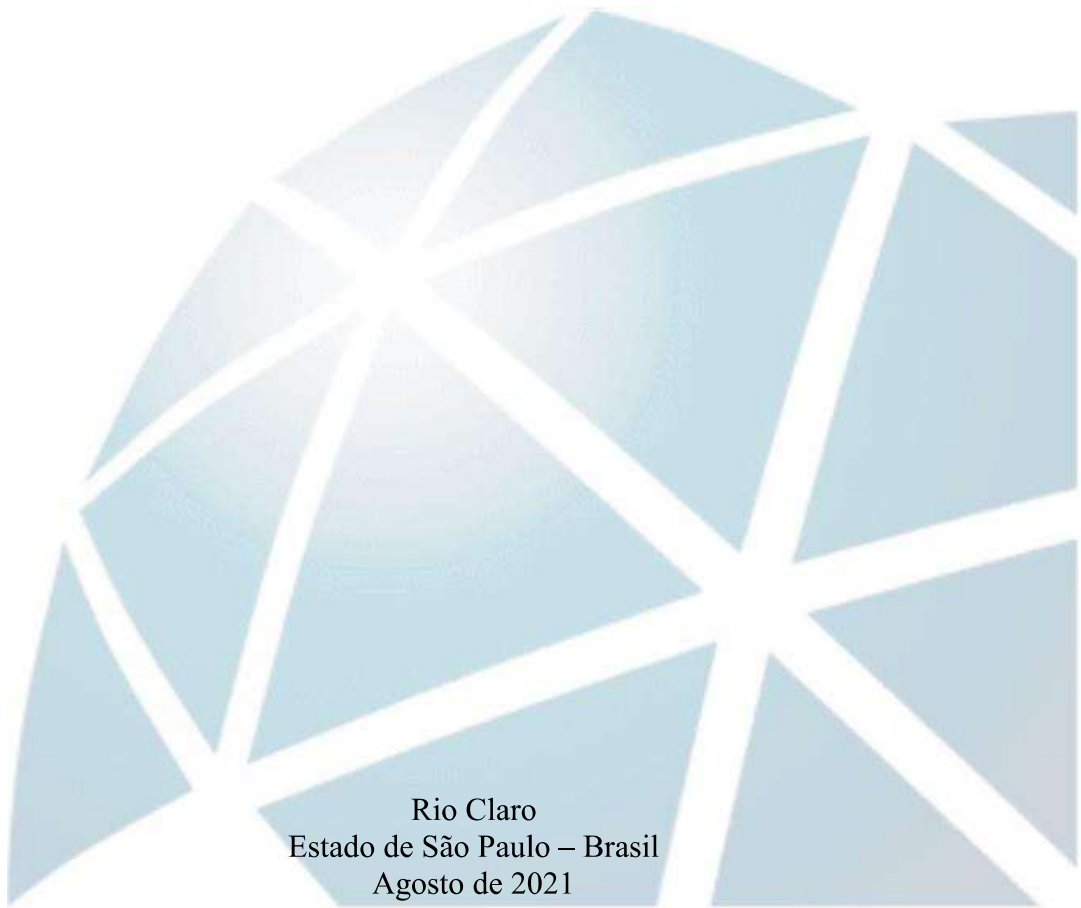

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Egletes viscosa* (ASTERACEAE) E *Lippia schaueriana* (VERBENACEAE) E SEUS POTENCIAIS EFEITOS SOBRE A BIOLOGIA REPRODUTIVA E A MORFOLOGIA (ÓRGÃO DE GENÉ, OVÁRIO E SINGÂGLIO) DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (ACARI: IXODIDAE) E SOBRE O FÍGADO E TIREOIDE DE CAMUNDONGOS *Mus musculus* A ELES EXPOSTOS

MELISSA CAROLINA PEREIRA

The background of the lower half of the page is a large, abstract geometric pattern. It consists of numerous triangles of varying sizes and shades of light blue, arranged in a way that creates a sense of depth and movement, resembling a stylized globe or a complex crystalline structure.

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Agosto de 2021

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Egletes viscosa* (ASTERACEAE) E *Lippia schaueriana* (VERBENACEAE) E SEUS POTENCIAIS EFEITOS SOBRE A BIOLOGIA REPRODUTIVA E A MORFOLOGIA (ÓRGÃO DE GENÉ, OVÁRIO E SINGÂGLIO) DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (ACARI: IXODIDAE) E SOBRE O FÍGADO E TIREOIDE DE CAMUNDONGOS *Mus musculus* A ELES EXPOSTOS

MELISSA CAROLINA PEREIRA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

Coorientador: Dr. Luis Adriano Anholeto

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Agosto de 2021

P436o

Pereira, Melissa Carolina

Os óleos essenciais de *Egletes viscosa* (Asteraceae) e *Lippia schaueriana* (Verbenaceae) e seus potenciais efeitos sobre a biologia reprodutiva e a morfologia (órgão de Gené, ovário e singânglio) de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) e sobre o fígado e a tireoide de camundongos *Mus musculus* a eles expostos / Melissa Carolina Pereira. -- Rio Claro, 2021

142 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo

Coorientador: Luís Adriano Anholetto

1. Carrapato. 2. Óleo essencial. 3. Histologia. 4. Toxicologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RESPOSTAS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (ACARI: IXODIDAE) E CAMUNDONGOS *Mus musculus* À EXPOSIÇÃO AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Egletes viscosa* (ASTERACEAE). E *Lippia schaueriana* (VERBENACEAE), POTENCIAIS ACARICIDAS NATURAIS

AUTORA: MELISSA CAROLINA PEREIRA

ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

COORIENTADOR: LUÍS ADRIANO ANHOLETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Prof. Dr. JOSÉ RIBAMAR LIMA DE SOUZA (Participação Virtual)
Universidade Federal do Acre

Prof. Dr. FRANCO DANI CAMPOS PEREIRA (Participação Virtual)
Claretiano Centro Universitário

Rio Claro, 03 de agosto de 2021

Título alterado para: "Os óleos essenciais de *Egletes viscosa* (Asteraceae) e *Lippia schaueriana* (Verbenaceae) e seus potenciais efeitos sobre a biologia reprodutiva e a morfologia (órgão de Gené, ovário e singânglio) de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) e sobre o fígado e a tireoide de camundongos *Mus musculus* a eles expostos"

Dedico este trabalho à minha mãe, Márcia, que por 26 anos foi meu anjo na Terra e agora é meu anjo no Céu.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Márcia, que me ensinou o amor incondicional, a alegria e o riso leve mesmo nos momentos difíceis e que foi guerreira a vida inteira, até o último momento da vida, me ensinando que embora algumas vezes na vida não possamos vencer a batalha, o importante é lutar, ter esperança e fé, e nunca desistir. Meu amor é eterno, mãe, obrigada por ter existido.

Ao meu pai, Claudinei, que nunca mediu esforços pela nossa família e sempre foi meu herói, meu apoio e meu maior exemplo de luta e dedicação à família.

Ao meu irmão, Matheus, meu parceirinho para a vida toda, que me ensina a ser uma pessoa melhor todos os dias.

A minha vó, Nely, e aos meus tios e primos que também amam a minha família e sempre estiveram ao nosso lado.

Aos meus amigos, Domênica Viana, Ruan Correa, Isabella Lee e Mileni Norberto, por sempre estarem ao meu lado. Quando nos encontramos é como se tempo nenhum tivesse passado, mostrando que a distância não importa realmente. Obrigada por existirem.

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo, por todo o apoio e carinho que dedicou a mim todos estes anos de graduação e pós-graduação, pelo exemplo de mulher forte e profissional, e por ser inspiração para todos nós, seus alunos e ex-alunos.

Ao meu coorientador, Luís Adriano Anholetto, por ter me acompanhado nessa caminhada, por todo o auxílio nos experimentos, os ensinamentos, as discussões, todo o apoio desde o início e por seu meu amigo. Obrigada por tudo, Lu.

Aos membros do *Brazilian Central of Studies in Ticks Morphology* (BCSTM) pelo acolhimento e ensinamento nestes 6 anos, em especial as amigas que levo sempre no coração Elen, Natália e Renata. Também à Giovanna Gennari, a quem fui coorientadora de Iniciação Científica, obrigada pela oportunidade de aprender com você e te orientar no início de sua caminhada na Ciência.

A Marina Rodrigues de Abreu, minha parceira no BCSTM, a qual não tenho palavras para agradecer todo o auxílio nos experimentos, o apoio, o carinho, os cafés no departamento e as conversas na sala da pós-graduação. Obrigada pelo apoio e pela amizade, Ma.

A Dra. Karina Neoob de Carvalho Castro, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, e ao Dr. Kirley Marques Canuto, da Embrapa Agroindústria Tropical pela parceria e colaboração.

Ao Gerson de Mello Souza, técnico no Laboratório de Histologia, a Cristiane Marcia Milleo, secretária do Departamento de Biologia, e a todos os técnicos administrativos da Seção

Técnica de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, pelo apoio técnico e administrativo durante todo o meu período na Pós-Graduação.

A todos os professores da UNESP que passaram pelo meu caminho durante a graduação e pós-graduação, agradeço por contribuírem imensamente com a minha formação pessoal e profissional.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro, e ao Instituto de Biociências, por serem a minha segunda casa por tantos anos inesquecíveis.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2019/02831-3, pelo apoio financeiro e institucional cedido para o desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Metade de mim agora é assim,
De um lado a poesia, o verbo, a saudade
Do outro, a luta, a força e a coragem pra chegar no fim
E o fim é belo, incerto
Depende de como você vê.”*

(O Teatro Mágico)

RESUMO

Os dados obtidos no presente trabalho comprovam o potencial acaricida dos óleos essenciais (OEs) de *Egletes viscosa* Less. e *Lippia schaueriana* Mart., nas concentrações de 12.5, 25 e 50 mg/mL, em fêmeas ingurgitadas do carrapato-do-cão *Rhiphicephalus sanguineus* sensu lato (s. l.). Ambos os OEs obtiveram um rendimento de 1.2% v/m e as análises químicas identificaram 27 componentes presentes em *E. viscosa* e 18 em *L. schaueriana*, sendo seus componentes majoritários o acetato de cis-isopinocarveíla (68.41%) e o óxido de piperitenona (64.36%), respectivamente. Estes compostos foram capazes de provocar alterações nas taxas de oviposição e viabilidade dos ovos nas concentrações de 25 e 50 mg/mL. O percentual de controle de *E. viscosa* foi de 58.9%, 70.8% e 92.7% nas concentrações de 12.5, 25 e 50 mg/mL, respectivamente. Nas mesmas concentrações, a eficácia de *L. schaueriana* foi de 39.3%, 53.4% e 84.6%. Ambos os OEs, em todas as concentrações e de maneira dose-dependente, provocaram severas alterações na morfologia dos ovos produzidos pelas fêmeas a eles expostas (ressecamento, escurecimento e desagregação). Quando expostas as concentrações de 12.5, 25 e 50 mg/mL dos OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana*, as fêmeas ingurgitadas mostraram alterações morfológicas nas glândulas tubulares e acessórias do órgão de Gené, sobretudo nas concentrações de 25 e 50 mg/mL, as quais induziram degeneração neste órgão. Os ovócitos das fêmeas aqui estudadas quando expostas as diferentes concentrações dos óleos também sofreram extensas alterações, sendo a exposição ao OE de *L. schaueriana* mais agressiva nos ovócitos em estágios iniciais (I a III) enquanto que todas as concentrações do OE de *E. viscosa* foram capazes de causar intensos danos aos ovócitos de I a V e ambos foram capazes de interferir na dinâmica da vitelogênese. Os OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana* apresentaram potencial altamente neurotóxico, visto que foram capazes de causar em todas as concentrações subletais aqui testadas a degeneração do tecido nervoso e de maneira dose-dependente. Ainda, os óleos aqui estudados provocaram severos danos tanto no tecido hepático quanto no tireoideano dos camundongos a eles expostos, na concentração de 50 mg/mL, induzindo degeneração em ambos os tecidos, danos estes que certamente prejudicaram a fisiologia destes órgãos.

Palavras-chave: ectoparasitas, controle natural, macela-da-terra, lipia-da-serra, morfologia, toxicidade

ABSTRACT

The data obtained in this study confirmed the acaricidal potential of essential oils (EOs) extracted from *Egletes viscosa* Less. and *Lippia schaueriana* Mart. at the concentrations of 12.5, 25 e 50 mg/mL against the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s. l.) engorged females. The yield of both oils was 1.2% v/m and the analyses identified 27 components in *E. viscosa* and 18 in *L. schaueriana*, whose major compounds was cis-isopinocarveyl acetate (68.41%) and piperitenone oxide (64.36%), respectively. Both EOs reduced significantly ($p<0.05$) oviposition and the eggs viability at the concentrations of 25 and 50 mg/mL. The control percentages of the *E. viscosa* oil were 58.9%, 70.8% and 92.7% at the concentrations of 12.5, 25 and 50 mg/mL, respectively. In the same concentrations, the efficacy of *L. schaueriana* was 39.3%, 53.4% and 84.6%. The eggs produced by the females exposed to all concentrations of the EOs presented several morphological alterations (dehydrated, darkened and disaggregated aspect). The engorged females exposed to the oils showed severe alterations in Gene's organ, both in the tubular and accessory glands, especially at the concentrations of 25 and 50 mg/mL, which induced this organ's degeneration. When exposed to EOs sublethal concentrations, the oocytes of the engorged females studied here also underwent extensive changes, with exposure to the EO of *L. schaueriana* being more aggressive in early stages oocytes (I - III) while all concentrations of the EO of *E. viscosa* were able to cause intense damage to oocytes I to V. Both EOs interfered in the dynamics of vitellogenesis. The EOs of *E. viscosa* and *L. schaueriana* presented highly neurotoxic potential, since they were able to induce degeneration in the nervous tissue at all concentrations analysed and in dose-dependent maner. Furthermore, the oils studied here caused great damage to the liver and thyroid of mice exposed to the concentration of 50 mg/mL, inducing degeneration in both tissues to such an extent that they certainly harmed the physiology of these organs.

Keywords: ectoparasites, natural control, macela-da-terra, lipia-da-serra, morphology, toxicity

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1 O carrapato-do-cão, <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato (Acari: Ixodidae)	9
1.2 O controle natural como estratégia	10
1.3 A macela-da-terra, <i>Egletes viscosa</i> (L.) Less.....	11
1.4 A lípia-da-serra, <i>Lippia schaueriana</i> Mart.	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Obtenção das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s. l.	15
3.2 Camundongos <i>Mus musculus</i>	16
3.3Obtenção e análise dos óleos essenciais (OEs) de <i>Egletes viscosa</i> Less. e <i>Lippia schaueriana</i> Mart.....	16
3.4 Exposição das fêmeas ingurgitadas de <i>R. sanguineus</i> s. l. aos OEs de <i>E. viscosa</i> e <i>L. schaueriana</i>	17
3.4.1 Teste de imersão de adultos	17
3.5 Análise estatística	18
3.6 Análise morfohistológica do órgão de Gené, ovário e singânglio de <i>R. sanguineus</i> s. l.	18
3.7 Análise semi-quantitativa	19
3.8 Exposição das fêmeas de camundongos <i>M. musculus</i> aos OEs de <i>E. viscosa</i> e <i>L. schaueriana</i> via aspersão	20
3.9 Análise morfohistológica do fígado e tireoide dos camundongos <i>M. musculus</i>	20
4 RESULTADOS	22
CAPÍTULO 1	24
CAPÍTULO 2	50
CAPÍTULO 3	80
CAPÍTULO 4	105
5 DISCUSSÃO GERAL	128
6 CONCLUSÕES.....	135
REFERÊNCIAS.....	137

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 O carrapato-do-cão, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae)

Rhipicephalus sanguineus sensu stricto (s.s.) é uma espécie descrita em 1806 por Latreille, baseado em exemplares coletados na França (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015). Entretanto em função de esta descrição ser bastante incompleta, principalmente ao ponto de vista morfológico, estudos da última década reuniram evidências filogenéticas e morfológicas que suportam a hipótese da existência de um complexo de espécies, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), no qual um número exato de táxons irmãos ainda não foi definido embora, atualmente, acredita-se compreender 17 espécies (BURLINI et al., 2010; NAVA et al., 2012; LIU et al., 2013; DANTAS-TORRES, 2018; ORTEGA-MORALES et al., 2019).

O “carrapato-do-cão”, como é popularmente conhecida a espécie *R. sanguineus* s. l., tem como seu hospedeiro preferencial o cão doméstico (CAMARGO-MATHIAS, 2018; NAVA et al., 2012; ORTEGA-MORALES et al., 2019) e ainda há relatos de parasitismo em outros mamíferos, incluindo o homem (DANTAS-TORRES, 2010). Este ectoparasita apresenta 3 estágios de desenvolvimento: larva, ninfa e adulto, sendo este último o único estágio com dimorfismo sexual (distinção morfológica entre machos e fêmeas), e ainda um ciclo de vida trioxeno, ou seja, dependente de 3 hospedeiros para completar todos os seus estágios de desenvolvimento (SONENSHINE; ROE, 2014; DANTAS-TORRES, 2018).

Acredita-se que a grande distribuição geográfica desta espécie esteja relacionada às altas taxas de migrações humanas pelo globo, que levam consigo o cão doméstico, e também à sua facilidade em se adaptar a diferentes condições climáticas (WALKER; KEIRANS; HORAK, 2000; DANTAS-TORRES, 2008).

O *R. sanguineus* s. l. tem especial destaque nas áreas médico-veterinária, econômico-sanitária e de saúde pública por ser, em todos os seus estágios de desenvolvimento, vetor de: *Ehrlichia canis* (erliquiose canina), *Babesia canis* (babesiose), *Anaplasma platys* (anaplasmosse) e *Hapatozoon canis* (hepatozoonose), doenças que acometem um grande número de cães todos os anos ao redor do mundo (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; DANTAS-TORRES, 2018). Além disso, transmite as bactérias do gênero *Rickettsia* spp., causadoras da febre maculosa na Europa (*R. conorii*) e nos EUA (*R. rickettsii*) (BORGES et al., 2007). No Brasil, já foram reportados carrapatos *R. sanguineus* s. l. infectados por *R. parkeri*, outro agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB) (CUNHA et al., 2009; MOERBECK et al., 2016; SILVA et al., 2017).

1.2 O controle natural como estratégia

Devido à grande participação dos carrapatos na transmissão de organismos de alta patogenicidade e virulência, à animais domésticos, de criação pecuária e à espécie humana, que causam severos danos à economia e à saúde pública, o controle destes ectoparasitas é de especial importância. Estima-se que US\$ 20 a US\$ 30 bilhões são perdidos anualmente em todo mundo devido aos carrapatos e as doenças transmitidas por eles (LEW-TABOR; RODRIGUEZ VALLE, 2016; NDAWULA; TABOR, 2020).

Segundo Oliveira e Camargo-Mathias (2018), acaricidas com princípios ativos de origem sintética tais como o fipronil, a permetrina e deltametrina são os mais utilizados no controle destes ectoparasitas. Entretanto, os altos custos tanto dos equipamentos para a sua aplicação quanto da adequação das instalações e da mão-de- obra em campo, somados ainda aos riscos de contaminação ambiental pelos resíduos deixados por esses produtos no solo e nos cursos d'água (NOLAN, 1985; OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; OLIVEIRA et al., 2009; ANHOLETO et al., 2017a), as elevadas taxas de toxicidade aguda em organismos não-alvos (CUNHA et al., 2017; REQUENA et al., 2019; SAKA; TADA, 2021) e principalmente, ao seu uso indiscriminado que tem resultado na seleção de cepas de carrapatos altamente resistentes (HIGA et al., 2015; VAN WYK; BARON; MARITZ-OLIVIER, 2016; GODARA et al., 2019; KUMAR; SHARMA; GHOSH, 2020; NDAWULA; TABOR, 2020; AMRUTHA et al., 2021), tem estimulado a busca por novas estratégias e métodos de controle, incluindo o biológico, as vacinas e a utilização de compostos bioativos de plantas (QUADROS et al., 2020).

Os compostos bioativos são baseados nos metabólitos secundários das plantas, os quais são identificados e caracterizados a partir de extratos de raízes, caule, folhas, flores, frutos

e sementes (LORENZI; MATTOS, 2008; QUADROS et al., 2020). Segundo Martins (2018), estes metabólitos fazem parte das estratégias de defesa das plantas, podendo promover efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos em humanos e outros animais e são basicamente classificados em 3 grupos de acordo com sua rota biossintética: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio.

Diante disso, substâncias extraídas de plantas vem sendo estudadas com o objetivo de se tornarem uma alternativa de controle destes ectoparasitas, visto que nestas estão presentes compostos que tem se mostrado efetivos no controle de pragas (REMEDIO et al., 2014; ROMA et al., 2015; ANHOLETO et al., 2017b; QUADROS et al., 2020; KONIG et al., 2021). O óleo essencial de neem (*Azadirachta indica*), por exemplo, atualmente já é comercializado como inseticida natural (OLIVEIRA et al., 2020a) e sua ação acaricida também já foi reportada na literatura (DENARDI et al., 2011; REMEDIO et al., 2014).

Componentes isolados de óleos essenciais como o timol (ARAÚJO et al., 2015; MATOS et al., 2014, 2018, 2019, 2020), o carvacrol (KONIG et al., 2019, 2020, 2021; LIMA DE SOUZA et al., 2019), o espilantol (extraído do jambú, *Acmella oleraceae*) (ANHOLETO et al., 2017, 2018) e os ésteres do óleo de mamona (*Ricinus communis*) (ARNOSTI et al., 2011) tem sido estudados e tem mostrado seu potencial como princípios ativos de novos acaricidas naturais.

1.3 A macela-da-terra, *Egletes viscosa* (L.) Less.

A *Egletes viscosa* (L.) Less., pertencente à família Asteraceae, é uma erva nativa da América tropical, incluindo o Brasil (LORENZI; MATTOS, 2008), popularmente conhecida como “macela” ou “macela-da-terra”, encontrada na região Nordeste, às margens de açudes e de cursos d’água (PEREIRA; BEZERRA; ALMEIDA, 2018).

Tem importância farmacológica, visto ter ação antiespasmódica, anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica e sedativa (CUNHA, 2003; LEE et al., 2005; ARAÚJO et al., 2008; CALOU et al., 2008; PEREIRA; BEZERRA; ALMEIDA, 2018). Devido a estas características sua exploração extrativista pela indústria farmacêutica vem sendo intensificada (BEG et al., 2011; AQUINO et al., 2015; PEREIRA; BEZERRA; ALMEIDA, 2018). Além de possuir bioativos com potencial farmacológico, outras propriedades de interesse econômico, incluindo a sua atividade antifúngica e inseticida, já foram reportadas na literatura (SINGH; MAURYA, 2005).

Cunha et al. (2003) em seus estudos dos aspectos químicos e farmacológicos dos componentes voláteis presentes no óleo essencial obtido a partir das inflorescências de *E.*

viscosa foram os primeiros a reportar na literatura a existência de dois quimiotipos diferentes para esta planta: quimiotipo **A**, caracterizado pela presença majoritária do componente acetato de *trans*-pinocarveíla; e quimiotipo **B**, com o acetato de *cis*-isopinocarveíla como principal constituinte. Estas diferenças foram corroboradas posteriormente através de análises morfológicas das partes vegetativas e reprodutivas da *E. viscosa* que demonstraram diferenças morfológicas marcantes entre os quimiotipos, tais como aspecto das folhas, tempos de floração e número de capítulos florais distintos (SILVEIRA; PESSOA, 2005).

Do quimiotipo **A** foram isolados a partir da *trans*-pinocarveíla, o ácido centipédico e a lactona do ácido hawtriwaico, enquanto que no tipo **B**, a escopoletina e a bachotricuneatina foram isoladas da *cis*-isopinocarveíla (CUNHA, 2003; MELO et al., 2006). Ainda, para ambas variedades de *E. viscosa* foi possível encontrar a ternatina, um composto fenólico do tipo flavonóide, das quais diversas propriedades farmacológicas já foram comprovadas na literatura, tais como sua ação anti-anafilática, anti-inflamatória, hepatoprotetora, gastroprotetora e antioxidante (SOUZA; RAO; SILVEIRA, 1992; RAO et al., 1997, 2003; VIEIRA et al., 2004, 2006; GUIMARÃES et al., 2011).

1.4 A lipia-da-serra, *Lippia schaueriana* Mart.

A *Lippia schaueriana* Mart. (família Verbenaceae) é outra espécie nativa do Brasil e endêmica de regiões da Caatinga, cuja distribuição geográfica está restrita aos estados da Bahia e Pernambuco (LORENZI; MATTOS, 2008; SOUZA et al., 2018). É encontrada em regiões serranas, abaixo dos 400m de altitude, e é popularmente conhecida como “lipia-da-serra”, “alecrim-da-serra” ou “alecrim-de-mocó” devido à sua localização e por compor a dieta principal de espécies nativas de roedores tais como o “mocó” (*Kerodon rupestres*, Caviidae) (SOUZA et al., 2018).

Diversos estudos abordam a atividade acaricida de plantas do gênero *Lippia* em todos os estágios de desenvolvimento de carrapatos. Gomes et al. (2014) e Gomes et al. (2012) comprovaram a ação acaricida do óleo essencial de *L. sidoides* em estudo com larvas e ninfas de carrapatos *R. sanguineus* l. s., *Amblyomma cajennense* l. s. (carrapato-estrela) e *Dermacentor nitens* (carrapato-da-orelha-do-cavalo). Ainda, espécies como *L. gracilis*, *L. alba* e *L. triplinervis* mostraram alta eficiência no controle de larvas, ninfas e adultos do carrapato-do-boi, *R. (Boophilus) microplus* (CRUZ et al., 2013; LAGE et al., 2013; PEIXOTO et al., 2015; COSTA-JÚNIOR et al., 2016;).

Embora até o momento não existam relatos na literatura sobre o potencial acaricida de *L. schaueriana*, Oliveira et al. (2020b) comprovaram recentemente a ação inseticida do

óleo essencial desta espécie em experimentos com larvas da mosca-minadora (*Liriomyza sativae*), um importante inseto praga de culturas hortícolas.

Souza et al. (2018) foram os primeiros a reportar a composição química do óleo essencial de *L. schaueriana*, a qual apresentou o monoterpeno óxido de piperitenona como seu principal constituinte.

A esse composto já são atribuídas na literatura ações fungicida e antimicrobiana contra diferentes micro-organismos de importância agrícola e médico-veterinária (PASCUAL et al., 2001; AGNANIET et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2006; MENDES et al., 2010) e ainda ação inseticida contra diferentes estágios de desenvolvimento das espécies *Anopheles stephensi* (TRIPATHI et al., 2004) e *Aedes aegypti* (LIMA et al., 2014), mosquitos vetores de patógenos que causam graves enfermidades como a malária e a dengue, respectivamente.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve o objetivo de avaliar o potencial acaricida dos óleos essenciais das plantas *Egletes viscosa* Less. e *Lippia schaueriana* Mart. sobre a biologia reprodutiva, órgão de Gené, ovário e singânglio de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s. l., analisando também o potencial tóxico destes óleos sobre o fígado e a tireoide de fêmeas de camundongos *Mus musculus*, utilizadas como modelo de organismos não-alvo.

2.2 Objetivos específicos

- 1 – Analisar e comparar a influência de diferentes concentrações (12.5, 25 e 50 mg/mL) dos óleos essenciais de *E. viscosa* e *L. schaueriana* sobre os parâmetros biológicos (oviposição, eclosão de larvas, percentual de controle) das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l., por meio de teste de imersão de adultos;
- 2 – Verificar e comparar a ocorrência de alterações morfológicas no órgão de Gené, ovários e singânglio das fêmeas de *R. sanguineus* s. l. após a exposição a diferentes concentrações dos óleos essenciais (12.5, 25 e 50 mg/mL), através de técnicas de Microscopia de Luz de Campo Claro e análises semi-quantitativas.
- 3 – Investigar e comparar o potencial tóxico dos óleos essenciais, na concentração considerada mais eficiente no controle dos carrapatos e determinada pelos testes prévios, sobre o fígado e a tireoide de fêmeas de camundongos *Mus musculus*, modelos de organismos não-alvo, por meio de técnicas de Microscopia de Luz de Campo Claro.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* s. l.

Indivíduos machos e fêmeas em jejum dos carrapatos provenientes de colônias dos laboratórios da “Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology” (BCSTM) instaladas em sala do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de Rio Claro, SP, Brasil, foram mantidos em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) Eletrolab EL 202 em condições controladas ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) para posteriormente serem utilizados na infestação.

Para obtenção das fêmeas de *R. sanguineus* s. l. completamente alimentadas (ingurgitadas), os espécimes foram alimentados em coelhos hospedeiros (Grupo Genético de Botucatu) por meio de infestações artificiais. Os coelhos hospedeiros eram isentos de contato prévio com o ectoparasita e com os óleos essenciais e foram mantidos em gaiolas de contenção em sala alocada no mesmo Biotério com ração e água *ad libitum* durante todo o período de experimentação.

A cada infestação realizada, 100 fêmeas e 50 machos em jejum foram colocados no interior de cada câmara de alimentação posicionada no dorso dos hospedeiros. Oito horas após a liberação dos carrapatos na câmara foi realizada a primeira observação da área de fixação das fêmeas e nos dias subsequentes, foram realizadas observações diárias até o ingurgitamento total e desprendimento dos espécimes no décimo dia.

Os procedimentos de fixação e de construção das câmaras de alimentação, e a infestação e controle dos carrapatos nestas câmaras, foram realizados segundo Bechara et al. (1995) em concordância com a Comissão de Ética no Uso Animal, CEUA-IB-UNESP/Rio Claro- protocolo 17/2019.

3.2 Camundongos *Mus musculus*

Foram utilizados neste estudo 20 camundongos *Swiss* fêmeas, da espécie *Mus musculus*, saudáveis, “spf” (patógeno-free), com peso aproximado de 40g, e idade entre 8 e 10 semanas, adquiridos do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA) da UNESP de Botucatu, SP, Brasil. Os animais foram alocados em sala nas dependências do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de Rio Claro, SP, Brasil e mantidos em caixas retangulares de polipropileno (30x20x13cm) (4 caixas com 5 animais cada) em condições normais de 22°C ± 2° de temperatura, 50% de umidade, ventilação apropriada, exaustor e fotoperíodo de 12 horas e foram alimentados com ração e água *ad libitum*.

3.3 Obtenção e análise dos óleos essenciais (OEs) de *Egletes viscosa* Less. e *Lippia schaueriana* Mart.

Capítulos florais secos de *E. viscosa* foram adquiridos em um supermercado na cidade de Fortaleza (Ceará, Brasil) em março/2016 e a obtenção e análise deste óleo foram realizadas na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, Ceará. Para a extração de OE, 300g de capítulos florais foram misturados a 1,5L de água destilada em um balão de fundo redondo (3L) e submetido a hidrodestilação por 4h, usando aparelho tipo Clevenger. Em seguida, o óleo essencial (R= 1,2 %, v/m) foi recolhido e centrifugado (2000 RPM; 10 min), seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em frasco âmbar a – 20 °C para posterior análise por Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM) (cromatógrafo CG-EM Agilent 5977A) e detecção por ionização em chama (CG-DIC) (Shimadzu modelo CG-2010 Plus).

L. schaueriana foi coletada em março de 2015 (8°22'58.2"S, 42°18'31.4"W) em São João do Piauí, Piauí. Uma amostra de referência das espécimes coletadas foi depositada no herbário Leopoldo Krieger (CESJ) da Universidade Federal de Juiz de Fora sob registro nº 67.395. A etapa de extração do óleo essencial foi realizada na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Meio-Norte, in Parnaíba, Piauí, onde aproximadamente 2 kg de folhas frescas de *L. schaueriana* foram misturadas a 3 L de água e submetido a hidrodestilação por 3h, utilizando aparelho Clevenger. O OE (R= 1,2 %, v/m) foi recolhido e centrifugado (2000 RPM; 10 min), seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em frasco âmbar a – 20 °C para posterior análise por Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM) (cromatógrafo CG-EM Agilent 5977A) e detecção por ionização em chama (CG-DIC) (Shimadzu modelo CG-2010

Plus) na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Agroindústria Tropical, in Fortaleza, Ceará.

3.4 Exposição das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l. aos OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana*

Para a realização dos experimentos utilizou-se o protocolo de imersão de adultos proposto por Drummond et al. (1973). Antes do início dos testes, as fêmeas completamente ingurgitadas foram separadas em grupos experimentais (20 espécimes para cada concentração, totalizando 100 fêmeas ingurgitadas para os parâmetros biológicos de cada óleo; e 10 espécimes para cada concentração, totalizando 80 fêmeas para as análises histológicas), com peso homogêneo garantido após pesagem de cada grupo em balança analítica, higienizadas com água corrente, em peneira, e secas com papel absorvente macio.

Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

Grupo controle 1 (C1): fêmeas ingurgitadas expostas somente à água destilada;

Grupo controle 2 (C2): fêmeas expostas ao solvente, etanol 50% (etanol e água, v/v).

Grupos tratamento (T1-T6): fêmeas expostas às diferentes concentrações dos óleos essenciais, 12.5 mg/mL do OE de *E. viscosa* (T1), 25 mg/mL do OE de *E. viscosa* (T2), 50 mg/mL do OE de *E. viscosa* (T3), 12.5 mg/mL do OE de *L. schaueriana* (T4), 25 mg/mL do OE de *L. schaueriana* (T5) e 50 mg/mL do OE de *L. schaueriana* (T6).

As fêmeas ingurgitadas foram imersas por cinco minutos nas diferentes concentrações dos óleos essenciais, 12.5 mg/mL, 25 mg/mL e 50 mg/mL (cada concentração = um tratamento), e em água destilada e etanol 50% para os grupos controle.

Após a imersão, as fêmeas foram colocadas sobre folhas de papel absorvente para retirada do excesso de líquido e na sequência, foram pesadas individualmente em balança analítica, posicionadas em placas de petri (150 x 30mm) devidamente identificadas e mantidas em câmara climatizada Eletrolab El 202 BOD (Biological Oxygen Demand) a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$. Os grupos de tratamento foram acondicionados em câmaras diferentes para cada OE., e os grupos controle também foram mantidos em câmara diferente daquela utilizada para os grupos tratados, para evitar possíveis interferências devido à volatilidade dos compostos.

3.4.1 Teste de imersão de adultos

Nesta etapa, foi realizado o acompanhamento diário até a morte da última fêmea e durante o processo de postura, o aspecto dos ovos foi avaliado e fotodocumentado com o uso de um estereomicroscópio.

Posteriormente a morte da última fêmea, as massas de ovos produzidas foram pesadas em balança analítica e acondicionadas em seringa plástica de 10 mL, com extremidade distal cortada, vedada com algodão hidrófilo e acondicionada em câmara climatizada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $80 \pm 10\%$). A eclosão das larvas foi avaliada 20 dias após a pesagem da massa de ovos.

Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: peso da fêmea ingurgitada antes da postura, peso da massa de ovos e percentual de eclosão dos ovos. Estes valores foram utilizados para: **a)** o cálculo do índice de produção de ovos ($\text{IPO}\% = (\text{peso da massa de ovos} \times 100) / \text{peso da fêmea antes da postura}$)(BENNETT, 1974); **b)** redução na oviposição ($\text{OR} = (\text{IPO}\% \text{ controle} - \text{IPO}\% \text{ tratamento}) / (\text{IPO}\% \text{ controle} \times 100)$)(ROULSTON; SCHNITZERLING; SCHUNTNER, 1968); e **c)** reprodução estimada ($\text{RE} = (\text{peso da massa de ovos} \times \% \text{ de eclosão das larvas}) / (\text{peso das fêmeas antes da postura} \times 20.400)$) para cálculo do percentual de controle ($\text{C}\% = (\text{RE controle} - \text{RE tratamento}) / (\text{RE controle} \times 100)$)(DRUMMOND et al., 1973). A quantidade de ovos por grama (20.000 - Drummond et al., 1973)) utilizado para calcular a RE foi modificado para 20.400 para *R. sanguineus* s. l. (FUJISAKI; KITAOKA; MORII, 1976).

3.5 Análise estatística

As médias de cada parâmetro foram submetidas a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0.05$), utilizando o software GraphPadPrism (versão 8.0, Graph Software, Inc. San Diego, CA, USA). Os testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls foram aplicados em distribuições não-paramétricas ($p < 0.05$).

3.6 Análise morfohistológica do órgão de Gené, ovário e singânglio de *R. sanguineus* s. l.

As fêmeas completamente ingurgitadas foram submetidas ao teste de imersão conforme item 3.4.1. Após imersão, as fêmeas foram secas em papel absorvente, e colocadas em estufa BOD, sob condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas) em placas de Petri identificadas onde permaneceram em observação durante 5 dias, visto que a maioria dos efeitos dos acaricidas não são imediatos e as alterações morfológicas geralmente aparecem após esse período.

Após 5 dias, as fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l. foram dissecadas em solução salina (NaCl 7.5 g/L, Na_2HPO_4 2.38 g/L e KH_2PO_4 2.72 g/L) para a remoção do seu escudo dorsal e exposição dos órgãos. Para a melhor preservação do singânglio apenas o intestino foi descartado (ocupa a maior parte do corpo do ectoparasita e dificultaria a visualização dos outros órgãos), e as fêmeas foram fixadas inteiras em paraformaldeído 4%, conforme estabelecido por

Pereira et al. (2017). Os órgãos de Gené e o ovários foram coletados e fixados separadamente em paraformaldeído 4%. Após 7 dias em fixador, as amostras foram transferidas para solução tampão fosfato onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratadas em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em historesina Leica® por 7 dias e incluídos em moldes plásticos que continham resina e polimerizador, onde permaneceram por mais 7 dias. Após esse período, os blocos de resina foram seccionados em micrótomo LEICA RM 2255, com secções de 3 µm de espessura, os quais foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As lâminas contendo as secções foram coradas pela hematoxilina de Harris durante 10 minutos. Depois de lavadas também por cinco minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa, por cinco minutos, e novamente lavadas em água corrente. Após secagem ao ar livre, as lâminas foram montadas em Entellan®, cobertas por lamínula (preparação permanente) e examinadas e fotografadas em microscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

3.7 Análise semi-quantitativa

A análise semi-quantitativa das alterações morfológicas encontradas no presente estudo para o órgão de Gené, ovário e singânglio foi realizada conforme estabelecido por Marinho et al. (2014) e König et al. (2019), e permitiu verificar estatisticamente a extensão e importância dos danos causados pela exposição aos óleos. Um fator de importância (ω) variando de 1 a 3 foi determinado para cada alteração observada nas análises, baseado na sua relevância para o funcionamento dos órgãos e a sobrevivência do carrapato: (1) importância mínima, quando a alteração poderia ser facilmente revertida após a interrupção da exposição ao tóxico; (2) importância moderada, quando a alteração poderia ser revertida na maioria dos casos e (3) importância máxima, quando a lesão foi considerada irreversível. As alterações encontradas nos grupos tratamento também foram classificadas em “scores” (α), variando de 0 a 5, onde 0 representou aspecto semelhante àquele observado nos controles e 5 a presença de alterações morfohistológicas em todas as células/estruturas observadas. O índice total foi calculado pela equação $\text{Index}_{\text{ind}} = \sum(\omega \times \alpha)$ e comparados estatisticamente por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguido do Teste de Tukey ($p < 0.05$), utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.00).

3.8 Exposição das fêmeas de camundongos *M. musculus* aos OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana* via aspersão

Para esta etapa, as 20 fêmeas de camundongos *Mus musculus* alocadas conforme item 3.2., foram divididas em 4 grupos experimentais:

Grupos Controle (**C1, C2**): as fêmeas expostas via aspersão, respectivamente, à água destilada e ao solvente dos óleos (etanol 50%);

Grupos Tratamento (**T1, T2**): foram expostas (aspersão) a concentração de 50 mg/mL dos óleos essenciais de *E. viscosa* e *L. schaueriana* diluídos em etanol 50% (concentração cuja eficácia como acaricida foi comprovada em estudos prévios).

As exposições foram realizadas em 3 dias consecutivos, com intervalos de 24h entre elas, e estes procedimentos foram realizados utilizando sprays esterilizados até que os animais estivessem totalmente molhados, segundo estabelecido por Cunha et al. (2017), tendo sido utilizado aproximadamente 15 mL de cada solução (água destilada, etanol 50% e óleos essenciais) durante todo o bioensaio. O tempo de experimentação (3 dias, intervalo de 24h) foi assim determinado para simular a aplicação de acaricidas comerciais, os quais devem ser aplicados consecutivamente em no máximo 3 dias. Após a exposição, os animais foram observados diariamente por 14 dias, sob protocolo de Cunha et al. (2017) .

No 14º dia, todos os indivíduos foram submetidos a anestesia com os analgésicos cloridrato de ketamina (80 mg/kg MC/IP) e cloridrato de xilasina (20mg/kg MC/IP) e tiveram o fígado e a tireóide coletados. Os procedimentos de remoção dos órgãos foram realizados pela veterinária Letícia Maria Gráballos Ferraz Hebling (CRMV 5412), segundo metodologia aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal, CEUA-IB-UNESP/Rio Claro), sob protocolo 17/2019.

3.9 Análise morfohistológica do fígado e tireoide dos camundongos *M. musculus*

Após coletados, os órgãos (a saber, fígado e tireoide dos grupos controles e tratamentos) foram fragmentados e estes fragmentos foram imediatamente fixados por 7 dias em fixador paraformaldeído 4%. Após a fixação das amostras, estas foram transferidas para solução tampão fosfato de sódio, onde permaneceram por mais de 24 horas. Na sequência, foram desidratadas em série crescente de álcool etílico (a 70, 80, 90, 95 e 100%) com intervalos de 1 hora e logo após, embebidas em historesina *Leica*® por 7 dias. O material foi então incluído em moldes plásticos que continham resina e polimerizador, onde permaneceram por mais 7 dias. Após esse período, os blocos de resina foram seccionados em micrótomo LEICA RM 2255, com secções de 3 µm de espessura, os quais foram recolhidas em lâminas de vidro

previamente limpas. As lâminas contendo as secções foram coradas pela hematoxilina de Harris durante 10 minutos. Depois de lavadas também por cinco minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa, por cinco minutos, e novamente lavadas em água corrente. Após secagem ao ar livre, as lâminas foram montadas em Entellan[®], cobertas por lamínula (preparação permanente) e examinadas e fotografadas em microscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho estão sendo aqui apresentados em quatro capítulos que contém artigos submetidos ou em fase de preparação para submissão em periódicos internacionais e específicos da área.

Capítulo 1:

Pereira, M.C.; Anholeto, L.A.; Kasa, G.G.; Castro, K.N.C.; Canuto, K.M.; Souza, A.S.Q.; Camargo-Mathias, M.I. Efficacy of *Egletes viscosa* and *Lippia schaueriana* essential oils on the reproductive biology of *Rhipicephalus sanguineus* engorged females.

Situação: Submetido à revista **Experimental Parasitology** (Novo Qualis A2).

Capítulo 2:

Pereira, M.C.; Anholeto, L.A.; Abreu, M.R.; Castro, K.N.C.; Canuto, K.M.; Souza, A.S.Q.; Camargo-Mathias, M.I. Alterações morfológicas no órgão de Gené e ovário de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato expostas aos óleos essenciais de *Egletes viscosa* Less. e *Lippia schaueriana* Mart., potenciais acaricidas naturais.

Situação: Em preparação.

Capítulo 3:

Pereira, M.C.; Anholeto, L.A.; Abreu, M.R.; Castro, K.N.C.; Canuto, K.M.; Souza, A.S.Q.; Camargo-Mathias, M.I. Avaliação morfohistológica e semi-quantitativa do singânglio de fêmeas ingurgitadas do carrapato-do-cão *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato expostas aos óleos essenciais de *Egletes viscosa* Less. e *Lippia schaueriana* Mart.

Situação: Em preparação.

Capítulo 4:

Pereira, M.C.; Anholeto, L.A.; Abreu, M.R.; Castro, K.N.C.; Canuto, K.M.; Souza, A.S.Q.; Hebling, L.M.G.;Camargo-Mathias, M.I. **Toxicidade dos óleos essenciais de *Egletes viscosa* Less. e *Lippia schaueriana* Mart., potenciais acaricidas naturais, em modelo de organismo não-alvo.**

Situação: Em preparação.

CAPÍTULO 1

**EFFICACY OF *Egletes viscosa* AND *Lippia schaueriana* ESSENTIAL OILS
ON THE REPRODUCTIVE BIOLOGY OF *Rhipicephalus sanguineus*
ENGORGED FEMALES¹**

Resumo

Este estudo inédito avaliou a eficácia de diferentes concentrações dos óleos essenciais da macela-da-terra (*Egletes viscosa* Less.) e da lipia-da-serra (*Lippia schaueriana* Mart.), ervas nativas da América tropical, sobre os parâmetros da biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s. l. Os óleos essenciais (OEs) aqui utilizados foram obtidos via hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa com espectrometria de massas e detecção por ionização em chama. Identificou-se 27 componentes no OE de *E. viscosa* e 18 em *L. schaueriana*, representando mais de 99% do total dos constituintes. As fêmeas completamente ingurgitadas foram expostas por meio do teste de imersão e divididas em 5 bioensaios para cada OE (20 fêmeas/grupo): controle 1 – expostas à água destilada; controle 2 – expostas ao etanol 50% (v/v); e tratamentos 1-3 – expostas às concentrações de 12.5, 25 e 50 mg/mL dos óleos essenciais diluídos em etanol 50%. Ambos os óleos essenciais reduziram significativamente ($p < 0.05$) o índice de produção de ovos nas concentrações de 25 e 50 mg/mL, bem como a viabilidade da postura em todas as concentrações testadas. A morfologia dos ovos das posturas de fêmeas expostas aos óleos essenciais sofreu alterações (ovos desidratados, escurecidos e desagregados) e estas alterações foram dose-dependentes. O percentual de controle do OE de macela foi de 58.9%, 70.8% e 92.7% nas concentrações de 12.5, 25 e 50 mg/mL respectivamente. Nas mesmas concentrações, a eficácia do óleo de lipia-da-serra foi de 11.4%, 53.4% e 84.6%. Assim, pode-se concluir que os óleos essenciais de *E. viscosa* e *L. schaueriana* tem atividade acaricida sobre o carrapato-do-cão.

Palavras-chave: carrapaticida, controle, parasita, acaricida natural

¹Melissa Carolina Pereira; Luis Adriano Anholetto; Giovanna Gennari Kasa; Karina Neoob de Carvalho Castro, Kirley Marques Canuto, Ana Sheila de Queiroz Souza e Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo científico em submetido ao periódico **Experimental Parasitology** em março/2021.

Abstract

The present study brings the first data on the efficacy of plants *Egletes viscosa* Less (macela-da-terra) and *Lippia schaueriana* Mart. (lipia-da-serra) essential oils (EOs), on the reproductive biology of *Rhipicephalus sanguineus* s. l. (Acari: Ixodidae) engorged females. The analyses identified 27 components in *E. viscosa* and 18 in *L. schaueriana*, comprising more than 98% of its constituents. The effects on the females reproductive biology was assessed by adult immersion test divided into 5 bioassays for each oil (20 females/group): 1 – exposed to distilled water; 2 – exposed to ethanol 50% (v/v); and 3-5 – exposed to the concentrations of 12.5, 25 and 50 mg/mL of the essential oils. Both EOs reduced significantly ($p < 0.05$) the egg production index at the concentrations of 25 and 50 mg/mL, also affecting significantly ($p < 0.05$) the egg viability. During the laying process, the eggs produced by the females exposed to the EOs presented several morphological alterations (dehydrated, darkened and disaggregated) and these alterations were greater as the concentrations increased. The control percentages of the *E. viscosa* oil were 58.9%, 70.8% and 92.7% at the concentrations of 12.5, 25 and 50 mg/mL, respectively. In the same concentrations, the efficacy of *L. schaueriana* was 39.3%, 53.4% and 84.6%. Therefore, it can be concluded that the essential oils from *E. viscosa* and *L. schaueriana* have acaricidal activity on *R. sanguineus* s. l. females.

Keywords: tickcide, control, parasite, natural acaricide

1 INTRODUÇÃO

Ticks are important vectors of a large number of diseases that affect the human being, domestic animals and livestock, causing significant economic losses. In a global scale, the damages caused by these ectoparasites represent an economic burden of US\$ 20 to 30 billion per annum (LEW-TABOR; RODRIGUEZ VALLE, 2016; NDAWULA; TABOR, 2020). Many factors must be considered in determining the global impact of ticks, mainly due to their feeding habits, which can cause tissue damages, myiasis and anemia by blood loss, directly affecting the cattle milk and meat production, in addition to creating favorable conditions for secondary bacterial infections on their hosts (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s. l.), represent a threat to public health in all stages of development as a vector of *Ehrlichia canis* (ehrlichiosis), *Babesia canis* (babesiosis) and *Hapatozoon canis* (hepatozoonosis), which cause diseases that affect a large number of dogs worldwide (DANTAS-TORRES, 2010; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015). Moreover, this parasite transmits several bacteria, such as *Rickettsia* spp., causative agent of Rocky Mountain spotted fever in Europe (*R. conorii*) and in the USA (*R. rickettsii*) (BORGES et al., 2007). In Brazil, *R. sanguineus* s. l. were reported to be infected with *R. parkeri*, another etiologic agent of the Brazilian spotted fever (BSF) (CUNHA et al., 2009; MOERBECK et al., 2016; SILVA et al., 2017).

In this sense, the use of chemical acaricides, mainly synthetic ones, is the most common and widely used strategy to control ticks. Despite their efficiency, synthetic acaricides cause significant environmental damages, contaminating the soils and water streams with residues (CAMARGO-MATHIAS, 2018). Moreover, these chemicals can also affect non-target organisms, including animals and human beings, since the majority of them present high levels of toxicity (CUNHA et al., 2017).

The rate at which tick species can develop resistance to tickcides has presented a challenge, mainly for developing countries where the indiscriminate and inappropriate use of synthetic products is a common practice (HIGA et al., 2015; LEW-TABOR; RODRIGUEZ VALLE, 2016). In this sense, the search for new alternatives to control these ectoparasites has stimulated studies with essential oils (EOs), since they contain an arsenal of secondary metabolites that are part of plant defense strategies (CASTRO et al., 2018) and have been proven effective to control pests (OLIVEIRA; CAMARGO-MATHIAS, 2018; ANHOLETO et al., 2017; NOLAN, 1985).

Egletes viscosa (L.) Less. (Asteraceae) is an endemic species to tropical America including the northeast of Brazil (LORENZI; MATTOS, 2008) and popularly known as “macela” or “macela-da-terra” (PEREIRA et al., 2018). *E. viscosa* contains bioactive compounds with pharmacological and economically important properties, including insecticide and acaricidal activity – already reported in the literature (PRATS et al., 2006; JAMUNA et al., 2015; TRIPATHI et al., 2011; ZHOU et al., 2019; GUIMARÃES et al., 2011; RAO et al., 2003).

Lippia schaueriana Mart. (Verbenaceae) is a Caatinga endemic species, mainly found in the states of Bahia and Pernambuco, although it can also be found in other northeast states, more specifically in transitional vegetation zones (LORENZI; MATTOS, 2008; SOUZA et al., 2018). In the northeast of Brazil, this plant is popularly known as “alecrim-de-mocó” or “lipia-da-serra”. Although the literature does not present any data on the tickcid potential of *L. schaueriana*, several studies have addressed the potential of *Lippia* plants against larvae, nymphs and adults from *R. sanguineus* s. l., *Amblyomma cajennense*, *Dermacentor nitens* (GOMES et al., 2012, 2014) and *R. microplus* (CRUZ et al., 2013; LAGE et al., 2013; PEIXOTO et al., 2015; COSTA-JÚNIOR et al., 2016).

Thus, the objective of the present study was to bring unprecedented data regarding the tickcid potential of EOs extracted from the leaves and flower heads of two tropical American active species, *Egletes viscosa* Less. (Asteraceae) and *Lippia schaueriana* Mart. (Verbenaceae) and their effects on the reproductive biology of *R. sanguineus* s.l. engorged females.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Obtaining *Rhipicephalus sanguineus* s. l. engorged females

Unfed adults (males and females) were provided by the “Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology” (BCSTM) and kept in BOD incubator Eletrolab EL 202 under controlled conditions ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 80% humidity and 12h photoperiod) in the Animal Facilities of the Institute of Biosciences at Sao Paulo State University, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

To reach the fully engorged stage, the *R. sanguineus* s. l. females fed on rabbits (Botucatu Genetic Group), with weight range of 3.0-3.5 kg, through artificial infestation. The hosts, which had no previous contact with the ectoparasite or the essential oils, were kept in cages and offered food and water *ad libitum* throughout the experimental period.

For each infestation, the unfed ticks - 100 females and 50 males – were placed into feeding chambers fixed on the back of the rabbits with nontoxic glue (2 rabbits/infestation). The first observation occurred 8h after releasing the ticks in the chambers, and, subsequently, daily observations were carried out until the complete engorgement and natural detachment of the specimens from the host's back on the tenth day.

The manufacture, the fixation of the feeding chambers and the infestation processes followed the protocol first established by Bechara et al. (1995) and all the procedures were approved by the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil under protocol no. 17/2019.

2.2 Obtaining and analyzing *Egletes viscosa* Less. and *L. schaueriana* Mart. essential oils (EOs)

Dried flower heads from *E. viscosa* were purchased at a supermarket in Fortaleza, CE, Brazil in March 2016. For the essential oil extraction, 300g of dried flower heads were mixed with 1.5 L of distilled water and submitted to hydro-distillation for 4h using a Clevenger apparatus. Then, the essential oil ($R = 1.2\%$, v/m) was centrifuged (2000 rpm; 10 min), dried over anhydrous sodium sulfate and stored at -20°C . The material was analyzed through gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) and submitted to flame ionization detector (GC-FID) for chemical composition determination at Embrapa Tropical Agroindustry in Fortaleza, Ceará, Brazil.

The *L. schaueriana* was harvested during March 2015 ($8^{\circ}22'58.2''\text{S}$, $42^{\circ}18'31.4''\text{W}$) in São João do Piauí, Piauí, Brazil. Reference plant specimen was deposited in the herbarium Leopoldo Krieger (CESJ) of the Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil,

under the registration number 67.395. The essential oil was extracted from the leaves of *L. schaueriana* through hydro-distillation using a Clevenger apparatus at Embrapa Mid-North Implementation Unit in Parnaíba, Piauí, Brazil. Nearly 2 kg of fresh plant was mixed with 3 L of water and boiled for 3 h. Then, the oil was dried over anhydrous sodium sulphate, filtered, and stored at 4°C. The material was tested and analyzed through gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) and submitted to flame ionization detector (GC-FID) for chemical composition determination (CASTRO et al., 2016) at Embrapa Tropical Agroindustry in Fortaleza, Ceará.

2.3 Adult immersion test

The experiments followed the protocol for adult immersion test established by Drummond et al. (1973). Prior to the tests, the engorged females were separated into 5 experimental groups/oil (20 specimens/concentration; a total of 100 engorged females per oil), with homogeneous weight measured with an analytic balance, washed in running tap water and dried on soft absorbent paper.

These experimental groups were established for each oil:

Control group 1 (C1): engorged females exposed to distilled water.

Control group 2 (C2): females exposed to the solvent - 50% ethanol (v/v).

Treatment groups (T1, T2 and T3): females exposed to the concentrations of 12.5 mg/mL (**T1**), 25 mg/mL (**T2**) and 50 mg/mL (**T3**) of EO diluted in 50% ethanol.

The engorged females were immersed for 5 min in distilled water or 50% ethanol or EOs different solutions as previously established. After immersion, the females were placed on absorbent paper to remove the excess of liquid, weighed individually on analytical balance, and placed on labelled Petri dishes (5.5 x 1.3 cm). The specimens were kept in climatized BOD (Biological Oxygen Demand) incubator Eletrolab El 202 at 27±1°C and 80±10% relative humidity. The treatment groups were placed into different incubators, one for each EO, to avoid possible interferences due to the volatility of the compounds. The control groups were also kept in different incubators under the same conditions. In this stage, observations were performed daily, until the death of the last female (20 days after immersion). During the laying process, the egg's appearance was evaluated and documented using a stereomicroscope.

After their death, the egg masses were weighed in analytic balance, placed in 10 mL plastic syringes, with the distal end cut off, sealed with hydrophilic cotton and kept in an incubator (27±1°C and 80±10% relative humidity). The hatching percentage of larvae (H%) was evaluated 20 days after weighing the egg.

The following biological parameters were evaluated: engorged female weight before oviposition, egg mass weight and hatching percentage of larvae. These values were used to calculate: **a)** egg production index ($EPI\% = (\text{egg mass weight} \times 100) / \text{engorged female weight before oviposition}$) (BENNETT, 1974); **b)** oviposition reduction ($OR = (EPI\% \text{ control} - EPI\% \text{ treatment}) / (EPI\% \text{ control} \times 100)$) (ROULSTON et al., 1968); and **c)** estimated reproduction ($ER = (\text{egg mass weight} / \text{initial female weight}) \times \% H \times 20.400$) to calculate the control percentage ($C\% = (ER \text{ control} - ER \text{ treatment}) / (ER \text{ control} \times 100)$) (DRUMMOND et al., 1973). The number of eggs per gram (20.000 - DRUMMOND et al., 1973) used to calculate the ER was modified to 20.400 for *R. sanguineus* s. l. (FUJISAKI et al., 1976).

2.4 Statistical Analysis

The means of each parameter were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test with confidence interval of 95% ($p < 0.05$), using software GraphPadPrism (version 8.0, Graph Software, Inc. San Diego, CA, USA). Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keulls tests were applied for nonparametric distributions ($p < 0.05$).

3 RESULTS

The chemical analysis of the essential oils (EOs) from *Egletes viscosa* (macela-da-terra) and *Lippia schaueriana* (lipia-da-serra) identified 27 components in *E. viscosa* and 18 in *L. schaueriana*, comprising more than 98% of the plants' constituents, as shown in **Table 1**.

This investigation also allowed the identification of the major compounds of the EOs, and for *E. viscosa* the most abundant compound was *cis*-isopinocarveyl acetate (68.41%), followed by *trans*-pinocarveyl acetate (10.33%), while the *L. schaueriana* oil presented a high concentration of piperitenone oxide (64.36%) and limonene (21.29%).

Both the EOs presented effects on the *Rhipicephalus sanguineus* s. l. engorged females, especially in the concentrations of 25 and 50 mg/mL.

Regarding the biological parameters analyzed, the *R. sanguineus* s. l. females exposed to the *E. viscosa* oil presented significant reduction ($p < 0.05$) in egg production index (EPI) at the concentrations of 25 mg/mL (EPI=37.2%) and 50 mg/mL (EPI=22.7%), reducing oviposition in 38.8% and 62.7%, respectively, in comparison with the control groups 1 (water, EPI=75.8%) and 2 (ethanol 50%, EPI=65.9%) (**Table 2**). The concentration of 12.5 mg/mL (EPI=40.7%) reduced oviposition in 33.1%, a significant reduction ($p < 0.05$) in relation to distilled water, but not to 50% ethanol (**Table 2**). In the comparison with the hatching percentage of larvae the *E. viscosa* oil at all concentrations was statistically different ($p < 0.05$) to the results for the control groups, showing that this oil can greatly affect the egg viability. The concentration of 50 mg/mL was the most effective one, since only 23% of the eggs hatched (**Table 2**).

The *L. schaueriana* oil tested in our study also affected the egg production index (EPI), however not in all concentrations, since the results were statistically significant ($p < 0.05$) only for the concentrations of 25 mg/mL (EPI=48.4%) and 50 mg/mL (EPI=37.7%) (**Table 3**). These concentrations reduced the oviposition values in 31.2% and 46.4%, respectively, in relation to the control groups 1 (IPO=70.4%) and 2 (IPO=63.9%). Although the percentage is lower in comparison with *E. viscosa*, these two concentrations of *L. schaueriana* oil were capable to inhibit egg viability significantly ($p < 0.05$), with hatchability rates of 67% (25 mg/mL) and 27.8% (50 mg/mL) (**Table 3**). The concentration of 12.5 mg/mL reduced oviposition in 18.7% (EPI=57.2%) and was not significant in comparison with the controls, despite having reduced significantly ($p < 0.05$) egg viability, since 73.6% of the larvae hatched (**Table 3**).

The morphological analysis of the eggs demonstrated that, differently from what was observed in the controls, where the eggs were intact, with smooth and glossy aspect and aggregated in a mass as typically for this species, the eggs produced by the females exposed to both EOs were darkened and dehydrated (**Fig. 1**). These alterations were greater as the concentrations increased. Remarkably, at the concentration of 50 mg/mL of the *E. viscosa* oil, in addition to dehydrated, the eggs were dispersed, i.e., no longer aggregated in a mass (**Fig. 1**).

With special attention in what regards the tickcide potential, the present study confirmed that both EOs were efficient to control *R. sanguineus* s. l. engorged females, especially at the highest concentration tested (50 mg/mL). The values varied from 58.9% to 92.7% for the lowest and the highest concentrations of *E. viscosa* oil, and from 39.3% to 84.6% for the concentrations of *L. schaueriana* oil (**Tables 2-3**). Comparing the control percentages, at the concentrations of 12.5 and 25 mg/mL, *E. viscosa* was more effective and statistically significant ($p < 0.05$) than *L. schaueriana* to control the engorged females; however, for the concentration of 50 mg/mL, the values were statistically similar (**Fig. 2**).

Table 1: Chemical composition of *Egletes viscosa* Less. and *Lippia schaueriana* Mart. essential oils

Compounds	RI ^a	RI _{lit} ^b	GC-MS(%)	
			<i>E. viscosa</i>	<i>L. schaueriana</i>
α -Thujene	928	928	0.18	—
α -Pinene	937	936	0.37	0.38
Sabinene	976	973	0.66	0.04
β -Pinene	981	978	5.16	—
Myrcene	992	989	0.36	0.71
α -Terpinene	1019	1017	0.12	—
p -Cymene	1026	1024	0.11	0.71
Limonene	1030	1030	0.67	21.29
<i>trans</i> - β Ocimene	1054	1050	—	0,78
γ -Terpinene	1059	1060	0.22	0.28
1-Terpineol	1137	1136	0.40	—
<i>trans</i> -Pinocarveol	1141	1140	0.55	—
<i>cis</i> -p-mentha-2,8-dien-1-ol	1145	1137	—	0.60
<i>cis</i> -Chrysanthenol	1162	1164	0.14	—
Terpinen-4-ol	1179	1177	0.47	—
α -Terpineol	1192	1190	0.42	—
Myrtenol	1198	1194	0.20	—
Methyl chavicol	1206	1196	—	0.54
<i>trans</i> -Carveol	1212	1217	2.70	—
Coahuilensol, methylether	1226	1221	—	0.55
Car-3-en-2-one	1244	1248	0.19	—
Linalool acetate	1251	1255	0.11	—
Carvone	1255	1243	—	0.35
<i>cis</i> -Chrysanthenyl acetate	1262	1262	4.22	—
Thymol	1298	1290	—	1.64
<i>trans</i>-pinocarveyl acetate	1302	1298	10.33	—
<i>cis</i>-isopinocarveyl acetate	1312	1305	68.41	—
Myrtenol acetate	1327	1329	1.01	—
<i>trans</i> -carvyl acetate	1345	1338	—	0.34
Piperitenone	1355	1343	—	2.83
Linalool isobutyrate	1371	1375	0.55	—
Piperitenone oxide	1383	1368	—	64.36
Butyl propanoate	1383	1384	0.12	—
<i>trans</i> -Myrtenol acetate	1386	1386	0.21	—
4 α ,7 α ,7 β -Nepetalactone	1414	—	—	3,30
<i>E</i> -Caryophyllene	1422	1420	0.47	—
Bicyclogermacrene	1510	1500	—	0,36
Caryophyllene oxide	1585	1581	0.27	—
Spathulenol	1593	1578	—	0,90
Total			98.62	99.96

^a: Retention index (RI) obtained by HP-5 MS; ^b: References (RI_{lit}) (ADAMS, 2017; BABUSHOK; LINSTROM; ZENKEVICH, 2011; CRAVEIRO et al. 1992; CUNHA, 2003). (—) Not identified.

Table 2: Mean $\pm$ standard deviation of the female weight before oviposition (mg), egg mass weight (mg), egg production index (EPI-%), oviposition reduction (OR-%), larval hatching percentage (H%) and control percentage (C%) of the *Rhipicephalus sanguineus* engorged females exposed different concentrations of *E. viscosa* essential oil under laboratory conditions ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ and $80 \pm 10\%$ RH).

	Female weight before oviposition (mg)	Egg mass weight (mg)	Egg production index (EPI-%)	Oviposition reduction (OR-%)	Larval hatching percentage (H%)	Control percentage (C%)
Control 1 - Distilled water	260.4 $\pm$ 3.4 ^a	195.7 $\pm$ 0.7 ^a	75.8 $\pm$ 10.1 ^a	0.0 $\pm$ 0.0 ^a	95.8 $\pm$ 0.3 ^a	0.0 $\pm$ 0.0 ^a
Control 2 - 50% ethanol (v/v)	266.7 $\pm$ 6.9 ^a	171.2 $\pm$ 1.1 ^a	65.9 $\pm$ 13.1 ^a	25.2 $\pm$ 0.7 ^{ac}	95.2 $\pm$ 0.9 ^a	13.4 $\pm$ 8.1 ^a
12.5 mg/mL	280.6 $\pm$ 3.6 ^a	114.6 $\pm$ 2.8 ^b	40.7 $\pm$ 9.7 ^a	33.1 $\pm$ 16.0 ^{bc}	73.0 $\pm$ 0.7 ^b	58.9 $\pm$ 10.2 ^b
25 mg/mL	260.0 $\pm$ 14.3 ^a	97.3 $\pm$ 2.0 ^b	37.2 $\pm$ 5.7 ^b	38.8 $\pm$ 9.3 ^{bc}	56.7 $\pm$ 1.4 ^c	70.8 $\pm$ 5.2 ^b
50 mg/mL	283.4 $\pm$ 9.7 ^a	64.3 $\pm$ 0.3 ^b	22.7 $\pm$ 0.8 ^b	62.7 $\pm$ 1.4 ^b	23.0 $\pm$ 8.6 ^d	92.7 $\pm$ 3.0 ^b

* Means followed by the same letters in the same column do not differ significantly at 5% (p<0.05).

Table 3: Mean $\pm$ standard deviation of the female weight before oviposition (mg), egg mass weight (mg), egg production index (EPI-%), oviposition reduction (OR-%), larval hatching percentage (H%) and control percentage (C%) of the *Rhipicephalus sanguineus* engorged females exposed different concentrations of *L. schaueriana* essential oil under laboratory conditions ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ and $80 \pm 10\%$ RH).

	Female weight before oviposition (mg)	Egg mass weight (mg)	Egg production index (EPI-%)	Oviposition reduction (OR-%)	Larval hatching percentage (H%)	Control percentage (C%)
Control 1 - Distilled water	280.4 $\pm$ 1.5 ^a	197.5 $\pm$ 5.8 ^a	70.4 $\pm$ 1.8 ^a	0.0 $\pm$ 0.0 ^a	97.7 $\pm$ 0.2 ^a	0.0 $\pm$ 0.0 ^a
Control 2 - 50% ethanol (v/v)	250.2 $\pm$ 2.0 ^a	160.1 $\pm$ 15.1 ^a	63.9 $\pm$ 0.8 ^a	9.2 $\pm$ 1.2 ^a	95.3 $\pm$ 0.0 ^a	11.4 $\pm$ 1.3 ^a
12.5 mg/mL	261.6 $\pm$ 2.1 ^a	149.7 $\pm$ 11.4 ^b	57.2 $\pm$ 4.8 ^{ab}	18.7 $\pm$ 7.8 ^a	73.6 $\pm$ 15.2 ^b	39.3 $\pm$ 7.5 ^b
25 mg/mL	278.7 $\pm$ 3.3 ^a	133.3 $\pm$ 11.0 ^b	48.4 $\pm$ 9.8 ^b	31.2 $\pm$ 13.9 ^b	67.0 $\pm$ 8.6 ^b	53.4 $\pm$ 3.4 ^b
50 mg/mL	273.8 $\pm$ 4.4 ^a	102.2 $\pm$ 2.8 ^c	37.7 $\pm$ 5.1 ^b	46.4 $\pm$ 7.2 ^b	27.8 $\pm$ 3.1 ^c	84.6 $\pm$ 3.7 ^c

* Means followed by the same letters in the same column do not differ significantly at 5% ($p < 0.05$).

Fig. 1: Micrographs of egg masses produced by the *Rhipicephalus sanguineus* s. l. engorged females exposed to: distilled water (**C1A-D**) and ethanol 50% (**C2 E-H**), where the eggs are intact, glossy and smooth. The eggs produced by the females exposed to the concentrations of 12.5 mg/mL (**T1 I-L**), 25 mg/mL (**T2 M-P**) and 50 mg/mL (**T3 Q-T**) of *Egletes viscosa* Less. (macela-da-terra) and *Lippia schaueriana* Mart. (lipia-da-serra) oils are dehydrated, darkened and disaggregated. **Bars (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S):** 2mm ; **(B, D, F, H, J, L, N, P, R, T):** 500 μ m.

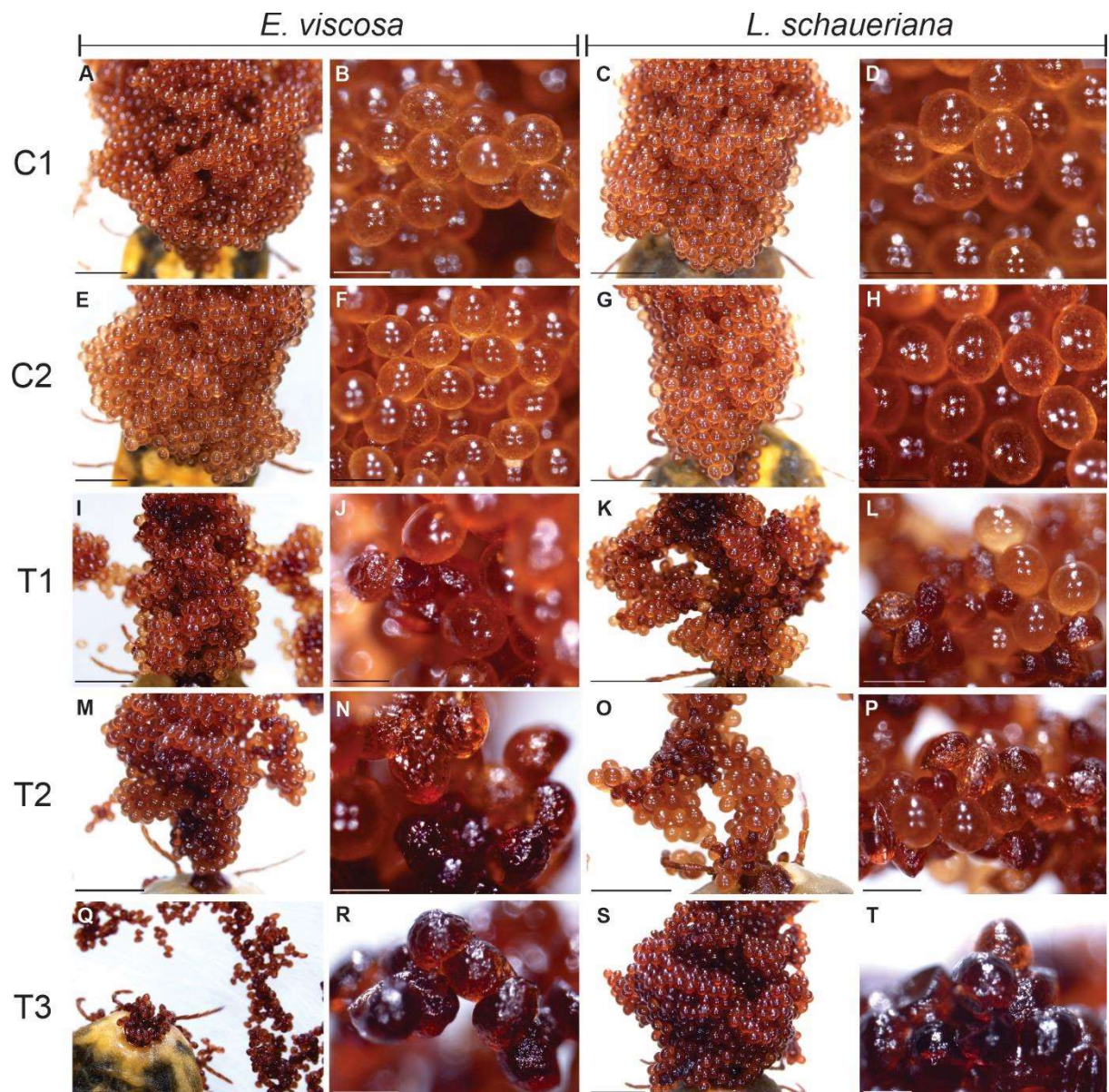
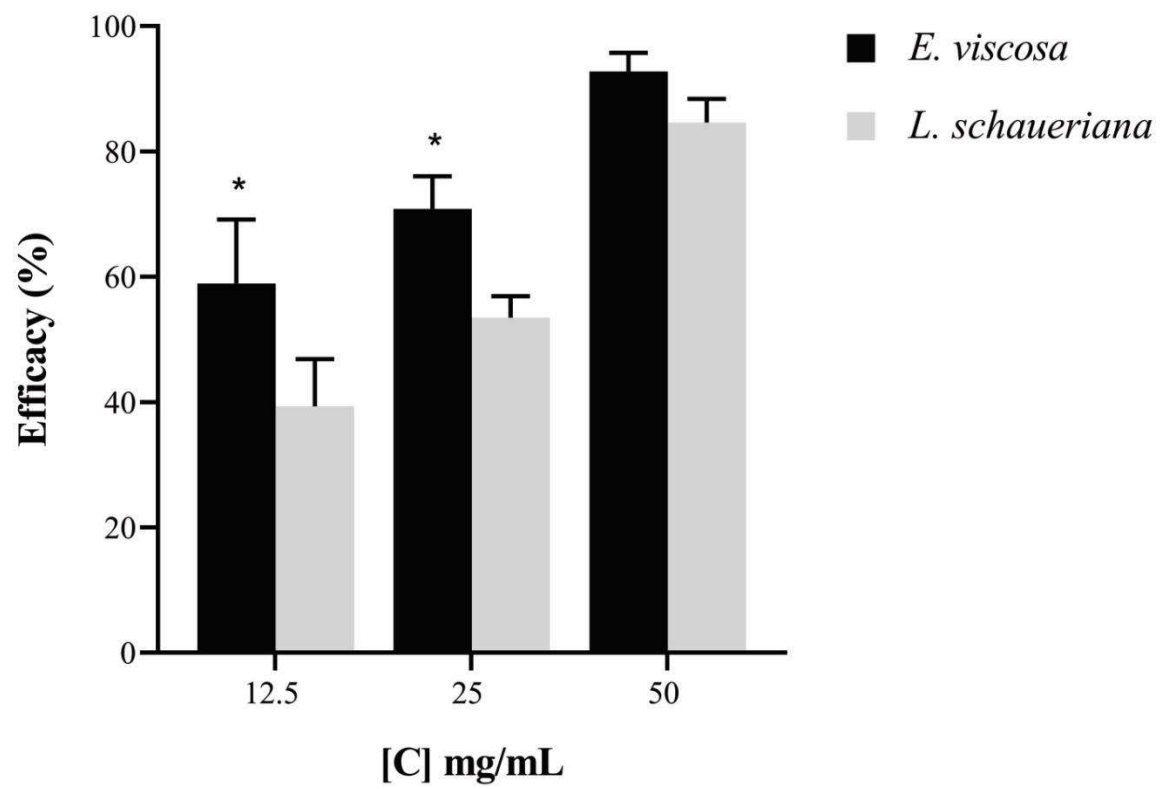


Fig. 2: Efficacy (%) of the *Rhipicephalus sanguineus* s. l. engorged females exposed to the different concentrations of *Egletes viscosa* Less. (macela-da-terra) and *Lippia schaueriana* Mart. (lipia-da-serra) essential oils. The values represent mean $\pm$ standard deviation. (*) The means between the groups show statistically significant difference at 5% ($p < 0.05$).



4 DISCUSSION

Essential oils (EOs) have been widely used in the cosmetic, pharmaceutical and agricultural industries, since they have a great arsenal of volatile compounds, such as terpenes, terpenoids and phenols with recognized medicinal, insecticidal, bactericidal, fungicidal and antiparasitic actions (BAKKALI et al., 2008). For these reasons, the EOs have been regarded as important elements in the search for bioactive compounds with the potential to control arthropods, including ticks. The aim is to develop alternative control strategies that are safe for the environment, for the animals and for public health as well, also contributing to curb the indiscriminate use of synthetic products that generate toxic chemical residues.

In this sense, the present study confirmed that the essential oils from *E. viscosa* Less. (macela-da-terra) and *L. schaueriana* Mart. (lipia-da-serra) greatly affects the reproductive biology of *Rhipicephalus sanguineus* s. l. engorged female ticks, reducing oviposition and egg viability, especially at the concentrations of 25 and 50 mg/mL. To our knowledge, this is the first report on the tickcidal effects of these oils.

The present study entailed the chemical composition analysis of the *E. viscosa* oil, identifying the presence of the isomer *cis*-isopinocarveyl acetate, major component of the oil, confirming that it was extracted from *E. viscosa* chemotype **B**. This result corroborates Cunha et al. (2003), the first work to report the existence of two chemotypes for this plant: chemotype **A**, characterized by the major presence of *trans*-pinocarveyl acetate; and chemotype **B**, whose main constituent is *cis*-isopinocarveyl acetate. This hypothesis was subsequently supported by morphological analyses on the vegetative and reproductive parts of *E. viscosa*, showing significant differences between the chemotypes, such as: aspect of the leaves and number or period of inflorescences (SILVEIRA; PESSOA, 2005; VIEIRA et al., 2006). Furthermore, molecular and phylogenetic analyses showed differences between DNA sequences, which would justify the classification into two chemotypes (BATISTA et al., 2012). Additionally, Vieira et al. (2006) reported the presence of two diterpenes - scopoletin and bacchotricuneatin – derivative from *cis*-isopinocarveyl acetate, i.e., exclusive to chemotype **B**.

The exposure to the *E. viscosa* EO, chemotype **B**, affected the reproductive biology of the *R. sanguineus* s. l. females, reducing oviposition and egg fertility rate, and, in highest concentrations used in this experiment, the results showed an efficacy of 70.8% (25 mg/mL) and 92.7% (50 mg/mL). These results are probably associated with the mode of action of this oil's major compound, the *cis*-isopinocarveyl acetate. The essential oil of *E. viscosa* has been reported to have antispasmodic, anti-inflammatory, antibacterial and antifungal properties (LEE

et al., 2005; ARAÚJO et al., 2008; CALOU et al., 2008). Although there are no reports of pharmacological actions directly related to this compound, some nonvolatile derivatives as flavonoid ternatine and diterpene scopoletin, which can be obtained from *cis*-isopinocarveyl, also have such properties (VIEIRA et al., 2006; RAO et al., 2003; RAO et al., 1997; SOUZA, 1992; VIEIRA et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2011; TRIPATHI et al., 2011; JAMUNA et al., 2015; PRATS et al., 2006).

In recent studies, Ma et al. (2020) and Zhou et al. (2017; 2019) demonstrated the acaricidal action of scopoletin on carmine spider mites (*Tetranychus cinnabarinus*), reporting direct effects of the compound on repellency and oviposition. The same authors tried to elucidate the acaricidal mechanism of scopoletin on *T. cinnabarinus*, providing evidences that the diterpene would act by inhibiting the expression of the genes associated with the calcium signaling pathway, leading to a significant increase in the number of free Ca^{2+} ions in the intracellular zone. Thus, as in normal conditions the Ca^{2+} ions are responsible for several biological functions of the cells, including the maintenance of homeostasis, gene expression, synthesis of proteins and cell secretion, the saturation of these ions in the intracellular zone would induce pro-apoptotic effects and prevent the cells from performing their regular functions (ZHOU et al., 2019).

The presence of calcium in tick oocytes has been reported by Denardi et al. (2004) for *Amblyomma cajennense* and Saito et al. (2005) for *Rhipicephalus microplus*. In both studies, the presence of calcium spheres associated with the mitochondria in oocytes was observed, and this was associated with the maintenance of cell homeostasis. Furthermore, Oliveira et al. (2008) demonstrated significant alterations in the morphology of the mitochondria found in the oocytes of *R. sanguineus* s. l. semi engorged females exposed to fipronil, and suggested that the increase in the number of Ca^{2+} ions in the cytoplasm would have caused the inhibition of the mitochondrial functions, leading to cell death.

Thus, the results of the present study suggests that *cis*-isopinocarveyl acetate could be acting on the oocytes of the *R. sanguineus* s. l. engorged females through the same acaricidal mechanism of its derivate, the scopoletin, and as fipronil, i.e., inducing an increase in the number of Ca^{2+} ions in the intracellular zone/cytoplasm, interfering in the development of oocytes. These events could explain the reduction in oviposition and egg viability observed in the analyses.

Corroborating Souza et al. (2018), who reported the chemical composition of *L. schaueriana* essential oil in the literature, the chromatographic analysis performed in this study showed the major presence of piperitenone oxide (64.36%) and limonene (21.29%), both with

known insecticide activity (OLIVEIRA et al., 2020; TRIPATHI et al., 2004; ZEKRI et al., 2016; KIM; LEE, 2014). Other studies conducted by Zandi-Sohani and Ramezani (2015) identified the piperitenone oxide as the major component of *Mentha pulegium* (“poejo”), attributing to this compound the acaricidal action against the spider mite *T. turkestani*. Nyabayo et al. (2015) analyzing the tickcidal effects of *Salvia nilótica* essential oil on *R. appendiculatus* also reported the presence of piperitenone oxide, although in small amounts. It is known that piperitenone oxide have neurotoxic action against insects, inhibiting acetylcholinesterase (AChE), an important enzyme that modulates the intensity of the synaptic responses through the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (MIYAZAWA et al., 1998). Despite these reports, the mode of action of this compound in ticks has not been thoroughly clarified.

Regarding the biological effects of the *L. schaueriana* EO on the *R. sanguineus* s. l. engorged females, it presented an efficacy of 53.4% and 84.6% at the highest concentrations tested (25 and 50 mg/mL respectively). Similarly to *E. viscosa*, this result was associated with a significant reduction in egg production index. However, in this case, the infertility of the eggs was the major contributing factor for the control percentages, mainly at the concentration of 50 mg/mL, which presented a reduction of 46.4% in the oviposition rate (an index 16.3% lower than the one of *Egletes viscosa* at the same concentration) and of 27.8% in egg hatchability. These results corroborate Oliveira et al. (2020), who reported that the *L. schaueriana* essential oil affected significantly the viability of eggs, larvae and pupae of leafminers (*Liriomyza sativae*).

The same authors reported that *L. sativae* pupae from larvae exposed to *L. schaueriana* oil had a different morphological aspect, presenting dehydration and color alterations (darkening), similarly to the *R. sanguineus* s. l. eggs produced by females exposed to *L. schaueriana* and *Egletes viscosa* EOs in the present study.

One current hypothesis to explain the morphological alterations and the occurrence of disaggregated eggs produced by females exposed to the EOs is that these oils could not only affect the development of the ovaries but also inhibit the synthesis and release of substances by the Genital organ. The latter is formed by a set of tubular exocrine glands found exclusively in female ticks, which performs an essential function by producing and releasing a viscous waterproof substance (wax and lipid secretions) that coat and protect the eggs from dehydration and allows them to be aggregated into a single mass (CAMARGO-MATHIAS, 2018). Corroborating these observations, Matos et al. (2020) reported the occurrence of disaggregated (dispersed) eggs laid by female ticks exposed to thymol, suggesting that this compound, also a

bioactive extracted from plants, would be interfering in the release, synthesis and oxidation of the wax produced by the Gené's organ.

Thus, the present study brings the first report on the tickcid activity of the EOs from *E. viscosa* and *L. schaueriana*, clarifying their effects on the reproductive biology of *R. sanguineus* s. l. females. The promising results described here demonstrate the potential of these oils and their components in the formulation of new efficient and sustainable products to control ticks.

Acknowledgements

We thank the funding agencies FAPESP (Sao Paulo Research Foundation, grants 2019/02831-3, 2019/16397-3), CAPES (*Coordination for the Improvement of Higher Education, funding code 001*) and CNPq (*National Council for Scientific and Technological Development*, productivity scholarship PQ-1A to Dr. M. I. Camargo-Mathias).

Funding

The São Paulo State Research Support Foundation (FAPESP) through a scholarship and technical reserve awarded to the Master student Melissa Carolina Pereira (grant 2019/02831-3) funded this research.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of the present study.

Ethics approval

All the procedures described in this work were approved by the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil under protocol no. 17/2019.

Authors' contributions

MCP and MICM conceived and designed the study. KNCC, KMC and ASQS conducted the essential oils extraction and analyses. MCP, LAA, GGK performed the ticks maintenance, artificial infestations and the adult immersion test. MCP analyzed data. MCP and MICM wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

References

ANHOLETO, L. A. et al. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to

control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017.

ARAÚJO, A. A. S. et al. Antinociceptive activity and toxicological study of aqueous extract of *Egletes viscosa* Less (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 707–715, 2008.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BATISTA, J. M. M. et al. Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of *Egletes viscosa* (L.) Less., a Traditional Medicinal Plant from Northeastern Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 5, p. 818–824, 2012.

BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 61–66, 1995.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus Microplus* (Canestrini) (Acarida : Ixodidae). I. Influence of Tick Size on Egg Production. **Acarologia**, v. 16, n. 1, p. 52–61, 1974.

BORGES, L. M. F. et al. Resistência carrapaticida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, p. 87–95, 2007.

CALOU, I. B. F. et al. Topically applied diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) attenuate the dermal inflammation in mouse ear induced by tetradecanoylphorbol 13-acetate and oxazolone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 8, p. 1511–1516, ago. 2008.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2018.

CASTRO, K. N. C. et al. In vitro efficacy of essential oils with different concentrations of 1,8-cineole against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 27, n. 2, p. 203–210, 2018.

CASTRO, K. N. de C. et al. Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. e0192014, 2016.

COSTA-JÚNIOR, L. M. et al. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 60–64, 2016.

CRUZ, E. M. de O. et al. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1–2, p. 198–202, 2013.

CUNHA, A. N. **Aspectos químicos do estudo multidisciplinar (químico, farmacológico, botânico e agrônômico) de *Egletes viscosa* Less.** Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, 2003.

CUNHA, E. L. R. da et al. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal of Histology and Histopathology**, v. 4, n. 1, p. 9, 2017.

CUNHA, N. C. et al. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105–108, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 1–11, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 9–13, 2015.

DENARDI, S. E. et al. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 379–395, 2004.

DRUMMOND, R. O. et al. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory Tests of Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–133, 1973.

FUJISAKI, K.; KITAOKA, S.; MORII, T. Comparative observations on some bionomics of Japanese ixodid ticks under laboratory cultural conditions. **National Institute of Animal Health quarterly**, v. 16, n. 3, p. 122–8, 1976.

GOMES, G. A. et al. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 111, n. 6, p.

2423–30, 2012.

GOMES, G. A. et al. Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 41–45, 2014.

GUIMARÃES, S. B. et al. Ternatin pretreatment attenuates testicular injury induced by torsion/detorsion in Wistar rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 325–328, 2011.

HIGA, L. de O. S. et al. Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview. **Med chem, an open access journal**, v. 5, n. 7, p. 326–333, 2015.

JAMUNA, S. et al. Confertin and scopoletin from leaf and root extracts of *Hypochoeris radicata* have anti-inflammatory and antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 221–230, 2015.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. S3-14, 2004.

KIM, S. Il; LEE, D. W. Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 1, p. 13–17, 2014.

LAGE, T. C. D. A. et al. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 863–869, 2013.

LEE, D. et al. Diterpene Glycosides from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, v. 71, n. 8, p. 792–794, 2005.

LEW-TABOR, A. E.; RODRIGUEZ VALLE, M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 4, p. 573–585, 2016.

LORENZI, H.; MATTOS, R. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MA, X. et al. Silencing T-type voltage-gated calcium channel gene reduces the sensitivity of *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) to scopoletin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 227, 2020.

- MATOS, R. S. et al. Thymol: Effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 1, 2020.
- MIYAZAWA, M. et al. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Essential Oils of *Mentha* Species. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3431–3434, 1998.
- MOERBECK, L. et al. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 6, p. 1458–1466, 2016.
- NOLAN, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 18, p. 155–166, 1985.
- NYABAYO, C. T.; MATASYOH, J. C.; MWENDIA, C. Chemical composition and acaricidal activity of *Salvia nilotica* essential oil against *Rhipicephalus appendiculatus*. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v. 3, n. 2, p. 46–54, 2015.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Essential oils activity from plants of the Brazilian caatinga on the vegetable leafminer. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 50, 2020.
- OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2459–2465, 2008.
- OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Controlling ticks (methods). In: CAMARGO-MATHIAS, M. I. (Ed.). **Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. 1th. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2018. p. 83–85.
- PEIXOTO, M. G. et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1–2, p. 118–122, 2015.
- PEREIRA, R. de C. A.; BEZERRA, M. A. E.; ALMEIDA, F. das C. S. **Produção de Mudanças de Macela (*Egletes viscosa* (L.) Less.) por Sementes**. Brasília: Livraria Embrapa, 2018.
- PRATS, E. et al. Fungitoxic effect of scopolin and related coumarins on *Sclerotinia sclerotiorum*. A way to overcome sunflower head rot. **Euphytica**, v. 147, n. 3, p. 451–460, 2006.

- RAO, V. et al. Investigations on the Gastroprotective and Antidiarrhoeal Properties of Ternatin, a Tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, v. 63, n. 02, p. 146–149, 1997.
- RAO, V. S. N. et al. Ternatin, an anti-inflammatory flavonoid, inhibits thioglycolate-elicited rat peritoneal neutrophil accumulation and LPS-activated nitric oxide production in murine macrophages. **Planta medica**, v. 69, n. 9, p. 851–3, 2003.
- ROULSTON, W. J.; SCHNITZERLING, H. J.; SCHUNTNER, C. A. Acetylcholinesterase insensitivity in the Biarra strain of the cattle tick *Boophilus microplus*, as a cause of resistance to organophosphorus and carbamate acaricides. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 4, p. 759–767, 1968.
- SAITO, K. C. et al. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3–4, p. 299–311, 2005.
- SILVA, A. B. et al. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 173, p. 30–33, 2017.
- SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. **Constituintes Micromoleculares de Plantas do Nordeste com Potencial Farmacológico - Com Dados de RMN 13C**. Fortaleza: Expressão Gráfica Editora, 2005.
- SOUZA, A. V. de et al. Chemical Composition of Essential Oil of Leaves from *Lippia schaueriana* Mart. Collected in the Caatinga Area. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2480, 2018.
- SOUZA, M. F.; RAO, V. S.; SILVEIRA, E. R. Anti-anaphylactic and anti-inflammatory effects of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 10, p. 1029–32, 1992.
- TRIPATHI, A. K. et al. Piperitenone Oxide as Toxic, Repellent, and Reproduction Retardant Toward Malarial Vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 4, p. 691–698, 2004.
- TRIPATHI, A. K. et al. Insect feeding deterrent and growth inhibitory activities of scopoletin isolated from *Artemisia annua* against *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Science**, v. 18, n. 2, p. 189–194, 2011.

- VIEIRA, G. A. B. et al. Chemical composition of teas from two cultivated chemotypes of *Egletes viscosa* (“Macela-da-terra”). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 43–47, 2006.
- VIEIRA, M. M. et al. Ternatin, a flavonoid, prevents cyclophosphamide and ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 2, p. 135–141, 2004.
- ZANDI-SOHANI, N.; RAMEZANI, L. Evaluation of five essential oils as botanical acaricides against the strawberry spider mite *Tetranychus turkestanii* Ugarov and Nikolskii. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 98, p. 101–106, 2015.
- ZEKRI, N. et al. Insecticidal effect of *Mentha pulegium* L. and *Mentha suaveolens* Ehrh. hydrosols against a pest of citrus, *Toxoptera aurantii* (Aphididae). **Research on Chemical Intermediates**, v. 42, n. 3, p. 1639–1649, 2016.
- ZHOU, H. et al. Silencing Chitinase Genes Increases Susceptibility of *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) to Scopoletin. **BioMed Research International**, v. 7, p. 1–13, 2017.
- ZHOU, H. et al. Acaricidal Mechanism of Scopoletin Against *Tetranychus cinnabarinus*. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. 169, p. 1–17, 2019.

CAPÍTULO 2

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO ÓRGÃO DE GENÉ E OVÁRIO DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Rhipicephalus sanguineus* SENSU LATO EXPOSTAS AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Egletes viscosa* LESS. E *Lippia schaueriana* MART., POTENCIAIS ACARICIDAS NATURAIS²

Resumo

O carrapato-do-cão *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) tem especial destaque por ser vetor de vários patógenos causadores de graves enfermidades que acometem os cães e os outros hospedeiros. Devido aos impactos negativos no ambiente e na saúde animal causados pelo uso de acaricidas sintéticos no controle de infestações de carrapatos, tem se destacado a utilização de acaricidas naturais, baseados em compostos extraídos de plantas, tais como os óleos essenciais (OEs), e estes tem demonstrado serem eficientes em reduzir as taxas de oviposição de várias espécies de carrapatos e afetarem a morfofisiologia dos principais órgãos destes ectoparasitas. No presente estudo buscou-se avaliar a ação de concentrações subletais dos óleos essenciais de duas plantas nativas da América Tropical, *Egletes viscosa* Less. e *Lippia schaueriana* Mart., na morfologia do ovário e do órgão de Gené de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l. Ainda, foi verificada estatisticamente a extensão e a importância dos danos causados pela exposição aos óleos nos órgãos objetos de estudo através de análises semi-quantitativas. Os OEs obtidos via hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa apresentaram como compostos majoritários o acetato de cis-isopinocarveila em *E. viscosa* e o óxido de piperitenona em *L. schaueriana*. A análise morfohistológica do órgão de Gené das fêmeas expostas aos OEs confirmou que este órgão foi severamente afetado pela exposição, especialmente nas concentrações de 25 e 50 mg/mL, com danos tanto nas glândulas tubulares quanto nas acessórias. A morfofisiologia dos ovócitos dos indivíduos aqui analisados também sofreu severas alterações, sendo a exposição ao OE de *L. schaueriana* mais agressiva nos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento (I a III), enquanto que o OE de *E. viscosa* provocou danos aos ovócitos em todos os estágios (I a V), e ambos foram capazes de interferir na dinâmica da vitelogênese. As alterações observadas neste

²Melissa Carolina Pereira; Luis Adriano Anholetto; Marina Rodrigues de Abreu; Karina Neoob de Carvalho Castro, Kirley Marques Canuto, Ana Sheila de Queiroz Souza e Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo científico em preparação.

estudo para o órgão de Gené certamente contribuiriam para a impossibilidade deste órgão de sintetizar e secretar a cera que recobriria externamente os ovos durante a postura, prejudicando a oviposição. Ainda, os danos aqui observados nos ovócitos e nos grânulos de vitelo também afetariam a oviposição e a viabilidade dos ovos produzidos pelas fêmeas visto causarem um déficit nutritivo no futuro embrião, dando origem a ovos inférteis e/ou a espécimes inviáveis de sobreviver.

Palavras-chave: macela-da-terra, lipia-da-serra, carrapatos, vitelogênese, oviposição

²**Melissa Carolina Pereira;** Luis Adriano Anholeto; Marina Rodrigues de Abreu; Karina Neoob de Carvalho Castro, Kirley Marques Canuto, Ana Sheila de Queiroz Souza e Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo científico em preparação.

1 INTRODUÇÃO

O carrapato-do-cão, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), é um ácaro pertencente à subordem Ixodida e à família Ixodidae, estando agrupados nesta última os “carrapatos de corpo duro” e que também são consideradas as principais espécies de carrapatos de importância médica-veterinária (NAVA et al., 2012; SONENSHINE; ROE, 2014; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; ORTEGA-MORALES et al., 2019; DANTAS-TORRES et al., 2020).

Em geral, os carrapatos ocupam o 2º lugar no ranking de maiores vetores da natureza (SONENSHINE; ROE, 2014) e *R. sanguineus* s. l. tem especial destaque por ser vetor de vários patógenos causadores de graves enfermidades (TBDs, do inglês “Tick-Borne Diseases”) que acometem não somente seus hospedeiros preferenciais, os cães, mas também outros animais, incluindo o ser humano (DANTAS-TORRES, 2008; CAMARGO-MATHIAS, 2018; DANTAS-TORRES et al., 2020). Segundo Failloux et al. (2015) e Adenubi et al. (2021), os carrapatos tem sido responsáveis por cerca de 22.8% das doenças infecciosas e emergentes no mundo nas últimas duas décadas, estando a principal estratégia de controle das TBDs baseada no controle das espécies vetoras.

Os acaricidas químicos sintéticos, em especial os da classe dos piretróides, são os mais utilizados e comercializados no mundo para controlar infestações de carrapatos (CAMARGO-MATHIAS, 2018; QUADROS et al., 2020; LUNS et al., 2021). Entretanto, o crescente impacto negativo que os resíduos químicos deixam no ambiente pela utilização de acaricidas sintéticos, bem como a resistência adquirida pelos carrapatos a estes químicos e os numerosos relatos da toxicidade destes em organismos não-alvo (VAN WYK; BARON; MARITZ-OLIVIER, 2016; CUNHA et al., 2017; GODARA et al., 2019; KUMAR; SHARMA; GHOSH, 2020; SAKA; TADA, 2021) tem estimulado a busca de outras estratégias de controle, tais como a utilização de substâncias e/ou moléculas orgânicas extraídas de plantas (ANHOLETO et al., 2017; CAMARGO-MATHIAS, 2018).

Segundo Quadros et al. (2020), são conhecidas cerca de 200 espécies de plantas cujos bioativos nelas presentes tem potencial acaricida e repelente, sendo os extratos, os óleos essenciais (OEs) e os aleloquímicos os mais estudados. Dentre estes, diversos estudos tem demonstrado em laboratório que os OEs testados em diferentes concentrações agem alterando as taxas de mortalidade e de oviposição de várias espécies de carrapatos (MADZIMURE et al., 2011; GOMES et al., 2012; LAGE et al., 2013; COSTA-JÚNIOR et al., 2016; CASTRO et al., 2018; SILVA LIMA et al., 2018).

Os óleos essenciais extraídos das plantas *Egletes viscosa* Less. (Asteraceae) e *Lippia schaueriana* Mart. (Verbenaceae) mostraram-se efetivos, segundo dados da literatura específica por conter em suas composições químicas, bioativos com potencial farmacológico, agindo como: antiparasitários, antimicrobianos, gastroprotetores e antiinflamatórios (RAO et al., 1997, 2003; PASCUAL et al., 2001; TRIPATHI et al., 2004; VIEIRA et al., 2004, 2006; LEE et al., 2005; ARAÚJO et al., 2008; SOUZA et al., 2018). Ainda, há relatos de ações inseticida e acaricida diretamente relacionados a estes óleos e/ou a seus componentes majoritários (TRIPATHI et al., 2011; ZHOU et al., 2019; MA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020).

Apesar de estudos já terem comprovado que os óleos essenciais e seus bioativos podem ser uma perspectiva futura para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de carrapatos, grande parte destes estudos enfocaram apenas nos efeitos destes sobre o desenvolvimento, reprodução e mortalidade dos carrapatos (NWANADE; YU; LIU, 2020). Entretanto, a ação destes compostos também pode causar intensas alterações na morfofisiologia de órgãos essenciais para a sobrevivência e sucesso biológicos dos carrapatos tais como o ovário, o singânglio, as glândulas salivares, o integumento e o órgão de Gené (ANHOLETO et al., 2018; CAMARGO-MATHIAS, 2018; MATOS et al., 2018, 2020a; LIMA DE SOUZA et al., 2019a; NWANADE; YU; LIU, 2020; KONIG et al., 2021).

O enfoque específico sobre a ação de bioativos vegetais sobre a reprodução dos carrapatos tem revelado a ocorrência de danos principalmente ao sistema reprodutor de machos (testículos e glândulas acessórias) e de fêmeas (morfofisiologia dos ovários) o que poderia sinalizar que esses bioativos poderiam ser uma estratégia promissora no controle de infestação de carrapatos (ANHOLETO et al., 2018; CAMARGO-MATHIAS, 2018; KONIG et al., 2020). Quando analisadas as fêmeas, o ovário destas pode produzir cerca de 3000 a 5000 ovos dependendo da espécie (SONENSHINE; ROE, 2014), representando a geração de um grande número de novos indivíduos. Ressalte-se também que para que esses ovos se desenvolvam com sucesso depois de ovipostos, o órgão de Gené, presente apenas nas fêmeas de carrapatos e responsável pela síntese, oxidação e secreção da cera que envolve e protege os ovos contra choques mecânicos e o dessecação no ambiente (SONENSHINE; ROE, 2014; CAMARGO-MATHIAS, 2018), deve estar íntegro para desempenhar suas funções, e que no entanto, já é sabido ser um órgão que sofre severas alterações quando expostos a bioativos extraídos de plantas (MATOS et al., 2020a).

Assim, considerando a problemática apresentada e, principalmente, que os estudos sobre os efeitos de bioativos com potenciais acaricidas sobre a morfofisiologia de carrapatos são fundamentais para a compreensão de como e onde agem os químicos nestes ectoparasitas, este

trabalho avaliou os efeitos dos OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana* sobre a morfologia do ovário e do órgão de Gené de fêmeas completamente alimentadas (ingurgitadas) do carrapato-do-cão, *R. sanguineus* s.l.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* s. l.

Indivíduos machos e fêmeas em jejum dos carrapatos provenientes de colônias dos laboratórios da “Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology” (BCSTM) instaladas em sala do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de Rio Claro, SP, Brasil, foram mantidos em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) Eletrolab EL 202 em condições controladas ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) para posteriormente serem utilizados na infestação.

Para obtenção das fêmeas de *R. sanguineus* s. l. completamente alimentadas (ingurgitadas), os espécimes foram alimentados em coelhos hospedeiros (Grupo Genético de Botucatu) por meio de infestações artificiais. Os coelhos hospedeiros eram isentos de contato prévio com o ectoparasita e com os óleos essenciais e foram mantidos em gaiolas de contenção em sala alocada no mesmo Biotério com ração e água *ad libitum* durante todo o período de experimentação.

A cada infestação realizada, 50 fêmeas e 50 machos em jejum foram colocados no interior de cada câmara de alimentação posicionada no dorso dos hospedeiros. Oito horas após a liberação dos carrapatos na câmara foi realizada a primeira observação da área de fixação das fêmeas e nos dias subsequentes, foram realizadas observações diárias até o ingurgitamento total e desprendimento dos espécimes no décimo dia.

Os procedimentos de fixação e de construção das câmaras de alimentação, e a infestação e controle dos carrapatos nestas câmaras, foram realizados segundo Bechara et al. (1995) em concordância com a Comissão de Ética no Uso Animal, CEUA-IB-UNESP/Rio Claro- protocolo 17/2019.

2.2. Obtenção e análise dos óleos essenciais (OEs) de *E. viscosa* Less. e *L. schaueriana* Mart.

Capítulos florais secos de *E. viscosa* foram adquiridos em um supermercado na cidade de Fortaleza (Ceará, Brasil) em março/2016 e a obtenção e análise deste óleo foram realizadas na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, Ceará. Para a extração de OE, 300g de capítulos florais foram misturados a 1,5L de água destilada em um balão de fundo redondo (3L) e submetido a hidrodestilação por 4h, usando aparelho tipo Clevenger. Em seguida, o óleo essencial ($R = 1,2\%$, v/m) foi recolhido e centrifugado (2000 RPM; 10 min), seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em frasco âmbar a -20°C para

posterior análise por Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM) (cromatógrafo CG-EM Agilent 5977A) e detecção por ionização em chama (CG-DIC) (Shimadzu modelo CG-2010 Plus).

L. schaueriana foi coletada em março de 2015 (8°22'58.2"S, 42°18'31.4"W) em São João do Piauí, Piauí. Uma amostra de referência das espécimes coletadas foi depositada no herbário Leopoldo Krieger (CESJ) da Universidade Federal de Juiz de Fora sob registro nº 67.395. A etapa de extração do óleo essencial foi realizada na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Meio-Norte, in Parnaíba, Piauí, onde aproximadamente 2 kg de folhas frescas de *L. schaueriana* foram misturadas a 3 L de água e submetido a hidrodestilação por 3h, utilizando aparelho Clevenger. O OE (R= 1,2 %, v/m) foi recolhido e centrifugado (2000 RPM; 10 min), seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em frasco âmbar a – 20 °C para posterior análise por Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM) (cromatógrafo CG-EM Agilent 5977A) e detecção por ionização em chama (CG-DIC) (Shimadzu modelo CG-2010 Plus) na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Agroindústria Tropical, in Fortaleza, Ceará.

2.3. Exposição das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l. aos OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana*

Para a realização dos experimentos utilizou-se o protocolo de imersão de fêmeas proposto por Drummond et al. (1973). Antes do início dos testes, as fêmeas completamente ingurgitadas foram separadas em 8 grupos experimentais (10 espécimes para cada concentração, totalizando 80 fêmeas ingurgitadas) com peso homogêneo garantido após pesagem de cada grupo em balança analítica, higienizadas com água corrente, em peneira, e secas com papel absorvente macio.

Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

Grupo controle 1 (C1): fêmeas ingurgitadas expostas somente à água destilada;

Grupo controle 2 (C2): fêmeas expostas ao solvente dos óleos, etanol 50% (etanol e água, v/v).

Grupos tratamento (T1-T6): fêmeas expostas às diferentes concentrações dos óleos essenciais, 12.5 mg/mL do OE de *E. viscosa* (T1), 25 mg/mL do OE de *E. viscosa* (T2), 50 mg/mL do OE de *E. viscosa* (T3), , 12.5 mg/mL do OE de *L. schaueriana* (T4), 25 mg/mL do OE de *L. schaueriana* (T5) e 50 mg/mL do OE de *L. schaueriana* (T6).

As fêmeas completamente ingurgitadas foram submetidas ao teste de imersão nas diferentes concentrações dos OEs (12.5, 25 e 50 mg/mL de cada óleo) e em água destilada e

etanol 50% por 5 minutos. Após imersão, as fêmeas foram secas em papel absorvente, e colocadas em estufa BOD, sob condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas) em placas de Petri identificadas onde permaneceram em observação durante 5 dias, visto que a maioria dos efeitos dos acaricidas não são imediatos e as alterações morfológicas geralmente aparecem após esse período.

2.4. Análise morfohistológica

Após 5 dias, as fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l. foram dissecadas em solução salina (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L e KH₂PO₄ 2.72 g/L) para a remoção do seu escudo dorsal e exposição dos órgãos, e tiveram os ovários e órgãos de Gené recolhidos e fixados em paraformaldeído 4%. Após 7 dias em fixador, as amostras foram transferidas para solução tampão fosfato onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratadas em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 15 minutos cada), embebidos em historesina Leica® por 7 dias e incluídos em moldes plásticos que continham resina e polimerizador, onde permaneceram por mais 7 dias. Após esse período, os blocos de resina foram seccionados em micrótomo LEICA RM 2255, com secções de 3 µm de espessura, os quais foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As lâminas contendo as secções foram coradas pela hematoxilina de Harris durante 10 minutos. Depois de lavadas também por cinco minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa, por cinco minutos, e novamente lavadas em água corrente. Após secagem ao ar livre, as lâminas foram montadas em Entellan®, cobertas por lamínula (preparação permanente) e examinadas e fotografadas em microscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

2.5. Análise semi-quantitativa

A análise semi-quantitativa das alterações morfológicas encontradas no presente estudo foi realizada conforme estabelecido por Marinho et al. (2014) e König et al. (2019), e permitiu verificar estatisticamente a extensão e importância dos danos causados pela exposição aos óleos. Para esta etapa foram analisadas 3 lâminas do órgão de Gené e 3 do ovário (6 secções/lâmina) de cada indivíduo, totalizando 80 indivíduos e 180 lâminas/órgão. Um fator de importância (ω) variando de 1 a 3 foi determinado para cada alteração observada nas análises, baseado na sua relevância para a integridade dos ovócitos e das células/estruturas do órgão de Gené: (1) importância mínima, quando a alteração poderia ser facilmente revertida após a interrupção da exposição ao tóxico; (2) importância moderada, quando a alteração poderia ser revertida na maioria dos casos e (3) importância máxima, quando a lesão foi considerada

irreversível. As alterações encontradas nos grupos tratamento também foram classificadas em “scores” (α), variando de 0 a 5, onde 0 representou aspecto semelhante àquele observado nos controles e 5 a presença de alterações morfohistológicas em todas as células/estruturas observadas. O índice total foi calculado pela equação $\text{Index}_{\text{ind}} = \sum(\omega \times \alpha)$ e comparados estatisticamente por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguido do Teste de Tukey ($p < 0.05$), utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.00). Os testes de Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keulls ($p < 0.05$) foi aplicado em distribuições não paramétricas.

3 RESULTADOS

3.1 Composição química dos OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana*

Neste trabalho, a caracterização química dos óleos de *E. viscosa* e *L. schaueriana* identificou 27 e 18 componentes, respectivamente, compreendendo mais de 98% dos constituintes de ambos os óleos. A lista completa de compostos, incluindo os majoritários, encontra-se na **Tabela 1**.

3.2 Órgão de Gené

3.2.1 Grupos Controle

Nas fêmeas de *R. sanguineus* s. l. pertencentes ao Grupo Controle 1 (expostas à água destilada), o órgão de Gené se apresentou com morfologia íntegra, onde foi possível observar que este é composto por: a) **glândulas tubulares**, formadas por um epitélio simples colunar, apoiado numa membrana basal e composto de células cilíndricas (**Fig. 1A**). As células apresentaram um citoplasma com afinidade pelo corante eosina (acidófilo) e algumas regiões não foram coradas, o que pode indicar a presença de gotículas de lipídio ou de grânulos de polissacarídeos. Os núcleos dessas células acompanharam a morfologia das mesmas, ou seja, ovais com nucléolos evidentes, fortemente corados pela hematoxilina (basófilos) e localizados na região basal da célula (**Fig 1A**); b) **glândulas acessórias**, compostas por ácinos com lúmen individual, formado a partir de canaliculos intra e extracelulares que irão transportar a secreção sintetizada pelos ácinos até o ducto intercalar, para que esta seja liberada pelas glândulas (**Fig. 1B**). As células acinares apresentaram núcleos ovais basófilos com nucléolos evidentes, e citoplasma fortemente corado pela eosina (**Fig. 1B**).

No Grupo Controle 2 (fêmeas expostas ao etanol 50%), as estruturas que formam o órgão apresentaram uma morfologia também preservada, com as mesmas características descritas para o Grupo Controle 1 (**Fig. 1C-D**).

3.2.2 Exposição ao OE de *Egletes viscosa* (Grupos Tratamento 1-3)

A análise morfológica das amostras do órgão de Gené pertencentes as fêmeas expostas as diferentes concentrações do OE de *E. viscosa* revelou que este óleo foi capaz de causar alterações na morfofisiologia das glândulas tubulares e das glândulas acessórias, de maneira dose-dependente. Entretanto, conforme a análise semi-quantitativa demonstrou, apenas as alterações encontradas nas exposições às concentrações de 25 e 50 mg/mL foram estatisticamente significativas em relação aos controles (**Tabela 2**).

No Grupo Tratamento 1 (12.5 mg/mL *E. viscosa*), as células das glândulas tubulares mantiveram a maioria das características observadas nos Grupos Controle, com exceção da região basal próxima à membrana basal que apresentou partes vacuolizadas ao longo de todo o epitélio (**Fig. 1E**). As glândulas acessórias apresentaram o citoplasma das células acinares com marcação menos evidente da eosina em contraste à coloração fortemente acidófila dos controles (**Fig. 1F**).

No Grupo Tratamento 2 (25 mg/mL *E. viscosa*), o epitélio das glândulas tubulares já apresentou maiores alterações. A membrana basal mostrou pontos de rompimento e deformações e algumas células epiteliais perderam o limite celular, levando consequentemente a perda de seu formato cilíndrico, e ainda, apresentaram muitos vacúolos citoplasmáticos (**Fig. 1G**). Nas células acinares das glândulas acessórias, os núcleos apresentam início de cariorrexe, ou seja, um acúmulo irregular da cromatina e em alguns deles foi possível observar a formação de pequenos “grumos” cromatínicos, bem como a perda dos limites nucleares (**Fig. 1H**).

O Grupo Tratamento 3 (50 mg/mL *E. viscosa*) revelou as maiores alterações, mostrando o epitélio das glândulas tubulares totalmente irregular, com células severamente deformadas devido à perda dos limites celulares (**Fig. 1I**). O citoplasma destas células também apresentou marcação fraca para eosina e muitas regiões não coradas, com presença de muitos vacúolos (**Fig. 1I**). A membrana basal também mostrou-se irregular e rompida ao longo da extensão do epitélio (**Fig. 1I**). Nas glândulas acessórias, os núcleos das células acinares em cariorrexe se apresentaram hipertrofiados e irregulares, provavelmente devido à perda dos limites nucleares, e cromatina extremamente condensada (**Fig. 1J**). Ainda, o citoplasma das células também se mostrou vacuolizado (**Fig. 1J**).

3.2.3 Exposição ao OE de *Lippia schaueriana* (Grupos Tratamento 4-6)

Semelhante ao observado para os Grupos Tratamentos expostos ao OE de *E. viscosa*, o órgão de Gené das fêmeas dos grupos expostos ao OE de *L. schaueriana* apresentaram alterações morfológicas que aumentaram de intensidade conforme o aumento da concentração

do OE (dose-dependente). Na análise semi-quantitativa foi possível observar que apenas as concentrações de 25 e 50 mg/mL foram capazes de causar danos significativos ao órgão (**Tabela 2**).

No Grupo Tratamento 4 (12.5 mg/mL *L. schaueriana*), as glândulas tubulares apresentaram morfologia íntegra, com núcleos das células epiteliais e limites celulares preservados, entretanto algumas das células apresentaram pequenos vacúolos na região basal próximo a membrana basal e também na região apical voltada para o lúmen (**Fig. 1K**). Semelhante ao observado no Grupo Tratamento 1 (12.5 mg/mL *L. schaueriana*), as células dos ácinos das glândulas acessórias apresentaram marcação fraca para eosina (**Fig. 1L**).

No Grupo Tratamento 5 (25 mg/mL *L. schaueriana*), o epitélio das glândulas tubulares apresentou células com forma alterada, provavelmente devido à perda de limites celulares, além de vacuolização citoplasmática principalmente na região apical e presença de núcleos também irregulares (**Fig. 1M**). Nas glândulas acessórias, muitos ácinos apresentaram células com citoplasma vacuolizado e com rompimento dos limites celulares (lise) (**Fig. 1N**). Ainda, os núcleos das células acinares se mostraram hipertrofiados e em avançado estágio de cariorrexe (**Fig. 1N**).

No Grupo Tratamento 6 (50 mg/mL *L. schaueriana*), tanto as glândulas tubulares quanto as acessórias apresentaram muitas alterações na forma com consequente perda da morfologia original, levando à total desorganização do órgão (**Fig. 1O-P**). O epitélio das glândulas tubulares perdeu a conformação original, não sendo possível classificá-lo mais como simples colunar (**Fig. 1O**). A maioria das células epiteliais tiveram seus limites celulares rompidos invadindo o lúmen glandular, e ainda, muitos núcleos apresentaram forma irregular (**Fig. 1O**). A membrana basal apresentou muitos rompimentos e dobramentos ao longo da sua extensão (**Fig. 1O**). Nas glândulas acessórias, as células acinares apresentaram muitas vacuolizações citoplasmáticas e rompimento de limites celulares (**Fig. 1P**). Os núcleos apresentaram-se hipertrofiados e com cromatina extremamente condensada (**Fig. 1P**).

Tabela 1: Composição química dos óleos de *Egletes viscosa* Less. e *Lippia schaueriana* Mart.

Componentes	RI ^a	RI _{lit} ^b	GC-MS(%)	
			<i>E. viscosa</i>	<i>L. schaueriana</i>
α -Tujeno	928	928	0.16	—
α -Pineno	937	936	0.39	0.38
Sabineno	976	973	0.49	0.04
β -Pineno	981	978	4.86	—
Mirceno	992	989	0.23	0.71
α -Terpineno	1019	1017	0.15	—
p-Cimeno	1026	1024	0.10	0.71
Limoneno	1030	1030	1.25	21.29
<i>trans</i> - β -ocimeno	1054	1050	—	0,78
γ -Terpineno	1059	1060	0.28	0.28
1-Terpineol	1137	1136	0.35	—
<i>trans</i> -Pinocarveol	1141	1140	0.30	—
<i>cis</i> -p-mentha-2,8-dien-1-ol	1145	1137	—	0.60
<i>cis</i> -Crisantenol	1162	1164	0.08	—
Terpinen-4-ol	1179	1177	0.40	—
α -Terpineol	1192	1190	0.33	—
Mirtenol	1198	1194	0.16	—
Metil chavicol	1206	1196	—	0.54
<i>trans</i> -Carveol	1212	1217	2.15	—
Coahuilensol, methyl ether	1226	1221	—	0.55
Car-3-en-2-one	1244	1248	0.15	—
Acetato de linalol	1251	1255	0.09	—
Carvona	1255	1243	—	0.35
Acetato de <i>cis</i> -Crisantenila	1262	1262	5.48	—
Timol	1298	1290	—	1.64
Acetato de <i>trans</i>-pinocarveila	1302	1298	11.49	—
Acetato de <i>cis</i>-isopinocarveila	1312	1305	67.72	—
Acetato de Mirtenila	1327	1329	1.31	—
Acetato de <i>trans</i> -carvila	1345	1338	—	0.34
Piperitenona	1355	1343	—	2.83
Linalol isobutanoato	1371	1375	0.79	—
Óxido de piperitenona	1383	1368	—	64,36
Propanoato de isobornila	1383	1384	0.18	—
Acetato de <i>trans</i> -Mirtanol	1386	1386	0.31	—
4a β ,7a α ,7a β -Nepetalactone	1414	—	—	3,30
E-Cariofileno	1422	1420	0.35	—
Biciclogermacreno	1510	1500	—	0,36
Óxido de cariofileno	1585	1581	0.08	—
Espatulanol	1593	1578	—	0,90
Total			99.63	99.96

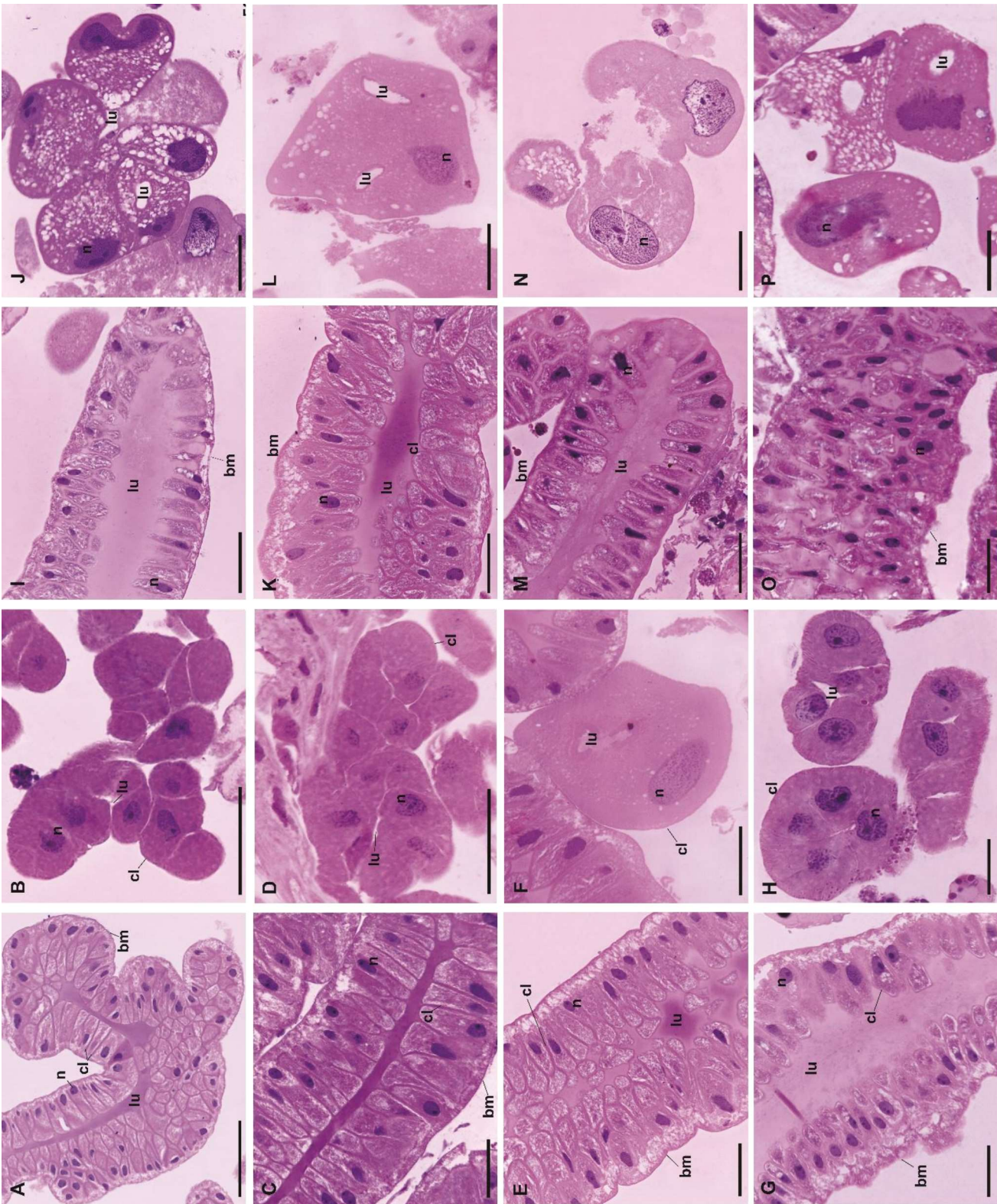
^a: Índice de Retenção (RI) obtido em coluna HP-5 MS; ^b: Dados da literatura (RI_{lit}) (ADAMS, 2017; BABUSHOK; LINSTROM; ZENKEVICH, 2011; CRAVEIRO et al. 1992; CUNHA, 2003). (—) Não identificado.

Tabela 2: Frequência da ocorrência de alterações morfológicas no órgão de Gené das fêmeas de *R. sanguineus* s. l. expostas aos óleos essenciais de *E. viscosa* e *L. schaueriana*. Valores representam as médias $\pm$ DP para cada grupo analisado (controle e tratamentos). (*) $p < 0.05$ em comparação aos controles 1 e 2.

Alterações morfológicas		(ω)	Controle 1	Controle 2	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5	Tratamento 6
Glândulas tubulares	Rompimentos e irregularidades na membrana basal	1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.60 $\pm$ 0.89	1.40 $\pm$ 0.54*	3.40 $\pm$ 0.54*	0.80 $\pm$ 0.83	1.40 $\pm$ 0.54*	4.00 $\pm$ 0.70*
	Vacuolização citoplasmática	1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.40 $\pm$ 0.54	1.60 $\pm$ 0.54*	4.20 $\pm$ 0.83*	0.40 $\pm$ 0.54	2.20 $\pm$ 0.83*	4.20 $\pm$ 0.83*
	Desorganização do epitélio	2	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.40 $\pm$ 0.89	2.40 $\pm$ 2.19*	7.60 $\pm$ 1.67*	0.80 $\pm$ 1.09	4.00 $\pm$ 1.41*	10.0 $\pm$ 0.00*
	Perda da integridade e limite celular	3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.60 $\pm$ 1.34	4.20 $\pm$ 1.64*	13.80 $\pm$ 1.64*	1.80 $\pm$ 2.68	4.60 $\pm$ 1.94*	13.20 $\pm$ 2.68*
	Núcleos irregulares	3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	1.80 $\pm$ 1.64	6.00 $\pm$ 3.00*	12.60 $\pm$ 2.51*	1.40 $\pm$ 1.51	9.00 $\pm$ 0.00*	13.20 $\pm$ 1.64*
Glândulas acessórias	Vacuolização citoplasmática	1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.40 $\pm$ 0.54	1.80 $\pm$ 0.44*	4.60 $\pm$ 0.54*	0.80 $\pm$ 0.83	2.20 $\pm$ 0.44*	4.20 $\pm$ 0.83*
	Condensação da cromatina	2	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.40 $\pm$ 0.89	2.40 $\pm$ 1.67*	10.00 $\pm$ 0.00*	0.80 $\pm$ 1.78	4.60 $\pm$ 1.34*	10.00 $\pm$ 0.00*
	Hipertrofia nuclear	3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	1.20 $\pm$ 1.64	6.60 $\pm$ 2.51*	14.40 $\pm$ 1.34*	0.60 $\pm$ 1.34	7.80 $\pm$ 1.64*	14.40 $\pm$ 1.34*
	Cariorrexe e perda do limite nuclear	3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	6.00 $\pm$ 3.00*	13.80 $\pm$ 1.64*	0.00 $\pm$ 0.00	7.80 $\pm$ 1.64*	15.00 $\pm$ 0.00*
	Perda da integridade e limite celular	3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	1.20 $\pm$ 1.64	6.00 $\pm$ 3.00*	12.00 $\pm$ 2.12*	1.20 $\pm$ 1.64	7.80 $\pm$ 1.64*	13.80 $\pm$ 1.64*

(ω): fator de importância; **Controle 1:** água destilada; **Controle 2:** etanol 50%; **Tratamento 1:** 12.5 mg/mL *E. viscosa*; **Tratamento 2:** 25 mg/mL *E. viscosa*; **Tratamento 3:** 50 mg/mL *E. viscosa*; **Tratamento 4:** 12.5 mg/mL *L. schaueriana*; **Tratamento 5:** 25 mg/mL *L. schaueriana*; **Tratamento 6:** 50 mg/mL *L. schaueriana*.

Figura 1: Secções histológicas do órgão de Gené de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* s. l. pertencentes aos Grupos Controle 1-2 e Grupos Tratamento 1-6 (expostas as diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Egletes viscosa* e *Lippia schaueriana*). Coloração pela HE. **A-B:** Controle 1 (água destilada). **C-D:** Controle 2 (etanol 50%). **E-F:** Grupo Tratamento 1 (12.5 mg/mL *E. viscosa*). **G-H:** Grupo Tratamento 2 (25 mg/mL *E. viscosa*). **I-J:** Grupo Tratamento 3 (50 mg/mL *E. viscosa*). **K-L:** Grupo Tratamento 4 (12.5 mg/mL *L. schaueriana*). **M-N:** Grupo Tratamento 5 (25 mg/mL *L. schaueriana*). **O-P:** Grupo Tratamento 6 (50 mg/mL *L. schaueriana*). **bm:** membrana basal; **cl:** limite celular; **lu:** lúmen glandular; **n:** núcleo. **Barras:** (A, C, E, G, H, I, K, M, N): 50 µm; (B, D, F, H, J, L, N, P): 20 µm.



3.3 Ovário

3.3.1 Grupos Controle

Os resultados mostraram que o ovário das fêmeas de *R. sanguineus* s. l. dos Grupos Controle 1 (água destilada) e 2 (etanol 50%) apresentaram morfologia preservada, como esperado para o órgão em condições normais. Em ambos os grupos as seguintes características foram observadas: **a)** ovócitos I, pequenos, com formato elíptico, com vesícula germinal ocupando a maior parte da célula, um nucléolo evidente e citoplasma homogêneo sem granulações (**Fig. 2A1-B1**); **b)** ovócitos II, ligeiramente maiores que os ovócitos I, com formato elíptico, citoplasma homogêneo e com granulação fina (pequenos grânulos) e vesícula germinal central (**Fig. 2A2-B2**); **c)** ovócitos III, arredondados e maiores que os anteriores, contendo citoplasma com granulações mais evidentes e vesícula germinativa localizada no polo da célula, próximo a região do pedicelo (**Fig. 2A3-B3**); foi possível observar o início da deposição do cório (**Fig. 2A3-B3**); **d)** ovócitos IV, arredondados e maiores que os III, com grande quantidade de grânulos de vitelo de variados tamanhos e homogeneamente distribuídos pelo citoplasma; neste estágio, já foi possível observar os estágios finais de deposição do cório (**Fig. 2A4-B4**); e **e)** ovócitos V, arredondado e maior que todos os outros estágios, com citoplasma completamente preenchido por grandes grânulos de vitelo, não sendo mais possível a visualização da vesícula germinal (**Fig. 2A5-B5**); o cório já está completamente depositado.

3.3.2 Exposição ao OE de *Egletes viscosa* (Grupos Tratamento 1-3)

No Grupo Tratamento 1 (12.5 mg/mL *E. viscosa*) foi possível observar alterações nos ovócitos I (**Fig. 2C1**); II (**Fig. 2C2**) e III (**Fig. 2C3**) que perderam a forma elíptica/arredondada passando a ter morfologia irregular e ainda, com a presença de vacuolização citoplasmática. Os ovócitos IV apresentaram grânulos de vitelo irregularmente distribuídos, com os grânulos menores concentrados na região central e os maiores localizados na periferia da célula (**Fig. 2C4**). Nos ovócitos V, houve ruptura dos grânulos de vitelo e formação de espaços entre eles. Foram observadas regiões do cório se descolando da membrana citoplasmática (**Fig. 2C5**). Na análise semi-quantitativa todas as alterações observadas neste grupo foram estatisticamente significativas ($p < 0.05$) em relação aos controles (**Tabela 3**).

No Grupo Tratamento 2 (25 mg/mL *E. viscosa*), semelhante ao observado no grupo anterior, os ovócitos I (**Fig. 2D1**), II (**Fig. 2D2**) e III (**Fig. 2D3**) apresentaram forma irregular e presença de vacúolos na região do citoplasma próximo à vesícula germinal. Os ovócitos IV

apresentaram cório irregular, levando a perda do formato original da célula (**Fig. 2D4**); a distribuição dos grânulos de vitelo não foi homogênea (**Fig. 2D4**), assim como observado no Grupo Tratamento 1. Nos ovócitos V, o cório apresentou muitas irregularidades e desprendimento da membrana citoplasmática (**Fig. 2D5**). Os grânulos de vitelo sofreram rompimento e entre os mesmos foi possível observar a presença de vacúolos (**Fig. 2D5**). As alterações observadas aqui foram significativas ($p < 0.05$) em relação aos controles (**Tabela 3**).

O Grupo Tratamento 3 (50 mg/mL *E. viscosa*) foi o que apresentou ovócitos com as maiores alterações morfológicas em todos os estágios e todas significativas em relação aos controles ($p < 0.05$) (**Tabela 3**). Nos ovócitos I além da total perda da forma original não foi possível observar a vesícula germinal (**Fig. 2E1**). O citoplasma destes esteve fortemente corado pela HE, sugerindo alteração no seu conteúdo (**Fig. 2E1**). Os ovócitos II (**Fig. 2E2**) e III (**Fig. 2E3**) apresentaram-se irregulares na forma e com grandes vacúolos citoplasmáticos. Nos ovócitos IV foi possível observar a diminuição na quantidade e no tamanho dos grânulos de vitelo e a formação de grandes vacúolos no citoplasma (**Fig. 2E4**). O cório dos ovócitos V além de completamente descolado da célula apresentou-se dobrado e muitas vezes rompido (**Fig. 2E5**). Os grânulos de vitelo dos ovócitos V também apresentaram ruptura e tamanho reduzido (**Fig. 2E5**).

3.3.3 Exposição ao OE de *Lippia schaueriana* (Grupos Tratamento 4-6)

Nos Grupo Tratamento 4 (12.5 mg/mL *L. schaueriana*) foi possível observar as mesmas alterações já descritas para grupos tratamento anteriores, em que houve perda do formato original dos ovócitos I (**Fig. 2F1**), II (**Fig. 2F2**) e III (**Fig. 2F3**) e a presença de vacuolização citoplasmática próxima a vesícula germinal. Os ovócitos IV apresentaram alteração na distribuição dos grânulos de vitelo, visto que houve concentração dos grânulos menores na região central da célula e dos maiores na periferia (**Fig. 2F4**). Os ovócitos V permaneceram com morfologia preservada (**Fig. 2F5**). Todas as alterações observadas neste grupo foram significativas em relação aos controles ($p < 0.05$) (**Tabela 3**).

Os ovócitos do Grupo Tratamento 5 (25 mg/mL *L. schaueriana*) apresentaram as mesmas modificações observadas no Grupo Tratamento 4, sendo que estas também foram significativas ($p < 0.05$) em relação aos controles (**Tabela 3**), entretanto, neste grupo ficou evidente a diminuição na intensidade da coloração pela HE em todos os ovócitos (**Fig. 2G1-5**), especialmente naqueles em estágios iniciais (I a III), sugerindo que tenham sofrido alteração na composição do vitelo.

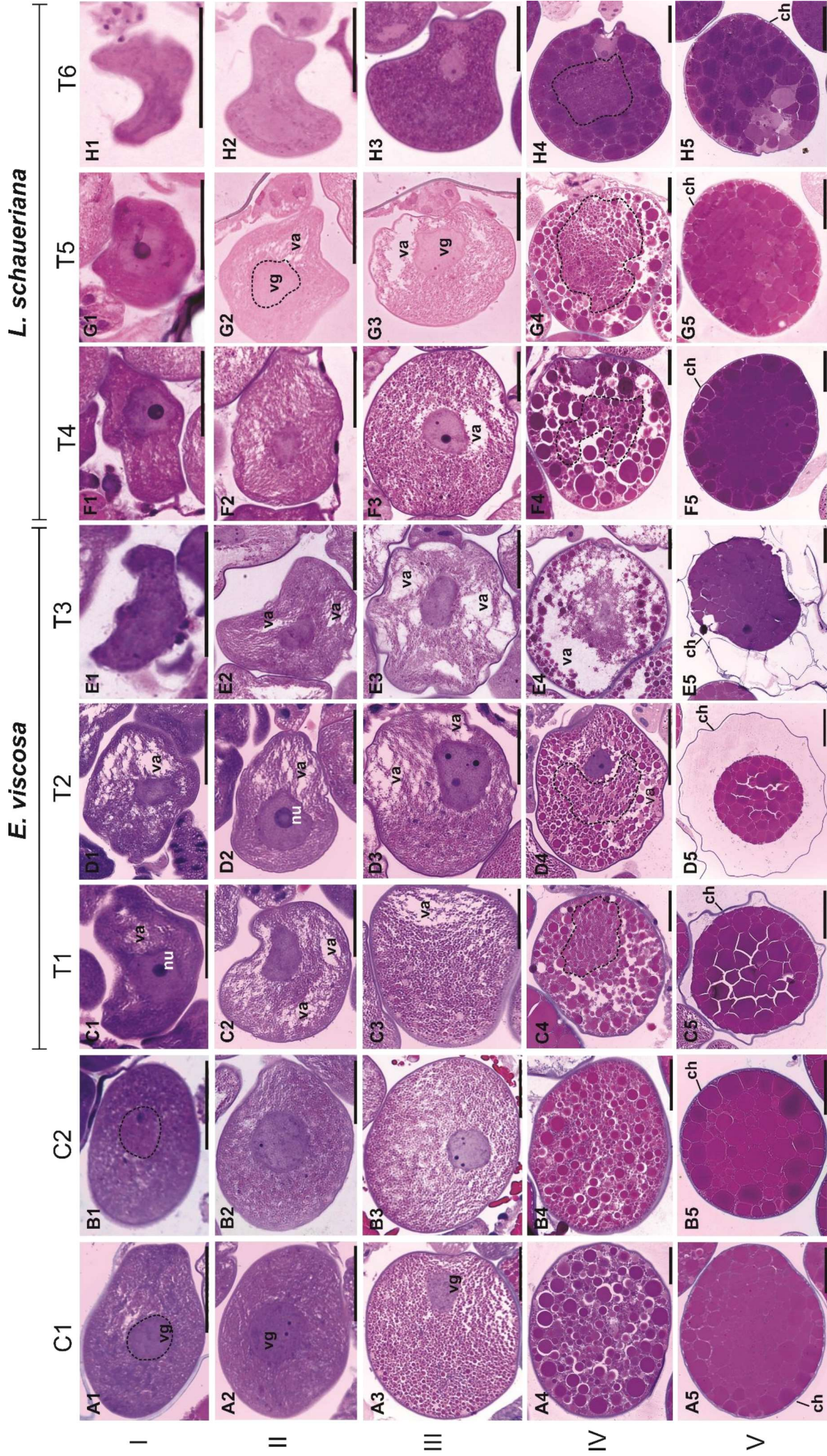
O Grupo Tratamento 6 (50 mg/mL *L. schaueriana*) apresentou severas alterações na morfologia dos ovócitos, especialmente nos estágios I a III. Os ovócitos I (**Fig. 2H1**) e II (**Fig. 2H2**) perderam completamente a forma original e não foi possível visualizar a vesícula germinal. Nos ovócitos III, o citoplasma foi intensamente corado pela HE, assim como a granulação vitelogênica, o que dificultou individualizar os grânulos de vitelo, sugerindo que estes ovócitos tenham também sofrido alteração na sua composição citoplasmática (**Fig. 2H3**). Os ovócitos IV foram fortemente corados e em sua região central observou-se fusão de grânulos menores de vitelo, formando uma grande massa (**Fig. 2H4**). Nos ovócitos V, o cório apresentou-se dobrado com poucas irregularidades e houve ruptura dos grânulos de vitelo (**Fig. 2H5**). A análise semi-quantitativa confirmou que as alterações morfológicas observadas neste tratamento foram significativas em relação aos controles ($p < 0.05$) (**Tabela 3**).

Tabela 3: Frequência da ocorrência de alterações morfológicas no ovário das fêmeas de *R. sanguineus* s. l. expostas aos óleos essenciais de *E. viscosa* e *L. schaueriana*. Valores representam as médias $\pm$ DP para cada grupo analisado (controle e tratamentos). (*) $p < 0.05$ em comparação aos controles 1 e 2.

Alterações morfológicas	(ω)	Controle 1	Controle 2	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5	Tratamento 6
Irregularidades no cório (desprendimento/dobramentos/ ruptura)	2	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	3.60 $\pm$ 0.89*	5.20 $\pm$ 1.09*	8.80 $\pm$ 1.09*	0.00 $\pm$ 0.00	1.20 $\pm$ 1.09	4.40 $\pm$ 0.89*
	3	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	4.20 $\pm$ 1.64*	7.80 $\pm$ 1.64*	14.40 $\pm$ 1.34*	4.20 $\pm$ 1.64*	4.80 $\pm$ 2.68*	12.0 $\pm$ 2.12*
Alteração no tamanho dos ovócitos	2	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	2.40 $\pm$ 0.89*	5.60 $\pm$ 0.89*	8.00 $\pm$ 1.41*	2.80 $\pm$ 1.09*	4.40 $\pm$ 1.67*	8.40 $\pm$ 1.67*
Vacuolização citoplasmática	1	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	1.40 $\pm$ 0.54*	2.60 $\pm$ 0.54*	4.40 $\pm$ 0.54*	1.40 $\pm$ 0.54*	2.40 $\pm$ 0.54*	0.80 $\pm$ 0.44
Distribuição irregular e diminuição dos grânulos de vitelo	2	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	1.20 $\pm$ 1.09	5.60 $\pm$ 0.89*	9.20 $\pm$ 1.09*	2.80 $\pm$ 1.09*	4.80 $\pm$ 1.09*	8.40 $\pm$ 1.67*
Ruptura e/ou fusão dos grânulos de vitelo	3	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	4.80 $\pm$ 1.64*	8.40 $\pm$ 1.34*	13.80 $\pm$ 1.64*	1.20 $\pm$ 1.64	7.20 $\pm$ 1.64*	12.30 $\pm$ 2.51*

(ω): fator de importância; **Controle 1:** água destilada; **Controle 2:** etanol 50%; **Tratamento 1:** 12.5 mg/mL *E. viscosa*; **Tratamento 2:** 25 mg/mL *E. viscosa*; **Tratamento 3:** 50 mg/mL *E. viscosa*; **Tratamento 4:** 12.5 mg/mL *L. schaueriana*; **Tratamento 5:** 25 mg/mL *L. schaueriana*; **Tratamento 6:** 50 mg/mL *L. schaueriana*.

Figura 2: Secções histológicas dos ovários de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* s. l. pertencentes aos Grupos Controle 1-2 e Grupos Tratamento 1-6 (expostas as diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Egletes viscosa* e *Lippia schaueriana*). Coloração por HE. **A1-A5:** Controle 1 (água destilada). **B1-B5:** Controle 2 (etanol 50%). **C1-C5:** Grupo Tratamento 1 (12.5 mg/mL *E. viscosa*). **D1-D5:** Grupo Tratamento 2 (25 mg/mL *E. viscosa*). **E1-E5:** Grupo Tratamento 3 (50 mg/mL *E. viscosa*). **F1-F5:** Grupo Tratamento 4 (12.5 mg/mL *L. schaueriana*). **G1-G5:** Grupo Tratamento 5 (25 mg/mL *L. schaueriana*). **H1-H5:** Grupo Tratamento 6 (50 mg/mL *L. schaueriana*). **ch:** cório; **nu:** nucléolo; **va:** vacuolização; **vg:** vesícula germinal; **linha tracejada (ovócitos IV):** distribuição irregular e/ou fusão dos grânulos de vitelo. **Barras:** 50 µm.



4 DISCUSSÃO

A caracterização química dos óleos essenciais das plantas *Egletes viscosa* Less. (macela-da-terra) e a *Lippia schaueriana* Mart. (lipia-da-serra) mostrou como componentes majoritários o acetato de cis-isopinocarveila e o óxido de piperitenona respectivamente, dados que corroboraram aqueles já reportados na literatura por Vieira et al. (2006) e Batista et al. (2012) para *E. viscosa* (quimiotipo B) e Souza et al. (2018) para *L. schaueriana*. Ainda, os dados morfológicos obtidos no presente trabalho trouxeram as primeiras informações que assinalam o efeito deletério dos óleos essenciais da macela-da-terra e da lipia-da-serra sobre a morfologia do ovário e do órgão de Gené de fêmeas ingurgitadas do carrapato-do-cão *R. sanguineus* s. l.

Ressalte-se que dentre os Arthropoda as fêmeas dos carrapatos são as únicas a possuírem o órgão de Gené, o qual tem grande importância para a sobrevivência, reprodução e sucesso biológico dos carrapatos, visto o mesmo ser responsável principalmente pela síntese e liberação de secreções lipídicas/polissacarídicas no momento da postura, que irão recobrir os ovos externamente e a eles conferir proteção contra as adversidades do meio ambiente (CAMARGO-MATHIAS, 2018).

Apesar de sua relevância, poucos são os estudos que trazem dados sobre a morfologia e organização histológica do órgão de Gené nas diferentes espécies de carrapatos, e em especial, pouco ainda se sabe sobre os efeitos causados por compostos naturais decorrentes da exposição a agentes químicos naturais, sendo que em *R. sanguineus* s. l. só foi descrito recentemente por Matos et al. (2020) em estudos com o timol. No presente estudo ficou confirmado que o órgão de Gené está composto por um epitélio secretor contendo células cilíndricas e apoiado sobre uma membrana basal, formando as glândulas tubulares, e também por um conjunto de ácinos glandulares, cujas células possuem canalículos internos que desembocam num ducto intercalar, local onde as secreções produzidas por estas glândulas são transportadas. Essas glândulas são denominadas de glândulas acessórias. Outros autores registraram essa mesma organização histológica para o órgão de Gené de outras espécies de carrapatos como *R. microplus* (BOOTH; BEADLE; HART, 1984), *Dermacentor reticulatus* (SCHÖL et al., 2001) e *Amblyomma sculptum* (SANTOS et al., 2018), além de Matos et al. (2020) para *R. sanguineus* s.l.

A exposição do órgão de Gené aos OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana* provocaram alterações morfológicas nas glândulas tubulares tendo sido os danos mais significativos aqueles resultantes da exposição as concentrações de 25 mg/mL e de 50 mg/mL, as quais romperam e causaram dobras na membrana basal, modificaram a forma das células secretoras as quais

passaram de cilíndricas a irregulares, bem como também provocaram o surgimento de áreas com vacuolizações citoplasmáticas.

A membrana basal é considerada ser uma estrutura fundamental para a manutenção da organização e função do tecido epitelial, fornecendo suporte estrutural para a adesão das células, regulando o comportamento celular e agindo, principalmente, como barreira seletiva no controle da entrada de substâncias e de moléculas com potencial de danificar as células epiteliais (DALEY et al., 2012; JAYADEV; SHERWOOD, 2017). Assim, diante dos resultados aqui encontrados pode-se sugerir que os danos à esta membrana decorrentes da exposição aos OEs, podem ter ocorrido devido ao contato da membrana basal que apoia as células glandulares tanto das glândulas tubulares quanto das acessórias, com os bioativos que neste caso, após a exposição estariam circulantes na hemolinfa e assim sendo banhariam o órgão de Gené.

As fêmeas alocadas nos Grupos Tratamento 3 (50 mg/mL *E. viscosa*) e 6 (50 mg/mL de *L. schaueriana*) foram aquelas que tiveram os órgãos de Gené com suas células glandulares extremamente deformadas e as maiores irregularidades observadas na membrana basal. Em algumas imagens foi possível verificar inclusive a invasão do lúmen glandular com restos destas células, o que provocou no epitélio extensa desorganização e perda da sua forma colunar simples (uma camada de células cilíndricas). Segundo Onochie et al. (2017), a morfologia, a organização e o tamanho das células epiteliais seria severamente afetada pela perda de rigidez e pela presença de irregularidades da membrana basal, corroborando os dados aqui obtidos.

Dentre as alterações morfológicas encontradas em decorrência da exposição aos OEs, no presente estudo verificou-se a ocorrência de vacuolização citoplasmática, tanto nas células das glândulas tubulares quanto nas das acessórias. A presença de extensa vacuolização citoplasmática pós-exposição a acaricidas, geralmente químicos sintéticos, já foi reportada em *R. sanguineus* s. l. em células de vários órgãos, tais como: glândulas salivares (NODARI et al., 2011, 2012; MATOS et al., 2019; KONIG et al., 2021), ovário (OLIVEIRA et al., 2015; LIMA DE SOUZA et al., 2019), órgão de Gené (MATOS et al., 2020b) e singânglio (ROMA et al., 2013; PEREIRA et al., 2017) e acredita-se que esta alteração seja resultado do envelopamento em vacúolos de partes danificadas do citoplasma ou mesmo de organelas que estivessem em processo de degeneração, devido ou não a presença do químico, o que poderia contribuir para que o tecido tivesse ainda a chance de preservar parte de sua organização e fisiologia pela prevenção da ocorrência de morte celular (OLIVEIRA et al., 2009; LIMA-DE-SOUZA et al., 2019; MATOS et al., 2020).

Nas células acinares das glândulas acessórias dos Grupos Tratamento 2 (25 mg/mL *E. viscosa*), 3 (50 mg/mL *E. viscosa*), 5 (25 mg/mL *L. schaueriana*) e 6 (50 mg/mL *L.*

schaueriana), além da extensa vacuolização citoplasmática, observou-se alterações nos núcleos celulares tais como hipertrofia, condensação da cromatina e cariorrexe ou perda dos limites nucleares. Corroborando esses dados, achados de Matos et al. (2020) nas glândulas acessórias do órgão de Gené de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. expostas ao timol, também confirmaram que esse composto extraído de plantas e com comprovada atividade acaricida, foi capaz de causar danos nos núcleos celulares, inclusive com a ocorrência de morte celular necrótica e apoptótica.

Além do órgão de Gené, também os ovários de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l. foram alterados pela exposição aos OEs de *E. viscosa* e de *L. schaueriana*. Segundo König et al. (2020) e Dantas-Torres et al. (2011), nas fêmeas de *R. sanguineus* s. l. grande parte da energia obtida do processo de ingurgitamento é investida na reprodução, visto que esta espécie pode ovipor cerca de 2500 ovos/fêmea em condições laboratoriais. Dessa forma, compostos que tenham a capacidade de interferir no funcionamento e desenvolvimento dos ovários podem ser consideradas como boas alternativas para controlar infestações de carrapatos. No presente trabalho, danos severos foram observados na morfofisiologia dos ovócitos das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l., entretanto ao contrário do observado para o órgão de Gené, onde os dois OEs interferiram na morfologia do órgão de maneira semelhante e afetando as mesmas estruturas, nos ovários de *R. sanguineus* s.l. o óleo de *L. schaueriana* provocou danos mais agressivos nos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento (I a III), enquanto o OE de *E. viscosa* provocou danos morfológicos nos ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento (I a V).

As alterações nos ovócitos, principalmente naqueles em estágios menos avançados do seu desenvolvimento pode ter sido em decorrência da deposição ainda não concluída do cório, membrana que atua como barreira protetora dos ovócitos controlando a entrada e saída de moléculas e de outros componentes no interior dos mesmos (ANHOLETO et al., 2018; CAMARGO-MATHIAS, 2018), o que inclui produtos com potencial citotóxico como os OEs aqui estudados. Assim, visto ser a partir do final do estágio II e início do III que o cório começa a ser depositado, ovócitos nestes estágios seriam aqueles mais vulneráveis a ação do tóxico circulante na hemolinfa em decorrência da exposição da fêmea (OLIVEIRA et al., 2015; ANHOLETO et al., 2018; LIMA DE SOUZA et al., 2019b) explicando os maiores danos em ovócitos nesses estágios, especialmente naqueles dos Grupo Tratamento 3 (50 mg/mL *E. viscosa*) e 6 (50 mg/mL *L. schaueriana*). Tamanhos e formas diferentes dos originais, bem como a presença de vacuolização citoplasmática em ovócitos de estágios iniciais como observado neste estudo e causados pela exposição a acaricidas tanto naturais quanto sintéticos já foram reportados nas espécies *Amblyomma cajennense* (ANHOLETO et al., 2018), *R.*

microplus (DE OLIVEIRA et al., 2016; REIS et al., 2021) e *R. sanguineus* s. l. (LIMA DE SOUZA et al., 2019; KONIG et al., 2020).

Estes dados, em conjunto com outros severos danos observados no cório (ruptura, dobras e descolamento) dos ovócitos V dos Grupos Tratamento 1 (12.5 mg/mL *E. viscosa*), 2 (25 mg/mL *E. viscosa*) e 3 (50 mg/mL *E. viscosa*) sugeriram que o OE de *E. viscosa* teria maior potencial citotóxico em comparação ao OE de *L. schaueriana*, visto que além de afetar os ovócitos em estágios iniciais (I a III), o óleo de macela foi capaz de danificar o cório e driblar a barreira seletiva dos ovócitos, mesmo daqueles em estágios finais de desenvolvimento (IV e V) inclusive alterando a estrutura e composição dos grânulos vitelínicos, os quais também sofreram fusão como nos ovócitos IV em todos os Grupos Tratamento e ruptura nos ovócitos V dos Grupos Tratamento 1 (12.5 mg/mL *E. viscosa*), 2 (25 mg/mL *E. viscosa*) e 3 (50 mg/mL *E. viscosa*) e 6 (50 mg/mL *L. schaueriana*). Alterações na composição e estrutura dos grânulos de vitelo também foram observadas por Reis et al. (2021) expondo fêmeas de *R. microplus* ao óleo essencial da planta *Satureja montana*, e os mesmos autores reportaram que considerando que os grânulos de vitelo armazenam os nutrientes do futuro embrião, os impactos causados pelos químicos podem levar a produção de ovos inviáveis, o que afetaria significativamente o desenvolvimento e a sobrevivência dos novos indivíduos.

Assim, os resultados aqui obtidos permitiram trazer à luz informações sobre quais são as alterações que podem ocorrer tanto no órgão de Gené quanto nos ovócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l. em decorrência da exposição destas aos óleos de *E. viscosa* e *L. schaueriana*. A toxicidade aqui comprovada em laboratório sobre a morfologia de órgãos internos dessa espécie de carrapatos certamente contribuiriam para a redução das taxas de produção de ovos viáveis ou mesmo dariam origem a espécimes inviáveis de sobreviver e de realizar com sucesso os processos essenciais a perpetuação da espécie.

Agradecimentos

Nós agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processos 2019/02831-3, 2019/20185-1, 2018/02999-9), à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de financiamento – 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, bolsa de produtividade PQ-1A) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- ADENUBI, O. T. et al. Chemical composition and acaricidal activity of *Eucalyptus globulus* essential oil against the vector of tropical bovine piroplasmiasis, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 83, n. 2, p. 301–312, 1 fev. 2021.
- ANHOLETO, L. A. et al. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 1 jan. 2017.
- ANHOLETO, L. A. et al. Morphological alterations in the ovaries of *Amblyomma cajennense* semi-engorged ticks exposed to ethanolic extract of *Acmella oleracea*. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 11, p. 1347–1357, 8 nov. 2018.
- ARAÚJO, A. A. S. et al. Antinociceptive activity and toxicological study of aqueous extract of *Egletes visciosa* Less (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 707–715, out. 2008.
- BATISTA, J. M. M. et al. Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of *Egletes visciosa* (L.) Less., a Traditional Medicinal Plant from Northeastern Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 5, p. 818–824, 2012.
- BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 61–66, 1995.
- BOOTH, T. F.; BEADLE, D. J.; HART, R. J. Ultrastructure of the accessory glands of Gene's organ in the cattle tick, *Boophilus*. **Tissue and Cell**, v. 16, n. 4, p. 589–599, 1 jan. 1984.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2018.
- CASTRO, K. N. C. et al. In vitro efficacy of essential oils with different concentrations of 1,8-cineole against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 2, p. 203–210, 2018.
- COSTA-JÚNIOR, L. M. et al. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 60–64, 2016.
- CUNHA, E. L. R. da et al. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal of Histology and Histopathology**, v. 4, n. 1, p. 9, 2017.
- DALEY, W. P. et al. ROCK1-directed basement membrane positioning coordinates epithelial tissue polarity. **Development**, v. 139, n. 2, p. 411–422, 15 jan. 2012.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 173–185, 2008.

- DANTAS-TORRES, F. et al. Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 195, p. 1–7, 2020.
- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; OTRANTO, D. Seasonal variation in the effect of climate on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* in southern Europe. **Parasitology**, v. 138, n. 4, p. 527–536, abr. 2011.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 9–13, 2015.
- DE OLIVEIRA, P. rosa et al. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 8, p. 744–753, 1 ago. 2016.
- DOS SANTOS, M. F. et al. Morphodifferentiation of Gené's organ in engorged *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 female ticks (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 3, p. 519–525, 1 mar. 2018.
- DRUMMOND, R. O. et al. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory Tests of Insecticides¹³. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–133, 1 fev. 1973.
- FAILLOUX, A.-B.; MOUTAILLER, S. Zoonotic aspects of vector-borne infections. **Revue Scientifique et Technique**, v. 34, p. 165–183, 2015.
- GODARA, R. et al. Synthetic pyrethroid resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks from north-western Himalayas, India. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 5, p. 1203–1208, 1 jun. 2019.
- GOMES, G. A. et al. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2423–2430, dez. 2012.
- JAYADEV, R.; SHERWOOD, D. R. Basement membranes. **Current Biology**, v. 27, n. 6, p. R207–R211, 20 mar. 2017.
- KONIG, I. F. M. et al. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 4, p. 766–774, 1 jun. 2019.
- KONIG, I. F. M. et al. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 129, p. 102780, 1 fev. 2020.
- KONIG, I. F. M. et al. Repellent activity of acetylcarvacrol and its effects on salivary gland morphology in unfed *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, p. 101760, 4 jun. 2021.
- KUMAR, R.; SHARMA, A. K.; GHOSH, S. Menace of acaricide resistance in cattle tick, *Rhipicephalus microplus* in India: Status and possible mitigation strategies. **Veterinary Parasitology**, v. 278, p. 108993, 1 fev. 2020.

- LAGE, T. C. D. A. et al. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 863–869, fev. 2013.
- LEE, D. et al. Diterpene Glycosides from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, v. 71, n. 8, p. 792–794, ago. 2005.
- LIMA DE SOUZA, J. R. et al. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, p. 66–72, 1 jan. 2019.
- LUNS, D. A. R. et al. Effect of essential oils against acaricide-susceptible and acaricide-resistant *Rhipicephalus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 83, n. 4, p. 597–608, 1 abr. 2021.
- MA, X. et al. Silencing T-type voltage-gated calcium channel gene reduces the sensitivity of *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) to scopoletin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 227, 1 jan. 2020.
- MADZIMURE, J. et al. Acaricidal efficacy against cattle ticks and acute oral toxicity of *Lippia javanica* (Burm F.) Spreng. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 2, p. 481–489, 2011.
- MARINHO, J. F. U. et al. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 239–245, 1 dez. 2014.
- MATOS, R. S. et al. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 314–320, 1 fev. 2019.
- MATOS, R. S. et al. Thymol: Effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 1, p. 101308, 1 jan. 2020.
- NAVA, S. et al. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3–4, p. 547–555, 21 dez. 2012.
- NODARI, E. F. et al. Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 151–158, 2011.
- NODARI, E. F. et al. Degenerative process and cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female exposed to the acaricide permethrin. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1012–1018, 2012.
- NWANADE, C. F.; YU, Z.; LIU, J. Botanical acaricides induced morphophysiological changes of reproductive and salivary glands in tick: A mini-review. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 285–291, 1 out. 2020.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Essential oils activity from plants of the Brazilian Caatinga on the vegetable leafminer. **Agropec. Trop**, v. 50, p. e58313, 2020.

- OLIVEIRA, P. R. et al. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in the ovaries and midgut of semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks. **Parasitology research**, v. 115, n. 2, p. 829–49, nov. 2015.
- ONOCHIE, O. E.; RICH, C.; TRINKAUS-RANDALL, V. E. Alterations in Basal Lamina Stiffness Lead to Impaired Epithelial Cell Migration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 58, p. 173, 2017.
- ORTEGA-MORALES, A. I. et al. Detection of *Rickettsia* spp. in *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) collected from free-roaming dogs in Coahuila state, northern Mexico. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 130, 26 mar. 2019.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201–214, 1 ago. 2001.
- PEREIRA, M. C. et al. Detrimental effect of deltamethrin on the central nervous system (synganglion) of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 71, n. 2, p. 159–169, 2017.
- QUADROS, D. G. et al. Plant-Derived Natural Compounds for Tick Pest Control in Livestock and Wildlife: Pragmatism or Utopia? **Insects**, v. 11, n. 8, p. 490, 2020.
- RAO, V. et al. Investigations on the Gastroprotective and Antidiarrhoeal Properties of Ternatin, a Tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, v. 63, n. 02, p. 146–149, 4 abr. 1997.
- RAO, V. S. N. et al. Ternatin, an anti-inflammatory flavonoid, inhibits thioglycolate-elicited rat peritoneal neutrophil accumulation and LPS-activated nitric oxide production in murine macrophages. **Planta medica**, v. 69, n. 9, p. 851–3, set. 2003.
- REIS, A. C. et al. Cytotoxic effects of *Satureja montana* L. essential oil on oocytes of engorged *Rhipicephalus microplus* female ticks (Acari: Ixodidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 7, p. 1375–1388, 1 jul. 2021.
- ROMA, G. C. et al. Morphological and cytochemical changes in synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks from exposure of andiroba oil (*Carapa guianensis*). **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 7, p. 687–696, jul. 2013.
- SAKA, M.; TADA, N. Acute and chronic toxicity tests of systemic insecticides, four neonicotinoids and fipronil, using the tadpoles of the western clawed frog *Silurana tropicalis*. **Chemosphere**, v. 270, p. 129418, 1 maio 2021.
- SCHÖL, H. et al. Morphology and structural organization of Gené's organ in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 25, n. 4, p. 327–352, 2001.
- SILVA LIMA, A. et al. Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 117, n. 1, 2018.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 1)**. vol. 1 ed. New York: Oxford University Press, 2014.

SOUZA, A. V. de et al. Chemical Composition of Essential Oil of Leaves from *Lippia schaueriana* Mart. Collected in the Caatinga Area. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2480, 27 set. 2018.

TRIPATHI, A. K. et al. Piperitenone Oxide as Toxic, Repellent, and Reproduction Retardant Toward Malarial Vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 4, p. 691–698, 1 jul. 2004.

TRIPATHI, A. K. et al. Insect feeding deterrent and growth inhibitory activities of scopoletin isolated from *Artemisia annua* against *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Science**, v. 18, n. 2, p. 189–194, 1 abr. 2011.

VAN WYK, R. D. J.; BARON, S.; MARITZ-OLIVIER, C. An integrative approach to understanding pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus* and *R. decoloratus* ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 4, p. 586–594, 1 jun. 2016.

VIEIRA, G. A. B. et al. Chemical composition of teas from two cultivated chemotypes of *Egletes viscosa* (“Macela-da-terra”). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 43–47, 2006.

VIEIRA, M. M. et al. Ternatin, a flavonoid, prevents cyclophosphamide and ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 2, p. 135–141, 1 fev. 2004.

ZHOU, H. et al. Acaricidal Mechanism of Scopoletin Against *Tetranychus cinnabarinus*. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. 169, p. 1–17, 6 mar. 2019.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO MORFOHISTOLÓGICA E SEMI-QUANTITATIVA DO SINGÂNGLIO DE FÊMEAS INGURGITADAS DO CARRAPATO-DO-CÃO *Rhipicephalus sanguineus* SENSU LATO EXPOSTAS AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Egletes viscosa* LESS. E *Lippia schaueriana* MART.³

Resumo

A aplicação inadequada de acaricidas químicos sintéticos no controle de carrapatos tem favorecido a seleção de cepas resistentes e estimulado a busca por outras estratégias eficientes de controle, dentre as quais se destacam a utilização de óleos essenciais tais como os das plantas *Egletes viscosa* Less. (Asteraceae) e *Lippia schaueriana* Mart. (Verbenaceae), cujos bioativos presentes em sua composição tem se mostrado promissores no controle de insetos e artrópodes. Nesse sentido, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos da exposição a diferentes concentrações dos OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana* (12.5, 25 e 50 mg/mL) na morfohistologia do singânglio, um dos principais órgãos-alvo de acaricidas, de fêmeas ingurgitadas do carrapato-do-cão *Rhipicephalus sanguineus* s. l. Ainda, o impacto das alterações morfológicas encontradas aqui para o funcionamento do singânglio e sobrevivência dos carrapatos foi avaliado através de análises semi-quantitativas. Os OEs obtidos via hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa apresentaram 27 componentes em *E. viscosa* e 18 em *L. schaueriana*, sendo os compostos majoritários o acetato de cis-isopinocarveíla e o óxido de piperitenona, respectivamente. A análise histológica e semi-quantitativa do singânglio das fêmeas expostas aos OEs revelou severas alterações e dose-dependentes, sendo as principais: irregularidades na estrutura das membranas externas (neurilema e perineuro), degeneração da região cortical com a presença de células neuronais com núcleos hipertróficos, picnóticos e fragmentados, vacuolização citoplasmática e desorganização das fibras da neurópila. Assim, as alterações observadas no singânglio das fêmeas expostas aos óleos essenciais de *E. viscosa* e *L. schaueriana* sugeriram um potencial

³Melissa Carolina Pereira; Luis Adriano Anholetto; Marina Rodrigues de Abreu; Karina Neoob de Carvalho Castro, Kirley Marques Canuto, Ana Sheila de Queiroz Souza e Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo científico em preparação.

altamente neurotóxico destes óleos, os quais induziram a morte celular no tecido nervoso, e possivelmente afetaram outras funções sistêmicas no carrapato controladas via SNC, como por exemplo a reprodução e a alimentação, e ademais confirma o potencial destes óleos como base no desenvolvimento de futuros acaricidas naturais.

Palavras-chave: ectoparasitas, acaricidas naturais, macela-da-terra, lipia-da-serra, neurotoxicidade

³**Melissa Carolina Pereira;** Luis Adriano Anholetto; Marina Rodrigues de Abreu; Karina Neoob de Carvalho Castro, Kirley Marques Canuto, Ana Sheila de Queiroz Souza e Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo científico em preparação.

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são importantes ectoparasitas que, além de distribuídos geograficamente por todo o globo, são também conhecidos por transmitirem agentes de alta patogenicidade e virulência ao homem e a outros animais (AMRUTHA et al., 2021), os quais são responsáveis por enfermidades (TBDs, do inglês “Tick-Borne Diseases”) potencialmente letais, cuja incidência aumenta todos os anos ameaçando não só a saúde humana como a animal em geral (GALAY et al., 2018).

Dentre a família Ixodidae, o carrapato-do-cão, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), é uma espécie que tem ampla distribuição, podendo ser encontrada em zonas tropicais, subtropicais e temperadas, tanto em áreas urbanas quanto rurais (DANTAS-TORRES, 2010), o que favorece que esta espécie parasite não somente seu hospedeiro preferencial, o cão doméstico, mas também outros animais incluindo o homem (SONENSHINE; ROE, 2014a; CAMARGO-MATHIAS, 2018). *R. sanguineus* s. l. é um conhecido vetor de *Ehrlichia canis* (erliquiose canina), *Babesia canis* (babesiose canina) e de bactérias do gênero *Rickettsia* spp. (rickettsioses) (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015).

Considerando-se que um único carrapato é capaz de transmitir simultaneamente ao seu hospedeiro vários patógenos durante o repasto sanguíneo (GALAY et al., 2018), alternativas de controle deste ectoparasita tem sido buscadas, principalmente para diminuir a transmissão de patógenos e a incidência das TBDs no mundo. No caso das estratégias mais utilizadas no controle desses ectoparasitas está a utilização dos acaricidas químicos sintéticos, de ampla comercialização, porém que tem favorecido a seleção de cepas resistentes aos princípios ativos dos mesmos, em especial aqueles da classe dos piretróides (VAN WYK; BARON; MARITZ-OLIVIER, 2016; GODARA et al., 2019; KUMAR; SHARMA; GHOSH, 2020).

Nesse sentido, vem sendo estudada a utilização de compostos bioativos que são extraídos de plantas e utilizados no desenvolvimento de acaricidas (LUNS et al., 2021), cuja grande variedade de moléculas nas suas composições possibilita além de diferentes modos de ação, eficiência no controle de artrópodes-praga (MATOS et al., 2014; PEIXOTO et al., 2015; ZANDI-SOHANI; RAMEZANI, 2015; COSTA-JÚNIOR et al., 2016; ZEKRI et al., 2016; ANHOLETO et al., 2017). Dentre estes bioativos extraídos de plantas, encontram-se os óleos essenciais (OEs) de diversas espécies, incluindo-se aqueles das plantas *Egletes viscosa* Less. (Asteraceae) e *Lippia schaueriana* Mart. (Verbenaceae), ambas nativas da América Tropical. Esses bioativos tem demonstrado serem potenciais fungicidas, inseticidas, antimicrobianos e acaricidas (RAO et al., 1997, 2003; LEE et al., 2005; VIEIRA et al., 2006; BATISTA et al.,

2012; SOUZA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020a), sinalizando também, em estudos já previamente realizados, que sua utilização no controle de carrapatos seria promissora.

Além do potencial acaricida, a exposição de várias espécies de carrapatos a concentrações subletais de bioativos extraídos de plantas tem provocado danos na morfofisiologia de órgãos essenciais para a sobrevivência dos mesmos (CAMARGO-MATHIAS, 2018; KONIG et al., 2021) tais como: glândulas salivares, ovários, órgão de Gené e singânglio (SNC dos carrapatos) (REMEDIO et al., 2014; ANHOLETO et al., 2018; LIMA DE SOUZA et al., 2019; MATOS et al., 2019, 2020a).

O SNC em carrapatos, foi descrito por Roma et al. (2012), Sonenshine e Roe (2014) e Pereira et al. (2017). Morfologicamente o mesmo está composto por uma massa de nervos fusionados, e no carrapato adulto, encontra-se localizado entre o gnatossoma e o poro genital, próximo ao primeiro par de pernas. Deste órgão partem nervos que são responsáveis por controlar todos os sistemas do ectoparasita, desde o digestório, o muscular até o reprodutor (SONENSHINE; ROE, 2014a; CAMARGO-MATHIAS, 2018). Devido a sua especial importância na biologia dos carrapatos, grande parte dos acaricidas tem focado o singânglio como principal órgão-alvo, sendo que a inibição na síntese de neurotransmissores e a consequente perda da função do órgão, o modo de ação mais reportado nestes compostos (PEREIRA et al., 2017).

Diante dessas informações, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de danos morfofisiológicos no singânglio de fêmeas ingurgitadas do carrapato-do-cão, *R. sanguineus* s. l., em decorrência da exposição das mesmas a diferentes concentrações dos óleos essenciais das plantas *E. viscosa* e *Lippia schaueriana*, com vistas a trazer informações que possam auxiliar na busca por estratégias de controle mais limpas e sustentáveis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* s. l.

Indivíduos machos e fêmeas em jejum dos carrapatos provenientes de colônias dos laboratórios da “Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology” (BCSTM) instaladas em sala do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de Rio Claro, SP, Brasil, foram mantidos em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) Eletrolab EL 202 em condições controladas ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) para posteriormente serem utilizados na infestação.

Para obtenção das fêmeas de *R. sanguineus* s. l. completamente alimentadas (ingurgitadas), os espécimes foram alimentados em coelhos hospedeiros (Grupo Genético de Botucatu) por meio de infestações artificiais. Os coelhos hospedeiros eram isentos de contato prévio com o ectoparasita e com os óleos essenciais e foram mantidos em gaiolas de contenção em sala alocada no mesmo Biotério com ração e água *ad libitum* durante todo o período de experimentação.

A cada infestação realizada, 50 fêmeas e 50 machos em jejum foram colocados no interior de cada câmara de alimentação posicionada no dorso dos hospedeiros. Oito horas após a liberação dos carrapatos na câmara foi realizada a primeira observação da área de fixação das fêmeas e nos dias subsequentes, foram realizadas observações diárias até o ingurgitamento total e desprendimento dos espécimes no décimo dia.

Os procedimentos de fixação e de construção das câmaras de alimentação, e a infestação e controle dos carrapatos nestas câmaras, foram realizados segundo Bechara et al. (1995) em concordância com a Comissão de Ética no Uso Animal, CEUA-IB-UNESP/Rio Claro- protocolo 17/2019.

2.2 Obtenção e análise dos óleos essenciais (OEs) de *Egletes viscose* Less. e *L. schaueriana* Mart.

Capítulos florais secos de *E. viscose* foram adquiridos em um supermercado na cidade de Fortaleza (Ceará, Brasil) em março/2016 e a obtenção e análise deste óleo foram realizadas na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, Ceará. Para a extração de OE, 300g de capítulos florais foram misturados a 1,5L de água destilada em um balão de fundo redondo (3L) e submetido a hidrodestilação por 4h, usando aparelho tipo Clevenger. Em seguida, o óleo essencial ($R = 1,2\%$, v/m) foi recolhido e centrifugado (2000

RPM; 10 min), seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em frasco âmbar a – 20 °C para posterior análise por Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM) (cromatógrafo CG-EM Agilent 5977A) e detecção por ionização em chama (CG-DIC) (Shimadzu modelo CG-2010 Plus).

L. schaueriana foi coletada em março de 2015 (8°22'58.2"S, 42°18'31.4"W) em São João do Piauí, Piauí. Uma amostra de referência das espécimes coletadas foi depositada no herbário Leopoldo Krieger (CESJ) da Universidade Federal de Juiz de Fora sob registro nº 67.395. A etapa de extração do óleo essencial foi realizada na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Meio-Norte, in Parnaíba, Piauí, onde aproximadamente 2 kg de folhas frescas de *L. schaueriana* foram misturadas a 3 L de água e submetido a hidrodestilação por 3h, utilizando aparelho Clevenger. O OE (R= 1,2 %, v/m) foi recolhido e centrifugado (2000 RPM; 10 min), seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em frasco âmbar a – 20 °C para posterior análise por Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM) (cromatógrafo CG-EM Agilent 5977A) e detecção por ionização em chama (CG-DIC) (Shimadzu modelo CG-2010 Plus) na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Agroindústria Tropical, in Fortaleza, Ceará.

2.3. Exposição das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l. aos OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana*

Para a realização dos experimentos utilizou-se o protocolo de imersão de fêmeas proposto por Drummond et al. (1973). Antes do início dos testes, as fêmeas completamente ingurgitadas foram separadas em 8 grupos experimentais (10 espécimes para cada concentração, totalizando 80 fêmeas ingurgitadas) com peso homogêneo garantido após pesagem de cada grupo em balança analítica, higienizadas com água corrente, em peneira, e secas com papel absorvente macio.

Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

Grupo controle 1 (C1): fêmeas ingurgitadas expostas somente à água destilada;

Grupo controle 2 (C2): fêmeas expostas ao solvente dos óleos, etanol 50% (etanol e água, v/v).

Grupos tratamento (T1-T6): fêmeas expostas às diferentes concentrações dos óleos essenciais, 12.5 mg/mL do OE de *E. viscosa* (T1), 25 mg/mL do OE de *E. viscosa* (T2), 50 mg/mL do OE de *E. viscosa* (T3), , 12.5 mg/mL do OE de *L. schaueriana* (T4), 25 mg/mL do OE de *L. schaueriana* (T5) e 50 mg/mL do OE de *L. schaueriana* (T6).

As fêmeas completamente ingurgitadas foram submetidas ao teste de imersão nas

diferentes concentrações dos OEs (12.5, 25 e 50 mg/mL de cada óleo) e em água destilada e etanol 50% por 5 minutos. Após imersão, as fêmeas foram secas em papel absorvente, e colocadas em estufa BOD, sob condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas) em placas de Petri identificadas onde permaneceram em observação durante 5 dias, visto que a maioria dos efeitos dos acaricidas não são imediatos e as alterações morfológicas geralmente aparecem após esse período.

2.4. Análise morfohistológica

Após 5 dias, as fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l. foram dissecadas em solução salina (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L e KH₂PO₄ 2.72 g/L) para a remoção do seu escudo dorsal e exposição dos órgãos, e para a melhor preservação do singânglio apenas o intestino foi descartado (ocupa a maior parte do corpo do ectoparasita e dificultaria a visualização dos outros órgãos), e as fêmeas foram fixadas inteiras em paraformaldeído 4%, conforme estabelecido por Pereira et al. (2017). Após 7 dias em fixador, as amostras foram transferidas para solução tampão fosfato onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratadas em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em historesina Leica® por 7 dias e incluídos em moldes plásticos que continham resina e polimerizador, onde permaneceram por mais 7 dias. Após esse período, os blocos de resina foram seccionados em micrótomo LEICA RM 2255, com secções de 3 µm de espessura, os quais foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As lâminas contendo as secções foram coradas pela hematoxilina de Harris durante 10 minutos. Depois de lavadas também por cinco minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa, por cinco minutos, e novamente lavadas em água corrente. Após secagem ao ar livre, as lâminas foram montadas em Entellan®, cobertas por lamínula (preparação permanente) e examinadas e fotografadas em microscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

2.5. Análise semi-quantitativa

A análise semi-quantitativa das alterações morfológicas encontrada no presente estudo foi realizada conforme estabelecido por Marinho et al. (2014) e König et al. (2019), e permitiu verificar estatisticamente a extensão e importância dos danos causados pela exposição aos óleos. Para esta etapa foram analisadas 3 lâminas do singânglio (6 secções/lâmina) de cada indivíduo, totalizando 80 indivíduos e 180 lâminas. Um fator de importância (ω) variando de 1 a 3 foi determinado para cada alteração observada nas análises, baseado na sua relevância para o funcionamento do singânglio e a sobrevivência do carrapato: (1) importância mínima, quando

a alteração poderia ser facilmente revertida após a interrupção da exposição ao tóxico; (2) importância moderada, quando a alteração poderia ser revertida na maioria dos casos e (3) importância máxima, quando a lesão foi considerada irreversível. As alterações encontradas nos grupos tratamento também foram classificadas em “*scores*” (α), variando de 0 a 5, onde 0 representou aspecto semelhante àquele observado nos controles e 5 a presença de alterações morfohistológicas em todas as células/estruturas observadas. O índice total foi calculado pela equação $\text{Index}_{\text{ind}} = \sum(\omega \times \alpha)$ e comparados estatisticamente por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguido do Teste de Tukey ($p < 0.05$), utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.00). Os testes de Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keulls ($p < 0.05$) foi aplicado em distribuições não paramétricas.

3 RESULTADOS

3.1 Composição química dos óleos essenciais

Neste trabalho, a caracterização química dos óleos de *E. viscosa* e *L. schaueriana* identificou 27 e 18 componentes, respectivamente, compreendendo mais de 98% dos constituintes de ambos os óleos. A lista completa de compostos, incluindo os majoritários, encontra-se na **Tabela 1**.

3.2 Morfologia do singânglio de *R. sanguineus* s.l.

3.2.1 Grupos Controle

A análise das fêmeas alocadas no Grupo Controle 1 (expostas à água destilada), observou-se que a morfologia do singânglio apresentou-se preservada, assim como era esperado para o órgão em condições normais. Suas membranas envoltórias estavam intactas, apresentando um neurilema acelular na porção mais externa do órgão e o perineuro, composto por células da glia, localizado entre o neurilema e o córtex (**Fig. 1 A-A2**). As células do córtex e as extensões fibrosas que compõe a neurópila também se mostraram preservadas (**Fig. 1 A1-A2**). O subperineuro íntegro foi identificado entre o córtex e a neurópila e composto pelas células da glia (**Fig. 1 A1**). Na figura 1 A foi possível observar o canal do esôfago o qual atravessa o órgão.

Nas fêmeas alocadas no Grupo Controle 2 (exposto ao etanol 50%), além das mesmas características descritas para aquelas do Controle 1, identificou-se alterações morfológicas no córtex e na neurópila, representadas por vacuolização citoplasmática (**Fig. 1 B-B2**).

3.2.2 Exposição das fêmeas ao óleo de *Egletes viscosa* (Grupos Tratamento 1-3)

O óleo essencial de *E. viscosa* atuou no singânglio das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l como um potente neurotóxico e ainda, dose-dependente. Nas fêmeas do Grupo 1 (expostos à 12.5 mg/mL do OE de *E. viscosa*) foram identificadas algumas alterações na morfologia do órgão, representadas pelo início do descolamento do neurilema e do perineuro do órgão, o qual foi estatisticamente significativo ($p < 0.05$) em relação aos controles na análise semi-quantitativa (**Tabela 2**), além de ter sido observado o surgimento de células do córtex com vacuolização no citoplasma (**Fig. 2 A-A2**).

Nas fêmeas do Grupo 2 (25 mg/mL do OE de *E. viscosa*), além da vacuolização citoplasmática já descrita anteriormente, verificou-se que as alterações morfológicas foram

intensificadas, visto que o descolamento tanto do neurilema quanto do perineuro foi observado em várias partes do órgão, bem como o surgimento de dobras e irregularidades nas duas membranas (Fig. 2 B-B2). Outra alteração observada foi a presença de várias células do córtex com núcleo hipertrofiado e picnótico (sinais indicativos de morte celular). Neste grupo, o subperineuro mostrou-se rompido em algumas partes do órgão (Fig. 2 B1-B2). Todas as alterações morfológicas observadas neste grupo foram significativas em relação aos controles ($p < 0.05$) (Tabela 2).

O singânglio das fêmeas do Grupo 3 (50 mg/mL do OE de *E. viscosa*) apresentou as alterações morfológicas mais severas, representadas principalmente pelas irregularidades nas membranas envoltórias do órgão (neurilema e perineuro), além do subperineuro, que apresentou-se quase que totalmente rompido, fato esse que dificultou sua visualização (Fig. 2 C-C1) e que conseqüentemente abriu espaço para que as células do córtex invadissem a região da neurópila, não sendo mais possível distinguir os limites entre as duas regiões (Fig. 2 C-C2). No tecido do córtex foi ainda possível observar a presença de células em vários estágios de morte celular (apoptótica) devido à presença de núcleos picnóticos, hipertróficos e até mesmo ocorrência de fragmentação nuclear (Fig. 2 C1-C2). Como era de se esperar, na análise semi-quantitativa as alterações observadas aqui também foram significativas em relação ao controle ($p < 0.05$) (Tabela 2).

3.2.3 Exposição das fêmeas a *Lippia schaueriana* (Grupos Tratamento 4-6)

A exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* ao óleo essencial de *L. schaueriana* causou severos danos na morfologia do singânglio das mesmas. Naquelas alocadas no Grupo 4 (12.5 mg/mL do OE de *L. schaueriana*), o singânglio mostrou algumas alterações morfológicas, semelhantes às observadas nas do Grupo Tratamento 1, e embora não tenham sido estatisticamente significativas (Tabela 2), foi possível observar a ocorrência de vacuolizações no citoplasma das células do córtex e da neurópila e o descolamento das membranas externas em algumas regiões do órgão (Fig. 2 2D). O neurilema e o perineuro apresentaram irregularidades e dobras (Fig. 2 D-D2). Nas células do córtex a maioria dos núcleos estavam íntegros e em apenas alguns deles observou-se hipertrofia e picnose (Fig. 2 D1-D2).

As fêmeas do Grupo 5 (25 mg/mL do OE de *L. schaueriana*), sofreram alterações mais severas, incluindo o descolamento e o rompimento do neurilema e perineuro e, ainda, células do córtex com características típicas de apoptose (picnose e hipertrofia nuclear) (Fig. 2 E-E2).

O subperineuro apresentou algumas irregularidades (**Fig. 2 E1**). As alterações observadas neste grupo foram estatisticamente significativas ($p < 0.05$) (**Tabela 2**).

A exposição das fêmeas a maior concentração do óleo de *L. schaueriana* (Grupo 6 - 50 mg/mL), foram as mais danosas ao singânglio, uma vez que tanto o neurilema quanto o perineuro perderam sua organização original, além de rompimento destas membranas (**Fig. 2 F-F2**). Não foi mais possível distinguir o córtex, o subperineuro e a neurópila (**Fig. 2 F**). Observou-se a formação de um extenso vacúolo entre as membranas externas e as poucas células restantes do córtex e extensões fibrosas da neurópila, e neste vacúolo é possível observar muitos fragmentos celulares e citoplasmáticos (**Fig. 2 F-F2**). Uma vez que houve a destruição do subperineuro, as células do córtex (muitas delas já em apoptose) se misturaram às extensões fibrosas da neurópila (**Fig. 2 F1-F2**). Na análise semi-quantitativa ficou comprovada que as alterações observadas no singânglio deste tratamento foi significativa em comparação aos controles ($p < 0.05$) (**Tabela 2**).

Tabela 1: Composição química dos óleos de *Egletes viscosa* Less. e *Lippia schaueriana* Mart.

Componentes	RI ^a	RI _{lit} ^b	GC-MS(%)	
			<i>E. viscosa</i>	<i>L. schaueriana</i>
α -Tujeno	928	928	0.16	—
α -Pino	937	936	0.39	0.38
Sabineno	976	973	0.49	0.04
β -Pino	981	978	4.86	—
Mirceno	992	989	0.23	0.71
α -Terpino	1019	1017	0.15	—
p-Cimeno	1026	1024	0.10	0.71
Limoneno	1030	1030	1.25	21.29
<i>trans</i> - β -ocimeno	1054	1050	—	0,78
γ -Terpino	1059	1060	0.28	0.28
1-Terpineol	1137	1136	0.35	—
<i>trans</i> -Pinocarveol	1141	1140	0.30	—
<i>cis</i> -p-mentha-2,8-dien-1-ol	1145	1137	—	0.60
<i>cis</i> -Crisantenol	1162	1164	0.08	—
Terpinen-4-ol	1179	1177	0.40	—
α -Terpineol	1192	1190	0.33	—
Mirtenol	1198	1194	0.16	—
Metil chavicol	1206	1196	—	0.54
<i>trans</i> -Carveol	1212	1217	2.15	—
Coahuilensol, methyl ether	1226	1221	—	0.55
Car-3-en-2-one	1244	1248	0.15	—
Acetato de linalol	1251	1255	0.09	—
Carvona	1255	1243	—	0.35
Acetato de <i>cis</i> -Crisantenila	1262	1262	5.48	—
Timol	1298	1290	—	1.64
Acetato de <i>trans</i>-pinocarveila	1302	1298	11.49	—
Acetato de <i>cis</i>-isopinocarveila	1312	1305	67.72	—
Acetato de Mirtenila	1327	1329	1.31	—
Acetato de <i>trans</i> -carvila	1345	1338	—	0.34
Piperitenona	1355	1343	—	2.83
Linalol isobutanoato	1371	1375	0.79	—
Óxido de piperitenona	1383	1368	—	64,36
Propanoato de isobornila	1383	1384	0.18	—
Acetato de <i>trans</i> -Mirtanol	1386	1386	0.31	—
4a β ,7a,7a β -Nepetalactone	1414	—	—	3,30
E-Cariofileno	1422	1420	0.35	—
Biciclogermacreno	1510	1500	—	0,36
Óxido de cariofileno	1585	1581	0.08	—
Espatuleno	1593	1578	—	0,90
Total			99.63	99.96

^a: Índice de Retenção (RI) obtido em coluna HP-5 MS; ^b: Dados da literatura (RI_{lit}) (ADAMS, 2017; BABUSHOK; LINSTROM; ZENKEVICH, 2011; CRAVEIRO et al. 1992; CUNHA, 2003). (—) Não identificado.

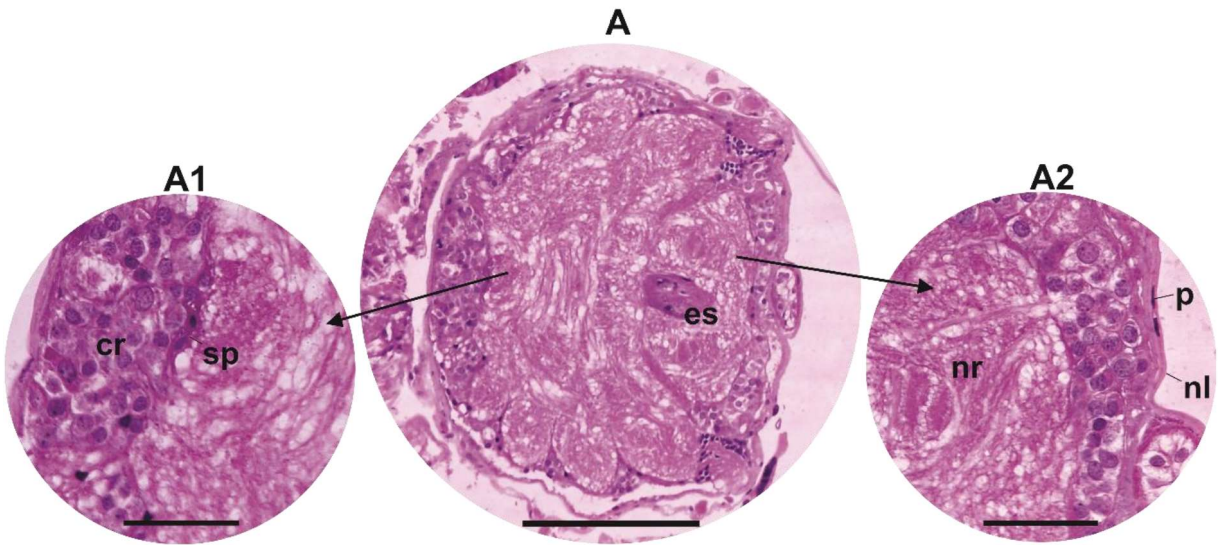
Tabela 2: Frequência da ocorrência de alterações morfológicas no singânglio das fêmeas de *R. sanguineus* s. l. expostas aos óleos essenciais de *E. viscosa* e *L. schaueriana*. Valores representam as médias $\pm$ DP para cada grupo analisado (controle e tratamentos). (*) $p < 0.05$ em comparação aos controles 1 e 2.

Alterações morfológicas		(ω)	Controle 1	Controle 2	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5	Tratamento 6
Neurilema e Perineuro	Dobramentos e irregularidades de membrana	1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.40 $\pm$ 0.54	1.60 $\pm$ 0.54*	3.80 $\pm$ 0.83*	0.60 $\pm$ 0.54	1.00 $\pm$ 0.70*	4.20 $\pm$ 0.44*
	Descolamento em relação ao órgão	2	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	1.60 $\pm$ 0.89*	2.00 $\pm$ 1.41*	6.80 $\pm$ 1.09*	0.60 $\pm$ 0.54	1.00 $\pm$ 0.70	4.20 $\pm$ 0.45*
	Rompimento de membrana	2	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	2.00 $\pm$ 1.41*	5.60 $\pm$ 1.67*	0.0 $\pm$ 0.0	2.50 $\pm$ 1.00*	5.20 $\pm$ 1.09*
	Rompimento de membrana	2	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.40 $\pm$ 0.89	1.60 $\pm$ 0.89*	8.80 $\pm$ 1.09*	0.40 $\pm$ 0.89	2.40 $\pm$ 0.89*	9.20 $\pm$ 1.09*
Subperineuro	Perda da integridade das células da glia	2	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.80 $\pm$ 1.09	8.80 $\pm$ 1.09*	0.0 $\pm$ 0.0	0.80 $\pm$ 1.09	8.40 $\pm$ 1.67*
	Vacuolização citoplasmática	1	0.0 $\pm$ 0.0	0.20 $\pm$ 0.44	0.40 $\pm$ 0.54	1.60 $\pm$ 0.54*	3.60 $\pm$ 0.89*	0.60 $\pm$ 0.54	1.40 $\pm$ 0.54*	4.40 $\pm$ 0.54*
Neurópila	Desorganização das fibras	2	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.40 $\pm$ 0.89	2.80 $\pm$ 1.09*	7.20 $\pm$ 1.09*	0.40 $\pm$ 0.89	2.40 $\pm$ 1.67*	7.60 $\pm$ 1.67*
	Perda da integridade do tecido	3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	4.80 $\pm$ 1.64*	12.60 $\pm$ 1.34*	0.0 $\pm$ 0.0	4.80 $\pm$ 1.64*	13.20 $\pm$ 1.64*
	Vacuolização citoplasmática	1	0.0 $\pm$ 0.0	0.20 $\pm$ 0.44	0.60 $\pm$ 0.54	1.80 $\pm$ 0.44*	3.40 $\pm$ 0.54*	0.40 $\pm$ 0.54	1.60 $\pm$ 0.54*	3.60 $\pm$ 0.54*
Córtex	Desorganização celular	2	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.40 $\pm$ 0.89	4.00 $\pm$ 0.0*	7.60 $\pm$ 1.67*	0.40 $\pm$ 0.89	3.60 $\pm$ 0.89*	9.60 $\pm$ 0.89*
	Perda da integridade do tecido	3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.60 $\pm$ 1.34	5.40 $\pm$ 1.34*	10.80 $\pm$ 1.64*	1.20 $\pm$ 1.64	6.00 $\pm$ 0.0*	14.40 $\pm$ 1.34*
	Hipertrofia	3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	1.80 $\pm$ 2.68	4.80 $\pm$ 1.64*	10.20 $\pm$ 1.64*	1.80 $\pm$ 1.64	5.40 $\pm$ 1.34*	9.60 $\pm$ 1.34*
Neurônios	Pícnose nuclear	3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	2.40 $\pm$ 2.51	4.80 $\pm$ 1.64*	11.40 $\pm$ 1.34*	1.80 $\pm$ 1.64	6.0 $\pm$ 0.0*	10.80 $\pm$ 1.64*
	Fragmentação nuclear	3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	1.20 $\pm$ 1.64	11.40 $\pm$ 1.34*	0.0 $\pm$ 0.0	1.80 $\pm$ 1.64	12.60 $\pm$ 2.51*
	Vacuolização intracitoplasmática	1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.60 $\pm$ 0.54	1.20 $\pm$ 0.83*	3.0 $\pm$ 0.0*	0.60 $\pm$ 0.54	1.60 $\pm$ 0.54*	3.0 $\pm$ 0.70*
	Perda da integridade e limite celular	3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.60 $\pm$ 1.34	3.60 $\pm$ 1.34*	10.80 $\pm$ 1.64*	0.60 $\pm$ 1.34	4.20 $\pm$ 1.64*	11.40 $\pm$ 2.51*

(ω): fator de importância; **Controle 1:** água destilada; **Controle 2:** etanol 50%; **Tratamento 1:** 12.5 mg/mL *E. viscosa*; **Tratamento 2:** 25 mg/mL *E. viscosa*; **Tratamento 3:** 50 mg/mL *E. viscosa*; **Tratamento 4:** 12.5 mg/mL *L. schaueriana*; **Tratamento 5:** 25 mg/mL *L. schaueriana*; **Tratamento 6:** 50 mg/mL *L. schaueriana*.

Figura 1: Secções histológicas do singânglio das fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* s. l. dos Grupos Controle 1 (água destilada) (**A-A2**) e Controle 2 (etanol 50%) (**B-B2**) coradas pela HE. **cr:** córtex, **es:** esôfago, **nl:** neurilema, **nr:** neurópila, **p:** perineuro, **sp:** subperineuro, **asterisco:** vacuolização. **Barras:** (A-B): 200 µm; (A1-B2): 50µm.

Controle 1



Controle 2

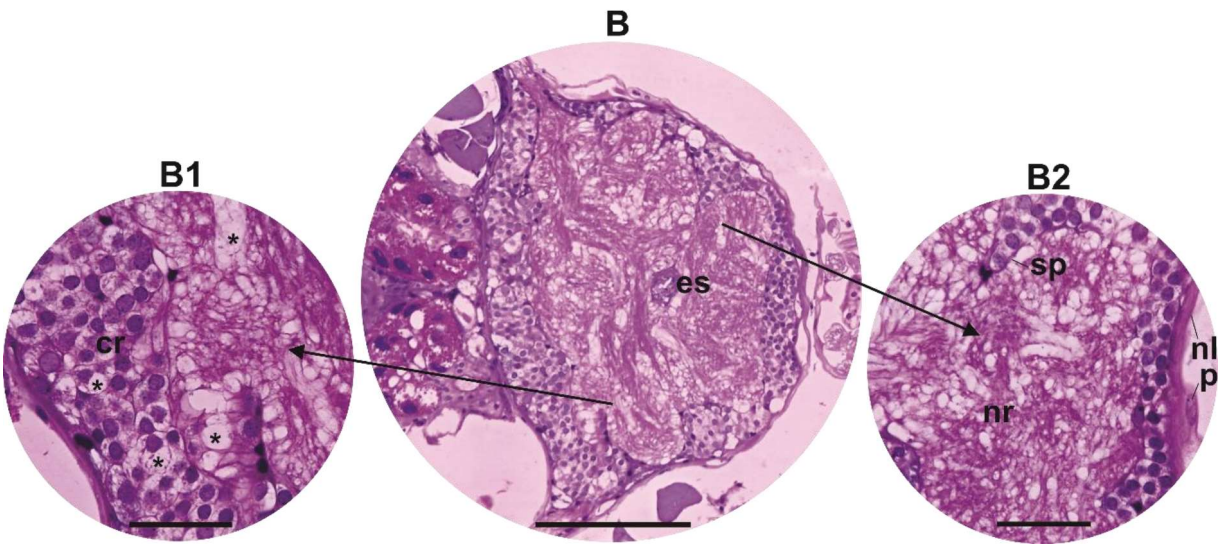
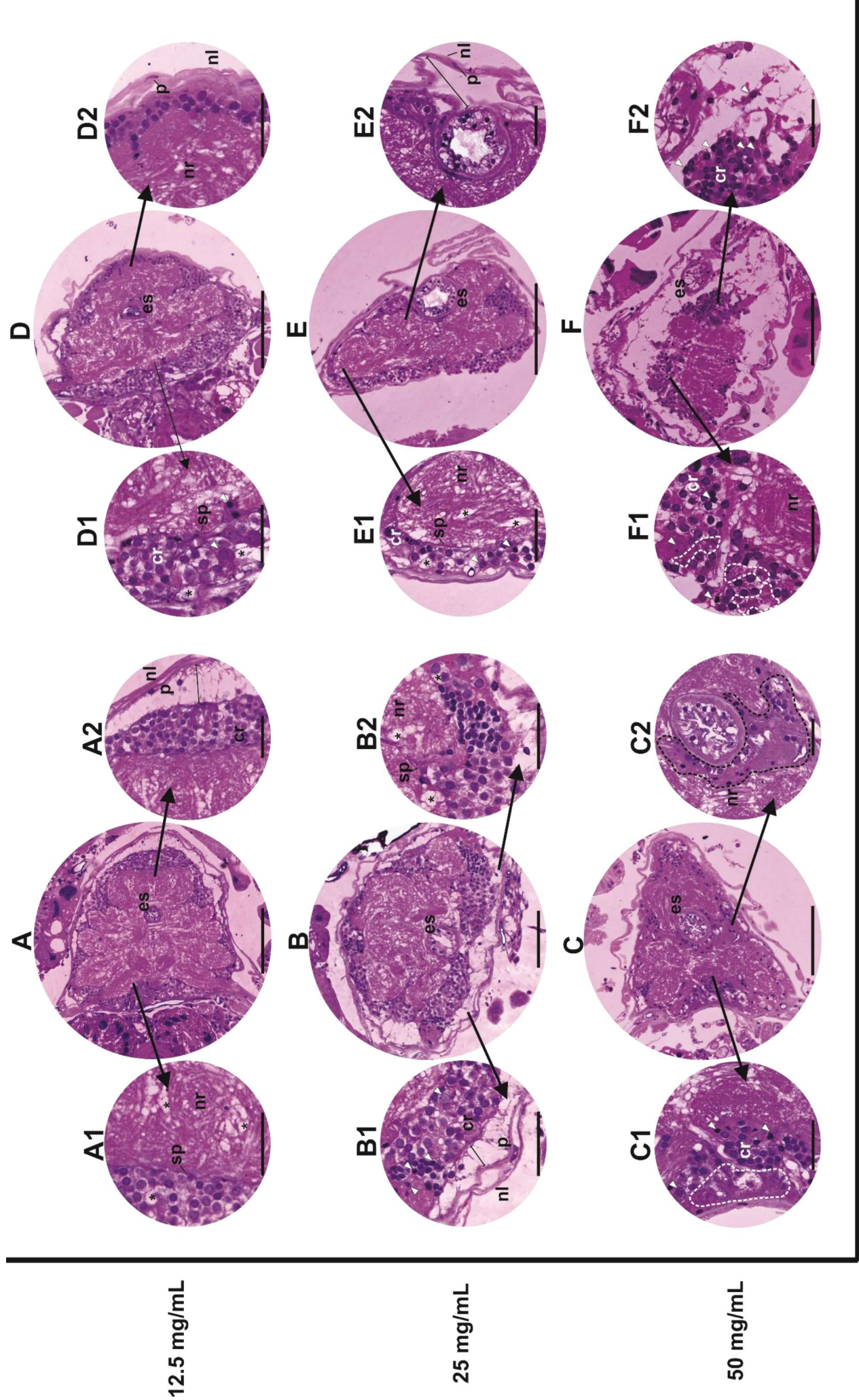


Figura 2: Secções histológicas do singânglio das fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. dos Grupos Tratamento, expostos as diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Egletes viscosa* e *Lippia schaueriana*, e coradas pela HE. **A-A2:** 12.5 mg/mL do OE de *E. viscosa*; **B-B2:** 25 mg/mL do OE de *E. viscosa*; **C-C2:** 50 mg/mL do OE de *E. viscosa*; **D-D2:** 12.5 mg/mL do OE de *L. schaueriana*; **E-E2:** 25 mg/mL do OE de *L. schaueriana*; **F-F2:** 50 mg/mL do OE de *L. schaueriana*. **cr:** córtex, **es:** esôfago, **nl:** neurilema, **nr:** neurópila, **p:** perineuro, **sp:** subperineuro, **asterisco (*)**: vacuolização, **seta branca:** características de morte apoptótica (picnose e/ou hipertrofia nuclear), **área destacada branca:** fragmentação nuclear, **área destacada preta:** invasão da neurópila pelas células do córtex. **Barras:** (A-F): 200 µm; (A1-F2): 50µm.



Egletes viscosa

Lippia schaueriana

4 DISCUSSÃO

Estudos avaliando a potencialidade dos óleos essenciais extraídos de plantas tem sido desenvolvidos e os resultados vem demonstrando as diversas aplicações que os mesmos podem ter. Especificamente os óleos essenciais (OEs) extraídos das plantas *Egletes viscosa* Less. e *Lippia schaueriana* Mart. já tiveram suas diversas ações reportadas na literatura, incluindo a de inseticida e acaricida (SINGH; MAURYA, 2005; OLIVEIRA et al., 2020). Embora esses resultados sejam promissores, pouco ainda se tem conhecimento sobre qual é o modo de ação desses óleos sobre a morfofisiologia dos animais a eles expostos, especialmente os carrapatos, objetivo do presente estudo, que teve a finalidade de demonstrar em fêmeas ingurgitadas do carrapato-do-cão, *Rhipicephalus sanguineus* s.l. a potencial ação neurotóxica destes OEs.

O perfil químico destes óleos também realizado neste estudo demonstrou que na composição de *E. viscosa* existem 27 componentes, sendo o acetato de cis-isopinocarveila o composto majoritário, confirmando que o óleo aqui utilizado foi extraído do quimiotipo B desta planta. Em estudos anteriores Vieira et al. (2006) haviam identificado 2 quimiotipos presentes na espécie *E. viscosa*, e a sua composição majoritária foi considerada como a principal característica para se distinguir as duas variantes (quimiotipos A e B), apontando as plantas que possuem o acetato de trans-pinocarveila como sendo classificadas no quimiotipo A, o primeiro a ser descrito, e as que possuem o acetato de cis-isopinocarveila, caso deste estudo, no quimiotipo B.

No óleo essencial de *L. schaueriana* foram identificados neste estudo 18 componentes, sendo o óxido de piperitenona o principal constituinte, corroborando Souza et al. (2018) quem primeiro reportou a composição química desta planta na literatura. O óxido de piperitenona tem ação neurotóxica em insetos agindo através da inibição da acetilcolinesterase, importante enzima que regula a atividade da acetilcolina responsável pela transmissão do impulso nervoso (MIYAZAWA et al., 1998).

No presente estudo as fêmeas de *R. sanguineus* alocadas no Grupo Controle 1, expostas somente à água destilada, observou-se, como era de se esperar, que as características morfológicas do singânglio não sofreram alterações e se apresentaram íntegras e de acordo com a descrição realizada por Roma et al. (2012) para esta mesma espécie, e ainda sugerindo que as alterações encontradas nos singânglios das fêmeas alocadas nos grupos tratamento ocorreriam devido à exposição aos óleos essenciais.

Ambos os óleos essenciais analisados neste estudo apresentaram potencial neurotóxico provocando severos danos no singânglio de *R. sanguineus* s.l., e de maneira dose-dependente,

ou seja, a medida que a concentração testada foi aumentada, os efeitos deletérios se intensificaram.

Alterações morfológicas decorrentes da exposição já foram encontradas mesmo nas menores concentrações dos dois óleos (12.5 e 25 mg/mL). Dentre elas observou-se o descolamento, dobramentos, irregularidades e/ou rompimento das membranas externas do singânglio, o neurilema e o perineuro, corroborando dados que foram anteriormente reportados por outros autores quando desenvolveram estudos de exposição de carrapatos a acaricidas tanto sintéticos como a permetrina e a deltametrina (ROMA et al., 2013; PEREIRA et al., 2017) quanto naturais como o timol (MATOS et al., 2020b). Estes resultados sugeriram que essas membranas envoltórias por recobrirem o singânglio externamente estariam atuando como barreiras seletivas impedindo/inibindo a entrada de compostos tóxicos vindos da hemolinfa, e por serem as primeiras a terem tido contato com os acaricidas (transportados via hemolinfa) foram aquelas que primeiro apresentaram danos, já na menor concentração (12.5 mg/mL) tanto do óleo de *E. viscosa* quanto do de *L. schaueriana*. Ainda, de acordo com Sonenshine e Roe (2014), as células da glia presentes no perineuro seriam aquelas responsáveis pela regulação metabólica das atividades neuronais e, sendo assim, qualquer tipo de alteração na estrutura desta membrana, como as descritas neste estudo devido a exposição aos OEs, levaria a uma disfunção generalizada do sistema nervoso central.

Os dados aqui obtidos revelaram ainda que com exceção das fêmeas do Grupo Tratamento 1 (12.5 mg/mL do OE de macela), todos os demais grupos de exposição aos óleos tiveram o singânglio apresentando degeneração na região cortical, principalmente nos núcleos das células neuronais, os quais mostraram-se hipertróficos, picnóticos e muitas vezes fragmentados sinalizando a ocorrência de um processo de apoptose no tecido nervoso dessas fêmeas e corroborando dados descritos por outros autores para esse mesmo órgão exposto a diferentes acaricidas (ROMA et al., 2013; PEREIRA et al., 2017).

Na região do córtex do singânglio das fêmeas de todos os grupos expostos aqui estudados, observou-se vacuolização intracitoplasmática, dado esse que sinalizou a possibilidade de as células estarem desenvolvendo um mecanismo de defesa contra os compostos tóxicos, neste caso os óleos essenciais. O isolamento de restos citoplasmáticos e/ou organelas destruídas dentro dos vacúolos, poderia representar uma tentativa da célula em preservar aquelas regiões que ainda não tivessem sido danificadas pela exposição ao tóxico. Esse mesmo mecanismo de defesa foi observado em outros estudos que avaliaram os efeitos deletérios de acaricidas tanto no sistema nervoso central de *R. sanguineus* s. l. quanto em outros

órgãos desta espécie, como as glândulas salivares (FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; ROMA et al., 2013; PEREIRA et al., 2017; MATOS et al., 2020b).

Ainda, em todos os grupos expostos ao óleo de *E. viscosa* e de *L. schaueriana* foram observados espaços na matriz extracelular entre as fibras que formam a neurópila. Esta região é formada por lóbulos que abrigam os dendritos e axônios das células neuronais, e segundo Pereira et al. (2017), alterações na organização destas fibras, como a vacuolização aqui observada na matriz extracelular, poderiam ocorrer por consequência dos danos provocados por neurotóxicos nas células do córtex.

Notavelmente, no caso do Grupo Tratamento 6 (50 mg/mL do OE de *L. schaueriana*) além da completa perda da conformação original do órgão, em que não foi mais possível distinguir as regiões do córtex e da neurópila, foram observados muitos fragmentos celulares e citoplasmáticos no grande espaço formado entre a região cortical e as membranas periféricas, indicando que este poderia ter sido formado não apenas pelo descolamento das membranas externas, mas devido à intensa degeneração nas regiões cortical e da neurópila. Sabe-se que o óxido de piperitenona, o composto majoritário encontrado no óleo de *L. schaueriana*, possui ação neurotóxica em insetos (MIYAZAWA et al. 1998) e esse intenso processo de degeneração do tecido nervoso observado em especial neste grupo exposto a maior concentração deste óleo poderia indicar que em carrapatos este composto também agiria como uma neurotoxina.

No Grupo Tratamento 4, o singânglio das fêmeas expostas a concentração de 50 mg/mL do óleo de *E. viscosa* apresentou intensas alterações que, semelhante ao Grupo Tratamento 6 (50 mg/mL do óleo de *L. schaueriana*), também causaram perda da organização original do órgão. O processo avançado de morte celular observado no córtex e ainda, a destruição do subperineuro que permitiu que as células corticais invadissem a neurópila, provavelmente também trouxe danos ao funcionamento do sistema nervoso central, visto que é na região cortical que se encontram os centros neurosecretores que sintetizam e secretam as substâncias responsáveis pela regulação do órgão (SONENSHINE; ROE, 2014). A destruição do subperineuro com consequente invasão das células no córtex na região da neurópila já foi reportado por Pereira et al. (2017) no singânglio de fêmeas de *R. sanguineus* s. l. como consequência da exposição ao acaricida sintético deltametrina. Todas estas alterações indicariam que o óleo de *E. viscosa* também teria ação neurotóxica em carrapatos.

A severa desorganização estrutural do tecido nervoso após a exposição a concentração de 50 mg/mL dos OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana* sugeriu um potencial altamente neurotóxico destes óleos, e ainda, uma desorganização estrutural em outros sistemas importantes do animal. Considerando que o SNC é responsável por controlar e regular todas as

outras funções sistêmicas no carrapato (SONENSHINE; ROE, 2014), como por exemplo a reprodução e alimentação, alterações na morfofisiologia do singânglio também impediria que o animal concluísse com sucesso outras atividades que garantiriam a sua sobrevivência.

Assim, tendo em vista todas as alterações observadas no singânglio das fêmeas expostas aos óleos essenciais de *E. viscosa* e *L. schaueriana* foi possível concluir que estes óleos atuaram como potenciais acaricidas, induzindo a morte celular no tecido nervoso, órgão vital para o sucesso e sobrevivência destes ectoparasitas.

Agradecimentos

Nós agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processos 2019/02831-3, 2019/20185-1, 2018/02999-9), à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de financiamento – 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, bolsa de produtividade PQ-1A) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- AMRUTHA, A. et al. Deltamethrin resistant alleles predominate in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato in South India. **Experimental and Applied Acarology**, v. 84, n. 2, p. 485–496, 28 jun. 2021.
- ANHOLETO, L. A. et al. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 1 jan. 2017.
- ANHOLETO, L. A. et al. Morphological alterations in the ovaries of *Amblyomma cajennense* semi-engorged ticks exposed to ethanolic extract of *Acmella oleracea*. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 11, p. 1347–1357, 8 nov. 2018.
- BATISTA, J. M. M. et al. Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of *Egletes viscosa* (L.) Less., a Traditional Medicinal Plant from Northeastern Brazil. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 23, n. 5, p. 818–824, 2012.
- BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive

aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 61–66, 1995.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2018.

COSTA-JÚNIOR, L. M. et al. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 60–64, 2016.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick , *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 1–11, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 9–13, 2015.

DRUMMOND, R. O. et al. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory Tests of Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–133, 1 fev. 1973.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 152–163, 2008.

GALAY, R. L. et al. Molecular detection of tick-borne pathogens in canine population and *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks from southern Metro Manila and Laguna, Philippines. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 17 dez. 2018.

GODARA, R. et al. Synthetic pyrethroid resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks from north-western Himalayas, India. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 5, p. 1203–1208, 1 jun. 2019.

KONIG, I. F. M. et al. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 4, p. 766–774, 1 jun. 2019.

KONIG, I. F. M. et al. Repellent activity of acetylcarvacrol and its effects on salivary gland morphology in unfed *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, p. 101760, 4 jun. 2021.

KUMAR, R.; SHARMA, A. K.; GHOSH, S. Menace of acaricide resistance in cattle tick, *Rhipicephalus microplus* in India: Status and possible mitigation strategies. **Veterinary**

Parasitology, v. 278, p. 108993, 1 fev. 2020.

LEE, D. et al. Diterpene Glycosides from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, v. 71, n. 8, p. 792–794, ago. 2005.

LIMA DE SOUZA, J. R. et al. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, p. 66–72, 1 jan. 2019.

LUNS, D. A. R. et al. Effect of essential oils against acaricide-susceptible and acaricide-resistant *Rhipicephalus ticks*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 83, n. 4, p. 597–608, 1 abr. 2021.

MARINHO, J. F. U. et al. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 239–245, 1 dez. 2014.

MATOS, R. S. et al. Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 669–673, fev. 2014.

MATOS, R. S. et al. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 314–320, 1 fev. 2019.

MATOS, R. S. et al. Thymol: Effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 1, p. 101308, 1 jan. 2020.

MIYAZAWA, M. et al. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Essential Oils of *Mentha* Species. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 46, n. 9, p. 3431–3434, 1998.

OLIVEIRA, A. C. et al. Essential oils activity from plants of the Brazilian caatinga on the vegetable leafminer. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 50, 2020.

PEIXOTO, M. G. et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1–2, 2015.

PEREIRA, M. C. et al. Detrimental effect of deltamethrin on the central nervous system (synganglion) of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v.

71, n. 2, p. 159–169, 2017.

RAO, V. et al. Investigations on the Gastroprotective and Antidiarrhoeal Properties of Ternatin, a Tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, v. 63, n. 02, p. 146–149, 4 abr. 1997.

RAO, V. S. N. et al. Ternatin, an anti-inflammatory flavonoid, inhibits thioglycolate-elicited rat peritoneal neutrophil accumulation and LPS-activated nitric oxide production in murine macrophages. **Planta medica**, v. 69, n. 9, p. 851–3, set. 2003.

REMEDIIO, R. N. et al. Morphological alterations in the synganglion and integument of *Rhipicephalus sanguineus* ticks exposed to aqueous extracts of neem leaves (*Azadirachta indica* A. JUSS). **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 12, p. 989–998, dez. 2014.

ROMA, G. C. et al. Central nervous system of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae): an ultrastructural study. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1277–1285, 2012a.

ROMA, G. C. et al. Synganglion histology in different stages of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 2455–2463, 2012b.

ROMA, G. C. et al. Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae) female ticks . Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 482–491, 2013.

SINGH, G.; MAURYA, S. Antimicrobial, antifungal and insecticidal investigations on essential oils: An overview. **Natural Product Radiance**, v. 4, n. 3, 2005.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 2)**. vol. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2014a.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 1)**. vol. 1 ed. New York: Oxford University Press, 2014b.

SOUZA, A. V. de et al. Chemical Composition of Essential Oil of Leaves from *Lippia schaueriana* Mart. Collected in the Caatinga Area. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2480, 27 set. 2018.

TRIPATHI, A. K. et al. Insect feeding deterrent and growth inhibitory activities of scopoletin isolated from *Artemisia annua* against *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Science**, v. 18, n. 2, p. 189–194, 1 abr. 2011.

VAN WYK, R. D. J.; BARON, S.; MARITZ-OLIVIER, C. An integrative approach to

understanding pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus* and *R. decoloratus* ticks.

Ticks and Tick-borne Diseases, v. 7, n. 4, p. 586–594, 1 jun. 2016.

VIEIRA, G. A. B. et al. Chemical composition of teas from two cultivated chemotypes of *Egletes viscosa* (“Macela-da-terra”). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 43–47, 2006.

ZANDI-SOHANI, N.; RAMEZANI, L. Evaluation of five essential oils as botanical acaricides against the strawberry spider mite *Tetranychus turkestani* Ugarov and Nikolskii.

International Biodeterioration and Biodegradation, v. 98, p. 101–106, 1 mar. 2015.

ZEKRI, N. et al. Insecticidal effect of *Mentha pulegium* L. and *Mentha suaveolens* Ehrh.

hydrosols against a pest of citrus, *Toxoptera aurantii* (Aphididae). **Research on Chemical Intermediates**, v. 42, n. 3, p. 1639–1649, 1 mar. 2016.

CAPÍTULO 4

TOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Egletes viscosa* LESS. E *Lippia schaueriana* MART., POTENCIAIS ACARICIDAS NATURAIS, EM MODELO DE ORGANISMO NÃO-ALVO⁴

Resumo

Os óleos essenciais e outros produtos extraídos de plantas tem sido utilizados como pesticidas e acaricidas naturais com a promessa de serem alternativas eficientes e seguras para o meio ambiente e para a saúde animal. Entretanto, pouco ainda se tem conhecimento sobre o seu modo de ação e principalmente, quais seriam as dosagens seguras para serem aplicadas em hospedeiros e que não prejudiquem possíveis organismos não-alvo. Neste sentido, o presente trabalho buscou demonstrar os efeitos causados pela exposição aos óleos essenciais (OEs) de *Egletes viscosa* e *Lippia schaueriana*, na concentração de 50 mg/mL, no tecido hepático e tireoidiano de fêmeas de camundongos *Mus musculus*, modelos de organismos não-alvo. Os camundongos foram submetidos a um bioensaio de aspersão (simulando aplicação de acaricida comercial), alocados em 4 grupos experimentais (5 fêmeas/grupo): grupos controle C1 e C2 – expostos via aspersão à água destilada e ao etanol 50%, respectivamente; e grupos tratamento T1 e T2 - expostos via aspersão a 50 mg/mL dos óleos de *E. viscosa* e *L. schaueriana*. As análises morfohistológicas do tecido hepático dos animais pertencentes aos grupos tratamento apresentaram importantes alterações que indicaram degeneração no tecido: extensa vacuolização citoplasmática, aumento na quantidade de células de Kupffer, picnose nuclear, acúmulo de pigmentos semelhantes à lipofuscina e dilatação/obstrução dos sinusóides. No tecido tireoidiano dos camundongos expostos aos OEs foram encontradas alterações como aumento no tamanho dos folículos e acúmulo de coloide, epitélio folicular pavimentoso, núcleos picnóticos, extensa vacuolização citoplasmática e aumento dos espaços intersticiais entre os folículos (possível instalação de edema), e todas estas alterações sugeriram inatividade da glândula tireoide, bem como a ocorrência de degeneração neste órgão. É possível concluir

⁴**Melissa Carolina Pereira**; Luis Adriano Anholetto; Marina Rodrigues de Abreu; Karina Neoob de Carvalho Castro, Kirley Marques Canuto, Ana Sheila de Queiroz Souza, Letícia Maria Gráballos Hebling e Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo científico em preparação.

que os OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana* provocaram severos danos tanto no tecido hepático quanto no tireoideano dos camundongos a eles expostos, na concentração de 50 mg/mL, danos estes possivelmente irreversíveis e que certamente prejudicam a fisiologia destes órgãos. Ressalta-se aqui a importância dos estudos sobre a toxicidade de substâncias com potencial acaricida em organismos não-alvo, mesmo aqueles de origem natural, frequentemente considerados seguros para serem utilizados em hospedeiros no controle de infestações.

Palavras-chave: toxicidade, acaricidas naturais, macela-da-terra, lipia-da-serra, fígado, tireoide

⁴**Melissa Carolina Pereira;** Luis Adriano Anholetto; Marina Rodrigues de Abreu; Karina Neoob de Carvalho Castro, Kirley Marques Canuto, Ana Sheila de Queiroz Souza, Letícia Maria Gráballos Hebling e Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo científico em preparação.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de acaricidas sintéticos no controle de infestações de carrapatos tem revelado ser um problema nas últimas décadas, visto os numerosos relatos de impactos ambientais e de toxicidade em organismos não alvos, incluindo os animais domésticos, causados pelo seu uso descontrolado (CUNHA et al., 2017; CAMARGO-MATHIAS, 2018; SAKA; TADA, 2021). Nesse sentido, a busca por alternativas que minimizem os danos colaterais, que sejam mais naturais, eficientes e seguras para o meio ambiente e à saúde animal tem estimulado a realização de diversos estudos nos quais os modelos biológicos tem sido os bioativos obtidos de plantas, tais como os extratos e os óleos essenciais, estes últimos destacando-se por apresentar diversas propriedades biológicas, e entre estas, a inseticida e a acaricida (QUADROS et al., 2020).

Egletes viscosa Less. (macela-da-terra) e *Lippia schaueriana* Mart. (lipia-da-serra) são plantas nativas da América Tropical e pertencentes às famílias Asteraceae e Verbenaceae, respectivamente. Os óleos essenciais destas plantas vem sendo frequentemente utilizados na medicina popular, especialmente na região Nordeste do Brasil, visto que diversos estudos já comprovaram o seu potencial farmacológico, bem como o de alguns compostos neles presentes, os quais dentre outros teriam potencial de ação antiparasitária, antimicrobiana e antiinflamatória, além de inseticida e acaricida (PASCUAL et al., 2001; RAO et al., 2003; TRIPATHI et al., 2004; VIEIRA et al., 2006; SOUZA et al., 2018).

No entanto, apesar de frequentemente considerados seguros, diversos produtos extraídos de plantas podem ser danosos a saúde humana e animal, em especial por sua toxicidade (FIRENZUOLI; GORI, 2007; MENGISTE et al., 2018; STOJANOVIĆ et al., 2019), ressaltando-se que a dosagem é que estabelece a diferença entre um medicamento e um produto tóxico.

Estudos demonstraram que os óleos essenciais, como o de *Melissa officinalis* (erva cidreira) (STOJANOVIĆ et al., 2019) e aleloquímicos como o timol (CUNHA et al., 2017) teriam potencial de ação acaricida, entretanto registros na literatura demonstraram a elevada toxicidade destes em decorrência da exposição de organismos não-alvos aos mesmos. Assim, estudos enfocando a ação tóxica de produtos extraídos de plantas, incluindo aqueles acaricidas naturais, são atualmente essenciais para que as dosagens seguras a serem utilizadas sejam definidas com critério (FIRENZUOLI; GORI, 2007; QUADROS et al., 2020).

Dentre os organismos preferenciais que são parasitados por carrapatos estão os mamíferos, que possuem como órgão detoxicador principal o fígado. Esta glândula é

considerada de grande importância, não só pela sua posição estratégica no corpo estabelecendo uma conexão entre o sistema digestório e o sangue, mas também pela funções que desempenha incluindo a de absorver e processar os nutrientes para posteriormente distribuí-los via circulação sanguínea para os outros órgãos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Sua importância como indicador de toxicidade está na capacidade de metabolizar e remover medicamentos e outras substâncias potencialmente danosas ao sistema (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Além do fígado, a tireoide, tem sido alvo de estudos com enfoque toxicológico, visto a mesma ter papel crucial na regulação do metabolismo dos mamíferos, além de ser extremamente sensível a ação de produtos tóxicos circulantes no sangue, mesmo que estes sejam encontrados em dosagens mínimas (CUNHA et al., 2017).

Desta forma, considerando as informações anteriormente colocadas, e também atentando para o fato da escassa literatura disponível a respeito do assunto, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar como os óleos essenciais extraídos de *E. viscosa* e de *L. schaueriana*, em concentrações com eficácia como acaricida previamente definidas, agiria na morfofisiologia do fígado e da tireoide de fêmeas de camundongos *Mus musculus* (modelos de organismos não-alvo) a eles expostas, a fim de fornecer valiosas informações que num futuro próximo auxiliem na melhor compreensão da ação de acaricidas naturais quando aplicados nos hospedeiros para o controle de carrapatos. Pretendeu-se também demonstrar como essas alterações poderiam afetar a biologia dos hospedeiros, lembrando que apesar de serem consideradas substâncias naturais as mesmas seriam potencialmente tóxicas causando danos a glândulas (fígado e tireoide) consideradas de extrema importância para os mamíferos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Camundongos *Mus musculus*

Foram utilizados neste estudo 20 camundongos *Swiss* fêmeas, da espécie *Mus musculus*, saudáveis, “spf” (patógeno-free), com peso aproximado de 40g, e idade entre 8 e 10 semanas, adquiridos do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA) da UNESP de Botucatu, SP, Brasil. Os animais foram alocados em sala nas dependências do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de Rio Claro, SP, Brasil e mantidos em caixas retangulares de polipropileno (30x20x13cm) (4 caixas com 5 animais cada) em condições normais de 22°C ± 2°C de temperatura, 50% de umidade, ventilação apropriada, exaustor e fotoperíodo de 12 horas e foram alimentados com ração e água *ad libitum*.

2.2 Obtenção e análise dos óleos essenciais (OEs) de *Egletes viscosa* Less. e *L. schaueriana* Mart.

Capítulos florais secos de *E. viscosa* foram adquiridos em um supermercado na cidade de Fortaleza (Ceará, Brasil) em março/2016 e a obtenção e análise deste óleo foram realizadas na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, Ceará. Para a extração de OE, 300g de capítulos florais foram misturados a 1,5L de água destilada em um balão de fundo redondo (3L) e submetido a hidrodestilação por 4h, usando aparelho tipo Clevenger. Em seguida, o óleo essencial (R= 1,2 %, v/m) foi recolhido e centrifugado (2000 RPM; 10 min), seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em frasco âmbar a – 20 °C para posterior análise por Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM) (cromatógrafo CG-EM Agilent 5977A) e detecção por ionização em chama (CG-DIC) (Shimadzu modelo CG-2010 Plus).

L. schaueriana foi coletada em março de 2015 (8°22'58.2"S, 42°18'31.4"W) em São João do Piauí, Piauí. Uma amostra de referência das espécimes coletadas foi depositada no herbário Leopoldo Krieger (CESJ) da Universidade Federal de Juiz de Fora sob registro nº 67.395. A etapa de extração do óleo essencial foi realizada na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Meio-Norte, in Parnaíba, Piauí, onde aproximadamente 2 kg de folhas frescas de *L. schaueriana* foram misturadas a 3 L de água e submetido a hidrodestilação por 3h, utilizando aparelho Clevenger. O OE (R= 1,2 %, v/m) foi recolhido e centrifugado (2000 RPM; 10 min), seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em frasco âmbar a – 20 °C para posterior análise por Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM) e detecção por ionização

em chama (CG-DIC) na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Agroindústria Tropical, in Fortaleza, Ceará.

2.3 Exposição de camundongos *Mus musculus* aos OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana*

Para esta etapa, as 20 fêmeas de camundongos *Mus musculus* alocadas conforme item 2.2., foram divididas em 4 grupos experimentais:

Grupos Controle (C1, C2): as fêmeas expostas via aspersão, respectivamente, à água destilada e ao solvente dos óleos (etanol 50%);

Grupos Tratamento (T1, T2): foram expostas (aspersão) a concentração de 50 mg/mL dos óleos essenciais de *E. viscosa* e *L. schaueriana* diluídos em etanol 50% (concentração cuja eficácia como acaricida foi comprovada em estudos prévios).

As exposições foram realizadas em 3 dias consecutivos, com intervalos de 24h entre elas, e estes procedimentos foram realizados utilizando sprays esterilizados até que os animais estivessem totalmente molhados, segundo estabelecido por Cunha et al. (2017), tendo sido utilizado aproximadamente 15mL de cada solução (água destilada, etanol 50% e óleos essenciais) durante todo o bioensaio. O tempo de experimentação (3 dias, intervalo de 24h) foi assim determinado para simular a aplicação de acaricidas comerciais, os quais devem ser aplicados consecutivamente em no máximo 3 dias. Após a exposição, os animais foram observados diariamente por 14 dias.

No 14º dia, todos os indivíduos foram eutanasiados, por meio de superdosagem de analgésicos com cloridrato de ketamina (80 mg/kg MC/IP) e cloridrato de xilasina (20mg/kg MC/IP) e tiveram o fígado e a tireóide coletados. Os procedimentos de remoção dos órgãos foram realizados pela veterinária Letícia Maria Gráballos Ferraz Hebling (CRMV 5412), segundo metodologia aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal, CEUA-IB-UNESP/Rio Claro), sob protocolo 17/2019.

2.4 Análise morfohistológica

Após coletados, os órgãos (a saber, fígado e tireoide dos grupos controles e tratamentos) foram fragmentados e estes fragmentos foram imediatamente fixados por 7 dias em fixador paraformaldeído 4%. Após a fixação das amostras, estas foram transferidas para solução tampão fosfato de sódio, onde permaneceram por mais de 24 horas. Na sequência, foram desidratadas em série crescente de álcool etílico (a 70, 80, 90, 95 e 100%) com intervalos de 1 hora e logo após, embebidas em historesina Leica® por 7 dias. O material foi então incluído em moldes plásticos que continham resina e polimerizador, onde permaneceram por mais 7

dias. Após esse período, os blocos de resina foram seccionados em micrótomo LEICA RM 2255, com secções de 3 μm de espessura, os quais foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As lâminas contendo as secções foram coradas pela hematoxilina de Harris durante 10 minutos. Depois de lavadas também por cinco minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa, por cinco minutos, e novamente lavadas em água corrente. Após secagem ao ar livre, as lâminas foram montadas em Entellan[®], cobertas por lamínula (preparação permanente) e examinadas e fotografadas em microscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

3 Resultados

3.1 Composição química dos óleos essenciais

Neste trabalho, a caracterização química dos óleos de *E. viscosa* e *L. schaueriana* identificou 27 e 18 componentes, respectivamente, compreendendo mais de 98% dos constituintes de ambos os óleos. A lista completa de compostos, incluindo os majoritários, encontra-se na **Tabela 1**.

3.2 Fígado

3.2.1 Grupos Controle

No presente trabalho os resultados obtidos mostraram que a fêmeas de camundongos *Mus musculus* alocadas nos Grupos Controle 1 (água destilada) (**Fig. 1A-C**) e 2 (etanol 50%) (**Fig. 1D-F**) apresentaram tecido hepático íntegro com morfologia semelhante àquela descrita por Junqueira e Carneiro (2017) para o órgão em condições normais, ou seja, organizado em cordões de hepatócitos bem definidos e separados entre si por pequenos espaços, estes últimos intermeados por vasos sanguíneos denominados de capilares sinusóides (**Fig. 1A**). Os hepatócitos apresentaram forma poliédrica e mono ou binucleados, além de um ou mais nucléolos. O citoplasma destas células se mostrou fortemente eosinófilo e em seu interior foi possível identificar uma granulação, provavelmente glicogênio (**Fig. 1A-F**). Distribuídas por entre os cordões de hepatócitos puderam ser detectadas as células de Kupffer (macrófagos do tecido hepático) as quais ficaram evidenciadas pelos seus núcleos com forma alongada (**Fig. 1C; 1F**).

3.2.2 Grupos Tratamento 1 (50 mg/mL *E. viscosa*) e 2 (50 mg/mL *L. schaueriana*)

O tecido hepático dos indivíduos do Grupo Tratamento 1 apresentou alterações morfológicas agressivas em comparação aos controles, visto ter sido possível se observar a desorganização instalada nos cordões de hepatócitos (**Fig. 1G-H**). Ainda, essas células tiveram seus núcleos fortemente marcados devido a intensa picnose nuclear (**Fig. 1I**). Cabe ressaltar que o citoplasma de muitos hepatócitos apresentou extensa vacuolização quando estas células foram comparadas com aquelas dos grupos controle (**Fig. 1H-I**). As células de Kupffer permaneceram íntegras, entretanto foi possível observar um aumento da população destas células no tecido (**Fig. 1H-I**).

O fígado dos indivíduos alocados no Grupo Tratamento 2 também mostraram severas alterações. Os cordões de hepatócitos apresentaram desorganização embora menor em

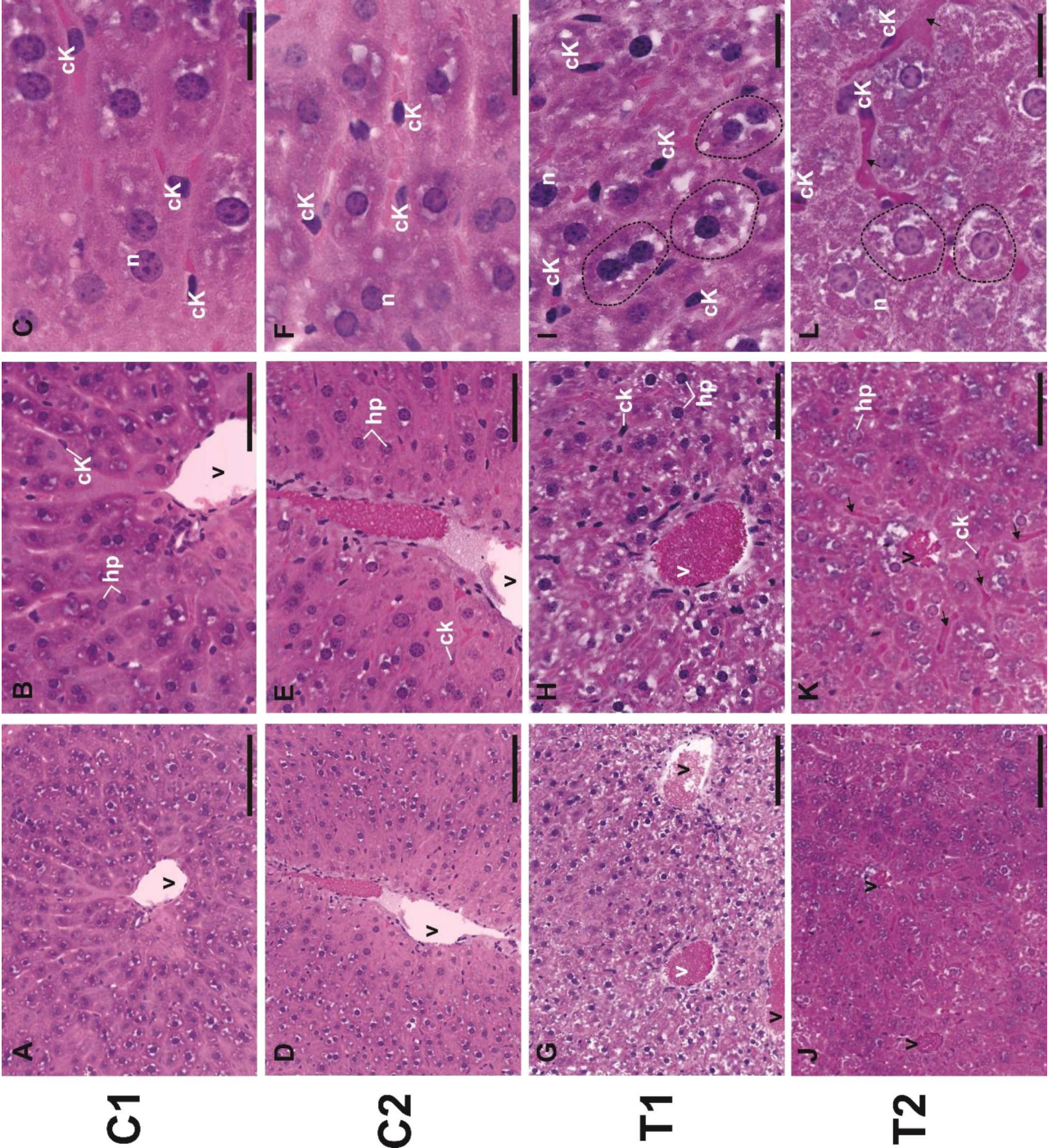
comparação ao Grupo Tratamento 1 (**Fig. 1J-L**) e os núcleos dos hepatócitos estavam com forma preservada e nucléolos evidentes (**Fig. 1K-L**). O citoplasma apresentou granulações fortemente coradas pela eosina (**Fig. 1K-L**), diferentemente do que foi observado nos controles, sugerindo alterações no conteúdo citoplasmático devido a presença do intoxicante. Entre os cordões de hepatócitos notou-se um aumento dos espaços entre eles, espaços estes que abrigam os capilares sinusóides, e cujo aumento pode indicar dilatação e obstrução destes vasos sanguíneos. As células de Kupffer se apresentaram íntegras, porém semelhante ao observado no grupo anterior, houve aumento na população destas (**Fig. 1K-L**).

Tabela 1: Composição química dos óleos de *Egletes viscosa* Less. e *Lippia schaueriana* Mart.

Componentes	RI ^a	RI _{lit} ^b	GC-MS(%)	
			<i>E. viscosa</i>	<i>L. schaueriana</i>
α -Tujeno	928	928	0.16	—
α -Pino	937	936	0.39	0.38
Sabineno	976	973	0.49	0.04
β -Pino	981	978	4.86	—
Mirceno	992	989	0.23	0.71
α -Terpino	1019	1017	0.15	—
p-Cimeno	1026	1024	0.10	0.71
Limoneno	1030	1030	1.25	21.29
<i>trans</i> - β -ocimeno	1054	1050	—	0,78
γ -Terpino	1059	1060	0.28	0.28
1-Terpineol	1137	1136	0.35	—
<i>trans</i> -Pinocarveol	1141	1140	0.30	—
<i>cis</i> -p-mentha-2,8-dien-1-ol	1145	1137	—	0.60
<i>cis</i> -Crisantenol	1162	1164	0.08	—
Terpinen-4-ol	1179	1177	0.40	—
α -Terpineol	1192	1190	0.33	—
Mirtenol	1198	1194	0.16	—
Metil chavicol	1206	1196	—	0.54
<i>trans</i> -Carveol	1212	1217	2.15	—
Coahuilensol, methyl ether	1226	1221	—	0.55
Car-3-en-2-one	1244	1248	0.15	—
Acetato de linalol	1251	1255	0.09	—
Carvona	1255	1243	—	0.35
Acetato de <i>cis</i> -Crisantenila	1262	1262	5.48	—
Timol	1298	1290	—	1.64
Acetato de <i>trans</i>-pinocarveila	1302	1298	11.49	—
Acetato de <i>cis</i>-isopinocarveila	1312	1305	67.72	—
Acetato de Mirtenila	1327	1329	1.31	—
Acetato de <i>trans</i> -carvila	1345	1338	—	0.34
Piperitenona	1355	1343	—	2.83
Linalol isobutanoato	1371	1375	0.79	—
Óxido de piperitenona	1383	1368	—	64,36
Propanoato de isobornila	1383	1384	0.18	—
Acetato de <i>trans</i> -Mirtanol	1386	1386	0.31	—
4a β ,7a,7a β -Nepetalactone	1414	—	—	3,30
E-Cariofileno	1422	1420	0.35	—
Biciclogermacreno	1510	1500	—	0,36
Óxido de cariofileno	1585	1581	0.08	—
Espatulanol	1593	1578	—	0,90
Total			99.63	99.96

^a: Índice de Retenção (RI) obtido em coluna HP-5 MS; ^b: Dados da literatura (RI_{lit}) (ADAMS, 2017; BABUSHOK; LINSTROM; ZENKEVICH, 2011; CRAVEIRO et al. 1992; CUNHA, 2003). (—) Não identificado

Figura 1: Secções histológicas do tecido hepático de camundongos *Mus musculus* dos Grupos Controle 1-2 e Grupos Tratamento 1-2. **A-C:** Grupo Controle 1 (água destilada). **D-F:** Grupo Controle 2 (etanol 50%). **G-I:** Grupo Tratamento 1 (50 mg/mL *E. viscosa*). **J-L:** Grupo Tratamento 2 (50 mg/mL *L. schaueriana*). **ck:** célula de Kupffer; **hp:** hepatócito; **n:** núcleo do hepatócito; **v:** veia central; **linha pontilhada:** célula com extensa vacuolização citoplasmática; **seta preta:** dilatação/obstrução sinusoidal. **Barras:** (A, D, G, J): 100 µm; (B, E, H, K): 50 µm; (C, F, I, L): 20 µm.



3.3 Tireoide

3.3.1 Grupos Controle

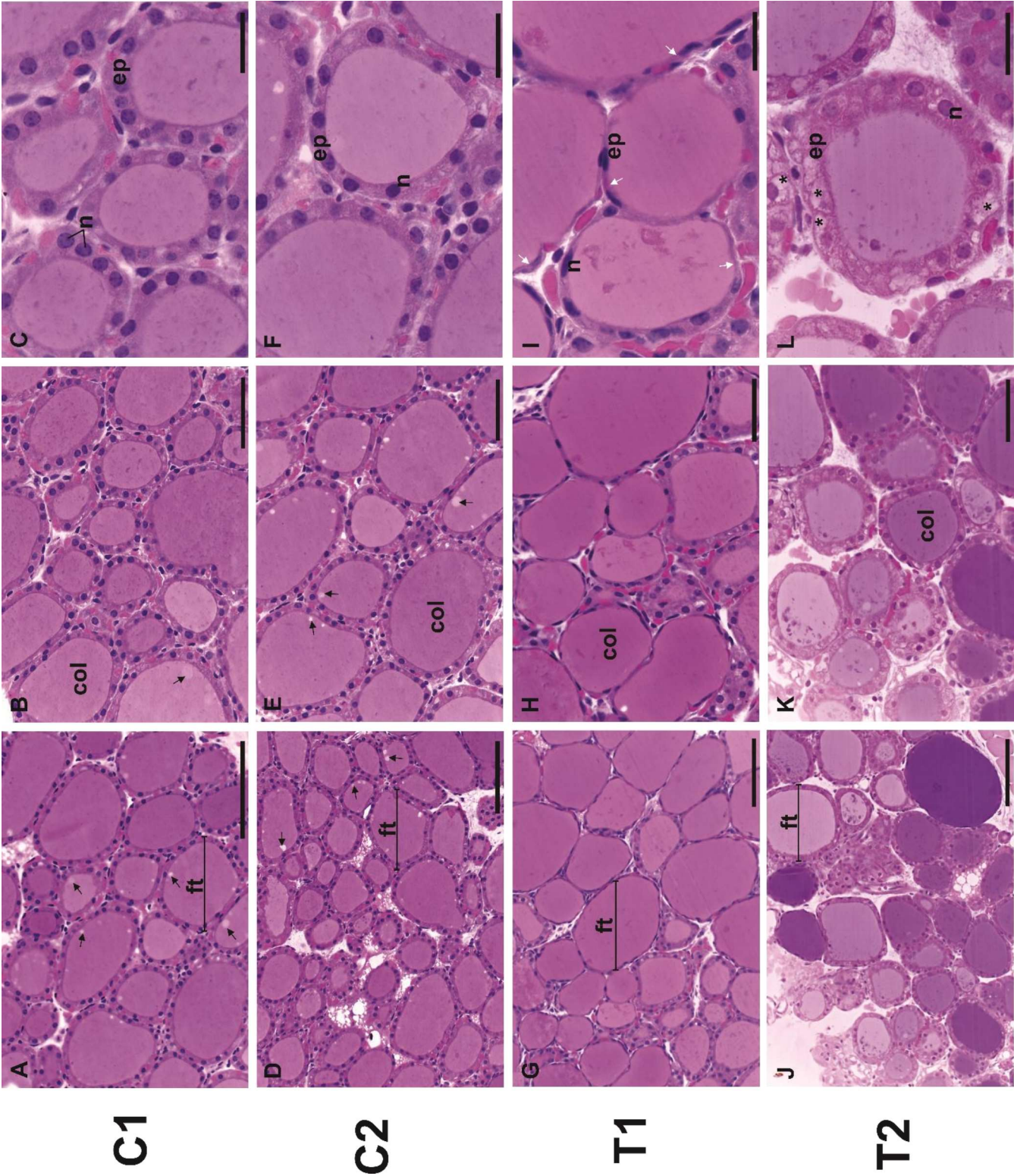
As análises histológicas da tireoide dos camundongos pertencentes aos Grupos Controle 1 (água destilada) (**Fig. 2A-C**) e 2 (etanol 50%) (**Fig. 2D-F**) mostraram características de um tecido íntegro e que corroboraram o já descrito por Junqueira e Carneiro (2017). Foi possível observar a presença de folículos tireoidianos, envoltos por um epitélio formado por células foliculares cúbicas mononucleadas o que indica que o mesmo estava em atividade (**Fig. 2A-F**). O interior dos folículos se apresentou preenchido pelo coloide (**Fig. 2B; 2E**). O aspecto homogêneo do colóide só ficou modificado em algumas regiões de contato (interno) epitélio folicular/colóide, onde observou-se um aspecto roído (pequenos espaços), confirmando que as células foliculares estavam ativas na transformação do colóide em hormônios tireoidianos (**Fig. 2A-B; 2D-E**).

3.3.2 Grupos Tratamento 1 (50 mg/mL *E. viscosa*) e 2 (50 mg/mL *L. schaueriana*)

A glândula tireoide do Grupo Tratamento 1 apresentou seus folículos com características que indicaram inatividade da glândula. As células foliculares perderam sua forma cúbica e passaram para pavimentosas, típico sinal de inatividade folicular (**Fig. 2G-I**), além de mostrarem núcleos picnóticos (**Fig. 2H-I**). O coloide presente no interior dos folículos não sofreu alterações quando comparado aos controles (**Fig. 2H**).

Nas tireoides das fêmeas alocadas no Grupo Tratamento 2 foi onde observou-se severas alterações morfológicas, o que sinalizou que as mesmas já não estariam fisiologicamente viáveis para desempenhar o seu papel na produção dos hormônios tireoidianos. As células do epitélio folicular perderam suas formas originais, o que provocou no próprio epitélio uma grande desorganização estrutural. A extensa vacuolização citoplasmática (**Fig. 2J-L**) alterou a posição dos núcleos nas células, os quais de centrais passaram a ocupar a sua periferia. O coloide presente no interior dos folículos foi marcado pela HE com diferentes intensidades de coloração (variando de fortemente a fracamente positivo), indicando que o seu conteúdo também sofreu alterações severas (**Fig. 2K**). Foi também observado que os espaços intersticiais (conjuntivo) presentes entre os folículos foram grandemente aumentados nas tireoides dos indivíduos do tratamento 2.

Figura 2: Secções histológicas da tireoide de camundongos *Mus musculus* dos Grupos Controle 1-2 e Grupos Tratamento 1-2. **A-C:** Grupo Controle 1 (água destilada). **D-F:** Grupo Controle 2 (etanol 50%). **G-I:** Grupo Tratamento 1 (50 mg/mL *E. viscosa*). **J-L:** Grupo Tratamento 2 (50 mg/mL *L. schaueriana*). **col:** coloide; **ep:** epitélio folicular; **ft:** folículo tireoidiano; **n:** núcleo das células foliculares; **asterisco:** vacuolização citoplasmática; **seta branca:** achatamento do epitélio folicular; **seta preta:** espaços onde há transformação ativa de coloide em hormônios tireoidianos. **Barras:** (A, D, G, J): 100 µm; (B, E, H, K): 50 µm; (C, F, I, L): 20 µm.



4 DISCUSSÃO

Produtos naturais e extraídos de plantas que tem sido utilizados como pesticidas e acaricidas naturais vem sendo considerados como uma alternativa eficiente no controle de diversos artrópodes, entretanto pouco ainda se tem conhecimento sobre o modo de ação e principalmente, quais seriam as dosagens seguras para que estes fossem utilizados em hospedeiros sem, no entanto, causarem prejuízos aos organismos não-alvos. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo principal demonstrar quais seriam os efeitos causados pela exposição aos óleos essenciais (OEs) de *Egletes viscosa* e *Lippia schaueriana*, em concentrações cuja eficácia como acaricida já foi estabelecida em estudos desenvolvidos em laboratório, sobre os tecidos hepático e tireoidiano de fêmeas de camundongos *Mus musculus*, modelos estes que foram utilizados simulando aqueles organismos não-alvos.

Segundo Quadros et al. (2020), os óleos essenciais consistem em uma mistura complexa de componentes orgânicos naturais e voláteis, que em sua maioria pertencem a classe dos terpenóides, considerados a maior classe química de ativos vegetais, e que inclui os monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos. Dentre esses, vários monoterpenos tem sido apontados como tendo potencial inseticida e acaricida e utilizados como princípio ativo de pesticidas (BOŽOVIC; PIROLI; RAGNO, 2015). No presente trabalho, os dados obtidos com a caracterização química dos OEs corroboraram os dados da literatura, confirmando que para *E. viscosa* o componente majoritário identificado seria o monoterpreno acetato de cis-isopinocarveila e para *L. schaueriana*, o monoterpreno óxido de piperitenona. Estes compostos seriam os mesmos reportados anteriormente por Vieira et al. (2006) em estudos com a macela-da-terra e Souza et al. (2018) com a lipia-da-serra.

Os resultados do presente estudo que foram obtidos das análises histológicas do fígado dos animais expostos a ambos os OEs, e alocados nos Grupos Tratamento 1 (50 mg/mL *E. viscosa*) e 2 (50 mg/mL de *L. schaueriana*) mostraram que houve nos hepatócitos vacuolização citoplasmática, a qual foi ainda mais severa no tratamento 1. Uma vez que o fígado é um órgão essencial para a sobrevivência dos mamíferos, principalmente por sua capacidade de metabolizar e degradar numerosas substâncias tóxicas e medicamentos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017), pode-se inferir que a extensa vacuolização citoplasmática aqui observada nos hepatócitos, seria uma estratégia de defesa destas células em virtude da exposição aos compostos tóxicos. Já foi reportado na literatura pertinente que a formação de vacúolos autofágicos contendo restos de citoplasma e de organelas danificados pela exposição, os quais seriam posteriormente digeridos pelos lisossomos ou exportados para o exterior da célula,

poderiam ainda dar condições para que as células e/ou o tecido permanecessem metabolicamente ativos (OLIVEIRA et al., 2009; CUNHA et al., 2017; CAMARGO-MATHIAS, 2018; MATOS et al., 2020).

Além da vacuolização citoplasmática, foi observado com frequência no tecido hepático dos camundongos pertencentes aos Grupos Tratamento 1 e 2 do presente estudo um aumento na população de células de Kupffer, assim denominados os macrófagos do fígado, corroborando estudos de Cunha et al. (2017) que analisaram o fígado de camundongos expostos aos acaricidas fipronil e timol, e observaram aumento destas células em decorrência da presença dos compostos tóxicos, estratégia que poderia estar relacionada a um aumento da eficiência de fagocitose e retirada dos xenobióticos do sistema, preservando assim a integridade do tecido/órgão.

Nos camundongos alocados no Grupo Tratamento 1 (50 mg/mL *E. viscosa*) verificou-se que o núcleo dos hepatócitos apresentou picnose, indicando um processo avançado de condensação da cromatina. De acordo com Majeed et al. (2015) em estudos com fígado de camundongos *Mus musculus* expostos a produtos tóxicos, a condensação da cromatina nos hepatócitos seria o primeiro indício de intoxicação celular e de degeneração do tecido hepático e, portanto, o que provavelmente também estaria ocorrendo com os camundongos aqui analisados e alocados no grupo Tratamento 1, dado que fortemente sugeriu que o OE de *E. viscosa* na concentração de 50 mg/mL seria potencialmente danoso ao sistema a ponto de induzir processos de degeneração celular no fígado dos camundongos a ele expostos.

Naqueles camundongos alocados no Grupo Tratamento 2 (50 mg/mL *L. schaueriana*) verificou-se a presença de granulações citoplasmáticas nos hepatócitos com característica fortemente acidófila, diferentes daquelas rotineiramente encontradas no citoplasma dos hepatócitos e as quais teriam natureza glicogênica, assim como o observado nos indivíduos dos grupos controle. A presença desse tipo de granulação poderia indicar que alterações estariam ocorrendo intracelularmente devido a presença do composto tóxico, ou ainda poderia ser uma evidência que sinalizaria o aumento do pigmento lipofuscina, acumulado em células de diversos tecidos, incluindo o hepático, no interior de lisossomos e marcados por meio de técnicas histoquímicas, as quais não foram aqui utilizadas. A lipofuscina é um pigmento composto por uma mistura complexa de macromoléculas (proteínas, lipídios e açúcares) com múltiplas origens metabólicas e que tem um papel fundamental na senescência celular (MORENO-GARCÍA et al., 2018), entretanto nas duas últimas décadas, a literatura pertinente vem demonstrando sua importância também no desequilíbrio e colapso da homeostase intracelular e sua interferência nos processos de autofagia, na estabilidade lisossomal e na propagação de

espécies reativas de oxigênio, estas últimas liberadas em grandes quantidades durante o estresse oxidativo (SNYDER; CRANE, 2019). Recentemente estudos desenvolvidos por Saif et al. (2020) mostraram também a ocorrência de acúmulos intracelulares de pigmentos semelhantes à lipofuscina no tecido hepático de camundongos expostos ao tetracloreto de carbono (hepatotóxico), postulando que essa condição estaria diretamente relacionada com o estresse oxidativo e que seria desencadeada por fatores patológicos ou por exposição a compostos tóxicos.

Nos camundongos alocados no Grupo Tratamento 2 observou-se que houve aumento do espaço presente entre os cordões de hepatócitos, bem como uma desorganização destas células, alterações que sugeriram que poderia estar ocorrendo a dilatação/obstrução dos sinusóides hepáticos, o que seria de se esperar, visto esta ser uma característica comum que vem sendo observada em fígados de organismos expostos a compostos tóxicos. Alguns autores como Uzunhisarcikli e Aslanturk (2019) que avaliaram os efeitos da substância bisfenol A (BPA) e Lakshmi et al. (2018) que avaliou os do acetaminofeno (paracetamol; APAP), substâncias indutoras de hepatotoxicidade, descreveram a ocorrência de dilatação/obstrução sinusoidal hepático em ratos postulando que este efeito seria consequência do estresse oxidativo em decorrência da exposição às hepatotoxinas.

Assim, considerando o acúmulo de granulações semelhantes à lipofuscina no citoplasma dos hepatócitos e a evidência de dilatação/obstrução sinusoidal observados no presente estudo, pode-se sugerir que o OE de *L. schaueriana* na concentração de 50 mg/mL seria hepatotóxico, induzindo o estresse oxidativo nas células do fígado de camundongos.

O outro órgão que foi aqui analisado em resposta a exposição dos camundongos a 50 mg/mL do OE de *E. viscosa* foi a tireoide, glândula endócrina que regula grande parte do metabolismo dos mamíferos e cuja integridade é fundamental para que suas funções sejam executadas com precisão. Assim no presente estudo pode-se observar que, em decorrência da exposição ao tóxico, alterações morfológicas surgiram, principalmente nos folículos tireoidianos, alterações estas que variaram desde a mudança de morfologia das células foliculares as quais passaram de cúbicas para pavimentosas (“achatadas”) com núcleos que passaram de ativos (cromatina dispersa) a menos ativos (picnóticos) até a desorganização do epitélio folicular e o aumento do folículo. As alterações observadas no formato das células foliculares provavelmente tenham sido decorrentes da inibição da atividade provocada pela presença do tóxico no sistema. É sabido que folículos tireoideanos que estão envoltos por um epitélio escamoso, tem menor atividade na síntese/transformação dos componentes que farão parte da composição dos hormônios tireoideanos e que o aumento do volume dos folículos

ocorre pelo maior armazenamento de Tg no coloide e que não está sendo ativamente absorvido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; SAKR; STEENKAMP, 2021). Numa glândula ativa a proteína tireoglobulina (Tg) presente no coloide está sendo reabsorvida pelas células foliculares para síntese dos hormônios tireoidianos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Observação de tireoide inativa e caracterizada pela dilatação/aumento folicular e presença de epitélio pavimentoso já foi reportada em roedores expostos a xenobióticos (CAPEN; MARTIN, 1989), pesticidas (CUNHA et al., 2017; REQUENA et al., 2019) e a outros compostos tóxicos como o óxido de zinco (SAKR; STEENKAMP, 2021) e que foram aqui corroborados. Os resultados sugeriram ainda, que o OE de *E. viscosa* na concentração de 50 mg/mL não somente inibiu o grau de atividade da tireoide, mas induziu alterações degenerativas no tecido, verificadas pela presença de núcleos picnóticos nas células foliculares.

Nos camundongos expostos a 50 mg/mL de OE de *L. schaueriana*, também foram observadas importantes alterações na tireoide que incluíram extensa vacuolização citoplasmática nas células foliculares e desorganização morfoestrutural do próprio epitélio folicular o que acarretou certamente na inatividade e degeneração destas estruturas tireoideanas, e conseqüentemente incapacitou essa glândula ou pelo menos parte dela de executar suas funções na produção dos hormônios tireoideanos.

Ainda, nestes indivíduos foram observadas alterações histoquímicas no colóide presente no interior dos folículos, o qual variou de fracamente a fortemente positivo em contraste com a coloração fortemente positiva e homogênea presente no colóide dos indivíduos dos grupos controle, corroborando os achados de Cunha et al. (2017) em estudos com a tireoide de camundongos *Mus musculus* expostas aos acaricidas fipronil e timol.

Ainda com relação as alterações morfológicas, observou-se um aumento dos espaços intersticiais presente entre os folículos tireoidianos nos indivíduos expostos a 50 mg/mL do OE de *L. schaueriana* sugerindo a possibilidade de ter havido um acúmulo de líquido intersticial nestes espaços e a possível instalação de um edema na glândula em função da presença do produto tóxico. Hossain (2019) reportou esta mesma alteração na tireoide de coelhos expostos ao carbimazol (indutor de hipotireoidismo), sugerindo que o acúmulo de líquido e a formação de edemas entre os folículos tireoidianos se deveria provavelmente a uma alteração na permeabilidade dos vasos sanguíneos da região, os quais ficariam impossibilitados de realizar a remoção do líquido em consequência da intoxicação pelo composto tóxico. Esta hipótese também foi postulada por Ferreira et al. (2007) e Cunha et al. (2017) em estudos com a tireoide de camundongos expostos ao propiltiouracil (indutor de hipotireoidismo) e ao timol e fipronil (acaricidas), respectivamente.

De maneira geral, o fígado e a tireoide são glândulas que estão interligadas uma vez que a disfunção de uma implica necessariamente na perda de integridade da outra. Ao mesmo tempo em que os hormônios tireoidianos auxiliam na regulação da função hepática, o fígado por sua vez, ativa e desativa os hormônios da tireoide por meio do processo de desiodação (transformação dos hormônio tireoidiano T4 em T3), além de regular o transporte e o metabolismo destes hormônios (SAKR; STEENKAMP, 2021).

Assim, as informações reportadas no presente estudo o qual simulou a exposição de hospedeiros de carrapatos a bioativos de origem natural extraídos das plantas *E. viscosa* e *L. schaueriana* e com potencial de controlar esses artrópodes, trouxeram à luz um alerta de que mesmo tendo origem natural (não sintética), esses potenciais acaricidas provocaram severos danos tanto no tecido hepático quanto no tireoideano dos camundongos a eles expostos, quando os mesmos foram testados na concentração de 50 mg/mL, provocando nestes órgãos danos muitas vezes irreversíveis e certamente trazendo prejuízos na sua fisiologia. Ressalte-se ainda que as informações inéditas aqui disponibilizadas e resultado do desenvolvimento deste trabalho reforçam a importância dos estudos sobre a toxicidade de substâncias naturais com potencial acaricida na exposição de organismos não-alvos, substâncias estas frequentemente consideradas seguras para serem utilizadas no controle de pragas, incluindo de carrapatos.

Agradecimentos

Nós agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processos 2019/02831-3, 2019/20185-1, 2018/02999-9), à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de financiamento – 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, bolsa de produtividade PQ-1A) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

BOŽOVIC, M.; PIROLI, A.; RAGNO, R. *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: Biological activities and chemistry.

Molecules, v. 20, n. 5, p. 8605–8633, 13 maio 2015.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and**

therapeutic perspectives. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2018.

CAPEN, C. C.; MARTIN, S. L. The Effects of Xenobiotics on the Structure and Function of Thyroid Follicular and C-Cells. **Toxicologic Pathology**, v. 17, n. 2, p. 266–293, 1989.

CUNHA, E. L. R. da et al. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal of Histology and Histopathology**, v. 4, n. 1, p. 9, 2017.

FERREIRA, E. et al. Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1245–1249, 2007.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L. Herbal Medicine Today: Clinical and Research Issues. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 4, n. Suppl 1, p. 37, set. 2007.

HOSSAIN, A. O. Carbimazole and its Effects on Thyroid Gland of Female Rabbits. **Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 310–316, 2019.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. C. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 13th. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

LAKSHMI, T. et al. Seed and bark extracts of *Acacia catechu* protects liver from acetaminophen induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress, antioxidant enzymes and liver function enzymes in Wistar rat model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, p. 838–844, 1 dez. 2018.

MAJEED, M. F.; HUSSEIN, A. J.; AL-KHALID, W. J. M. Evaluation the therapeutic role of some antioxidants in cellular and histological alterations which caused by the acute toxicity of lead in female mice (*Mus musculus* L.). **Basrah Journal Of Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 343–366, 2015.

MATOS, R. S. et al. Thymol: Effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 1, p. 101308, 1 jan. 2020.

MENGISTE, B. et al. Acute skin irritation, acute and sub-acute oral toxicity studies of *Rosmarinus officinalis* essential oils in mice and rabbit. v. 12, n. 26, p. 389–396, 2018.

MORENO-GARCÍA, A. et al. An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. **Frontiers in Neuroscience**, v. 0, n. JUL, p. 464, 5 jul. 2018.

OLIVEIRA, P. R. de et al. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1255–1264, 1 jun. 2009.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201–214, 1 ago. 2001.

QUADROS, D. G. et al. Plant-Derived Natural Compounds for Tick Pest Control in Livestock and Wildlife: Pragmatism or Utopia? **Insects**, v. 11, n. 8, p. 490, 2020.

RAO, V. S. N. et al. Ternatin, an anti-inflammatory flavonoid, inhibits thioglycolate-elicited rat peritoneal neutrophil accumulation and LPS-activated nitric oxide production in murine macrophages. **Planta medica**, v. 69, n. 9, p. 851–3, set. 2003.

REQUENA, M. et al. Environmental exposure to pesticides and risk of thyroid diseases. **Toxicology Letters**, v. 315, n. 15, p. 55–63, 2019.

SAIF, M. et al. Non-invasive monitoring of chronic liver disease via near-infrared and shortwave-infrared imaging of endogenous lipofuscin. **Nature Biomedical Engineering**, v. 4, n. 8, p. 801–813, 1 ago. 2020.

SAKA, M.; TADA, N. Acute and chronic toxicity tests of systemic insecticides, four neonicotinoids and fipronil, using the tadpoles of the western clawed frog *Silurana tropicalis*. **Chemosphere**, v. 270, p. 129418, 1 maio 2021.

SAKR, S.; STEENKAMP, V. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and histopathological toxicity in the thyroid gland and liver of rats. **Toxicological & Environmental Chemistry**, p. 1–24, 2021.

SNYDER, A.; CRANE, J. Histology, Lipofuscin. **StatPearls**, 7 fev. 2019.

SOUZA, A. V. de et al. Chemical Composition of Essential Oil of Leaves from *Lippia schaueriana* Mart. Collected in the Caatinga Area. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2480, 27 set. 2018.

STOJANOVIĆ, N. M. et al. Toxic essential oils, part VI: Acute oral toxicity of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) essential oil in BALB/c mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 133, p. 110794, 1 nov. 2019.

TRIPATHI, A. K. et al. Piperitenone Oxide as Toxic, Repellent, and Reproduction Retardant

Toward Malarial Vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 4, p. 691–698, 1 jul. 2004.

UZUNHISARCIKLI, M.; ASLANTURK, A. Hepatoprotective effects of curcumin and taurine against bisphenol A-induced liver injury in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 36, p. 37242–37253, 1 dez. 2019.

VIEIRA, G. A. B. et al. Chemical composition of teas from two cultivated chemotypes of *Egletes viscosa* (“Macela-da-terra”). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 43–47, 2006.

DISCUSSÃO GERAL

5 DISCUSSÃO GERAL

Os carrapatos e as doenças causadas por eles geram grandes impactos na economia mundial e na saúde pública e animal. As altas taxas de transmissão de agentes de alta patogenicidade e virulência através dos carrapatos, a facilidade com que estes ectoparasitas desenvolvem resistência a diferentes tipos de acaricidas e os crescentes relatos de contaminação do ambiente por acaricidas sintéticos e da toxicidade destes para hospedeiros e organismos não-alvo, tem estimulado o interesse e a busca por outras alternativas de controle (QUADROS et al., 2020).

Os produtos extraídos de plantas, tais como os óleos essenciais (OEs), representam uma alternativa promissora de controle, visto possuírem em sua composição grande variedade de moléculas bioativas com potencial farmacológico e com atividades inseticida e acaricida (CAMARGO-MATHIAS, 2018). Dentre estes produtos estão os OEs das plantas *Egletes viscosa* Less. (Asteraceae) (macela-da-terra) e *Lippia schaueriana* Mart. (Verbenaceae) (lipia-da-serra), cujos bioativos já demonstraram ter diversas propriedades farmacológicas com relatos de ações inseticida e acaricida destes óleos e de seus compostos majoritários (TRIPATHI et al., 2004; VIEIRA et al., 2006; BATISTA et al., 2012; BOŽOVIC; PIROLI; RAGNO, 2015; ZEKRI et al., 2016; SOUZA et al., 2018; ZHOU et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020a).

Nesse sentido, o presente estudo trouxe os primeiros relatos sobre o potencial dos óleos essenciais de *E. viscosa* e *L. schaueriana* sobre a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas do carrapato-do-cão, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., estabelecendo concentrações subletais (12.5, 25 e 50 mg/mL dos OEs) que posteriormente foram utilizadas para verificar os efeitos destes óleos na morfofisiologia dos ovários, órgão de Gené e singânglio das fêmeas ingurgitadas

a eles expostas. Além disso, realizou-se o estudo do potencial tóxico destes OEs sobre o fígado e tireoide de camundongos *Mus musculus*, modelos de organismos não-alvo, simulando a aplicação de um acaricida comercial.

Devido as variações que os OEs podem sofrer dependendo de suas interações com o ambiente e de fatores abióticos (luminosidade, temperatura, pluviosidade, solo, época e horário de coleta, entre outros), a identificação dos componentes presentes nestes é essencial. Neste estudo, a caracterização química dos OEs revelou 27 componentes no óleo de *E. viscosa* e 18 em *L. schaueriana*, totalizando mais de 98% dos constituintes de ambos, e apontou como componentes majoritários os monoterpenos acetato de cis-isopinocarveíla (68.41%) e óxido de piperitenona (64.36%), respectivamente. *E. viscosa* é reportada na literatura por apresentar duas variantes, quimiotipos A e B, as quais diferem entre si pela morfologia de partes vegetativas, por alterações nas sequências de DNA e principalmente pela constituição química, esta última podendo apresentar majoritariamente o acetato de trans-pinocarveíla (quimiotipo A) ou o acetato de cis-isopinocarveíla (quimiotipo B) (CUNHA, 2003; SILVEIRA; PESSOA, 2005; VIEIRA et al., 2006; BATISTA et al., 2012), resultados que corroboraram os estudos anteriores sobre o OE de *E. viscosa* e confirma se tratar do quimiotipo B. Além disso, a análise cromatográfica do OE de *L. schaueriana* também corroborou estudos prévios (SOUZA et al., 2018), confirmando o óxido de piperitenona como seu principal constituinte.

No presente estudo a exposição ao OE de *E. viscosa* afetou significativamente os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l., especialmente nas concentrações de 25 e 50 mg/mL, as quais causaram severa redução nas taxas de oviposição e de viabilidade dos ovos, resultando em uma eficácia geral de 70,8% e 92,7% respectivamente. Estes resultados podem estar relacionados ao modo de ação do acetato de cis-isopinocarveíla, o qual muito embora não se tenha registros de ações farmacológicas diretamente atribuídas a este composto, alguns de seus derivados não-voláteis como a ternatina e a escopoletina apresentam atividade acaricida e inseticida. A escopoletina, afetou diretamente a oviposição de ácaros da espécie *Tetranychus cinnabarinus* via inibição da expressão de genes que regulam o transporte de íons Ca^{2+} no meio intracelular, causando o acúmulo destes íons nas células e induzindo morte celular por apoptose (ZHOU et al., 2019; MA et al., 2020). Corroborando estes achados, Oliveira et al. (2008) descreveram que a saturação de Ca^{2+} nos ovócitos de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l. expostas ao fipronil teria inibido a função mitocondrial e causado a morte destas células. Desta forma, sugere-se aqui que o acetato de cis-isopinocarveíla, semelhante a seu derivado escopoletina e ao fipronil, induziria o aumento de íons Ca^{2+} nos ovócitos das fêmeas de *R. sanguineus* s.l. expostas ao OE de *E. viscosa*,

interferindo no desenvolvimento destes e ocasionando a redução nas taxas de oviposição e na viabilidade dos ovos.

Para o OE de *L. schaueriana* verificou-se eficácia de 53,4 % (25 mg/mL) e 84,6% (50 mg/mL), nas maiores concentrações aqui testadas que também afetaram significativamente as taxas de oviposição e de eclosão dos ovos, corroborando Oliveira et al. (2020) que reportaram que este mesmo OE foi reduziu significativamente a viabilidade de ovos, larvas e pupas da mosca-minadora (*Liryomiza sativae*). Estudos com os óleos essenciais de *Mentha pulegium* e *Salvia nilotica* apresentaram o óxido de piperitenona na composição e comprovaram sua atividade acaricida sobre o ácaro *T. turkestan*i e o carrapato *R. appendiculatus*, respectivamente. Embora o modo de ação do óxido de piperitenona não esteja ainda bem esclarecido em artrópodes, sabe-se que possui alta toxicidade em insetos-praga (BOŽOVIC; PIROLI; RAGNO, 2015) com ação neurotóxica nestes organismos, através da inibição da acetilcolinesterase durante a transmissão do impulso nervoso, ocasionando um acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica e um estado de hiperestimulação colinérgica (excitação, convulsão, paralisia e morte) (MIYAZAWA et al., 1998).

No presente estudo também foi verificada a ocorrência de alterações no aspecto dos ovos produzidos pelas fêmeas de *R. sanguineus* s.l. expostas aos OEs, os quais apresentaram-se ressecados, escurecidos e desagregados da massa em contraste aos ovos íntegros, brilhantes e unidos em massa observados nos controles, corroborando dados de outros autores que observaram estas características em ovos de *R. sanguineus* s. l. expostos ao acaricida natural timol (MATOS et al., 2020) e em pupas de *L. sativae* expostas ao OE de *L. schaueriana* (OLIVEIRA et al., 2020). Os resultados aqui obtidos permitiram postular que as reduções nas taxas de oviposição e na viabilidade dos ovos produzidos pelas fêmeas de *R. sanguineus* s.l. expostas aos óleos e que as alterações morfológicas encontradas nestes ovos seriam consequência de danos causados não somente à morfofisiologia dos ovários, mas também ao órgão de Gené, visto este ser um importante órgão para os carrapatos e responsável pela síntese e liberação de secreções que recobrem externamente os ovos durante a postura, conferindo a eles proteção contra o ressecamento e os mantendo unidos em uma massa (CAMARGO-MATHIAS, 2018; MATOS et al., 2020).

A análise morfohistológica do órgão de Gené de fêmeas expostas às concentrações subletais dos óleos de *E. viscosa* e *L. schaueriana* (12.5, 25 e 50 mg/mL) confirmou que este órgão foi severamente afetado pela exposição, especialmente nas duas maiores concentrações, com danos tanto nas glândulas tubulares quanto nas acessórias. Nas tubulares dos grupos expostos as concentrações de 25 e 50 mg/mL dos OEs verificou-se alterações na membrana

basal (rompimentos e dobramentos), bem como a perda do formato original das células secretoras (de cilíndricas a totalmente amorfas), o que provocou extensa desorganização do epitélio, dados estes que corroboraram estudos anteriores que postularam que a membrana basal, seria a mais suscetível a danos causados por compostos tóxicos circulantes na hemolinfa (neste caso, os OEs) (DALEY et al., 2012; JAYADEV; SHERWOOD, 2017), e assim sendo abriria uma porta para que os OEs passassem para o interior do órgão e lá causassem nas células e no epitélio secretor as alterações que foram observadas. Nas glândulas acessórias, também observou-se intensas alterações nas células acinares dos grupos expostos às concentrações de 25 e 50 mg/mL do OE de *E. viscosa* e de *L. schaueriana*, as quais apresentaram hipertrofia, núcleo com condensação da cromatina e cariorrexe ou perda dos limites nucleares, corroborando resultados de Matos et al. (2020) sobre o modo de ação do timol sobre o órgão de Gené de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l. Ainda, aqui verificou-se a ocorrência de extensa vacuolização citoplasmática nas células das glândulas tubulares e nas das acessórias em decorrência da exposição aos OEs, semelhante ao reportado por outros autores para células de outros órgãos de carrapatos na pós-exposição a acaricidas (NODARI et al., 2011; ROMA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; PEREIRA et al., 2017; LIMA DE SOUZA et al., 2019; MATOS et al., 2019, 2020; KONIG et al., 2021). Ressalte-se que a formação destes vacúolos poderia indicar uma estratégia de defesa das células na tentativa de eliminar organelas ou partes do citoplasma danificados pelos tóxicos e manter ainda a integridade do tecido.

Como era de se esperar considerando o impacto significativo que os OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana* provocaram sobre os parâmetros da biologia reprodutiva das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l., especialmente na redução das taxas de oviposição e viabilidade dos ovos, a morfofisiologia dos ovócitos dos indivíduos aqui analisados também sofreu severas alterações, sendo a exposição ao OE de *L. schaueriana* mais agressiva nos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento (I a III), enquanto que o OE de *E. viscosa* provocou danos aos ovócitos em todos os estágios (I a V). Segundo Oliveira et al. (2015b), Anholeto et al. (2018) e Lima-de-Souza et al. (2019), ovócitos em estágios iniciais seriam mais susceptíveis a ação de tóxicos circulantes na hemolinfa, em decorrência da deposição ainda não concluída do cório, visto esta ser uma membrana que atua como barreira protetora dos ovócitos e que somente começaria a ser depositada no final do estágio II e início do III. Nessa perspectiva, König et al. (2020) e Reis et al. (2021) afirmaram que ao danificar ovócitos em estágios iniciais, a quantidade de ovos viáveis depositados pelas fêmeas no ambiente certamente seria reduzida, dados que o presente trabalho corroborou.

Os dados morfológicos aqui obtidos permitiram concluir que, comparativamente, ao OE de *L. schaueriana*, o OE de *E. viscosa* seria mais citotóxico para os ovócitos de *R. sanguineus* s.l., uma vez que todas as concentrações testadas (12.5, 25 e 50 mg/mL) interferiram na estrutura do cório, o qual apresentou ruptura, dobras e descolamento nos ovócitos V. Ambos os OEs interferiram na dinâmica da vitelogênese, causando fusão dos grânulos de vitelo nos ovócitos IV e ruptura destes nos ovócitos V, entretanto enquanto estes danos foram visíveis na exposição ao OE de *E. viscosa* em todas as concentrações, para o OE de *L. schaueriana* apenas a concentração de 50 mg/mL foi capaz de provocar tais alterações. Danos na estrutura e composição dos grânulos vitelínicos poderia levar a um déficit nutritivo do embrião e a produção de ovos inviáveis, impactando significativamente no desenvolvimento e na sobrevivência dos novos indivíduos (REIS et al., 2021) e também poderia explicar a severa redução na taxa de viabilidade dos ovos produzidos por fêmeas expostas ao OE de *E. viscosa* verificada durante as análises dos parâmetros biológicos.

Além dos ovários e do órgão de Gené, o singânglio (sistema nervoso central, SNC) é considerado um importante órgão-alvo no controle de infestações de carrapatos, sendo que tanto acaricidas sintéticos como a permetrina (ROMA et al., 2013) e a deltametrina (PEREIRA et al., 2017) quanto naturais como o timol (MATOS et al., 2019) agem como neurotóxicos. Nesse sentido, ficou aqui demonstrado que os OEs de *E. viscosa* e de *L. schaueriana* provocaram severos danos no singânglio das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l. em todas as concentrações testadas (12.5, 25 e 50 mg/mL) e de maneira dose-dependente. As principais alterações em decorrência da exposição foram irregularidades na estrutura das membranas externas (neurilema e perineuro), degeneração da região cortical com a presença de células neuronais com núcleos hipertróficos, picnóticos e até fragmentados, vacuolização citoplasmática e desorganização das fibras da neurópila, dados estes que corroboraram os obtidos de estudos anteriores sobre a ação neurotóxica de acaricidas (ROMA et al., 2013; PEREIRA et al., 2017; MATOS et al., 2019). O avançado processo de morte celular observado no córtex e a completa desorganização estrutural do tecido nervoso dos indivíduos expostos a concentração de 50mg/mL de ambos os OEs, sugeriram que estes possuem um potencial altamente neurotóxico em *R. sanguineus* s.l. O SNC sendo responsável por regular todas as outras funções sistêmicas dos carrapatos, com as alterações observadas no singânglio estaria impedido de realizar com sucesso suas funções.

O uso de produtos naturais e extraídos de plantas como pesticidas e acaricidas naturais é frequentemente considerado uma alternativa eficiente e segura ao ambiente e à saúde animal, entretanto é importante ressaltar que a dosagem estabelece a diferença entre um produto tóxico

e um medicamento. Assim, estudos que avaliam as concentrações de potenciais acaricidas naturais cujos efeitos podem vir a ser prejudiciais a hospedeiros e organismos não-alvo são essenciais para definir dosagens seguras a serem utilizadas (QUADROS et al., 2020). Sob essa perspectiva, o presente trabalho também buscou demonstrar os efeitos causados pela exposição aos OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana*, na concentração de 50 mg/mL (considerada a mais eficiente nos estudos anteriores), em camundongos *Mus musculus*, modelos de organismos não-alvo, verificando alterações na morfologia de dois importantes órgãos indicadores de toxicidade e com funções diretamente relacionadas entre si, a saber o fígado e a tireoide.

O tecido hepático dos camundongos expostos aos OEs apresentou importantes alterações que indicariam uma estratégia de defesa para manter a integridade do órgão: a) a vacuolização citoplasmática, como um processo de envelopamento de organelas e partes do citoplasma possivelmente danificados em contato com os óleos (OLIVEIRA et al., 2009; CUNHA et al., 2017; CAMARGO-MATHIAS, 2018; MATOS et al., 2020) e b) o aumento na quantidade de células de Kupffer, macrófagos responsáveis pela fagocitose e remoção de substâncias prejudiciais no fígado (CUNHA et al., 2017). Ainda, no tratamento com 50 mg/mL do OE de *E. viscosa*, muitos hepatócitos apresentaram picnose, indicando um avançado processo de condensação da cromatina nuclear e indicativo de degeneração no tecido em decorrência da exposição (MAJEED; HUSSEIN; AL-KHALID, 2015). Importantes alterações também foram encontradas no fígado dos animais expostos ao OE de *L. schaueriana*, como a presença de pigmentos semelhantes à lipofuscina no citoplasma dos hepatócitos e a evidência de dilatação e obstrução dos sinusóides, o que causou desorganização dos cordões de hepatócitos. Estes resultados corroboraram os de outros estudos sobre os efeitos de hepatotoxinas em roedores e indicaram que o OE de *L. schaueriana* induziu o estresse oxidativo nas células do fígado dos camundongos a ele expostos (LAKSHMI et al., 2018; UZUNHISARCIKLI; ASLANTURK, 2019; SAIF et al., 2020).

Considerando que o fígado tem importante atividade na regulação da síntese de hormônios tireoidianos, os quais posteriormente também auxiliarão na regulação da função hepática, as alterações descritas neste estudo para o tecido hepático dos animais expostos aos OEs certamente implicariam em danos na tireoide, o que também ficou confirmado através das análises morfohistológicas deste órgão nos animais expostos aos OEs de *E. viscosa* e especialmente em *L. schaueriana*. No grupo exposto a 50 mg/mL do OE de *E. viscosa* foram verificadas alterações que sugeriram inibição na atividade da tireoide, devido ao aumento no tamanho dos folículos tireoideanos em razão do acúmulo de coloide no interior pela deficiência de absorção do mesmo pelas células foliculares, bem como pela presença de um epitélio

folicular pavimentoso em contraste ao cúbico observado nos controles (foliculos ativos) e ainda, pelo início de um processo degenerativo no tecido, verificado pela presença de muitos núcleos picnóticos nas células foliculares. Estes resultados corroboraram aqueles descritos por outros autores no tecido tireoidiano de roedores expostos a tóxicos (CAPEN; MARTIN, 1989; CUNHA et al., 2017; REQUENA et al., 2019; SAKR; STEENKAMP, 2021).

A exposição ao OE de *L. schaueriana* causou na tireoide intensa desorganização estrutural o que certamente levaria a uma degeneração parcial ou até mesmo total da tireoide nos animais expostos, alterações estas que foram: a) extensa vacuolização citoplasmática nas células foliculares; b) alterações na composição do coloide, o qual apresentou variação na intensidade de coloração e provavelmente de composição e c) aumento dos espaços intersticiais entre os foliculos, indicando acúmulo de liquido intersticial e possivelmente a instalação de um edema. Estas alterações também corroboraram estudos anteriores sobre os efeitos tóxicos de pesticidas e acaricidas em organismos não-alvo desenvolvidos por outros autores (CUNHA et al., 2017; SAKR; STEENKAMP, 2021). Todas as alterações aqui descritas em decorrência da exposição aos OEs sugeriram uma disfunção generalizada na glândula tireoide, o que consequentemente levaria a uma incapacidade do órgão em sintetizar e liberar os hormônios tireoideanos, fundamentais nos vários processos metabólicos dos animais, incluindo a atividade do fígado, rins, coração e cérebro, e interferindo diretamente no crescimento e no desenvolvimento dos indivíduos expostos.

De maneira geral, a informações trazidas à luz com o desenvolvimento do presente trabalho confirmaram o potencial dos óleos essenciais das plantas *Egletes viscosa* e *Lippia schaueriana* no controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato-do-cão *Rhipicephalus sanguineus* s. l., especialmente nas concentrações de 25 e 50 mg/mL, interferindo diretamente na biologia reprodutiva destas através da redução na oviposição e da viabilidade dos ovos, além de interferir no desenvolvimento e na sobrevivência de novos indivíduos, visto os ovários, o órgão de Gené e o singânglio terem tido sua morfofisiologia alteradas.

As informações obtidas nesse estudo também reforçam a importância do desenvolvimento de estudos sobre a toxicidade de substâncias naturais com potencial acaricida sobre organismos não-alvo, no caso em tela de hospedeiros de carrapatos, para que estes se e quando expostos aos mesmos não sofram alterações que lhes causem prejuízos.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- a) Os OEs obtidos das plantas *E. viscosa* Less. e *L. schaueriana* Mart. mostraram-se em testes de laboratório, ser efetivos no controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato-docão *R. sanguineus* s. l.
- b) *E. viscosa* reduziu as taxas de oviposição e a viabilidade dos ovos nas concentrações de 12.5, 25 e 50 mg/mL, e obteve eficácia no controle de 58.9%, 70.8% e 92.7%, respectivamente.
- c) *L. schaueriana* interferiu na oviposição e na viabilidade dos ovos nas concentrações de 25 e de 50 mg/mL, cuja eficácia foi de 53.4% e 84.6%, respectivamente. A exposição a 12.5 mg/mL agiu sobre a viabilidade dos ovos e registrou eficácia de 39.3%.
- d) Os ovos das fêmeas expostas às diferentes concentrações do OE de *E. viscosa* e *L. schaueriana* (12.5, 25 e 50 mg/mL) sofreram dessecação, escurecimento e aspecto desagregado em contraste aos ovos produzidos pelas fêmeas dos grupos controle, as quais se mostraram íntegras, brilhantes e unidas em uma única massa.
- e) Ambos os OEs afetaram a morfologia das glândulas tubulares e acessórias que compõe o órgão de Gené nas fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l., especialmente nas concentrações de 25 e 50 mg/mL, causando degeneração no tecido.
- f) A exposição ao OE de *L. schaueriana* foi mais agressiva nos ovócitos em estágios iniciais (I a III), enquanto o OE de *E. viscosa* atuou em todos os estágios (I a V).
- g) Os OEs de *E. viscosa* e *L. schaueriana* foram neurotóxicos provocando danos morfológicos no singânglio das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s. l., de maneira dose-dependente.

- h) Os OEs de *E. viscosa* e de *L. schaueriana* na concentração de 50 mg/mL foram tóxicos para os camundongos *Mus musculus* causando danos estruturais aos tecidos hepático e tireoideano.

REFERÊNCIAS

- AGNANIET, H. et al. Volatile constituents and antioxidant activity of essential oils from *Lippia multiflora* Mold. growing in Gabon. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 1, p. 34–38, 1 jan. 2005.
- ALBUQUERQUE, C. C. de et al. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 527–535, jul. 2006.
- AMRUTHA, A. et al. Deltamethrin resistant alleles predominate in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato in South India. **Experimental and Applied Acarology**, v. 84, n. 2, p. 485–496, 28 jun. 2021.
- ANHOLETO, L. A. **Ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) sobre a inibição da proliferação de células de linhagem tumoral**. 2014. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - campus de Rio Claro/SP, 2014.
- ANHOLETO, L. A. et al. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 1 jan. 2017.
- ANHOLETO, L. A. et al. Morphological alterations in the ovaries of *Amblyomma cajennense* semi-engorged ticks exposed to ethanolic extract of *Acmella oleracea*. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 11, p. 1347–1357, 8 nov. 2018.
- AQUINO, P. E. A. de et al. The association between drugs and herbal products: In vitro enhancement of the antibiotic activity by extracts of dry floral buttons of *Egletes viscosa* L. (macela). **European Journal of Integrative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 258–262, 1 maio 2015.
- ARAÚJO, A. A. S. et al. Antinociceptive activity and toxicological study of aqueous extract of *Egletes viscosa* Less (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 707–715, out. 2008.
- ARAÚJO, L. X. et al. Acaricidal activity of thymol against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under semi-natural conditions. **Parasitology Research**, v. 114, n. 9, p. 3271–3276, 4 set. 2015.
- ARNOSTI, A. et al. Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 569–574, 2011.
- BATISTA, J. M. M. et al. Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of *Egletes viscosa* (L.) Less., a Traditional Medicinal Plant from Northeastern Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 5, p. 818–824, 2012..
- BEG, S. et al. Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspectives. **Pharmacognosy reviews**, v. 5, n. 10, p. 120–37, jul. 2011.
- BORGES, L. M. F. et al. Resistência carrapaticida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, p. 87–95, 2007.
- BOŽOVIC, M.; PIROLI, A.; RAGNO, R. *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) essential

oil and its main constituent piperitenone oxide: Biological activities and chemistry. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8605–8633, 13 maio 2015.

BURLINI, L. et al. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: Is there a geographical pattern? **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, n. 4, p. 361–374, abr. 2010.

CALOU, I. B. F. et al. Topically applied diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) attenuate the dermal inflammation in mouse ear induced by tetradecanoylphorbol 13-acetate- and oxazolone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 8, p. 1511–1516, ago. 2008.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2018.

CAPEN, C. C.; MARTIN, S. L. The Effects of Xenobiotics on the Structure and Function of Thyroid Follicular and C-Cells. **Toxicologic Pathology**, v. 17, n. 2, p. 266–293, 1989.

COSTA-JÚNIOR, L. M. et al. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 60–64, 2016.

CRUZ, E. M. de O. et al. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1–2, p. 198–202, 1 jul. 2013.

CUNHA, A. N. **Aspectos químicos do estudo multidisciplinar (químico, farmacológico, botânico e agrônomo) de *Egletes viscosa* Less.** 2003. Tese de Doutorado - Pós Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, 2003.

CUNHA, E. L. R. da et al. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal of Histology and Histopathology**, v. 4, n. 1, p. 9, 2017.

CUNHA, N. C. et al. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105–108, fev. 2009.

DALEY, W. P. et al. ROCK1-directed basement membrane positioning coordinates epithelial tissue polarity. **Development**, v. 139, n. 2, p. 411–422, 15 jan. 2012.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 173–185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 1–11, 2010.

DANTAS-TORRES, F. Species Concepts: What about Ticks?. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1017–1026, 1 dez. 2018.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 9–13, 2015.

DENARDI, S. E. et al. Inhibitory action of neem aqueous extract (*Azadirachta indica* A. Juss) on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, p. 889–899, 2011.

- GODARA, R. et al. Synthetic pyrethroid resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks from north-western Himalayas, India. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 5, p. 1203–1208, 1 jun. 2019.
- GOMES, G. A. et al. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 111, n. 6, p. 2423–30, dez. 2012.
- GOMES, G. A. et al. Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 137, p. 41–45, 1 fev. 2014..
- GUIMARÃES, S. B. et al. Ternatin pretreatment attenuates testicular injury induced by torsion/detorsion in Wistar rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 325–328, jul. 2011.
- HIGA, L. de O. S. et al. Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview. **Med chem, an open access journal**, v. 5, n. 7, p. 326–333, 2015.
- JAYADEV, R.; SHERWOOD, D. R. Basement membranes. **Current Biology**, v. 27, n. 6, p. R207–R211, 20 mar. 2017.
- KONIG, I. F. M. et al. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 4, p. 766–774, 1 jun. 2019.
- KONIG, I. F. M. et al. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 129, p. 102780, 1 fev. 2020.
- KONIG, I. F. M. et al. Repellent activity of acetylcarvacrol and its effects on salivary gland morphology in unfed *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, p. 101760, 4 jun. 2021.
- KUMAR, R.; SHARMA, A. K.; GHOSH, S. Menace of acaricide resistance in cattle tick, *Rhipicephalus microplus* in India: Status and possible mitigation strategies. **Veterinary Parasitology**, v. 278, p. 108993, 1 fev. 2020.
- LAGE, T. C. D. A. et al. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 863–869, fev. 2013.
- LAKSHMI, T. et al. Seed and bark extracts of *Acacia catechu* protects liver from acetaminophen induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress, antioxidant enzymes and liver function enzymes in Wistar rat model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, p. 838–844, 1 dez. 2018.
- LEE, D. et al. Diterpene Glycosides from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, v. 71, n. 8, p. 792–794, ago. 2005.
- LEW-TABOR, A. E.; RODRIGUEZ VALLE, M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 4, p. 573–585, 2016.
- LIMA DE SOUZA, J. R. et al. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, p. 66–

72, 1 jan. 2019.

LIMA, T. C. et al. Larvicidal activity of *Mentha villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. **Chemosphere**, v. 104, p. 37–43, 1 jun. 2014.

LIU, G. H. et al. Complete mitochondrial genome sequence data provides genetic evidence that the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) represents a species complex. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 4, p. 361–369, 2013.

LORENZI, H.; MATTOS, R. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MA, X. et al. Silencing T-type voltage-gated calcium channel gene reduces the sensitivity of *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) to scopoletin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 227, 1 jan. 2020.

MAJEED, M. F. et al. Evaluation the therapeutic role of some antioxidants in cellular and histological alterations which caused by the acute toxicity of lead in female mice (*Mus musculus* L.). **Basrah Journal Of Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 343–366, 2015.

MARTINS, C. M. **Estudo da cinética de secagem e extração de compostos bioativos presentes em *Egletes viscosa* Less (macela-da-terra)**. 2018. Tese de Doutorado - Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, 2018.

MATOS, R. S. et al. Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 669–673, fev. 2014.

MATOS, R. S. et al. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 314–320, 1 fev. 2019.

MATOS, R. S. et al. Thymol: Effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2020.

MELO, C. M. et al. 12-Acetoxyhawtriwaic acid lactone, a diterpene from *Egletes viscosa*, attenuates capsaicin-induced ear edema and hindpaw nociception in mice: Possible mechanisms. **Planta Medica**, v. 72, n. 7, p. 584–589, 24 jun. 2006.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391–397, 16 jun. 2010.

MIYAZAWA, M. et al. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Essential Oils of *Mentha* Species. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 46, n. 9, p. 3431–3434, 1998.

MOERBECK, L. et al. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 6, p. 1458–1466, 1 nov. 2016.

NAVA, S. et al. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3–4, p. 547–555, 21 dez. 2012.

NDAWULA, C.; TABOR, A. E. Cocktail Anti-Tick Vaccines: The Unforeseen Constraints

and Approaches toward Enhanced Efficacies. **Vaccines**, v. 8, n. 3, p. 457, 19 ago. 2020.

NODARI, E. F. et al. Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 151–158, 2011.

NOLAN, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 18, p. 155–166, 1985.

OLIVEIRA, A. C. et al. Essential oils activity from plants of the Brazilian Caatinga on the vegetable leafminer. **Agropec. Trop**, v. 50, p. e58313, 2020.

OLIVEIRA, P. R. de et al. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1255–1264, 1 jun. 2009.

OLIVEIRA, P. R. De et al. Potential of the chemical dinotefuran in the control of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female ticks. **Experimental Parasitology**, v. 155, p. 82–88, 2015a.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2459–2465, 2008.

OLIVEIRA, P. R. et al. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in the ovaries and midgut of semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks. **Parasitology research**, v. 115, n. 2, p. 829–49, nov. 2015b.

OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. 10 - Controlling ticks (methods). In: CAMARGO-MATHIAS, M. I. (Ed.). **Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. 1th. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2018. p. 83–85.

ORTEGA-MORALES, A. I. et al. Detection of *Rickettsia* spp. in *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) collected from free-roaming dogs in Coahuila state, northern Mexico. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 130, 26 mar. 2019.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201–214, 1 ago. 2001.

PEIXOTO, M. G. et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1–2, 2015.

PEREIRA, M. C. et al. Detrimental effect of deltamethrin on the central nervous system (synganglion) of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 71, n. 2, p. 159–169, 2017.

PEREIRA, R. de C. A.; BEZERRA, M. A. E.; ALMEIDA, F. das C. S. **Produção de Mudanças de Macela (*Egletes viscosa* (L.) Less.) por Sementes**. Brasília: Embrapa, 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/185091/1/COT18011.pdf>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

QUADROS, D. G. et al. Plant-Derived Natural Compounds for Tick Pest Control in Livestock and Wildlife: Pragmatism or Utopia? **Insects**, v. 11, n. 8, p. 490, 2020.

- RAO, V. et al. Investigations on the Gastroprotective and Antidiarrhoeal Properties of Ternatin, a Tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, v. 63, n. 02, p. 146–149, 4 abr. 1997.
- RAO, V. S. N. et al. Ternatin, an anti-inflammatory flavonoid, inhibits thioglycolate-elicited rat peritoneal neutrophil accumulation and LPS-activated nitric oxide production in murine macrophages. **Planta medica**, v. 69, n. 9, p. 851–3, set. 2003.
- REIS, A. C. et al. Cytotoxic effects of *Satureja montana* L. essential oil on oocytes of engorged *Rhipicephalus microplus* female ticks (Acari: Ixodidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 7, p. 1375–1388, 1 jul. 2021.
- REMEDIO, R. N. et al. Morphological alterations in the synganglion and integument of *Rhipicephalus sanguineus* ticks exposed to aqueous extracts of neem leaves (*Azadirachta indica* A. JUSS). **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 12, p. 989–998, dez. 2014.
- REQUENA, M. et al. Environmental exposure to pesticides and risk of thyroid diseases. **Toxicology Letters**, v. 315, n. 15, p. 55–63, 2019.
- ROMA, G. C. et al. Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 482–491, 2013.
- ROMA, G. C. et al. Effects of andiroba (*Carapa guianensis*) oil in ticks: Ultrastructural analysis of the synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Acta Tropica**, v. 141, p. 7–15, 2015.
- SAIF, M. et al. Non-invasive monitoring of chronic liver disease via near-infrared and shortwave-infrared imaging of endogenous lipofuscin. **Nature Biomedical Engineering**, v. 4, n. 8, p. 801–813, 1 ago. 2020.
- SAKA, M.; TADA, N. Acute and chronic toxicity tests of systemic insecticides, four neonicotinoids and fipronil, using the tadpoles of the western clawed frog *Silurana tropicalis*. **Chemosphere**, v. 270, p. 129418, 1 maio 2021.
- SAKR, S.; STEENKAMP, V. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and histopathological toxicity in the thyroid gland and liver of rats. **Toxicological & Environmental Chemistry**, p. 1–24, 2021.
- SILVA, A. B. et al. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 173, p. 30–33, set. 2017.
- SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. **Constituintes Micromoleculares de Plantas do Nordeste com Potencial Farmacológico - Com Dados de RMN 13C**. Fortaleza: Expressão Gráfica Editora, 2005.
- SINGH, G.; MAURYA, S. Antimicrobial, antifungal and insecticidal investigations on essential oils: An overview. **Natural Product Radiance**, v. 4, n. 3, 2005. D
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 1)**. vol. 1 ed. New York: Oxford University Press, 2014.
- SOUZA, A. V. de et al. Chemical Composition of Essential Oil of Leaves from *Lippia schaueriana* Mart. Collected in the Caatinga Area. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2480, 27 set. 2018.

SOUZA, M. F.; RAO, V. S.; SILVEIRA, E. R. Anti-anaphylactic and anti-inflammatory effects of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 10, p. 1029–32, 1 jan. 1992.

TRIPATHI, A. K. et al. Piperitenone Oxide as Toxic, Repellent, and Reproduction Retardant Toward Malarial Vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 4, p. 691–698, 1 jul. 2004.

UZUNHISARCIKLI, M.; ASLANTURK, A. Hepatoprotective effects of curcumin and taurine against bisphenol A-induced liver injury in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 36, p. 37242–37253, 1 dez. 2019.

VAN WYK, R. D. J.; BARON, S.; MARITZ-OLIVIER, C. An integrative approach to understanding pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus* and *R. decoloratus* ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 4, p. 586–594, 1 jun. 2016.

VIEIRA, G. A. B. et al. Chemical composition of teas from two cultivated chemotypes of *Egletes viscosa* (“Macela-da-terra”). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 43–47, 2006.

VIEIRA, M. M. et al. Ternatin, a flavonoid, prevents cyclophosphamide and ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 2, p. 135–141, 1 fev. 2004.

WALKER, J. B. .; KEIRANS, J. E. .; HORAK, I. G. **The genus *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). A Guide to the Brown Ticks of the World**. London: Cambridge University Press, 2000.

ZEKRI, N. et al. Insecticidal effect of *Mentha pulegium* L. and *Mentha suaveolens* Ehrh. hydrosols against a pest of citrus, *Toxoptera aurantii* (Aphididae). **Research on Chemical Intermediates**, v. 42, n. 3, p. 1639–1649, 1 mar. 2016.

ZHOU, H. et al. Acaricidal Mechanism of Scopoletin Against *Tetranychus cinnabarinus*. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. 169, p. 1–17, 6 mar. 2019.