamentos (CORRÊA & SANT'ANA, 2001). Depois das fêmeas conseguirem se fixar ao hospedeiro e começarem a se alimentar, elas produzem feromônios sexuais. Como resultado, os machos alimentados iniciam a procura de parceiras, localizando-as e inseminando-as. Um macho que encontra uma fêmea sexualmente ativa monta sobre seu dorso, aplica suas patas e partes bucais à superfície de corpo da mesma, vira e arrasta-se para a superfície ventral. Uma vez que o macho localiza o poro genital da fêmea, ele insere as suas peças bucais e começa a formar o espermatóforo. Quando pronto, o macho insere o espermatóforo para inseminar a fêmea (SONENSHINE, 1991; 2006). O sucesso destes eventos sucessivos deve-se a uma ordem complexa de sinais químicos e comunicação, órgãos do sentido e fisiologia sensorial.

1.9 Uso de feromônios em controle de ixodídeos

Sabe-se que o papel das substâncias químicas na comunicação dos carrapatos não pode ser generalizado para todas as espécies, mas podem ter um papel preponderante, principalmente naquelas espécies que precisam de mais de um hospedeiro para completar o seu ciclo e naquelas que procuram ativamente o hospedeiro ou se posicionam em locais demarcados pelo mesmo. Evidentemente, informações claras dos feromônios sexuais através de pesquisa, onde não existem, podem contribuir para desenvolvimento de tecnologias para sua melhor aceitação no manejo de carrapatos.

Compreendendo o comportamento de carrapatos e os feromônios envolvidos, há possibilidades práticas do uso destas substâncias no tratamento tanto de animais infestados quanto no meio ambiente. Estes compostos podem atrair e eliminar grandes quantidades de carrapatos antes que estes infestem os

animais, sendo uma forma alternativa e satisfatória de controlar carrapatos e minimizar o uso de acaricidas (SONENSHINE, 2006). Isto possibilita-se pela caracterização dos compostos químicos e a maneira com qual eles influenciam as atividades vitais destas espécies assim armando a manipulação deles para um controle sustentável. Estes feromônios podem então ser usados para múltiplas propostas tais como captura de carrapatos para monitoramento e avaliações de populações, captura massiva objetivando a supressão da população, como iscas e causando confusão sexual (SILVERSTEIN, 1981). Ressalta-se que o único composto atraente disponível para a captura de *A. cajennense* é o dióxido de carbono. Devido às dificuldades de transporte e preço o seu uso é inviável em determinadas regiões, dificultando assim a vigilância para a febre maculosa nestes locais (BORGES, 2004).

Em pesquisas envolvendo os feromônios, a quantificação dos componentes ou as taxas de liberação é imprescindível, seja de fontes naturais ou sintéticas, não apenas durante a implantação dos programas de controle e formulação de produtos mas também nos processos iniciais de isolamento e identificação uma vez que essas podem influenciar nas respostas obtidas em ensaios no laboratório. Louly et al. (2008) observaram conflitos nas respostas dos machos de *A. cajennense* diante fêmeas vivas e septas de borrachas impregnadas com diferentes concentrações de 2,6-DCF. Sabe-se que as extremas de concentração para mais ou para menos podem atrapalhar, levando a repelência se forem muito altas ou a não percepção caso muito baixas (NCHU et al. 2010).

1.10 Identificação de feromônios

Avanços tecnológicos na instrumentação usada para detectar e identificar substâncias têm levado à descoberta de muitos compostos químicos no reino animal e seus efeitos comportamentais nas várias espécies envolvidas (PERS & MINKS, 1997; SONENSHINE, 2006). Devido à versatilidade e à eficiência dos métodos cromatográficos existentes, a sua aplicação nas diversas áreas da ciência torna possível a separação de substâncias de uma mistura complexa,

difíceis ou até mesmo impossíveis de serem separadas por outros métodos (SKOOG et al., 1996). A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) se tornou uma ferramenta eficaz para analisar qualitativa e quantitativamente substâncias presentes em misturas complexas. No entanto, poucos utilizam a técnica em determinações analíticas quantitativas sendo ela considerada majoritariamente uma técnica elucidativa em química orgânica (ROCHA et al., 2009).

Uma miríade de objetos tais como cadáveres secos de carrapatos, cortiças, papéis filtros, borrachas, pérolas de vidro, placas de Petri divididas em setores e vários tipos de olfatômetros e ambientes simulados tem sido utilizadas para a avaliação de atividade de feromônios de ixodídeos *in vitro* (BRILL & SOLOMON 1979; GORDON et al., 1988; SONENSHINE 1991; BORGES et al., 2002). Os machos podem ser induzidos a montar sobre objetos, por exemplo pérolas plásticas cobertas em mistura de 2,6-DCF e ésteres de colestril tão espontaneamente quanto sobre fêmeas com a superfície deslipidizada para adequá-las para estes testes. Esses estudos demonstram, quase com unanimidade, o feromônio e suas características como terem sido responsáveis pelas respostas observadas e não o substrato do qual ele é liberado. O uso de objetos tem a vantagem de praticidade e serve para complementar uma vez que observações feitas em carrapatos fixos *in vivo* podem ser cansativas, desconfortáveis, e frequentemente atrapalhadas pelos movimentos do hospedeiro. Além de mais, para o uso de feromônios em animais ou mesmo em campo têm sido imprescindível a adoção de iscas ou “manequins” (SONENSHINE, 2006). Estudos comportamentais e sensoriais envolvendo a olfação, precisos para validar o papel dos compostos dos feromônios, não foram adequadamente realizados em *A. cajennense*. Contudo a compreensão destes aspectos pode conduzir ao desenvolvimento de estratégias mais efetivas de controle.

1.11 Objetivos

Baseado no exposto acima os objetivos deste trabalho voltados ao *A. cajennense* foram os seguintes:

1.11.1 Geral

Realizar a caracterização química e biológica de feromônios de *Amblyomma cajennense*

1.11.2 Específicos

1. quantificar o 2,6-DCF no extrato de fêmeas atrativas.
2. comparar duas técnicas de quantificação.
3. avaliar o seu papel como feromônio sexual de monta.
4. caracterizar o FAAF de *A. cajennense* para compostos descritos como FAAF de outras espécies de *Amblyomma*.
5. avaliar as respostas comportamentais da espécie diante do mesmo para complementar a caracterização química.

Referências

ALLAN, S. A.; PHILLIPS, J. S.; TAYLOR D.; SONENSHINE D. E.; Genital sex pheromones of ixodid ticks: Evidence for the role of fatty acids from the anterior reproductive tract in mating of *Dermacentor variabilis* and *Dermacentor andersoni*. **Journal of Insect Physiology** v. 34, n. 4, p. 315-323, 1988.

ALLAN, S. A.; SONENSHINE, D. E. Evidence of an assembly pheromone in the black-legged deer tick, *Ixodes scapularis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 1, p. 15-27, 2002.

APPS, P. J.; VILJOEN, H. W.; PRETORIUS, V. Aggregation pheromone of the bont tick *Amblyomma hebraeum*: identification of candidates for bioassay. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 135-137, 1988.

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, 223 p., 2006.

BORGES, L. M. F. Feromônios: uso no controle de carrapatos. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, MG, 2004.

BORGES, L. M. F.; EIRAS, A. E.; FERRI, P. H.; LOBO, A. C. C. The role of 2,6-dichlorophenol as sex pheromone of the tropical horse tick *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 27, p. 223-230, 2002.

BORGES, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Presence of sex pheromones in *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 36, n. 1, p. 50-54, 1999.

BORGES, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; BICALHO, K. A.; FERREIRA, F. Estudo das fôveas dorsais de ninfas e adultos de quatro espécies de carrapatos (Acari: Ixodidae) por microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 89-96, 2006.

BORGES, L. M. F.; SILVA, C. R. F. Ixodídeos parasitos de bovinos e eqüinos da microrregião de Goiânia, Goiás. **Revista de Patologia Tropical**, n.1, v. 23, p. 69-74, 1994.

BRILL, J. H.; SOLOMON, K. R. Research communication. A bioassay method for the pheromone(s) of the bont tick *Amblyomma hebraeum* Koch. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 46, p. 9-60, 1979.

BRUYNE, D.; GUERIN, P. M. Isolation of 2,6-dichlorophenol from the cattle tick, *Boophilus microplus*: receptor cell responses but no evidence for a behavioural response. **Journal of Insect Physiology**, v. 40, p. 143-154, 1994.

CABRERA, R. R.; LABRUNA, M. B. Influence of photoperiod and temperature on the larval behavioral diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 6, p. 1303-1309, 2009.

CAMPOS, P. M.; LABRUNA, M. B. Febre maculosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 12, p. 19-23, 1998.

CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Disponível em: <http://www.cna.org.br/AgropecuariaAgora/Agora03/ag297.htm>, Acesso em: dia 10 de setembro de 2008.

CORRÊA, A. G.; SANT'ANA, J. **Fundamentos da comunicação química de insetos**. Em FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P.C. (org), Produtos naturais no controle de insetos, Editora da Universidade Federal de São Carlos, 2001, 176 p.

DUSBABEK, F.; SIMEK, P.; JEGOROV, A.; TRISKA, J. Identification of xanthine and hypoxanthine as components of assembly pheromone in excreta of argasid ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 11, p. 307-316, 1997.

FALCE, H. C. Infestações múltiplas por ixodídeos (Acari: Ixodidae) em bovinos e eqüídeos no primeiro planalto do Estado de Paraná. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v. 8, p. 11-13, 1986.

FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de Importância Médico-Veterinária**. 3ªed. São Paulo, Nobel, 1990, 192p.

FLECHTMANN, C. H. W. **Elementos de Acarologia**. 1ª ed. São Paulo, Nobel, 1975, 344p.

FONSECA, A. H. Doenças transmitidas ao homem e animais por carrapatos que parasitam eqüinos. Em: Simpósio sobre controle de parasitos, 2., 1997, **Colina**, Campinas: CGE, p. 1-8, 1997.

FREITAS, C. M. V.; LEITE, R. C.; LOPES, C. M. L.; PAZ, G. F.; OLIVEIRA, P. R. Lack of parthenogenesis by *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 843-846, 2002.

GORDON, J.; HAMILTON, C.; SONENSHINE, D. E. Evidence for occurrence of mounting sex pheromone on body surface of female *Dermacentor variabilis* (Say) and *Dermacentor andersoni* (Stiles) (Acari: Ixodidae), **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n. 1, p. 401-410, 1988.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA, B. G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico dos principais ectoparasitos em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 21, p. 8-10, 2002.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R.; GONZALES-ACUNÃ, D.; ESTRADA-PENÃ, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, Berlin, v. 40, p. 83-100, 2006.

GUNN, S. J.; HILBURN, L.R. Parthenogenesis and karyotypic evolution in the cayenne tick, *Amblyomma cajennense* (F.): model for the production of karyotypic changes through a parthenogenetic pathway. **Journal of Medical Entomology**, v. 28, p. 340-349, 1991.

HAMILTON, J.G.C.; PAPADOPOULOS, E.; HARRISON, S.J.; LLOYD, C.M.; WALKER, A.R. Evidence for a mounting sex pheromone in the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus*, Neumann 1901 (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.18, p. 331-338, 1994.

HAMILTON, J. G. C.; SONENSHINE, D. E. Evidence for the occurrence of mounting sex pheromone on the body surface of female *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, p. 401-410, 1988.

IMAMURA, S.; KONNAI, S.; OHASHI, S.; ONUMA, M. Recent topics of candidate antigens for immunological control of ixodid ticks. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, p. 1-16, 2007.

IRAC <http://www.irac-online.org>. Website for Insecticide Resistance Action Committee. Acesso em: 30 de agosto de 2007.

LABRUNA, M.B.; KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; WAAL DE, D.T.; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 97, p. 1-14, 2001.

LABRUNA, M. B.; MACHANDO, R. Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região Neotropical. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. (Eds), **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, p. 155-162, 2006.

LABRUNA, M. B.; TERASSINI, F.A.; CAMARGO, L. M. A. Notes on population dynamics of *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Journal of Parasitology**, Amsterdam, v. 95, n. 4, p. 1016-1018, 2009.

LEITE, R.C., OLIVEIRA, P.R. Frequência de *Amblyomma cajennense* (Fabricius) em rebanhos bovinos de Minas Gerais. In: Seminário do colégio brasileiro de parasitologia veterinária, VII, São Paulo, 1991. **Anais...**São Paulo, 1991.

LOPES, C. M. L.; ROMARÍO, C. L.; LABRUNA, M. B.; OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; RODRIGUES, Z. B.; CARVALHO, H. A.; FREITAS, C. M. V.; VIEIRA JUNIOR, C. R. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 347-351, 1998.

LOULY, C. C. B.; SILVEIRA, D. N.; SOARES, S. F.; FERRI, P. H.; MELO, A. C. C.; BORGES, L. M. F. More about the role of 2,6-dichlorophenol in tick courtship: identification and olfactometer bioassay in *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 60-65, 2008.

MADEIRA, N. G.; AMARANTE, A. F. T.; PADOVANI, C. R. Diversity of ectoparasites in sheep flocks in São Paulo, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 32, n. 4, p. 225-232. 2000.

MARANGA, R. O.; HASSANALI, A.; KAAYA, G. P.; MUEKE, J. M. Performance of a prototype baited trap in attracting and infecting the tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in field experiments. **Experimental and Applied Acarology**, v. 38, p. 211-218, 2006.

MARTINS, J. R. S.; FURLONG, J.; LEITE, R. C. Controle de carrapatos. Em: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. (Eds), **Carrapatos**

de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, p. 145-153, 2006.

NCHU, F.; MANIANIA, N. K.; HASSANALI, A.; ELOF, J. N. Performance of a *Metarhizium anisopliae*-treated semiochemical-baited trap in reducing *Amblyomma variegatum* populations in the field. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 367-372, 2010.

NOLAN, J. Acaricide resistance in single and multi-host ticks and strategies for control. **Parasitologia**, v. 32, p. 145-153, 1990.

OLIVEIRA, P. R. ***Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae): Avaliação de técnicas para o estudo de dinâmica populacional e biotecnologia.** 2000. 105 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LEITE, R. C.; FREITAS, C. M. V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 17, p. 412-416, 2003.

OLIVER., J. H. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodidae). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 397-430, 1989.

PERS, J. N. C. VAN der; MINKS, A. K. Measuring pheromone dispersion in the field with single sensillum recording technique. Em: CARDE, R. T.; MINKS, A. K. (Eds) Insect pheromone research new directions, Chapman and Hall, p. 359-371, 1997.

PETNEY, T. N.; BULL, C. M. A non-specific aggregation pheromone in two Australian reptile ticks. **Animal Behaviour**, v. 29, p. 181-185, 1981.

REHAV, Y.; GOLDBERG, M.; FIELDEN, L. J. Evidence for attachment pheromones in the cayenne tick (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 34, p. 234-237, 1997.

ROCHA, G. O.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; VASCONCELLOS, P. C.; OLIVEIRA, F. S.; CARVALHO, L. S.; CONCEIÇÃO, L. S.; ANDRADE, J. B. Quantification and source identification of atmospheric particulate polycyclic aromatic hydrocarbons and their dry deposition fluxes at three sites in Salvador Basin, Brazil, impacted by mobile and stationary sources. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2009, v. 20, n. 4, p. 1759-1767.

ROJAS, R.; MARINI, M. Â.; COUTINHO, M. T. Z. Wild birds as hosts of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 315-322, 1999.

SANAVRIA, A.; PRATA, M. C. A. Metodologia para colonização do *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Ouro Preto, v. 5, n. 2, p. 87-90, 1996

SERRA-FREIRE, N. M. Tick paralysis in Brazil. **Tropical animal health and production**, v.15, p.124-126, 1983.

SERRA-FREIRE, N. M. **Toxicidade de *Amblyomma cajennense* para ruminantes do mestiços e sua significação como agente de uma nova forma de “tick paralysis”**. 1979. Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro.

SERRA-FREIRE, N. M.; CUNHA, D. W. *Amblyomma cajennense*: Comportamento de ninfas e adultos como parasitos de bovinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Ouro Preto, v. 9 n. 5, p. 100–103, 1987.

SILVERSTEIN, R. M. Pheromones: background and potential use in insect pest control. **Science**, Washington, v. 213, p. 1326-1332, 1981.

SILVERSTEIN, R.; WEST.; J.R.; KHALIL, G.M.; SONENSHINE, D.E. Occurrence of 2,6- dichlorophenol in the hard ticks *Hyalomma dromedarii* and *Hyalomma anatolicum excavatum* with notes on its role in mating regulation in these species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 9, p. 1543–1549, 1983.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 7. Ed. Philadelphia, Saunders College Publishing, 1996. 21p.

SOBBHY, H.; AGGOUR, M.G.; SONENSHINE, D.E.; BURRIDGE, M.J. 1994. Cholesteryl esters on the body surfaces of the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Koch, 1844) and the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Experimental Applied Acarology**, v. 18, p. 265-280, 1994.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. Oxford University Press, 1991. 447 p.

SONENSHINE, D. E. Tick pheromones and their use in tick control. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 557-580, 2006.

SONENSHINE, D. E.; ADAMS, T.; ALLAN, S. A.; McLAUGHLIN, J.; WEBSTER, F. X. Chemical composition of some components of the arrestment pheromone of the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and their use in tick control. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, p. 849-859, 2003.

SONENSHINE, D. Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. **Parasitology**, v. 129, p. S405–S425, 2004.

SONENSHINE, D.; TAYLOR, D.; CORRIGAN, G. Studies to evaluate the effectiveness of sex pheromone impregnated formulations for control of populations of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, Berlin, v. 1, p. 23–34, 1985.

STREY, O. F.; TEEL, P. D.; LONGNECKER, M. T.; NEEDHAM, G. R. Survival and water-balance characteristics of unfed adult *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n.1, p. 63-73, 1996.

SUCEN –Superintendência de Controle de Endemias. Secretaria de Estado da Saúde Manual de Vigilância Acarológica. Coordenação: Vera Lúcia Fonseca de Camargo - Neves. São Paulo, 2004.

SZABÓ, M. P. J.; CASTAGNOLLI, K. C.; SANTANA, D. Á.; CASTRO, M. B.; ROMANO, M. A. *Amblyomma cajennense* ticks induce immediate hypersensitivity in horses and donkeys. **Experimental and Applied Acarology**, Berlin, v. 33, p. 109-117, 2004.

SZABÓ, M. P. J.; CUNHA, T. M.; PINTA, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Berlin, v. 25, p. 909-916, 2002.

TELLAM, R. L.; SMITH, D.; KEMP, D. H.; WILLADSEN, P. Vaccination against ticks. Em: **Animal parasite control utilizing biotechnology**. Wong, W K. edt. Boca Raton. CRC Press, 303-331, 1992.

WILLADSEN, P. Ticks control: thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 138, n. 7, p. 161-168, 2006.

CAPÍTULO 2: Comparação de dois métodos para quantificação de 2,6-diclorofenol do carrapato *Amblyomma cajennense* por CG/EM-MSI

Comparison of two methods to quantify 2,6-dichlorophenol from the tick *Amblyomma cajennense* by GC/MS-SIM

Kennedy K. Gachoka,^a Deomar P. Costa,^b Carla C. B. Louly,^a Lorena L. Ferreira,^a Lígia M. F. Borges,^c Lourival C. Faria,^b Pedro H. Ferri^{1,b}

^aEscola de Veterinária and ^bInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, CP 131, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil

^cInstituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 s/n, Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brazil

Resumo

Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae) é um carrapato de grande importância sócio-econômica no subcontinente Sul-Americano. Apesar disso, pouco se conhece a cerca de sua ecologia química, informação que pode ser crucial para o seu controle. A quantificação de taxa de liberação e quantidades de feromônios tanto das fontes sintéticas como das naturais é preciso durante o processo inicial de isolamento e identificação. Nesse estudo, 2,6-diclorofenol (2,6-DCF), o feromônio sexual de *A. cajennense* foi quantificado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas no modo de análise por monitoramento seletivo de íons (CG/EM-MSI) a partir de fêmeas alimentadas em coelhos durante 6 dias. O extrato do feromônio sexual foi obtido pela exposição ao ultrassom de fêmeas virgens em hexano em duas amostras independentes. Nenhum pré-tratamento da amostra foi necessário. Os métodos de adição padrão (SA) e de curva de calibração com 5-bromo-4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído (5-BrV) como padrão interno (IS) foram utilizados para a

¹ e-mail: pedro@quimica.ufg.br

quantificação. O conteúdo de 2,6-DCF não apresentou nenhuma diferença significativa entre os extratos e/ou métodos utilizados. Os resultados mostraram que as faixas de concentração de 2,6-DCF por fêmea foram de 2,03–2,27 ng mL⁻¹ e de 2,06–2,24 ng mL⁻¹ para os métodos SA e IS, respectivamente. Os métodos mostraram-se específicos, sensíveis e fidedignos na determinação de 2,6-DCF em carrapatos.

Palavras-chave: Adição padrão, feromônio sexual de carrapatos, padrão interno, Ixodidae

Abstract

Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae) is a tick of socioeconomic importance in the South American sub-continent. Nevertheless, little is known pertaining to its chemical ecology, information deemed crucial to its management. Quantification of pheromone release rates or amounts from both natural and synthetic sources is paramount during the initial isolation and identification process. In this study, the tick sex pheromone 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP) was quantified from *A. cajennense* fed on rabbits for 6 days by use of gas chromatography–mass spectrometry in the selected ion monitoring mode (GC/MS-SIM). The sex pheromone extract was obtained by the exposure of attractive females to hexane and ultrasound probe in two independent samples. Clean-up was not necessary. Standard addition method (SA) and calibration curve with 5-bromine-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (5-BrV) as an internal standard (IS) were employed in the quantification. 2,6-DCP contents did not show significant differences between extracts and/or methods. Results showed that the concentration range of sex pheromone per female were 2.03–2.27 ng mL⁻¹ and 2.06–2.24 ng mL⁻¹ for SA and IS methods, respectively. The methods provide a specific, sensitive and reliable technique for determining 2,6-DCP levels in ticks.

Keywords: internal standard, Ixodidae, tick sex pheromone, standard addition

Introduction

Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) is a three-host tick of great socioeconomic importance.¹ Its distribution is limited to the tropics and subtropics of South and Central America, Mexico, and southern USA.² Though mainly a parasite of equines, *A. cajennense* attacks humans and a diverse range of other animals, both wild and domesticated. It is also a vector of the etiologic agent for Rocky Mountain spotted fever, *Rickettsia rickettsii*, in humans and animals living in the region.³ This tick species seems to expand continually in areas where it was previously unimportant, with recent reports of its spread from the Brazilian Cerrado and Pantanal biomes to tropical Atlantic forest areas.⁴

Unlike the majority of *Amblyomma* species, pheromone mediation of the reproductive behavior of *A. cajennense* has been reason for discussion owing to the existence of relatively few studies. However, recent studies have contested a previous consideration that females of this species do not produce a sex pheromone courtesy of positive isolation and identification of the chlorinated phenol, 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP).^{5,6} 2,6-DCP is a highly volatile component that stimulates the detachment of metastriate males from the host to begin searching for emitting females.⁷ In some species, it acts solely as an attractant sex pheromone with steryl esters serving as the cue for final recognition and mounting of female ticks by males,^{8,9} whereas in others it also doubles up as the mounting sex pheromone.^{6,10} Thus this component may be used for multiple purposes in the control of *A. cajennense*, such as confounding males or mimicking females for sexual interruption.^{11,12}

Sex pheromone research has progressed steadily towards the point where quantification of component release rates or amounts from both natural and synthetic sources is essential. Pheromone quantification is required not only during implementation of control programs, such as the formulation of

disruptants, but also during the initial isolation and identification process, as it may influence behavioral responses observed in laboratory bioassays. *A. cajennense* males released in an olfactometer bioassay to females and rubber septa impregnated with 2,6-DCP oriented themselves towards the females and the septa impregnated with 500 ng ml⁻¹, apparently recognizing them as copula partners.⁶ The hypothesis was that the higher orientation to the impregnated septa than to females probably occurred because the concentrations tested were many times higher than those released by females.⁶ In this study we quantified 2,6-DCP from *A. cajennense* using gas chromatography–mass spectrometry–selected ion monitoring method (GC/MS-SIM). For this purpose, internal standard and standard addition methods were used for the measurement of 2,6-DCP in the hexane extract of attractive females from two tick populations.

Experimental

Ticks and pheromone extraction

Engorged adult female *A. cajennense* ticks were collected from naturally infested horses and incubated (T = 27°C and RH > 80%) until oviposition. From the eggs obtained a laboratory colony was initiated and maintained from this stage onwards for use in the study. As regards pheromone extraction, one-month old adults were fed on rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) for six days. In addition, to ensure a clean pheromone extract, the ticks were washed a day prior to rabbits' infestation by being briefly dipped in water and gently swabbed with tissue paper to remove the dirt stuck on their cuticles. These were then used for pheromone extraction. To reduce any effect of uncontrolled factors affecting ticks' life cycle, the extract was obtained from two independent tick populations.

Pheromone was extracted according to the method of Borges *et al.*¹⁰ Briefly, this involved immersing 100 confirmed attractive females in 4 mL of hexane ultra-residue grade (Baker; Phillipsburg, NJ, USA) and exposing them to ultrasound probe for 15min. Extracts were filtered on a 0.45 µm Millipore Millex HV filter (Bedford, MA, USA); the solvent was evaporated under a nitrogen gas

stream and adjusted to 1 mL with ethyl acetate, then kept in dark bottles at -20°C until analyses. Two pheromone extracts (I and II) represented each tick population.

Chemical analyses

Analyses were carried out on a GC/MS Shimadzu (Kyoto, Japan) QP5050A instrument equipped with a data processing system employing the following conditions: a Shimadzu CBP-5 (Kyoto, Japan) fused silica capillary column with 30 m long $\times$ 0.25 mm i.d. $\times$ 0.25 μm film thickness composed of 5% phenylmethylpolysiloxane connected to a quadrupole mass detector operating in the SIM mode by EI ionization (70 eV) with a scan rate of 1.0 scan s^{-1} ; carrier gas: He (1.0 mL min^{-1}), column pressure, 56.7 kPa; injector and detector temperatures of 250°C and a split ratio of 1:5. The injection volume was 0.5 μL and the oven temperature was raised from 80°C to 280°C at $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$, with a total time of 10min. Three ions were recorded for monitoring each compound: m/z 162 $[M]^+$, 164 $[M + 2]^+$ and 166 $[M + 4]^+$ for 2,6-DCP and ions m/z 230 $[M]^+$, 231 $[M + 1]^+ = [M + 2 - H]^+$ and 232 $[M + 2]^+$ ions for the internal standard (IS), 5-bromine-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (5-BrV).

Quantification procedure

The GC/MS-SIM tick pheromone quantification procedure was used to quantify pheromone extracts.¹³ This involved two methods for the construction of calibration curves: internal standard and standard addition.

For the preparation of standard, the stock solutions (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of 2,6-DCP and 5-bromine-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (5-BrV) were prepared in ethyl acetate and stored in dark bottles at -20°C . Under such conditions they remained stable for at least two weeks. Standard solutions used to construct the calibration curves and to spike the extracts were prepared daily by diluting stock solutions with ethyl acetate. All chemicals were analytical-reagent grade purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and solvents were ultra-residue

grade from Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Water was obtained by a Milli-Q BioCell system from Millipore (Bedford, MA, USA).

The calibration curve for the internal standard method was built with six different concentrations (5, 8, 10, 30, 50 and 100 ng mL⁻¹ in 2,6-DCP). Aliquots from the IS stock solution (500 µL) were added to each standard solution. Standard solutions were diluted to a final volume of 10 mL with ethyl acetate. Aliquots of each extract (1 mL) were spiked with 500 µL of the IS stock solution, diluted to a final volume of 10 mL with ethyl acetate, and then analyzed by GC/MS-SIM. All injections were made in triplicate.

In the standard addition, the analytical calibration curve was built through successive additions of known volumes (0, 5, 10, 20 and 30 µL) of the stock solution of 2,6-DCP (0.5 µg mL⁻¹) in 50 µL of the ethyl acetate solution (10 mL) of *A. cajennense* extracts. In the quantification step, the final volume was adjusted to 100 µL and then analyzed by GC/MS-SIM. All injections were made in triplicate.

Statistical analyses

A variety of statistics was used in association with residues to ensure the reliability of all regression models, i.e. Grubbs and Dixon's tests for outliers and Cochran's *C test* for equality of variance in the calibration range.¹⁴ Quantification method and extract origin effects on 2,6-DCP contents were established by two-way ANOVA (extracts and methods as factors) using SAS GLM analyses (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1996). All data were checked for homoscedasticity with the use of Hartley's test. Whenever a difference was established a *post-hoc* Tukey test was performed. Results are shown as mean values and are joined by the standard deviation. *P*-values less than 0.05 were regarded as significant. The results of Grubbs and Dixon's tests and Cochran's *C test* in the calibration curves as well as two-way ANOVA are shown in a supplementary information file.

Results and discussion

This study represents the first attempt to quantify an *A. cajennense* pheromone. Owing to the increased complexity of pheromone samples and to the small amounts of components of interest found in them, highly sensitive methods are required to detect and identify these substances. To achieve this goal, the equipment was thoroughly calibrated and thus the compounds in the column were clearly separated, enabling an accurate quantification of very small amounts of 2,6-DCP in the extract. Clean-ups were not required before the determination by GC/MS-SIM.

Method optimization

The use of gas chromatography–mass spectrometry–selected ion monitoring analyses (SIM method) has been widely applied to the measurement of trace amounts of substances in biological materials because of its high sensitivity and selectivity, which are related to the correct choice of monitored ion fragments. The areas under peaks are directly proportional to component concentrations and thus serve as an analytical parameter. Peaks with the highest intensity for 2,6-DCP were $[M]^+$ ($m/z = 162$, 100%), $[M + 2]^+$ ($m/z = 164$, 95%), and $[M + 4]^+$ ($m/z = 166$, 35%), whereas the most intense peaks for internal standard (5-BrV) were $[M]^+$ ($m/z = 230$, 100%), $[M + 1]^+ = [M + 2 - H]^+$ ($m/z = 231$, 97%), and $[M + 2]^+$ ($m/z = 232$, 98%). Therefore these ions were monitored in the SIM mode. Under the imposed conditions, baseline separation of the two compounds was obtained with retention times of 5.04min for the sex pheromone (2,6-DCP) and 7.09min for the 5-BrV in a chromatographic run of 10min.

Analytical curves

In the internal standard method, analytical calibration curves over a concentration range from 0.5 to 500 ng mL⁻¹ in 2,6-DCP and 0.5 µg mL⁻¹ in 5-BrV had linear responses with correlation coefficients (r^2) higher than 0.99 and fit

to a calibration curve such as $A/A_0 = a + b(C/C_0)$, where A and C are the integrated peak area and concentration of 2,6-DCP, respectively; A_0 and C_0 are the corresponding quantities for IS; b is the slope of the calibration line and a is its intercept. The analytical parameters defined a linear relationship obtained between the ratio area of ions m/z 162, 164, 166 to ions m/z 230, 231, 232 of the IS and the concentration of 2,6-DCP.

In the standard addition method, the linear range was established by adding known volumes (0, 5, 10, 20, and 30 μL) of the stock solution of 2,6-DCP ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) in volumetric flasks of 10 mL containing a synthetic sample (50 μL) of known concentration (8 ng mL^{-1}). The concentrations were ascertained by extrapolation of the calibration curves. The x-intercept represented the original amount of 2,6-DCP. Detection and quantification limits for both methods were calculated from analyses of 17 replicates of blank sample. The standard deviation (SD) of those analyses was divided by the angular coefficient of the linear equation model and multiplied by three (LD) and ten (LQ) times. Table 1 shows calibration parameters for both methods.

Table 1. Analytical characteristics of calibration curves of 2,6-DCP in GC/MS-SIM methods

Parameters	Methods	
	Internal standard	Standard addition
Regression equation	$A/A_0 = a + b(C/C_0)$	$A = a + bC$
Slope (b)	0.0079 ± 0.0001^a	214.693 ± 1.524^b
Intercept (a)	0.0608 ± 0.0046^a	2462.808 ± 128.614^b
Correlation coefficient (r^2)	0.9994	0.9998
Calibration range (ng mL^{-1})	0.5-500	0-150
Quantification limit (ng mL^{-1})	3.9	4.7
Detection limit (ng mL^{-1})	1.2	1.4

^a Average of six determinations, sd ($n = 6$). ^b Average of five determinations, sd ($n = 5$).

Precision and accuracy

Table 2 shows the precision and accuracy for the proposed methods assessed by values of coefficient of variation (CV) and relative error (RE). Recovery data for the IS method was estimated by six replicates of two standard solutions of known concentrations (8 and 20 ng mL⁻¹ in 2,6-DCP). The results obtained for 2,6-DCP recoveries ranged from 93.38 to 103.60%. For the standard addition method the recovery was obtained by five replicates of a synthetic sample of known concentration (8 and 20 ng mL⁻¹ in 2,6-DCP) spiked with 2,6-DCP at five levels of fortification; the value was 106.55%.

Table 2. Precision and accuracy of 2,6-DCP in GC/MS-SIM methods

2,6-DCP (ng mL ⁻¹)	Internal standard (<i>n</i> = 6)			Standard addition (<i>n</i> = 5)		
	Concentration (mean ± <i>sd.</i>)	Precision (%) ^b	Accuracy (%) ^c	Concentration (mean ± <i>sd.</i>)	Precision (%) ^b	Accuracy (%) ^c
8 ^a	7.81 ± 0.34	4.35	2.38	8.48 ± 0.39	4.60	5.63
20 ^a	19.82 ± 0.90	4.54	0.91	21.42 ± 0.93	4.34	6.63

^a Reference value of concentration. ^b Expressed as values for coefficient of variation (CV). ^c Expressed as values for relative error (RE).

2,6-DCP quantification

Internal standard was employed for several reasons. It cancels all variation in quantification caused by instrument instability and it allows for greater certainty in the assignment of retention times and increased sensitivity. To check its accuracy, the 2,6-DCP concentration of spiked samples was calculated by the standard addition method. Two-way analysis of variance (two-way ANOVA) was performed to investigate the method's (and the extract's) effects. If the null hypothesis is accepted with a significant level over 5%, then it is inferred that methods are accurate because of the similarity of the results for 2,6-DCP contents, which are not significantly different. In addition, the absence of a matrix effect is confirmed.

For quantifying the pheromone in the samples we chose the concentration range from 5 to 150 ng mL⁻¹, since it included quantities reported for other tick species.^{13,15,16}

Values obtained by the direct measurement of 2,6-DCP in calibration curves ranged between 10.19 and 10.89 ng mL⁻¹ for internal standard and between 10.26 and 11.68 ng mL⁻¹ for the standard addition method. Pheromone quantities in females ranged from 2.03 to 2.32 ng mL⁻¹ each. Two-way ANOVA (Table 7S, supplementary information) showed that no significant differences in 2,6-DCP amounts were found according to tick population (extracts I and II: degrees of freedom, $df = 3, 28$; F -value = 2.33; $p < 0.138$) and quantification method (IS and AS: $df = 3, 28$; F -value = 0.001; $p < 0.950$), as well as in the interaction between the two factors (extract*method: $df = 3, 28$; F -value = 0.160; $p < 0.691$).

Table 3. 2,6-DCP concentration (average and standard deviations) assessed by GC/MS-SIM in extract samples

	Methods	
	Internal standard ($n = 6$)	Standard addition ($n = 10$)
Values (ng mL ⁻¹) obtained by direct measurement in calibration curves		
Extract I	21.70 ± 1.32	11.00 ± 0.67
Extract II	21.34 ± 0.43	10.60 ± 0.34
Values (ng mL ⁻¹) expressed for one tick female		
Extract I	2.17 ± 0.13	2.19 ± 0.14
Extract II	2.13 ± 0.04	2.12 ± 0.07

The fact that the two methods which analyzed two different samples yielded no significant differences for 2,6-DCP quantities highlights the consistency of the whole process, from infestation of the rabbits with the ticks to the extraction and quantification procedures. Furthermore, they are reliable for the quantification of 2,6-DCP in the range of the established concentration. In addition, these results revealed the absence of tick life cycle and matrix interferences.

The mean value of 2.15 ng mL^{-1} per female was within the range of 2-3 ng per female *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) and of 2.0 ng per tick after six days of feeding in *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann, 1901).^{15,16} However, it was several times higher than the 0.31 ng mL^{-1} per female value, found by the same methods when quantifying 2,6-DCP in *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897).¹³ These variations mainly serve to define the range of expected 2,6-DCP quantities, as it is not possible to make direct comparisons of pheromone quantities obtained by different methods from tick species of various hosts, life cycles and habitats, even when such quantities are apparently similar.

The identification of 2,6-DCP dates back to the 1970s, with the first reports registered for *Amblyomma americanum* Linnaeus.¹⁷ So far the compound has been reported in 18 species of Ixodidae from seven genera.^{6,10,18-20} However, confirmatory reports of 2,6-DCP's role as a sex-attraction pheromone are fewer and conclusive in only eight species, including *A. cajennense*.^{6,10,21-23} In *R. microplus*, cell responses to 2,6-DCP were not followed by any evidence of behavioral reaction.¹⁸ Whereas most reports allude to 2,6-DCP in feeding females, other studies have shown the phenol from unfed females,¹⁶ unfed males, and larvae in *R. appendiculatus* and *R. microplus*.¹⁸ Nevertheless, it is in females of the Ixodidae species following the onset of feeding that the role of 2,6-DCP has been elucidated. *A. cajennense* males released to females and control rubber septa impregnated with 2,6-DCP at 50, 500, and 5000 ng oriented themselves towards the females and the septa impregnated with 500 ng⁶. They apparently recognized them as copula partners attaining a degree of mounting and ventral positioning in both cases,⁶ even though quantities impregnated on the rubber septa were many times higher than those determined in females in this work. Going by the values obtained here, the quantities impregnated on the rubber septa were many times higher than those emitted by the females. Thus, the quantities of 2,6-DCP tested may contribute to the behavioral responses observed and hence the importance of quantification as a first step towards the evaluation of its role in the courtship behavior of *A. cajennense*.

Conclusion

In this paper, the quantification of 2,6-DCP in extract samples of *A. cajennense* females was achieved by GC/MS-SIM with standard addition and internal standard as calibration methods. All calibration curves had a correlation coefficient greater than 0.99 over the 2,6-DCP concentration range of 0.5-500 ng mL⁻¹. The methods are quick, accurate, and highly efficient, and may be used for the qualitative or quantitative determination of 2,6-DCP in ticks.

Supplementary information

Supplementary data are available free of charge at <http://jbcs.sbq.org.br>, as a PDF file.

Acknowledgements

The authors are indebted to CNPq, Academy of Sciences for the Developing World-TWAS, PADCT III, and FUNAPE/UFG for financial support, as well as to CNPq/TWAS for granting a fellowship to Kennedy K. Gachoka.

References

1. Guglielmone, A. A.; Mangold, A. J.; Aguirre, D. H.; Aido, A. B.; *Vet. Parasitol.* **1990**, 35, 93.
2. Campos, P. M.; Labruna, M. B.; *Clin. Vet.* **1998**, 12, 19; Guglielmone, A. A.; Beati, L.; Barros-Battesti, D. M.; Labruna, M. B.; Nava, S.; Venzal, J. M.; Mangold, A. J.; Szabó, M. P. J.; Martins, J. R.; Gonzales-Acunã, D.; Estrada-Penã, A.; *Exp. Appl. Acarol.* **2006**, 40, 83.
3. Dias, E.; Martins, A. V.; *Am. J. Trop. Med.* **1939**, 19, 103; Lemos, E. R. S.; Machado, R. D.; Pires, F. D. A.; Machado, S. L.; Costa, L. M. C.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1997**, 92, 477; Horta, M.; Labruna, M. B.; Sangioni, L. A.; Vianna, M. C. B.; Gennari, S. M.; Galvão, M. A. M.; Mafra, C. L.; Vidotto, O.;

- Schumaker, T. T. S.; Walker, D. H.; *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *71*, 93;
- Guedes, E.; Leite, R. C.; Prata, M. C. A.; Pacheco, R. C. P.; Walker, D. H.; Labruna, M. B.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2005**, *100*, 841.
4. Labruna, M. B.; Jorge, R. S. P.; Sana, D. A.; Anah, T. A. J.; Kashivakura, C. K.; Furtado, M. M.; Ferro, C.; Perez, A. S.; Silveira, L.; Santos Junior, T. S.; Marques, S. R.; Morato, R. G.; Nava, A.; Adania, C. H.; Texeira, R. H. F.; Gomes, A. A. B.; Conforti, V. A.; Azevedo, F. C. C.; Prada, C. S.; Silva, J. C. R.; Batista, A. F.; Marvulo, M. F. V.; Morato, R. L. G.; Alho, C. J. R.; Pinter, A.; Ferreira, P. M.; Ferreira, F.; Barros-Battesti, D. M.; *Exp. Appl. Acarol.* **2005**, *40*, 149.
 5. Rechav, Y.; Goldberg, M.; Fielden, L. J.; *J. Med. Entomol.* **1997**, *34*, 234.
 6. Louly, C. C. B.; Silveira, D. N.; Soares, S. F.; Ferri, P. H.; Melo, A. C. C.; Borges, L. M. F.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2008**, *103*, 60.
 7. Sonenshine, D. E.; *Biology of ticks*, vol. 1; Oxford University Press: Oxford, 1991.
 8. Hamilton, J. G. C.; Sonenshine, D. E.; Lusby, W. R.; *J. Insect Physiol.* **1989**, *11*, 873.
 9. Hamilton, J. G. C.; Sonenshine, D. E.; *J. Chem. Ecol.* **1988**, *14*, 401;
 10. Borges, L. M. F.; Eiras, A. E.; Ferri, P. H.; Lobo, A. C. C.; *Exp. Appl. Acarol.* **2002**, *27*, 223.
 11. Sonenshine, D. E.; Taylor, D.; Corrigan, G.; *Exp. Appl. Acarol.* **1985**, *1*, 23.
 12. Borges, L. M. F.; Ferreira, L. A. M.; Silva, L. S.; Oliveira, R. A.; Mussi, S. V.; Faria, K. A.; Melo, L. S.; Abud, L. J.; Costa, G. V.; Soares, S. F.; *Vet. Parasitol.* **2007**, *147*, 155.
 13. Rodrigues, C. M.; Borges, L. M. F.; Ferri, P. H.; Faria, L. C.; *Talanta* **2004**, *62*, 637.
 14. Miller, J. N.; Miller, J. C.; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th Ed.; Prentice Hall: New York, 2001.
 15. Chow, Y. S.; Wang, C. B.; Lin, L. C.; *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1975**, *68*, 485.
 16. McDowell, P. G.; Waladde, S. M.; *J. Chem. Ecol.* **1986**, *12*, 69-82.
 17. Berger, R. S.; Dukes, J. C.; Chow, Y. S.; *J. Med. Entomol.* 1971, *8*, 84; Berger, R. S.; *Science* **1972**, *177*, 704.

18. Bruyne, M.; Guerin, P. M.; *J. Insect Physiol.* **1994**, *40*, 143.
19. Liu, J. Z.; Jiang, Z. J.; Yang, Y. P.; Sun, R. Y.; *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.* **1998**, *5*, 253.
20. Sonenshine, D. E.; *Annu. Rev. Entomol.* **2006**, *51*, 557.
21. Sonenshine, D. E.; Silverstein, R. M.; Plummer, E.; West, J. R.; Mccullough, T.; *J. Chem. Ecol.* **1976**, *2*, 201.
22. Kellum, D.; Berger, R. S.; *J. Med. Entomol.* **1977**, *20*, 701.
23. Silverstein, R.; West, J. R.; Khalil, G. M.; Sonenshine, D. E.; *J. Chem. Ecol.* **1983**, *9*, 1543.

Received: August 26, 2009

Web Release Date: May 11, 2010

Journal of the Brazilian Chemical Society

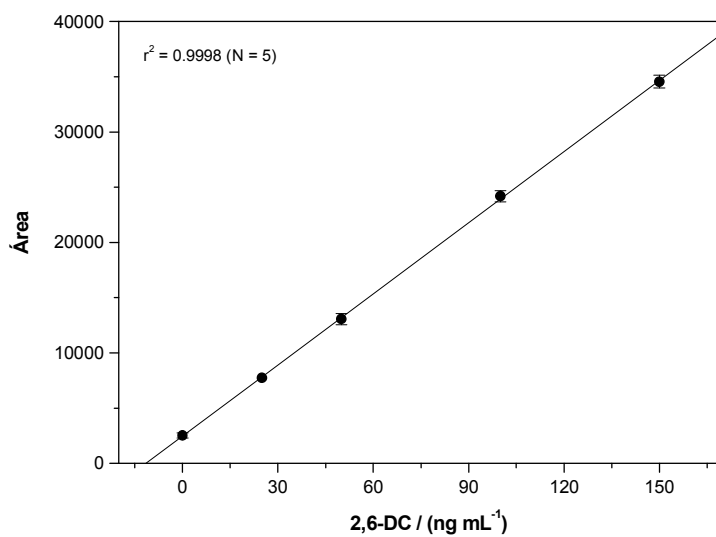
URL: http://jbcs.sbq.org.br/online/2010/vol21_n9/06-09588AR.pdf

Supplementary Information

GRAPHICAL ABSTRACT

Comparison of two methods to quantify 2,6-dichlorophenol from tick *Amblyomma cajennense* by GC/MS-SIM

Kennedy K. Gachoka, Deomar P. Costa, Carla C. B. Louly, Lorena L. Ferreira, Lígia M. F. Borges, Lourival C. Faria, and Pedro H. Ferri



$$G_{95\%} \text{ experimental} = (X_i - \text{average})/\text{sd}; G_{95\%} \text{ (critical, } n = 6, \alpha = 0.05) = 1.89$$
[illegible]

Table 5S. Dixon's test results of 2,6-DCP quantification by standard addition method

2,6-DCP (ng mL ⁻¹)	Measurements					Q _{95%} (experimental)	
	1	2	3	4	5	Up	Down
5	2148	2565	2572	2887	2893	0.01	0.56
8	7745	7747	7747	7749	7752	0.43	0.29
10	12078	12085	13348	13372	13782	0.24	0.00
30	23150	23250	24226	25060	25090	0.02	0.05
50	33620	33710	34422	35535	35635	0.05	0.04

Q_{95%} (critical, H = 5; α = 0.05) = 0.71

Table 6S. Grubb's test results of 2,6-DCP quantification by standard addition method

2,6-DCP (ng mL ⁻¹)	Average	sd	G _{95%} (experimental)				
			1	2	3	4	5
5	2613.000	305.649	-1.52	-0.16	-0.13	0.90	0.92
8	7748.000	2.646	-1.13	-0.38	-0.38	0.38	1.51
10	12933.000	796.222	-1.07	-1.07	0.52	0.55	1.07
30	24155.200	939.061	-1.07	-0.96	0.08	0.96	1.00
50	34584.400	965.455	-1.00	-0.91	-0.17	0.98	1.09

G_{95%} experimental = (Xi-average)/sd; G_{95%} (critical, n = 5, α = 0.05) = 1.71

Table 7S. 2,6-DCP contents^a (ng mL⁻¹ per female) in hexane extract samples determined by internal standard and standard addition methods from two *A. cajennense* populations

Population (extract)	Quantification method		Average
	Internal standard (<i>n</i> = 6)	Standard addition (<i>n</i> = 10)	
I	2.17 ± 0.13	2.19 ± 0.14	2.18 ± 0.14 A
II	2.13 ± 0.04	2.12 ± 0.07	2.12 ± 0.06 A
Average	2.15 ± 0.09 a	2.15 ± 0.12 a	

^a Averages followed by the same capital letter in the columns and by the same small letter in the rows did not share significant differences at 5% probability by Tukey test.

CAPÍTULO 3: Indução de monta e reversão ventral em *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) *in vitro* pelo 2,6-diclorofenol em quantidades iguais às liberadas naturalmente

2,6-dichlorophenol induction of mounting-turn-tipping over courtship behaviour in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) *in vitro* at naturally-occurring quantities

Kennedy Kiriira Gachoka¹, Lorena Lopes Ferreira¹, Carla Cristina Braz Louly¹,
Lígia Miranda Ferreira Borges^{2/2}

¹Escola de Veterinária, ²Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública,
Universidade Federal de Goiás, Rua 235 s/n, Setor Universitário, 74605-050
Goiânia, GO, Brasil

Resumo

Visando esclarecer o(s) papel(s) de 2,6-diclorofenol (2,6-DCF) no processo de monta em *A. cajennense*, machos sexualmente maduros alimentados em coelhos por seis dias foram liberados sobre manequins impregnados com o extrato bruto de fêmeas ou 2,6-DCF na dose de dois fêmea-equivalentes em bioensaios *in vitro*. Na presença do extrato e 2,6-DCF foi demonstrada resposta dos machos em forma de toques e explorações sobre os manequins. A monta ocorreu livremente. A monta e reversão ventral ocorreram em até 80% e 73% dos casos usando o extrato e o 2,6-DCF, respectivamente, e foram significativamente maior ($P < 0,05$) do que nos controles. Foram observadas montas de durações relativamente curtas (média 11s), mas quase todos os casos de monta (60 a 80%) levaram à reversão ventral. Raros casos de machos que foram direto ao posicionamento ventral foram registrados, uma resposta considerada contrária a seqüência convencional do processo de cópula em

Financial support: CNPq/TWAS

²Corresponding author: ligia@iptsp.ufg.br

carrapatos. Confirmou-se que o 2,6-DCF sozinho conduz à monta em *A. cajennense*.

Palavras-chave: Comunicação química, feromônio sexual, Ixodidae

Abstract

In order to clarify the role(s) of 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP) in *Amblyomma cajennense* courtship behaviour, sexually mature males previously fed on rabbits were released on dummies impregnated with whole female extract sample or 2,6-DCP at concentrations of two female equivalents in *in vitro* bioassays and their responses observed. In the presence of the extract and 2,6-DCP, the excitement of the males expressed in form of touches and probes on the dummy was observed and mounting occurred readily. Mounting and tipping over occurred in up to 80% and 73% of all cases using the extracts and 2,6-DCP, respectively, and were significantly higher than in the control. Relatively short mounting durations (11s in average) were recorded but almost all instances of mounting resulted in tipping over behaviour (60 – 80%). Isolated cases were reported of males that went directly to ventrolateral positioning against conventional tick mating sequence. It was confirmed that 2,6-DCP alone mediates mounting behaviour in *A. cajennense*.

Keywords: Chemical communication, Ixodidae, sex pheromone

Introduction

Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) is a tick of great economic importance in the South-American sub-continent owing principally to its capacity to transmit the causative agent of Brazilian spotted fever, *Rickettsia rickettsii*, in humans and animals (SUCEN, 2004; SANGIONI et al., 2005). Its female attractant sex pheromone is constituted of 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP), a volatile substance (LOULY et al., 2008). The phenol has been reported from 18 species of Ixodidae from seven genera to date and holds great potential for

exploitation in the management of such species if innovatively crafted in as a pheromone-assisted control method (SONENSHINE, 2006). However, behavioural and chemical studies necessary to validate 2,6-DCP's role as a sex-attraction pheromone have been conclusive in just eight of these species (SONENSHINE et al., 1976; KELLUM & BERGER, 1977; SILVERSTEIN et al., 1983; BORGES et al., 2002; LOULY et al., 2008) among which in two, *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) and *A. cajennense*, it has been further associated with induction of mounting behaviour (BORGES & RIBEIRO, 1999; BORGES et al., 2002; LOULY et al., 2008) within the conventional mating sequence described in ixodid ticks (SONENSHINE, 1985). In certain majority species, however, 2,6-DCP together with cholesteryl esters are considered necessary for the males to recognize and mount on sexual partners (HAMILTON & SONENSHINE, 1988; SOBBHY et al., 1994). In such species the esters are classified as another category - the mounting sex pheromone.

2,6-DCP in *A. cajennense* was identified and characterized for male courtship behaviour using live females and impregnated rubber septa which served as female odour sources in an arena olfactometer (LOULY et al., 2008). Subsequent quantification of 2,6-DCP in *A. cajennense*, however, yielded a mean value of 2.15 ng ml^{-1} per female (GACHOKA et al., 2010) which was far less than the 50 – 5000 ng tested in the cited work above. The present work was aimed, therefore, at verifying the behavioural responses that the female extract and 2,6-DCP provoke in *A. cajennense* courtship at the quantities established in the quantification and thus definitely closer to those perceived by the males under natural conditions.

Materials and methods

Ticks maintenance and pheromone preparation procedure

Fully engorged *A. cajennense* females were collected from naturally infested horses and maintained in incubators ($T = 27^{\circ}\text{C}$, $\text{RH} > 80\%$) in the laboratory for colony establishment, according to the method described by

SANAVRIA & PRATA (1996). Towards this end, successive life cycle stages were allowed to feed on the backs of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). To obtain the pheromone extract, 100 females fed for six days were placed in 4 ml of hexane in sealable glass tubes, followed by sonication for 15min and the filtrate concentrated to 1 ml under nitrogen gas, according to the method by BORGES et al. (2002). In total, about 1500 females in different batches were used for the extraction of the sex pheromone.

Biological assays

The evaluation bioassay for the role of 2,6-DCP as a mounting pheromone was done in an isolated odour-free test room with controlled conditions of temperature and relative humidity ($T = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{RH} > 50\%$). The method by BORGES & RIBEIRO (1999) was used with slight modifications. A Petri dish (70 mm diameter, 10 mm depth) placed over a glass-covered water bath (37°C) served as the test arena in a simulation of the host. Smooth, inert, solid spherical glass beads of approximately the same size as feeding female ticks (dummies, 5 mm diameter, 4 mm high, 0.1 g) were roughened on the surface with sandpaper to reduce slipperiness and abraded flat on one side with a file to prevent rolling over. One glass dummy at a time was impregnated incrementally with 20 μl of the extract sample or 2,6-DCP (4.3 ng ml^{-1} = two female equivalents in each case) and left for 5 s in a clean bench to allow for complete solvent evaporation. This was then placed in the middle of the Petri dish arena for the bioassay. Control dummies were treated in exactly the same way but only hexane was added. Each male was tested independently against a newly impregnated unused dummy.

Fifteen freshly detached (after five days of feeding) sexually mature males each were released individually 1 cm from the dummy using a pair of forceps and the Petri dish covered. By close observation and with the aid of a camera, the data collected included: (1) number of males that got in contact with the dummy; (2) number of probes and explorations on the dummy; (3) mounting frequency; (4) frequency of tipping over beneath the dummy (ventrolateral positioning); (5)

time taken in the mounted and tipped over position and (6) associated behaviours. Mounting or perching referred to a position where all legs were entirely in contact with the bead while tipping over was defined as being able to observe partly the posterior ventrolateral side of the probing male from the top with a degree of arrestment. Those that failed to mount after 60 s were re-introduced up to three times before scoring the response.

A second bioassay was then conducted under similar conditions aimed at laying emphasis on the behaviours of interest by making a direct introduction of the male on top of the dummy. In this case, a record was made of (1) the number that remained perched on the dummy for > 2s, (2) frequency of ventrolateral positioning; (3) total time taken in the perched and tipped over position and (4) associated behaviour. Three releases each were made for every male tick each lasting at least 60s, depending on whether mounting occurred or not. Mounting/perching was uninterrupted for as long as it lasted. One-month old adults were used in the bioassays.

Statistical analyses

Data between treatments in mounting and tipping-over responses were analyzed by Kruskal-Wallis test while time durations analysis was by one way ANOVA at 95% level of confidence. Mean separation was by Tukey's test.

Results and discussion

More heightened than normal tick activity was observed in the males characterized by walking randomly and rapidly while waving their forelegs but this eventually slowed down to normal. In the presence of either the pheromone extract or 2,6-DCP, males were observed to attempt to push themselves in between the bead and the surface on which it sat such that it was sometimes moved but did not roll over. Others engaged in sideways movement in the crawled-over position against the dummy. In the control, most males after descending from the dummy onto which they had been placed walked across to

the side and cover (underside) of the Petri dish and back to the floor again. In the process most failed to re-locate the dummy. Slowed activity occurred once the males had been successfully oriented to the pheromone source. Owing to the flattened bottom of the dummy for stability purposes in this bioassay, males could only attain ventrolateral positioning after tipping-over rather than the complete ventral positioning attained with live females in nature.

Overall, statistically significant induction of mounting activity and tipping over by the pheromone extract of fed females as well as 2,6-DCP was observed compared to the control. In fact, there was a great tendency of the males to seek out and to mount on the dummy or remain perched thereon upon the first release. From the results, 73.33% of the males attained the mounted position using the extract sample and 2,6-DCP in the first bioassay (TABLE 1) while 80% and 73.33% remained perched on dummies impregnated with the two samples, respectively (TABLE 2), compared to 26.67% and 40% in the controls. These percentages compare closely to the 67% and 73% reported by LOULY et al. (2008) in experiments using rubber septa impregnated with 500 ng of 2,6-DCP and live fed females, respectively. These workers had however reported discrepancies whereby 50 ng and 5000 ng in the same series had failed to induce mounting at all, a situation which had left the exact role of 2,6-DCP in *A. cajennense* still undefined. While lower concentrations might go undetected, very high ones could end up confusing the males by creating a ubiquitous environment of 2,6-DCP and thereby stimulating the males to start searching but negating their ability to locate females in such an environment. It is a concentration gradient that enables a male to locate the source of the pheromone (SONENSHINE, 2006). High concentrations have also been associated with repellence (NCHU et al., 2010).

Frequencies of tipping over compared closely with those of mounting in that almost all the males that attained the mounted/perched position on the dorsal surface progressed to tip-over being 60 and 80%, 60 and 73.33%, and 20 and 40% with the sample, 2,6-DCP and control in the two bioassays, respectively (TABLES 1 & 2). There was no indication of any relationship between and among the nature of initial contact(s), probability of mounting or perching the dorsal

surface, turning onto the venter or the time durations of these stages. Almost equal degrees of activity were recorded with the extract and 2,6-DCP while it was significantly less in the controls.

TABLE 1: Percentage frequency and mean duration of mounting and tipping over of male ticks on glass dummies impregnated with two-female equivalents of the female extract or 2,6-DCP at a concentration of 4.3 ng ml⁻¹

Sample	Relative frequency mounting (%)	Time (s) [mean $\pm$ sd.] ¹	Tipping-over frequency (%)
Extract	73.33	6.82 $\pm$ 2.46 ^a	60
2,6-DCP	73.33	4.91 $\pm$ 1.23 ^a	60
Control	26.67	3.13 $\pm$ 0.52 ^a	20

Means within a column followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ by Tukey's test. ¹Data on time was log transformed before ANOVA.

TABLE 2: Percentage frequency and mean duration of perching and tipping over of male ticks on glass dummies impregnated with two-female equivalents of the female extract or 2,6-DCP at a concentration of 4.3 ng ml⁻¹

Sample	Relative frequency perching (%)	Time (s) [mean $\pm$ sd.] ²	Tipping-over frequency (%)
Extract	80	8.04 $\pm$ 2.68 ^a	80
2,6-DCP	73.33	4.95 $\pm$ 1.53 ^a	73.33
Control	40	3.67 $\pm$ 1.05 ^a	40

Means within a column followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ by Tukey's test. ²Data on time was log transformed before ANOVA.

In these experiments, slight qualitative differences between *A. cajennense* and other reported species were observed; *A. cajennense* had relatively short but numerous contact times appearing to give up rather quickly and move on. BORGES & RIBEIRO (1999) had, reported average durations of 60s in this phase in experiments with the tropical horse tick *A. nitens*, a relatively higher

average than that of 11s shown by *A. cajennense*. The differences in time durations between species could be attributed to unelucidated mechanical and structural features.

According to HAMILTON & SONENSHINE (1988) and SOBBHY et al., (1994), males attracted to 2,6-DCP placed on inanimate objects which fail to recognize these objects as potential mates leave immediately even if they make physical contact with them. In such cases cholesteryl esters, also called mounting sex pheromone, are considered necessary for the males to recognize the objects as sexual partners. In *Rhipicephalus sanguineus* (Latreilla, 1806) and *R. microplus* however, these processes are not mediated by the phenol (BRUYNE & GUERIN 1998; LOULY et al., 2008). The first report of 2,6-DCP as an attractant and mounting sex pheromone was that by BORGES et al. (2002) made from the tropical horse tick *D. nitens* where it was demonstrated to elicit the complete response sequence of orientation, location, mounting and ventral positioning. A most peculiar observation though in the present study was whereby a male went straight to ventrolateral positioning without necessarily mounting. Although only observed in very few individuals, this is the first report of such a phenomenon and seems to contradict the stepwise approach currently accepted as standard in tick courtship. It would be interesting to investigate if this 'anomaly' happens with frequency with *A. cajennense* in nature.

On the basis of this study, it is reasonable to conclude that *A. cajennense* joins the emerging list of species where 2,6-DCP has been validated as not only a sex attraction pheromone but also a mounting one based on tests at quantities equal to those emitted naturally. Based on this conclusion and considering that several studies have successfully demonstrated the potential for use of 2,6-DCP in tick control by killing those attracted to the pheromones-acaricide incorporated decoys or by disruption of their reproduction behaviour/sequence (ZIV et al., 1981; SONENSHINE et al., 1992; BORGES et al., 2007), similar models to evaluate the potential utility of 2,6-DCP in *A. cajennense* control are recommended for investigation.

Conclusion

In this study, a confirmation of the role of 2,6-DCP alone as the stimulus for attraction and mounting at naturally-occurring quantities in *A. cajennense* courtship was achieved in *in vitro* bioassays. Mounting and associated behaviours were recorded in the presence of 2,6-DCP. The phenol demonstrated potential, pending relevant trials, for use in the control of *A. cajennense*.

Acknowledgements

The authors are indebted to CNPq/TWAS for financial support in form of a grant fellowship to Kennedy K. Gachoka.

References

- BORGES, L. M. F.; EIRAS, A. E.; FERRI, P. H.; LOBO, A. C. C. The role of 2,6-dichlorophenol as sex pheromone of the tropical horse tick *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 27, p. 223-230, 2002.
- BORGES, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Presence of sex pheromones in *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 36, n. 1, p. 50-54, 1999.
- BORGES, L. M. F.; FERREIRA, L. A. M.; SILVA, L. S.; OLIVEIRA, R. A.; MUSSI, S. V.; FARIA, K. A.; MELO, L. S.; ABUD, L. J.; COSTA, G. V.; SOARES, S. F. Efficacy of 2,6-dichlorophenol lure to control *Dermacentor nitens*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 155-160, 2007.
- BRUYNE, M.; GUERIN, P. M. Contact chemostimuli in the mating behaviour of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 39, p. 65-80, 1998.
- GACHOKA, K. K.; COSTA, D. P.; LOULY, C. C. B.; FERREIRA, L. L.; BORGES, L. M. F.; FARIA, L. C.; FERRI, P. H. Comparison of two methods to quantify 2,6-dichlorophenol from tick *Amblyomma cajennense* by GC/MS-SIM. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 9, p. 1642-1647, 2010.
- HAMILTON, J. G. C.; SONENSHINE, D. E. Evidence for the occurrence of mounting sex pheromone on the body surface of female *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, p. 401-410, 1988.

KELLUM, D.; BERGER, R. S. Relationship of the occurrence and function of 2,6-dichlorophenol in two species of *Amblyomma* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 20, p. 701-705, 1977.

LOULY, C. C. B.; SILVEIRA, D. N.; SOARES, S. F.; FERRI, P. H.; MELO, A. C. C.; BORGES, L. M. F. More about the role of 2,6-dichlorophenol in tick courtship: identification and olfactometer bioassay in *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 103, n. 1, p. 60-65, 2008.

NCHU, F.; MANIANIA, N. K.; HASSANALI, A.; ELOF, J. N. Performance of a *Metarhizium anisopliae*-treated semiochemical-baited trap in reducing *Amblyomma variegatum* populations in the field. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 367-372, 2010.

SANAVRIA, A.; PRATA, M. C. A. Metodologia para colonização do *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Ouro Preto, v. 5, n. 2, p. 87-90, 1996

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases** v. 2, n. 11, p. 265-270, 2005.

SILVERSTEIN, R.; WEST, J. R.; KHALIL, G. M.; SONENSHINE, D. E. Occurrence of 2,6- dichlorophenol in the hard ticks *Hyalomma dromedarii* and *Hyalomma anatolicum excavatum* with notes on its role in mating regulation in these species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 9, p. 1543–49, 1983.

SOBBHY, H.; AGGOUR, M. G.; SONENSHINE, D. E.; BURRIDGE, M. J. Cholesteryl esters on the body surfaces of the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Koch, 1844) and the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Experimental and Applied Acarology**, v. 18, p. 265-280, 1994.

SONENSHINE, D. E. Pheromones and other semiochemicals of the Acari. **Annual Review of Entomology**, v. 30, p. 1-28, 1985.

SONENSHINE, D. E. Tick pheromones and their use in tick control. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 557-80, 2006.

SONENSHINE, D. E.; HAMILTON, J. G. C.; LUSBY, W. R. The use of cholesteryl esters as mounting sex pheromones in combination with 2,6-dichlorophenol and pesticides to control ticks. **US Patent**, n. 5149526, 1992.

SONENSHINE, D. E.; SILVERSTEIN, R. M.; PLUMMER, E.; WEST, J. R.; MCCOLLOUGH, T. 2,6-dichlorophenol, the sex pheromone of the rocky mountain wood tick, *Dermacentor andersoni* Stiles and the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, n. 2, p. 201-209, 1976.

SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias. Secretaria de Estado da Saúde, **Manual de Vigilância Acarológica**. Coordenação: Vera Lúcia Fonseca de Camargo – Neves. São Paulo, 2004. 48 p.

ZIV, M.; SONENSHINE, D. E.; SILVERSTEIN, R. M.; WEST, J. R.; GINGHER, K. H. Use of sex pheromone, 2,6-dichlorophenol, to disrupt mating by American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Chemical Ecology**, v. 7, p. 829-840, 1981.

CAPÍTULO 4: Composição química e caracterização biológica de extratos do feromônio produzido pelos machos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae)

Chemical composition and biological characterization of extracts of male-produced pheromone from *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) by GC/MS-SIM and behavioural responses

Kennedy Kiriira Gachoka¹, Carla Cristina Braz Louly¹, Lorena Lopes Ferreira¹, Pedro Henrique Ferri², Lígia Miranda Ferreira Borges^{3*}

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil

²Instituto de Química, Laboratório de Bioatividade Molecular, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil

³Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 s/n, Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brazil

Resumo

O feromônio proveniente de machos alimentados do *Amblyomma cajennense* foi caracterizado pela sua composição química em comparação às repostas comportamentais induzidas por este. O feromônio foi obtido por extração em hexano e analisado por CG/EM-MSI. Em seguida, ele foi avaliado em bioensaios de comportamento feitos *in vitro* e *in vivo*. A análise qualitativa do extrato do feromônio mostrou a presença de benzaldeído, ácido benzóico, ácido nonanoíco, ácido salicílico, 2,6-diclorofenol, limoneno e salicilato de metila e a ausência de ácido butírico, ácido isobutírico e o-nitrofenol. Em ensaios feitos em um olfatômetro usando machos, fêmeas e ninfas, não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os ângulos de deslocamento na faixa de 0° a 10°, os quais indicam atração, sendo 13.3 a 38.6% nos testes e 8.5 a 23.7% nos controles. Da mesma forma, não houve uma agregação

estatisticamente significativa dos carrapatos em testes realizados *in vitro*. Porém, uma fixação significativamente maior e mais rápida ($P < 0,05$) do que no controle foi registrada *in vivo* dentro de 24 h. Uma mistura sintética de padrões equivalente ao feromônio feito por meio das proporções obtidas a partir da análise química provocou respostas biológicas compatíveis. A composição química revelada a partir da análise de amostras do feromônio correspondeu aos comportamentos induzidos. O significado dos achados no manejo do *A. cajennense* em regiões endêmicas apresenta-se na discussão.

Palavras-chave: Agregação, atração, comunicação química, fixação

Abstract

The pheromone from fed *Amblyomma cajennense* males was characterized for chemical composition vis-à-vis behavioural responses. The pheromone was obtained by extraction in hexane, analysed by GC/MS-SIM and subjected to behavioural bioassays *in vitro* and *in vivo*. Qualitative analysis of the pheromone extract indicated the presence of benzaldehyde, benzoic acid, nonanoic acid, salicylic acid, 2,6-dichlorophenol, limonene and methyl salicylate and the absence of butyric acid, isobutyric acid and *o*-nitrophenol. In an olfactometer bioassay using males, females and nymphs, there was no statistically significant difference ($P > 0.05$) between displacement angles in the range of 0° to 10° which indicate attraction between tests (13.3 to 38.6%) and controls (8.5 to 23.7%). Similarly, there lacked statistically significant aggregation response of test ticks in bioassays *in vitro*. However, significantly faster and eventually greater overall attachment ($P < 0.05$) was registered *in vivo* within a 24-hour test duration than that in the control. An equivalent of the sample mixed based on the proportions obtained in the chemical analysis yielded comparable behavioural responses. The pheromone's chemical composition was consistent with the corresponding behavioural observations made. The potential implication of the findings in the management of *A. cajennense* in the regions where it is endemic is discussed.

Keywords: Aggregation, *Amblyomma*, attachment, attraction, volatiles

Introduction

Chemical communication is a vital component in tick biology whereby pheromones are largely responsible in the regulation of mate finding and courtship. Chemical compositions of different pheromones and cuticular extractive compounds are well studied for certain representatives of the genus *Amblyomma* but this has not been the case in *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), in spite of its wide distribution and great economic importance in South America. In this genus, the pheromones produced by feeding males are currently referred to as attraction-aggregation-attachment pheromones (AAAPs) (SONENSHINE, 2006). This is because they have been implicated in the induction of attachment of ticks to host body sites where feeding males are attached. By attracting unfed females, males and in some cases nymphs, the emitting males lead to their aggregation on the host. Consequently, they contribute to the discrimination of viable hosts from non-viable ones thus enhancing chances of survival of the ticks. In addition, they promote spatial proximity between males and females in anticipation for mating post blood-meal (SONENSHINE, 1991).

AAAPs are known in species such as *Amblyomma gemma*, *Amblyomma hebraeum* (Koch, 1844), *Amblyomma lepidum*, *Amblyomma maculatum* (Koch, 1844) and *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794) (SCHÖENI et al., 1984; BARRÉ et al., 1987; APPS et al., 1988; DIEHL et al., 1991; SONENSHINE et al., 2000). They have been described as being extremely potent attractants, inducing vigorous searching behaviour by females and males (GLADNEY et al., 1974; NORVAL & REHAV, 1979; NORVAL et al., 1989; REHAV et al., 1997). Apart from the biological role they play, this characteristic also indicates their great potential as decoys, mating disruptants or in other such control-oriented measures especially in ticks that show predilection for specific attachment sites on hosts. Their exploitation this way could reduce acaricide treatments whose

use is associated with environmental degradation and chemical pollution of the food chains.

Although comprehensively studied in *A. hebraeum* and *A. variegatum* (NORVAL et al., 1991), the presence of this category of pheromones is not clearly elucidated in *A. cajennense* and is thus still reason for conjecture. RECHAV et al. (1997) reported that males produce a pheromone that promotes the attachment of unfed males and females but not their aggregation. This raises questions related to the occurrence or mediation of the processes of attraction, aggregation and attachment in the case of *A. cajennense*, as compared to the findings cited from other *Amblyomma* species. In addition, information regarding its chemical composition is non-existent. This work had therefore, as an objective, to evaluate the male-produced pheromone in *A. cajennense* by gas chromatography/mass spectrometry-single ion monitoring (GC/MS-SIM) and examine its role in the mediation of attraction, aggregation as well as attachment behaviours of the sexes through bioassays.

Materials and methods

Collection and establishment of tick colony

Engorged adult female *A. cajennense* were collected from naturally infested and untreated horses in the field. The ticks were detached from the hosts by holding them gently near the point of attachment using a pair of forceps, slightly twisting and pulling them off. They were then incubated ($T = 27^{\circ}\text{C}$ and $\text{RH} > 80\%$) in the laboratory until oviposition. From the eggs obtained a laboratory colony was initiated and maintained for use in the studies.

Preparation of male extract

To obtain the male pheromone extract, 1-month old males were fed on rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, for six days. Pheromone was extracted following the method by BORGES et al. (2002). Briefly, this involved immersing 100 males fed for six days in 4 ml of hexane ultra-residue grade (Baker; Phillipsburg, NJ, USA) followed by exposure to ultrasound probe for 15min. The extracts were

filtered on a 0.45 μm Millipore Millex HV filter (Bedford, MA, USA), the solvent was evaporated under a nitrogen gas stream and adjusted to 1 ml with ethyl acetate ultra-residue grade (Baker; Phillipsburg, NJ, USA), and maintained in dark bottles at -20°C until the moment of the chemical analyses. In total, about 1500 males in different batches were used for the extractions.

Standards and samples analysis

Ten standards were chosen based on principal pheromone components known in other *Amblyomma* species (SCHÖENI et al., 1984; APPS et al., 1988; LUSBY et al., 1991; NORVAL et al., 1991). These were 2,6-dichlorophenol, benzaldehyde, benzoic acid, butyric acid, isobutyric acid, limonene, methyl salicylate, nonanoic acid, *o*-nitrophenol and salicylic acid. These were analysed separately using the GC/MS-scan method to determine the best ions for monitoring as single ions. A mixture of the analogues was then analysed in the same manner to indicate the expected arrangement of peaks. Following optimization, the male pheromone extract was subjected, first to GC/MS-scan to detect any compounds present in substantial proportions and later to GC/MS-single ion monitoring (SIM) for the detection of those substances in quantities undetectable under scan mode. Three pheromone extracts prepared separately were used in the analysis.

Chemical analyses by GC/MS

Analyses were carried out on a Shimadzu (Kyoto, Japan) QP5050A GC/MS equipped with a data processing system employing the following conditions: column, Shimadzu CBP-5 (Kyoto, Japan) fused silica capillary column with 30 m long x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness composed of 5% phenylmethylpolysiloxane connected to a quadrupole mass detector operating in scan mode by EI ionisation (70 eV) at a scan rate of 1 scan s^{-1} ; carrier gas, He (1 ml min^{-1}), column pressure, 56.7 kPa; injector and detector temperatures were 250°C and a split ratio of 1:5. Injection volume was 0.5 μl and the oven temperature was 80°C to 280°C at $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$, with total time of 10min. The integrated chromatogram was used to analyze the ratio of the peaks (relative

proportions). When necessary, CG/MS-SIM mode was utilized under the same conditions above for monitoring the ions presented in TABLE 1.

Attraction bioassays

These bioassays were conducted, first using females only to evaluate three different male pheromone equivalents for attraction (x1, x5, x10), and later to test attraction for males and nymphs using the higher pheromone concentration. The method and parameters by LOULY et al. (2008) were adopted.

To test the samples for attraction, filter papers were cut to the size of adult ticks (5 x 5 mm). They were each treated with the relevant males-equivalent (ME) of pheromone extract diluted in hexane (20 μ l) and placed in an arena olfactometer similar to the one described by BORGES et al. (2002). Briefly, this is an arena olfactometer equipped with a fan which generates airflow through the arena and comes with an in-built rheostat to regulate wind speed. Hexane only served as control. A temperature of 25-28°C, RH > 80% and wind velocity of 2.8-3.1 m s^{-1} were maintained in the olfactometer. The base of the olfactometer was lined with an arena-fitting plain paper with faint grids. Individual ticks were released 6 cm from the stimulus source and their dislocation behaviour observed closely.

Fifteen unfed individuals of both sexes as well as nymphs were tested separately against the odour source in (or hexane in), each impregnated filter paper being used with one tick only. Their directional movement in relation to the stimulus source and their tracks were traced and recorded on camera and later superimposed against the grids of a graph paper. Those that failed to get to the pheromone source were re-introduced up to three times with the last of their trajectories being adopted for analysis. The percentages of individuals that showed orientation to the odour source were recorded. Angles of displacement along the track were recorded for every 2 cm for adults and 1 cm for nymphs by linking two consecutive points by a straight line and measuring the angle between this line and the position of the stimulus upwind (angle 0°). The data generated was analysed using Kruskal-Wallis test and circular statistics (Oriana

version 3.0, Kovach Computing Services, Wales) to determine the orientation behaviour.

Aggregation bioassays

The spatial distribution pattern over time exhibited by the ticks was recorded using a digital surveillance recorder (Pico version 1.7.1, Indigo Rose Corporation, Canada) to enable the monitoring in real time of temporal changes in the ticks' movements. This bioassay was conducted in a plastic Petri dish (145 mm i.d., 15 mm depth) as an assay chamber whose base was covered with a faintly-gridded filter paper. Test ticks (groups of 30 males, 30 females and 50-100 nymphs) were separately selected from the colony for introduction into the chamber. These were then released at the centre of the chamber and the chamber covered. After being conditioned for 20min, a strip of filter paper (2.5 x 10 cm), which had been impregnated with 10 ME of either the whole pheromone extract or a mixture of the standards in 100 µl of hexane, was introduced into one side of the chamber. Hexane only served as control. The distribution of the ticks was recorded continuously over a 24 hour duration. Frozen images were taken at 0 (= after 20min acclimatisation), 20, 40min, 1, 2, 3 and 24hrs and used to make counts for use in analysis. Individuals that remained at the point of release (2 cm² area) were not counted i.e. were considered not to have chosen either of the treated or untreated sides hence some count frequencies did not add up to 100% of the number initially released. All bioassays were replicated three times and the results obtained were analysed by Chi-square test.

Attachment bioassays

These were done *in vivo* on rabbits hosts not previously infested. Hexane extract (= 20 ME em 20 µl) were spread evenly on a discrete shaved area (about 4 cm² in area) on the back of rabbits. Test areas were enclosed with rectangular pads of cotton cloth slightly raised by gluing a rectangular (30 mm thick x 1 cm wide) layer of EVA rubber around its margins with a partially open inlet to allow release of ticks. The pad was in turn glued (Brascoplast standard, Brascola Ltd, SC, Brazil) to cover the shaved area on the rabbits. Twenty unfed males or

females were released in the middle and the pad sealed. The pads were gently opened and re-sealed at intervals of 20, 40min, 1, 2, 3 and 24hrs to record the number of ticks attached. As a negative control, the same numbers of different ticks from the same colony were exposed in a similar manner to hosts treated with hexane only. Six replicates each were carried out. Data analysis was by Wilcoxon signed-ranked test to assess whether there was significant difference between treatments and controls and Friedman repeated measures ANOVA to assess the effect of time.

Results

Composition of the male extracts

From the pheromone samples were identified various classes of compounds. TABLE 1 lists these substances and their corresponding ions as selected for GC/MS-SIM analyses. Seven out of the ten compounds tested for turned out positive. These were 2,6-dichlorophenol, benzaldehyde, benzoic acid, limonene, methyl salicylate, nonanoic acid and salicylic acid. Those that tested negative were butyric acid, isobutyric acid and o-nitrophenol.

Identification of components was achieved through comparisons with retention times of the selected standards and confirmed by reference to the Kovat's Index. The resultant chromatogram obtained after GC/MS analysis also served to indicate relative proportions of substances present in the sample under analysis. FIGURE 1 shows a typical chromatogram obtained from an extract sample of the pheromone.

TABLE 1: Chemical composition of male extract of *Amblyomma cajennense* from three samples as determined by two complementary GC/MS methods (scan and SIM) and corresponding properties

Retention time (min)	Component	Kovat's Index	Ions	Extract 1 (% RA)	Extract 2 (% RA)	Extract 3 (% RA)
3.73	benzaldehyde	965	77, 105,106	15.46	< 1.0 [†]	5.86
4.13	limonene	1036	67, 93, 121, 136	< 1.0 [†]	80.44	18.87
4.69	o-nitrophenol	1149	65, 81, 139	-	-	-
4.76	benzoic acid	1171	105, 122	12.21	2.43	9.02
4.98	methyl salicylate	1190	92, 120, 152	16.10	< 1.0 [†]	26.31
5.04	2,6-dichlorophenol	1206	162, 164	< 1.0 [†]	< 1.0 [†]	< 1.0 [†]
5.19	nonanoic acid	1265	60, 73, 115, 129	15.74	1.36	29.03
5.39	salicylic acid	1716	64, 92, 120, 138	1.05	2.24	4.38
5.50	isobutyric acid	1584	60, 73	-	-	-
6.01	butyric acid	834	60, 73, 88	-	-	-

RA –Relative abundance of compost; [†]detected by SIM

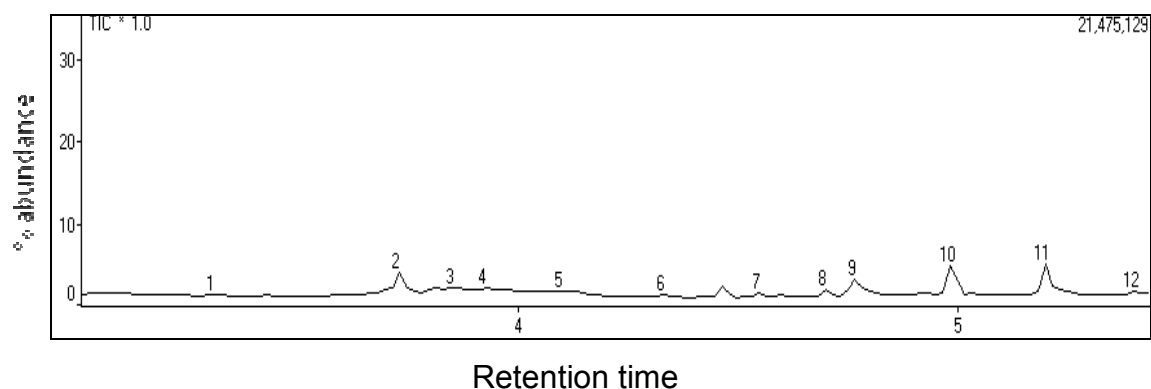


FIGURE 1: Typical GC/MS-scan chromatogram of an extract sample from male *A. cajennense* after a chromatographic run with the region of peaks of interest augmented. Peaks 2, 9, 10, 11 and 12 represent benzaldehyde (15.46%), benzoic acid (12.21%), methyl salicylate (16.10%), nonanoic acid (15.74%) and salicylic acid (1.05%) respectively. The rest of the peaks represent non-volatile sterols not necessarily part of the pheromone.

Attraction

The percentage number of individuals that successfully traced a trajectory that led to direct contact with the odour source at the three pheromone concentrations tested with the females, males and nymphs was not statistically different from the control ($P > 0.05$). In the same manner, analysis of angles of displacement by circular statistics along the displacement trajectory revealed no significant difference between angles of displacement in the range of 0 to 10°, which indicate attraction even in the absence of successful contact with the source, being 13.3 to 38.6% in the treatments and 8.5 to 23.7% in the controls (TABLE 2).

TABLE 2: Percentages of *Amblyomma cajennense* individuals that contacted or showed orientation towards the odour source in olfactometer attraction bioassays to specific male extract concentrations and their controls

<i>A. cajennense</i>	% contact with odour source			% orientation (angles 0° to 10°) to odour source	
	ME ¹	Extract	Hexane	Extract	Hexane
Females	1	47	20 [§]	25.7	8.5 [§]
	5	20		34.2	
	10	20		18.9	
Nymphs	10	40	13	13.3	10.2
Males	10	53	33	38.6	23.7

¹ME values not applicable to hexane columns. [§]Single hexane control represented all concentrations with females (n = 15).

The angles of displacement were rather evenly distributed across the spectrum irrespective of the pheromone concentration used as observable from FIGURE 2. A similarly even distribution was observed in the control.

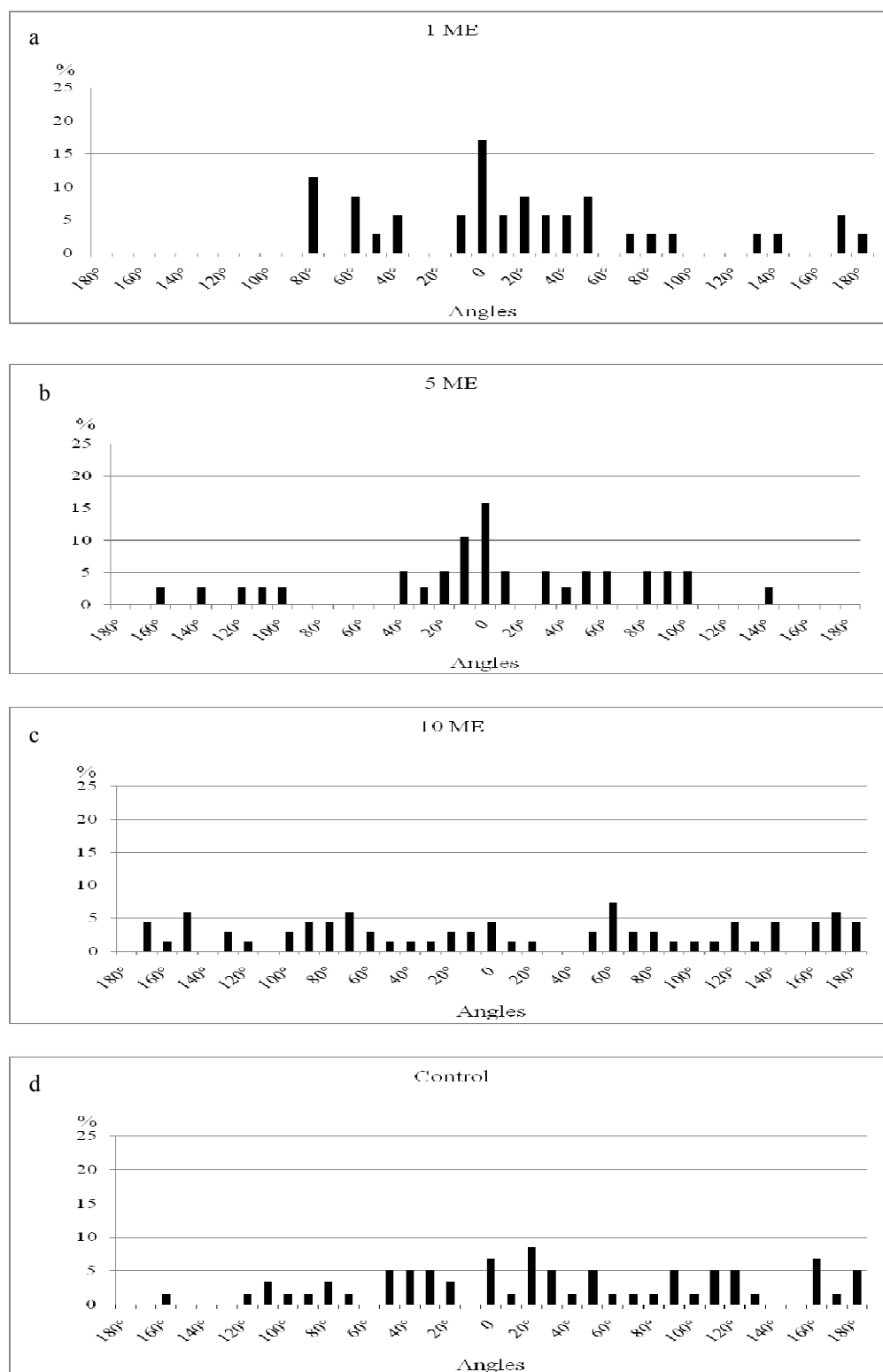
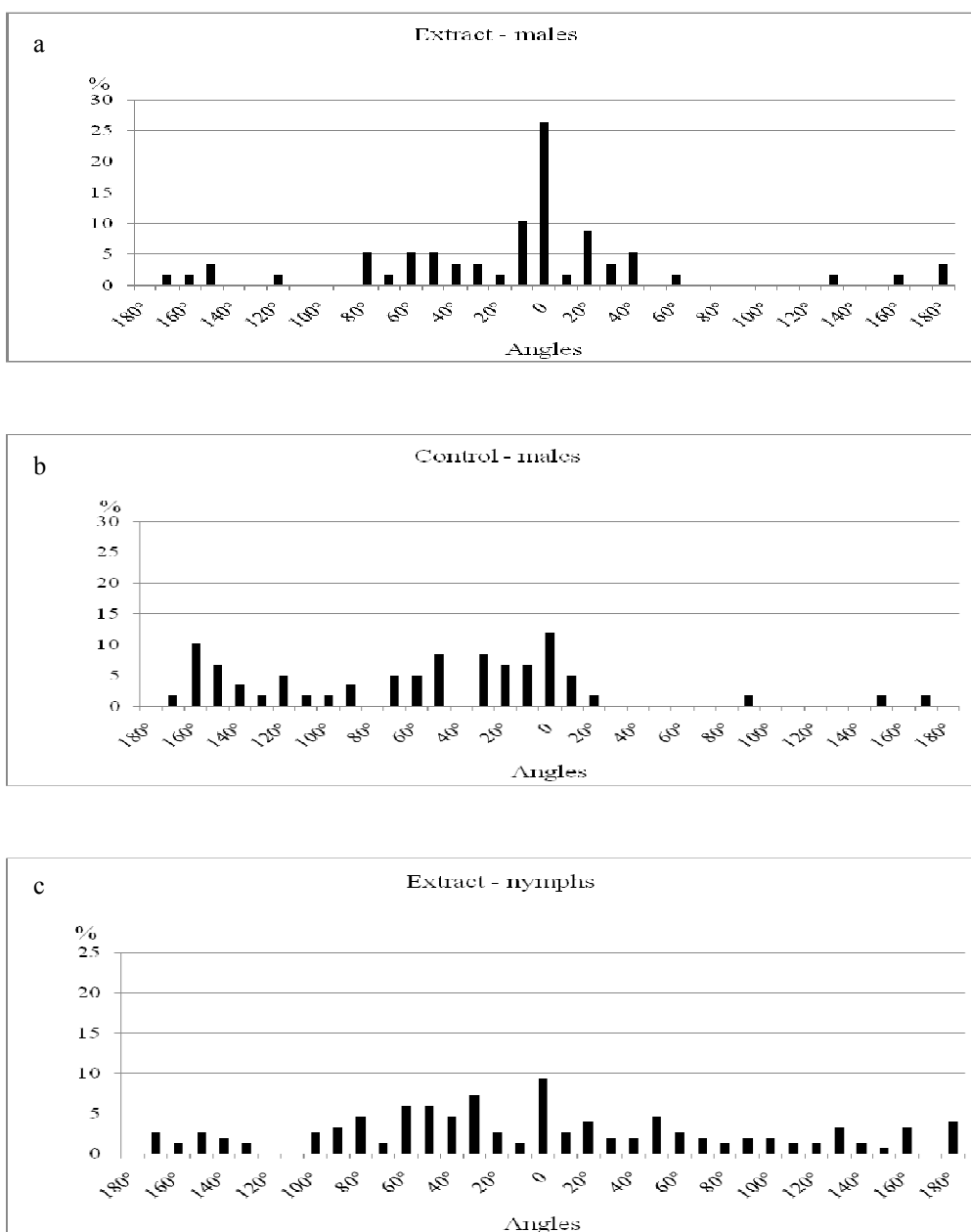


FIGURE 2: Percentage frequencies and distribution of displacement angles of *A. cajennense* females in olfactometer attraction assays to different male pheromone equivalents (ME) and control, a - d.

In similar tests involving males and nymphs at the higher concentration (10 ME), the extract was shown to attract a marginally higher percentage of males over the nymphs at the same concentration (FIGURES 3a - d). However, in comparison with responses from their respective control responses, no significant differences were recorded.



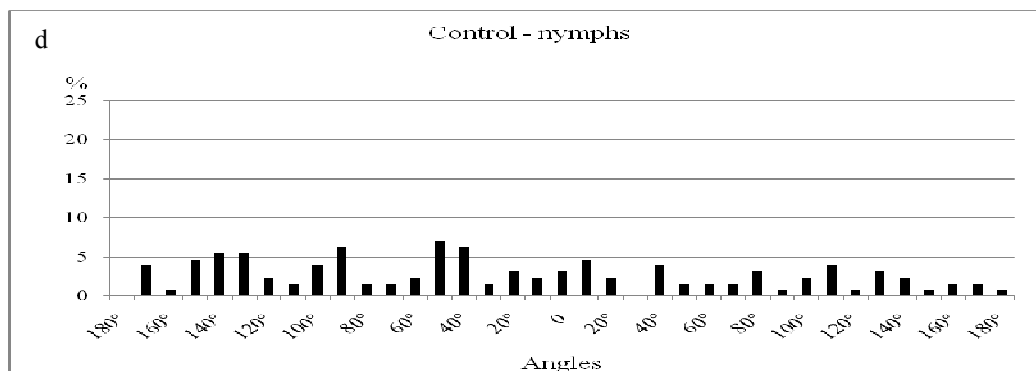


FIGURE 3: Percentage frequencies and distribution of displacement angles of *A. cajennense* males and nymphs in olfactometer attraction assays to 10 ME, a – d, respectively.

Aggregation

There were no significant differences in the aggregation of *A. cajennense* between the treated and untreated sides in the Petri dish assays among the tick stages and treatments in virtually all the chosen time intervals (TABLE 3). Intermediate values (20 to 65%) occurred on any one side. However, the percentage of individuals at the various time intervals varied slightly for more or for less in most instances indicating subtle changes in positions of the ticks. The observation was corroborated by the recordings made in real time. Overall, most ticks after the initial excitement observed during transference to the Petri dishes quickly returned and remained in the quiescent state, in clusters or individually. The observation held true for the treatments and the controls. For the male extract, 20min after release, the highest percentage of ticks on the treated side was observed in nymphs (55%) and in the case of the mixture of the standards at the same interval in males (56%). There were always some nymphs on the sides of the Petri dish, with small but variable numbers not seen, hidden beneath the filter paper strip or dead. On the contrary, all adults were clearly visible.

TABLE 3: Percentage aggregation of unfed *A. cajennense* adults and nymphs on sides treated and untreated (blank) with extracts from fed males or hexane at various time intervals in Petri dish assays

Time ¹		Males		Females		Nymphs	
		treated	blank	treated	blank	treated	blank
0min	Extract	43	53	33	63	60	25
	Hexane	63	38	65	29	40	47
20min	Extract	47	50	33	57	55	32
	Hexane	53	38	61	39	20	51
40min	Extract	47	53	37	57	43	23
	Hexane	56	41	58	39	23	51
1hr	Extract	43	50	33	57	32	23
	Hexane	56	38	55	39	19	46
2hrs	Extract	43	50	37	53	27	27
	Hexane	59	38	55	45	20	56
3hrs	Extract	33	50	37	57	38	27
	Hexane	56	38	48	52	27	59
24hrs	Extract	40	47	37	47	43	22
	Hexane	44	22	39	48	24	43

¹In all cases Chi square test did not reveal statistically significant aggregation ($P > 0.05$)

Attachment

The whole extract stimulated a strong attachment response in both males and females. In bioassays carried out *in vivo*, a statistically significant greater attachment and faster rate of attachment ($P < 0.05$) was observed between treatments and controls within 24 hours in males and in the interval between 40min and 2hrs in females (FIGURE 4).

Still, it was observed cases of ticks that attached themselves only to detach or change positions a few moments or hours later, a phenomenon which was considered to be within the realm of normal *A. cajennense* behaviour, having been observed in both treatments and controls.

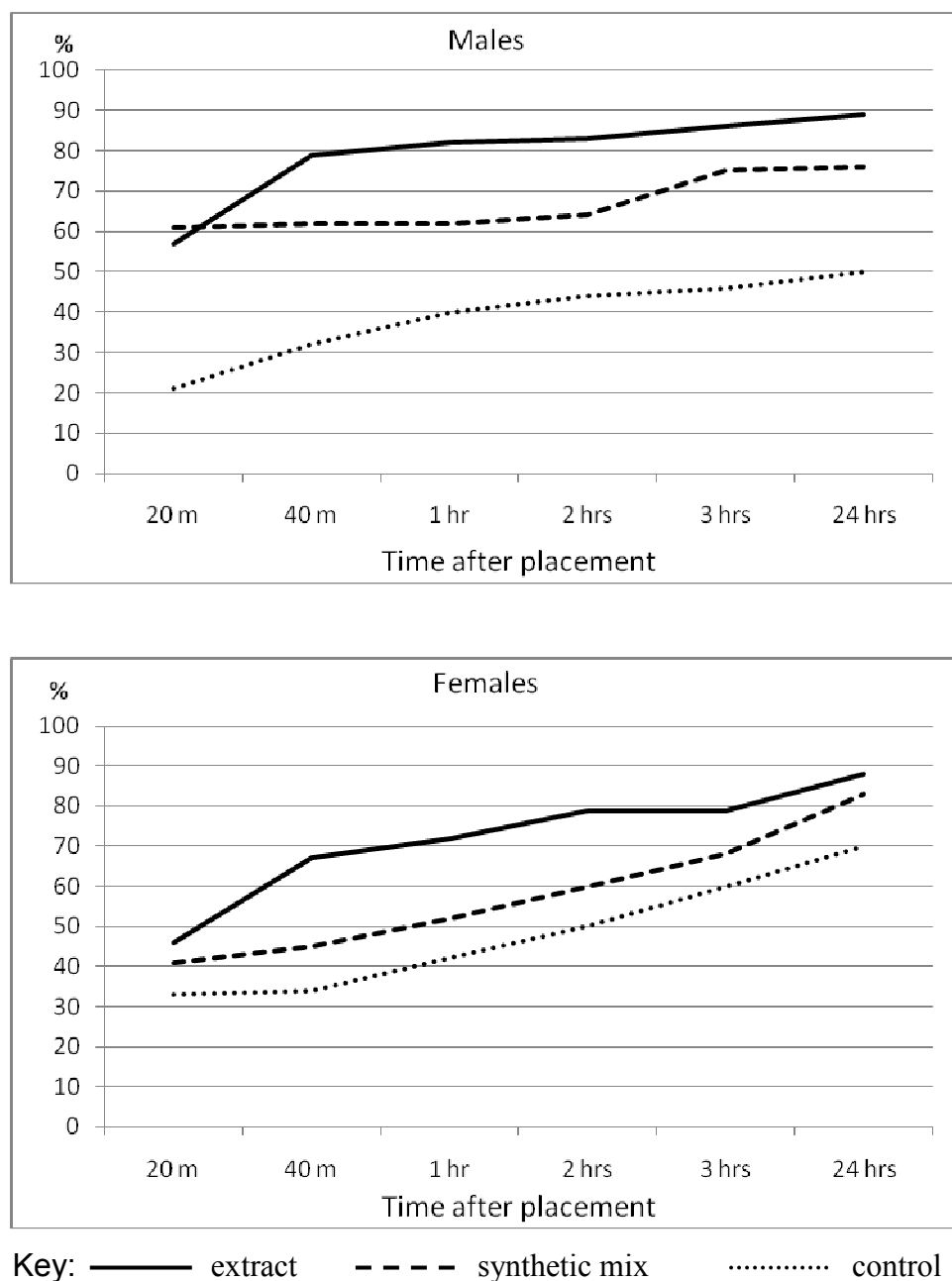


FIGURE 4: Rates of attachment of *A. cajennense* males and females, respectively, on the backs of rabbits treated with 20 ME extracts of fed males, equivalent mixture of standards or control at different time intervals after placement.

Discussion

Multiple components were identified from the extract from *A. cajennense* males. Most previous work reported from other *Amblyomma* species was limited to the identification of basically four components in the crude extracts of the pheromone i.e. benzaldehyde, methyl salicylate, *o*-nitrophenol, and nonanoic acid (SCHÖENI et al., 1984, APPS et al., 1988; LUSBY et al., 1991; SONENSHINE et al. 2000). The present work included a few more potential components of the pheromone informed by our preliminary studies, and not necessarily existent in current literature on *Amblyomma* spp. This work is the first to investigate compounds encountered in the male extract of *A. cajennense* after RECHAV et al. (1997) first reported the production of this pheromone in male members of the species after four days of feeding. This is important as a first step in advanced studies aimed at development of novel strategies for the management of this species as specific modifications could have implications, at least partially, on the observations made in behavioural bioassays. It is worth note that not all the compounds identified necessarily constitute the *A. cajennense* pheromone.

One notable difference in the compounds identified in the extract from *A. cajennense* and *A. variegatum* was the absence of *o*-nitrophenol in the former and its presence in the latter. Studies on the pheromone of *A. variegatum* had revealed that it consisted of a blend of three compounds, namely, *o*-nitrophenol, methyl salicylate and nonanoic acid apparently in a precise ratio to one another (SCHÖENI et al., 1984). APPS et al. (1988) reported *o*-nitrophenol, benzaldehyde and 2-methyl propanoic acid, but not nonanoic acid, as the volatiles emitted by *A. hebraeum*. Our finding on the absence of *o*-nitrophenol is contrary to the suggestion by APPS et al. (1988) that this was a non-species-specific AAP component in the genus *Amblyomma* implying that it occurred universally across the species. However, *A. cajennense* and *A. hebraeum* (LUSBY et al., 1991) showed traces of 2,6-dichlorophenol as an additional common denominator between their pheromone extracts. In addition to pheromones, kairomones produced by the host and perceived by the ticks, CO₂

and physical factors are among the chief forms of communication employed by these ectoparasites (GARCIA, 1965; BARRÉ et al., 1997; OSTERKAMP et al., 1999).

Relative proportions of the pheromone components were also determined in the present work based on the scan analysis reports. While the contents showed consistency between samples, the proportions varied. This could have been due to various factors but care was taken to avoid any contamination. SONENSHINE et al. (2000) in a comparison of AAPs from *A. variegatum* from sub-Saharan Africa and the Caribbean described variations in composition too between samples yet no significant differences in biological responses of the species between and among the pheromone extracts.

With reference to biological responses, the whole pheromone extract induced attachment but not attraction or aggregation behaviour in male and female *A. cajennense*. In this respect, the findings were in agreement with those of REHAV et al. (1997) who reported that males produced a pheromone that enhanced attachment of fed and unfed females but not their aggregation. According to SCHÖENI et al. (1984) and APPS et al. (1988), different compounds regulate different aspects of the tick response whereby *o*-nitrophenol excites searching and aggregation behaviour while methyl salicylate and nonanoic acid are believed to induce attachment and clasping behaviour. The absence of *o*-nitrophenol in the *A. cajennense* extract probably explains the absence of aggregation behaviour reported herein while the presence of methyl salicylate and nonanoic acid accounts for the stimulation of attachment observed. Although attraction was not evident here, we demonstrated in a separate study that in the presence of either the female extract (which is constituted of 2,6-dichlorophenol) or an equivalent mixture of standards, males were attracted to the source, among other behaviours (GACHOKA et al., unpublished data). Concerning aggregation, its absence is rather characteristic of *A. cajennense* even on hosts in nature (SERRA-FREIRE & CUNHA, 1987).

It is probable that in *A. cajennense*, the regulation of meeting and consequent mating shifts to the female-produced sex pheromones. We also suggest that a species' host-finding strategy (hunting vs. ambush) and hosts'

range which in *A. cajennense* includes diverse domestic and wild animals (BARROS-BATTESTI et al., 2006), might be decisive factors in determining how much a tick species depends on this pheromone to identify viable hosts. The hunting strategy is the method used by several species that parasitize large mammals, although some like *A. cajennense* show a degree of both (ASSAL, 2008). These characteristics could afford the species the luxury of hopping on and off from hosts at will depending on their viability, as previously mentioned of males attaching and detaching in the attachment bioassays. By stimulating attachment though, this pheromone could aid in bringing males and females close to each other for mating purposes post blood-meal. In the demarcation of the attraction-aggregation-attachment process, it is not always very clear-cut which events mark the transition between the different phases. This informed the choice of bioassays in this work allowing for the monitoring of a particular behaviour of interest without preventing the expression of another simultaneously, as was the case in the arena olfactometer and in bioassays *in vivo* with respect to attraction, orientation and recognition of the odour source.

RECHAV et al. (1997) evaluated the pheromone *in vivo* on rabbits and cattle using live *A. cajennense* males as pheromone source, and a Y-shaped olfactometer and Petri dish technique for *in vitro* studies achieving results that closely mirrored those from this study. Consequently, they hypothesized that the pheromone in *A. cajennense* could represent an intermediate stage in the evolution of tick pheromones from sex pheromones to AAPs characterized by a lesser complex composition compared to those of *A. hebraeum*, *A. variegatum* and *A. maculatum*. There exists, however, some Ixodid species that are not attracted by components of AAPs, such as *Rhipicephalus evertsi* (Neumann, 1897), *Rhipicephalus zambeziensis* (Walker, Norval & Corwin, 1981) and *Hyalomma* spp.

AAPs are believed to be restricted to *Amblyomma* where they play a vital role in regulating host infestation, attachment and mating (GLADNEY et al. 1974; NORVAL & RECHAV, 1979; RECHAV et al. 1997. Indeed, field trials in Africa and the Caribbean using pheromone and acaricide in tail decoys have demonstrated their potential for use in control on livestock (NORVAL et al., 1996;

ALLAN et al., 1997). Similarly, field experiments using semiochemical-treated entomopathogenic fungi-baited traps for the reduction of *A. variegatum* populations around water points, camping sites and paddock facilities have demonstrated success (MARANGA et al., 2006; NCHU et al., 2009; 2010).

It is interesting that some classes of compounds that constitute AAAPs feature prominently elsewhere in the biology of other organisms: nonanoic acid, a short-chain hydrocarbon has been reported to be present on insects' integument and to be capable of inhibiting the germination and establishment of germinative tubes of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (SMITH et al. 1981). *o*-Nitrophenol is reportedly derived from the anaerobic degradation of tyrosine and released from cattle (STEULLET & GUERIN, 1994). Limonene, a heavier molecule, is known to occur in human breath (PHILLIPS et al., 1999), while 2,6-dichlorophenol stimulates the detachment of metastriate males of a range of tick species, including *A. cajennense*, from the host to commence searching for the emitting females (SONENSHINE, 1991).

When a pheromone contains a single active chemical substance, it is easy to identify, quantify and integrate in a control programme contrary to one containing multiple chemical substances. The former is the case in a majority of insects where, consequently, synthesis and commercialization of pheromone-based products is responsible for their growing use in the control and management of these pests. The challenge for incorporation and intensification of the use of pheromones in *A. cajennense* control, the male one in particular, lies in the elaboration of a stimulus from the mixture of the standards simulating closely the natural odour.

Conclusion

In this paper, characterization of pheromone extracts of *A. cajennense* chemically and biologically was carried out. The pheromone induced attachment but not attraction or aggregation responses in this species. For this reason, more studies are necessary before it can be considered a suitable candidate for use in the management of *A. cajennense*.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Brazilian entities: CNPq, PADCT III and FUNAPE/UFG for financial support, and to Deomar P. Costa for assistance in the chemistry laboratory. Kennedy K. Gachoka wishes to acknowledge CNPq/TWAS (Academy of Sciences for the Third World) for a grant fellowship towards his doctorate studies of which this work was part.

References

- ALLAN, S. A.; BARRE, N.; SONENSHINE, D. E.; BURRIDGE, M. J. Efficacy of tags impregnated with pheromone and acaricide for control of *Amblyomma variegatum*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 12, p. 141-150, 1997.
- APPS, P. J.; VILJOEN, H. W.; PRETORIUS, V. Aggregation pheromone of the bont tick *Amblyomma hebraeum*: identification of candidates for bioassay. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 135-137, 1988.
- ASSAL, F. E. **Estudo sobre o comportamento de apetência de diferentes estágios do carrapato *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae)**. 2008. 61 f. Dissertação (mestrado em biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.
- BARRÉ, N.; UILENBERG, G.; MOREL, P. C.; CAMUS, E. Danger of introducing heartwater on the American mainland: potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 405-417, 1997.
- 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, 223 p, 2006.
- BORGES, L. M. F.; EIRAS, A. E.; FERRI, P. H. ; LOBO, A. C. C. The role of 2,6-dichlorophenol as sex pheromone of the tropical horse tick *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 27, p. 223-230, 2002
- DIEHL, P. A.; GUERRIN, P.; VLIMANT, M.; STEULLET, P. Biosynthesis, production site, and emission rates of aggregation-attachment pheromone in males of two *Amblyomma* ticks. **Journal of Chemical Ecology**, v. 17, p. 883-847, 1991.

GARCIA, R. Collection of *Dermacentor andersoni* (Stiles) with carbon dioxide and its application in studies of Colorado tick fever virus. **American Journal of Tropical Hygiene**, v. 14, p. 6-10, 1965.

GLADNEY, W. J.; ERNST, S. E.; GRABBE, R. R. The aggregation response of the gulf coast tick on cattle. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 67, p. 750-752, 1974.

LOULY, C. C. B.; SILVEIRA, D. N.; SOARES, S. F.; FERRI, P. H.; MELO, A. C. C.; BORGES, L. M. F. More about the role of 2,6-dichlorophenol in tick courtship: identification and olfactometer bioassay in *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 103, n. 1, p. 60-65, 2008.

LUSBY, W. R.; SONENSHINE, D. E.; YUNKER, C. E.; NORVAL, R. A. I. Comparison of known and suspected pheromonal constituents in males of the African ticks, *Amblyomma hebraeum* Koch and *Amblyomma variegatum* (Fabricius). **Experimental and Applied Acarology**, v.13, p. 143-152, 1991.

MARANGA, R. O.; HASSANALI, A.; KAAYA, G. P.; MUEKE, J. M. Performance of a prototype baited trap in attracting and infecting the tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in field experiments. **Experimental and Applied Acarology**, v. 38, p. 211-218, 2006.

NCHU, F.; MANIANIA, N. K.; HASSANALI, A.; ELOF, J. N. Performance of a *Metarhizium anisopliae*-treated semiochemical-baited trap in reducing *Amblyomma variegatum* populations in the field. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 367-372, 2010.

NCHU, F.; MANIANIA, N. K.; TOURÉ, A.; HASSANALI, A.; ELOF, J. N. The use of a semiochemical bait to enhance exposure of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) to *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 279-284, 2009.

NORVAL, R. A. I.; ANDREW, H.R.; YUNKER, C.E. Pheromone-mediation of host-selection in bont ticks (*Amblyomma hebraeum* Koch). **Science**, v. 243. n. 4889, p. 364 – 365, 1989.

NORVAL, R. A. I.; SONENSHINE, D. E.; ALLAN, S. A.; BURRIDGE, M. J. Efficacy of pheromone-acaricide-impregnated tail-tag decoys for controlling the bont tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae), on cattle in Zimbabwe. **Experimental and Applied Acarology**, Berlin, v. 20, p. 31-46, 1996.

NORVAL, R. A. I.; PETER, T.; YUNKER, C. E.; SONENSHINE, D. E.; BURRIDGE, M. J. Responses of the ticks *Amblyomma hebraeum* and *A. variegatum* to known or potential components of the aggregation-attachment pheromone. 1. Long-range attraction. **Experimental and Applied Acarology**, Berlin, v. 13, p. 11–18, 1991.

NORVAL, R. A. I.; RECHAV, Y. An assembly pheromone and its perception in the tick *Amblyomma variegatum* (Acarina: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 16, p. 507-511, 1979.

OSTERKAMP, J.; WAHL, U.; SCHMALFUSS, G.; HAAS, W. Host-odour recognition in two tick species is coded in a blend of vertebrate volatiles. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 185, p. 59-67, 1999.

PHILLIPS, M.; HERRERA, J.; KRISHNAN, S.; ZAIN M.; GREENBERG J.; CATANEO, R. N. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. **Journal of Chromatography B**, v. 729, p. 75-88, 1999.

RECHAV, Y.; GOLDBERG, M.; FIELDEN, L. J. Evidence for attachment pheromones in the cayenne tick (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 34, p. 234-237, 1997.

SCHÖENI, R.; HESS, E.; BLUM, W.; RAMSTEIN, K. The aggregation-attachment pheromone of the bont tick, *Amblyomma variegatum* Fabricius (Acari:Ixodidae). Isolation, identification, and action of its active components. **Journal of Insect Physiology**, v. 30, p. 613-618, 1984.

SERRA-FREIRE, N. M.; CUNHA, D. W. *Amblyomma cajennense*: Comportamento de ninfas e adultos como parasitos de bovinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Ouro Preto, v. 9 n. 5, p. 100–103, 1987.

SMITH, R. J.; PEKRUL, S.; GRULA, E. A. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 38, p. 335 - 344, 1981.

SONENSHINE, D. E. Tick pheromones and their use in tick control. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 557-80, 2006.

SONENSHINE, D. E.; ALLAN, S. A.; PETER, T. F.; McDANIEL, R.; BURRIDGE, M. J. Does geographic range affect the attractant-aggregation-attachment pheromone of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*? **Experimental and Applied Acarology**, v. 24, p. 283-299, 2000.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. Oxford University Press, 1991. 447 p.

STEULLET, P.; GUERIN, P. M. Identification of vertebrate volatiles stimulating olfactory receptors on tarsus I of the tick *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae), I. Receptors within the Haller's organ capsule. **Journal of Comparative Physiology. A. Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, Heidelberg, v. 174, p. 27-38, 1994.

CAPÍTULO 5: Considerações finais

Algumas conclusões, inferências e aspectos voltados à ecologia química de *A. cajennense* foram alcançados através deste estudo, procedentes das técnicas utilizadas e dos resultados obtidos.

Os resultados obtidos na quantificação de 2,6-diclorofenol com os dois métodos de calibração propostos com a CG/EM-MIS mostraram-se específicos, sensíveis e fidedignos na quantificação do feromônio nas matrizes estudadas. Por isso, estes métodos podem ser recomendados para quaisquer estudos de identificação e quantificação de feromônios e/ou outras substâncias de interesse que se encontram em matrizes complexas.

Há poucos grupos de química analítica no Brasil usando a técnica de quantificação analítica, sendo ela majoritariamente uma técnica elucidativa em química orgânica. Embora seja laborioso e muitas vezes demorado identificar e quantificar todos os compostos que componham os feromônios mais complexos, o ideal seria que isto seja feito, para assegurar respostas repetitíveis e exatas, subsequente. Isto serve como um ponto de partida sem o qual estudos avançados, usando estas substâncias para o desenvolvimento de novas estratégias de controle e de manejo de espécies nocivas, não poderiam ser realizados.

Baseado nos resultados obtidos é possível supor que o 2,6-DCF possa ser útil no manejo e controle de *A. cajennense*, uma vez que foi o único composto responsável por mediar o processo de busca e de monta da parceira sexual. Para este fim, ele deve ser avaliado dentro das três possibilidades do uso de substâncias do gênero: como uma isca, causando confusão ou interrompendo a cópula. É digno de nota que o uso de feromônios sexuais com ou sem acaricida para o controle de carrapatos oferece um meio de suprimir a população de carrapatos por interferir na cópula e conseqüentemente no seu sucesso reprodutivo, portanto, o efeito primário é a redução da cópula e conseqüentemente, em longo prazo, redução das populações de parasitos.

De acordo com os resultados oriundos do estudo do feromônio de machos de *A. cajennense*, deduz-se que ele não é um atraente potente a despeito de

evidência de que o feromônio contenha atraentes potenciais, por exemplo, o 2,6-diclorofenol. Por este motivo novos estudos são necessários antes de poder integrá-lo nas medidas de controle. A importância de outros fatores não deve ser subestimada. A ausência de atratividade observada pode ter sido devido ao fato de esta resposta ser mediada por uma combinação de fatores sejam eles físicos, visuais, auditivos ou táteis, e não poder ser reproduzida por um estímulo isolado, neste caso apenas o feromônio. É provável que a resposta seja melhorada na presença de outros estímulos agindo em combinação com o feromônio. Portanto, o feromônio não pode substituir o CO₂ na captura de *A. cajennense*. Mais estudos, com outras abordagens serão necessários para avaliar a utilidade do odor de machos no controle de *A. cajennense*. Dependendo dos resultados obtidos nos estudos sugeridos acima, recomendam-se, também, testes heteroespecíficos de *A. cajennense* diante de extratos dos machos de outras espécies do gênero, parasitando os mesmos hospedeiros, assim indicando se um único produto pode ser eficaz entre espécies diferentes.

Além disso, registros eletrofisiológicos de sensilas únicas ou grupos de sensilas presentes no primeiro par de patas são adequados para a detecção de quais compostos individuais, identificados em um odor complexo, como foi o caso em machos de *A. cajennense*, podem ser biologicamente relevantes. Mesmo que essa informação não possa ser diretamente associada com a função biológica e o seu papel na atração ou repelência, ela serviria como uma das múltiplas abordagens para se entender melhor a natureza hierárquica de comportamentos de orientação. Com efeito, estudos eletrofisiológicos que usam a técnica de registro de sensila única podem mostrar mais correspondência com ensaios comportamentais.

Embora seja comprovada a existência de mecanismos comportamentais e feromonais de isolamento reprodutivo em carrapatos, ainda persistem lacunas em alguns aspectos devido à certas limitações experimentais. Porém, a pesquisa e a posterior comercialização de produtos e tecnologias à base de feromônios no manejo de outras pragas agrícolas têm se tornado um campo de oportunidades para biólogos, veterinários, agrônomos e químicos em várias partes do mundo. Assim sendo, ela deve ser intensificada em carrapatos

também na medida do possível. No Brasil o número de estudos e pesquisas nesta área vem crescendo, entretanto muito ainda há para se conhecer e compreender. A pesquisa na área vem evoluindo progressivamente com o enfoque redirecionado ultimamente de estudos básicos para os aplicados. *A. cajennense* não deve ficar para trás, considerando a ampla distribuição da espécie no Brasil, sua baixa especificidade parasitária, sua resistência às adversidades climáticas tropicais e sua capacidade de veicular a *Rickettsia rickettsii* entre seus hospedeiros mamíferos. Com efeito, estudos de feromônios de *A. cajennense* em particular têm ocasionado uma mudança de paradigma, desde a especulação de que esta espécie não possuía feromônios à identificação e caracterização de aspectos variados sobre seus feromônios, alcançados até agora. O auge destes avanços será poder integrar estes feromônios de alguma forma sustentável no controle e manejo desta espécie.

Anexos



PROTOCOLO No
058/2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

I – FINALIDADE DO PROJETO (PESQUISA/ENSINO)

Utilizar animais como coelhos para abrigar e alimentar carrapatos da espécie *A. Canennense* e estudar a morfologia e arranjo estrutural das sensilas olfativas do tarso I de carrapatos adultos. Estudar a morfologia das glândulas dermais tipo II de machos alimentados e não alimentados. Comparar as resposta olfativa para adultos em relação a compostos de atração sexual FAAF e odores associados ao hospedeiro através do RSU. Identificar e quantificar o FAAF por cromatografia e espectrometria de massa.

II – IDENTIFICAÇÃO: 058/08

O projeto intitulado: “*Amblyomma Cajennense* (acari: ixodidae): Eletrofisiologia e resposta comportamental para diferentes odores e identificação do seu feromônio de atração-agregação-fixação”.

Coordenado pela Profª. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges do **DMIPP/IPTSP da UFG**, tendo como Pesquisadores Participantes os alunos:

- 1- M.Sc. Kennedy Kiriira Gachoka (Escola de Veterinária/UFG),
- 2- Dr Pedro Henrique Ferri (Instituto de Química/UFG),

**** Data de apresentação ao CEP/UFG: 18/04/08**

O presente projeto apresentou detalhadamente os objetivos e justificativas, bem como a metodologia a ser aplicada na utilização de animais para o presente estudo. Em suma, o presente projeto visa trabalhar com estudos a respeito do carrapato de ciclo trioxeno de importância sócio-econômica na América do Sul, o *Amblyomma cajennense*. Esse carrapato é um importante ectoparasito de diversos hospedeiros e sua importância se dá devido sua relação com surtos de febre maculosa na América Latina e seu papel como vetor de vários agentes etiológicos nesta região, justifica-se cada vez mais trabalhos realizados com esta espécie.

Foi considerada a possibilidade de métodos alternativos, visto que várias espécies de carrapatos podem ser alimentadas por animais de laboratório como camundongos, ratos, porcos da índia e coelhos. Carrapatos adultos são bem alimentados em animais como cães e

coelhos. No entanto, para a espécie *A. cajennense* coelhos atendem adequadamente às necessidades alimentares.

Nesta pesquisa serão utilizados coelhos *Oryctolagus cuniculus*, da raça Nova Zelândia, a partir de 3 meses de idade, pesando aproximadamente 2,0 kg, provenientes da loja agropecuária Canto das Aves, localizada na avenida Nerópolis nº330, qd.01, lt.09, Parque das Nações, e da chácara São Domingos, na GO 070, km 3, saída para Inhumas, onde há um criatório comercial destes animais. Permanecerá no biotério um máximo de dez animais por vez. Ao todo serão utilizados sessenta coelhos durante este experimento.

Os coelhos utilizados serão alojados no biotério do Centro de Parasitologia Veterinária. O biotério é uma sala fechada (3,6 m x 3,5 m x 3,25 m), com janela (2,24 m x 1,33m). Nesta sala são mantidas 10 gaiolas individuais (60 cm x 40 cm x 35 cm), de aramado. Os animais serão acondicionados nestas gaiolas onde receberão água e ração (10,3 MJ DE/kg, c. proteína = 16%, c. fibra = 15.5%) *ad libitum* os quais serão trocadas diariamente. As gaiolas ficam suspensas sobre suportes de ferro onde são colocadas bandejas plásticas para reter as fezes e urina. Também a limpeza do biotério será feita diariamente. Os animais serão mantidos na temperatura e umidade relativa ambientes, sendo cerca de 20 a 30°C e 30 a 70%, respectivamente. A duração da luz e escuro será 12L:12E.

Não será utilizado nenhum agente infeccioso para os coelhos. Existem diferentes formas de inoculação de carrapatos em coelhos. A forma mais amplamente utilizada é a inoculação auricular e o isolamento por meio de sacos confeccionados em tecidos, permitindo uma circulação adequada de ar. Este método é o menos incômodo, por inocular carrapatos em uma região menos sensível, reduzindo o estresse dos animais.

Pelo descrito na metodologia, nenhum sofrimento será imposto aos animais, visto que serão devidamente alojados, alimentados e avaliados periodicamente. E, aqueles que apresentarem alguma enfermidade serão tratados e retirados da atividade. Os animais que apresentarem elevada irritabilidade ao serem manuseados e inoculados também serão excluídos após a retirada dos carrapatos. Será utilizada pomada cicatrizante e anti-infecciosa para reduzir o prurido, acelerar a cicatrização e evitar infecções secundárias.

No projeto, não fica explícito sobre a administração de aulas ou caracterização por estudantes, mas fica claro que a equipe é que realizará os experimentos e conforme o descrito no lattes a equipe está altamente qualificada para a realização de tais atividades. Será utilizada pomada cicatrizante e anti-infecciosa para reduzir o prurido, acelerar a cicatrização e evitar infecções secundárias.

Não será utilizada eutanásia. Ao final do projeto os coelhos serão doados para a Chácara São Domingos, onde serão utilizados na reprodução.

Comentários do relator frente às orientações do COBEA

Estrutura do protocolo: todo protocolo foi devidamente respeitado e como os animais serão doados aos pesquisadores e doados ao final do projeto, não houve a necessidade de Termo de consentimento dos responsáveis pelos animais. Todas as análise de sofrimento imposto, métodos alternativos foram devidamente avaliados, sendo informado que não haverá riscos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

ORIENTAÇÕES AO PESQUISADOR

A - Para Parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS nº196/96-item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS nº196/96-item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS nº196/96-item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à Anvisa, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. nº 251/97, item III.2.e).
Relatórios Parciais e final devem ser apresentados ao CEP/UFG, inicialmente em 169/21 e ao término do estudo.

B - Para projetos do Grupo 1 do fluxograma acrescentar:

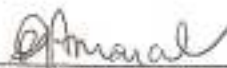
- Seu projeto (Registro _____ GRUPO _____ Área temática especial _____)

Foi encaminhado à CONEP e só poderá ser iniciado após o parecer aprovatório desta.

para alunos e pesquisadores envolvidos diretamente nas atividades da pesquisa. O número de animais foi devidamente esclarecido e não será aplicado a eutanásia ao final do projeto. Ao final do projeto os animais, coelhos, serão doados a uma fazenda na qual serão encaminhados para o processo de reprodução.

Baseada nestas informações, como relatora do COEP declaro o projeto aprovado, salvo melhor juízo deste comitê.

Data da reunião: 07 de julho de 2008



Rita Goreti Amaral

Coordenador do COEP/PRPPG/UFG