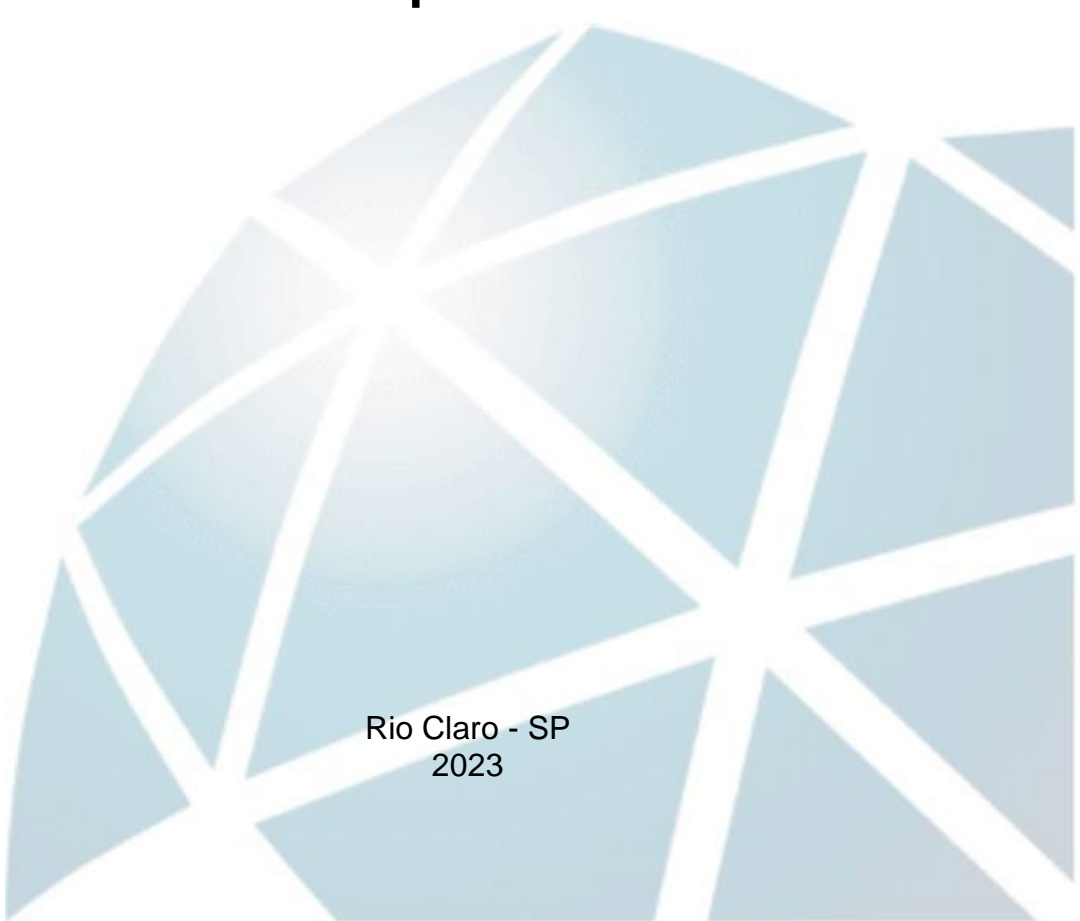

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GIOVANNA GENNARI KASA

Avaliação dos efeitos: acaricida do óleo essencial da macela (*Egletes viscosa*) na dinâmica da vitelogenese do carrapato do cão (ectoparasita) e toxicológico no fígado de camundongos (modelos hospedeiros) a ele expostos



Rio Claro - SP
2023

GIOVANNA GENNARI KASA

Avaliação dos efeitos: acaricida do óleo essencial da macela (*Egletes viscosa*) na dinâmica da vitelogênese do carrapato do cão (ectoparasita) e toxicológico no fígado de camundongos (modelos hospedeiros) a ele expostos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Maria Izabel Souza Camargo

Coorientador: Melissa Carolina Pereira

Rio Claro - SP
2023

K19a Kasa, Giovanna Gennari
Avaliação dos efeitos: acaricida do óleo essencial da macela (*Egletes viscosa*) na dinâmica da vitelogênese do carrapato do cão (ectoparasita) e toxicológico no fígado de camundongos (modelos hospedeiros) a ele expostos / Giovanna Gennari Kasa. -- Rio Claro, 2022
30 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo
Coorientador: Melissa Carolina Pereira

1. *Rhipicephalus sanguineus*. 2. Controle. 3. Ovário. 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.

GIOVAN NA GENNARI KASA

Avaliação dos efeitos: acaricida do óleo essencial da macela (*Egletes viscosa*) na dinâmica da vitelogênese do carrapato do cão (ectoparasita) e toxicológico no fígado de camundongos (modelos hospedeiros) a ele expostos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr^a. Maria Izabel Souza Camargo
M.a. Melissa Carolina Pereira
Prof. Dr. Michel Brienzo
Prof. Dr^a. Maria Izabel Souza Camargo

Aprovado em: 12 de junho de 2023

Assinatura do discente

Giovanna Gennari Kasa

Assinatura do(a) orientador(a)

Melissa Carolina Pereira

Assinatura do(a) coorientador(a):

Melissa Carolina Pereira

GIOVAN NA GENNARI KASA

Avaliação dos efeitos: acaricida do óleo essencial da macela (*Egletes viscosa*) na dinâmica da vitelogênese do carrapato do cão (ectoparasita) e toxicológico no fígado de camundongos (modelos hospedeiros) a ele expostos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Michel Brienzo
Prof. Dr^a. Maria Izabel Souza Camargo
M.a. Marina Rodrigues de Abreu

Aprovado em: 12 de junho de 2023



Assinatura do(a) discente



Assinatura do(a) orientador(a)

Avaliação dos efeitos: acaricida do óleo essencial da macela (*Egletes viscosa*) na dinâmica da vitelogênese do carrapato do cão (ectoparasita) e toxicológico no fígado de camundongos (modelos hospedeiros) a ele expostos

Giovanna Gennari Kasa

ALUNA: GIOVANNA GENNARI KASA



ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

Melissa Carolina Pereira

COORIENTADOR: MELISSA CAROLINA PEREIRA

Rio Claro

2023

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer por todas as pessoas que contribuíram no meu processo de graduação, por todos os anos bem vividos, amigos (em especial: Daniela, Andressa, Isabella, Halima, Letícia, Ana Carolina e Thaís – vocês foram a minha família e me construíram como pessoa), Rep. Gleice e os eternos “Sem bagunça”, vocês tem um espaço gigante no meu coração, minha família, pois sem eles nada seria possível, ao meu companheiro de vida Pedro Hippólito que sempre segurou minha mão em cada prova prestada à universidade, a grandiosa Bateria Porcaria que preencheu minha vida com amigos e muito samba! E principalmente aos meus animais de estimação: Gaia, Rovigo, Bhaloo, Fred e Tulipa que estiveram literalmente em cada passo meu, sendo a força e o motivo para eu ir atrás do que eu amo, a Biologia. E para finalizar, agradecer por todas as etapas alcançadas nesse processo de grande amadurecimento que me formam hoje como uma grande profissional, pois neste processo encontrei meus grandes mestres e hoje sigo pelos mesmos passos. Obrigada aos que estiveram presentes em cada momento especial da minha vida. Meu diploma também é para vocês. E meu mais novo obrigada ao Lab. 6 Ipben e aos meus novos amigos do coração Nat, Mario, Igor, Gi e Caio, sou muito grata em ter crescido tanto em tão pouco tempo com vocês e aos meus orientadores Prof^a Dr. Maria Izabel, Prof. Dr Henrique Ferreira e Prof. Dr. Michel Brienzo, se hoje eu sou uma pesquisadora, foi graças a vocês. Meu muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo nº – 2019/16397-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), em que devo o imenso agradecimento pela oportunidade em fazer ciência em um país que necessita tanto.

RESUMO

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s. l.) é popularmente conhecida como “carrapato do cão” e tem destaque no campo científico pelo fato de este ectoparasita ser um importante vetor de patógenos, causadores de severas enfermidades a animais domésticos, de pecuária e ao homem. Sabe-se que o uso indiscriminado de acaricidas sintéticos acarretam danos ambientais, além de ocasionarem a seleção de populações de carrapatos resistentes. Nesse sentido, a procura por métodos alternativos e naturais que proporcionem um controle efetivo e por acaricidas formulados a partir de bioativos extraídos de plantas tem se intensificado, caso de plantas da espécie nativa *Egletes viscosa* (macela) que já tiveram comprovadas na literatura os potenciais de ações antiespasmódica, anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica e sedativa. No entanto, além de se encontrar um bioativo que seja eficiente no controle do ectoparasita, espera-se que este também não seja tóxico para os hospedeiros (considerados organismos não-alvos). Assim, este estudo pretende avaliar, por meio da morfofisiologia, os possíveis danos causados nos ovários de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. expostos ao óleo de macela, bem como no tecido hepático de camundongos *Mus musculus* (modelo de hospedeiro) aspergidos com o mesmo óleo, afim de identificar o potencial acaricida dos bioativos presentes no óleo essencial da macela e obter resultados que venham, num futuro próximo, contribuir com os estudos de controle de ectoparasitas que trazem inúmeros prejuízos econômicos, sanitários e de saúde pública.

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus*; controle; ovário; óleo essencial; macela

ABSTRACT

Individuals of the species *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu (SS) are popularly known as "dog tick" and has become of great importance in the academic field by the fact that this ectoparasite pathogen vector. It is known that the indiscriminate use of synthetic acaricides causes environmental damage, besides causing a selection of resistant tick populations. In this sense, the search for alternative and natural methods that provide effective control by formulated acaricides from bioactives extracted from plants has intensified, case of the native species *Viscous egletes* (macela) that have already been shown potential antispasmodic, anti-inflammatory, antimicrobial, analgesic and sedative actions in the literature. However, besides finding a bioactive that is effective in controlling the ectoparasite, in this case the dog tick which in the present proposal will have evaluated the dynamics of ovarian development, as this is the part that will generate new individuals, also be non-toxic to hosts (considered non-target organisms), which will be evaluated here by means of the hepatic morphophysiology of *Mus musculus* mice sprayed with macela oil. Thus, generally, this study aims to obtain results that will, in the future, contribute to the studies of control of ectoparasites that bring numerous economic, sanitary and public health losses.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*; ovary; essential oil; macela

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1	MATERIAIS	13
2.1.1	Carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> L. s.	13
2.1.2	Camundongos <i>Mus musculus</i>	13
2.1.3	Óleo essencial de macela-da-terra (<i>Egletes viscosa</i> Less.)	14
2.2	MÉTODOS	14
2.2.1	Teste de imersão das fêmeas de <i>R. sanguineus</i> s.l.	14
2.2.3	Bioensaio de exposição dos camundongos <i>Mus musculus</i> ao óleo essencial de macela via aspersão	16
2.2.4	Avaliação morfológica do fígado de camundongos <i>Mus musculus</i> expostos ao óleo de macela	16
3	RESULTADOS	17
3.1	Morfohistologia do ovário de fêmeas ingurgitadas de <i>R. sanguineus</i> s.l. expostas ao óleo de macela	17
3.1.1	Coloração pela hematoxilina-eosina (HE) e pelo azul de bromofenol	17
3.2	Morfohistologia do fígado de camundongos <i>Mus musculus</i> expostos ao óleo de macela via aspersão	22
4	DISCUSSÃO	24
5	BIBLIOGRAFIA	27

1 INTRODUÇÃO

Conhecer aspectos morfofisiológicos dos carrapatos, dentre eles os da espécie *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu (l. s) popularmente chamado de “carrapato do cão” tem se tornado de grande importância, uma vez que, este ectoparasita é vetor de patógenos, tais como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e *Hepatozoon canis* em cães (DANTAS-TORRES, 2010; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015) e ainda, de bactérias do gênero *Rickettsia spp.*, que causa a erliquiose canina, babesiose, hepatozoonose e febre maculosa, nos animais em geral, incluindo no homem. Este ectoparasita pode ser encontrado em qualquer país do continente americano, sendo, possivelmente, a espécie observada com maior frequência em todo o mundo (GUGLIELMONE et al., 2014).

Além de ser vetor de todos esses patógenos, essa espécie ainda pode provocar coinfeções, ou seja, já foram observados patógenos humanos interagindo com muitos daqueles caninos (CABEZAS-CRUZ et al., 2019). Na tentativa de minimizar-se os danos causados pelo carrapato do cão, o qual hoje habita juntamente com esse hospedeiro preferencial, grande número de residências ao redor do mundo, há a necessidade de buscar-se métodos que sejam eficientes em seu controle, sem, contudo, interferir no metabolismo dos organismos ditos não alvos (em que se inclui o próprio hospedeiro) (TORRES, 2008; CAMARGO-MATHIAS, 2018).

A literatura pertinente tem disponibilizado estudos que reportam resultados que foram obtidos, embora, a grande maioria em laboratório, com formulações acaricidas com bases químicas de origem tanto sintética, quanto natural, sendo a primeira aquela que domina o comércio de medicamentos de uso veterinário (CAMARGO-MATHIAS, et al., 2018) e que, embora eficientes na eliminação dos carrapatos, exibem pontos negativos quando voltados para a sustentabilidade. Dentre os agravantes mais reportados, estão: a utilização indiscriminada e em larga escala destes acaricidas, os resíduos que os mesmos deixam no ambiente, a interferência no metabolismo dos organismos não alvos e o surgimento de indivíduos resistentes, que se adaptam para metabolizar com muita rapidez e sucesso os químicos a que os mesmos são expostos.

Na busca de novas estratégias, exemplos podem ser citados, como o desenvolvimento de formulações acaricidas que tenham em sua composição bioativos extraídos tanto de plantas como de outros animais, que já demonstraram ser eficientes no controle dos carrapatos, como foi o caso dos bioensaios com carvacrol (LIMA-DE-

SOUZA, JOSÉ RIBAMAR, 2019) e com o óleo de semente de neem (REMEDIÇÃO NEODINI, RAFAEL, 2014). Especificamente quando se fala em resistência dos carrapatos aos produtos químicos, já se tem informações disponíveis na literatura mostrando a ocorrência de indivíduos da linhagem *R. sanguineus* (s.s), encontrados principalmente numa da região do Rio Grande do Sul, (SIMONE BECKER et al., 2019).

O sistema reprodutor feminino dos carrapatos é o responsável por prover as células germinativas que darão origem aos novos indivíduos. O mesmo está composto por várias estruturas que incluem um ovário que consiste em um tubo formado por uma parede epitelial, onde estão presos, por meio do pedicelo, ovócitos nos diversos estágios de desenvolvimento, que no caso de *R. sanguineus* l. s. são 05: imaturos (I, II e III) e maduros (IV e V), sendo que o V já está pronto para ser fecundado (CAMARGO-MATHIAS, et al., 2018) (Fig. 1) . Encontrar, portanto, substâncias com potencial acaricida que consigam inibir o desenvolvimento desse importante órgão dos carrapatos seria uma alternativa para controlar as infestações desse ectoparasita, visto que uma vez inibida a vitelogênese, as chances de geração de um novo indivíduo ficariam diminuídas.

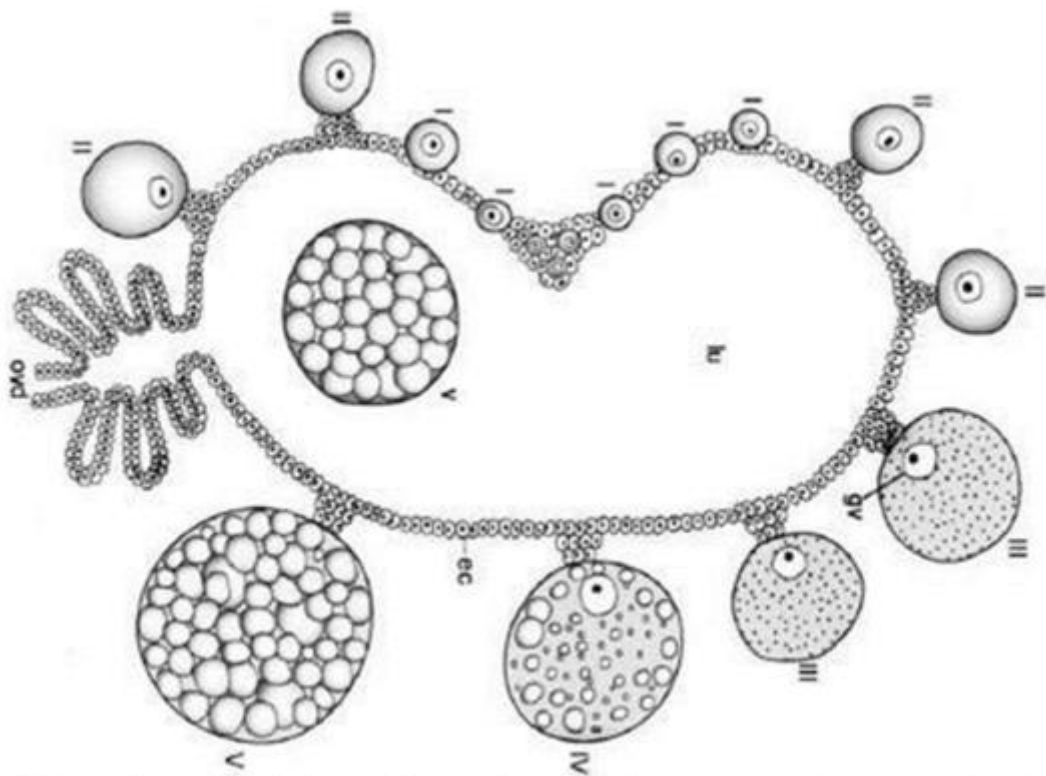


Fig. 1: Ilustração dos estágios de desenvolvimento dos ovócitos imaturos (I, II e III) e maduros (IV e V) (Saito et al., 2005).

Desta forma, a busca por alternativas mais limpas tem levado os pesquisadores a testarem os bioativos que vem sendo frequentemente utilizados com outros objetivos (medicinais e mesmo no setor alimentício), geralmente pelas populações locais, e os quais são encontrados em diversas plantas nativas do Brasil. Dentre esses vegetais com potencial para fornecer bioativos acaricidas, encontram-se plantas da espécie silvestre *Egletes viscosa*, popularmente conhecida como macela, pertencente à família Asteraceae. Podem ser encontradas nas margens de lagoas, açudes e cursos d'água do sertão e do litoral nordestino (MATOS, 2000). Vale ressaltar que a macela é muito utilizada pela população destes locais, uma vez que seus bioativos agem como: antiespasmódicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, analgésicos e sedativos (PEREIRA et al, 2018).



Fig. 2: *Egletes viscosa* (L.) Less., família Asteraceae (Foto por Wynn Anderson, University of California, Berkeley, EUA).

Assim, diante da busca por alternativas que sejam eficientes como acaricidas, porém, ainda sustentáveis e mais limpas, minimizando os prejuízos que possam ser causados pelo seu uso, tanto aos organismos não alvos quanto ao meio ambiente, o presente estudo teve como objetivo avaliar morfohistologicamente o efeito sobre os ovários de fêmeas ingurgitadas (5 dias de alimentação) de carrapatos *R. sanguineus* l. s., da exposição das mesmas ao óleo vegetal de *Egletes viscosa*, nas concentrações

de 25; 12,5 e 5 mg/mL (baseadas em estudos prévios), verificando-se a potencialidade destes bioativos em interferir na dinâmica da vitelogênese, inibindo-a e conseqüentemente, interferindo na geração de novos indivíduos, visto serem essas células, as responsáveis pela perpetuação da espécie. Ainda neste mesmo estudo, realizou-se a avaliação da toxicidade das concentrações de 25; 12,5 e 5 mg/mL do mesmo óleo, sobre camundongos *Mus musculus*, que aqui simularam o modelo vertebrado de hospedeiro. Essas informações obtidas em laboratório e abordando aspectos tanto do ectoparasita quanto do hospedeiro, certamente auxiliarão na busca por acaricidas naturais que possam a médio prazo ser utilizados em campo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

2.1.1 Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus l. s.*

Indivíduos machos e fêmeas em jejum dos carrapatos originários de colônias dos laboratórios da “*Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology*” (BCSTM) instaladas em sala do Biotério do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Rio Claro, SP, Brasil, foram mantidos em estufa BOD (*Biological Oxygen Demand*) Eletrolab EL 202 em condições controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) para 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 Botucatu) por meio de infestações artificiais. Os coelhos hospedeiros eram isentos de contato prévio com o ectoparasita e com o óleo essencial 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.

Para a infestação, 25 fêmeas e 25 machos em jejum foram colocados no interior de uma câmara de alimentação posicionada no dorso do hospedeiro. 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 construção das câmaras de alimentação, de fixação, de infestação e de 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 nº 17/2019.

2.1.2. Camundongos *Mus musculus*

Foram utilizados 15 camundongos Swiss fêmeas, da espécie *Mus musculus*, saudáveis, “spf” (patógeno-free), com peso aproximado de 20g, e idade entre 5 e 6 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) (3 caixas com 5 animais cada) em condições normais de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ de T, 50% de umidade, ventilação apropriada, exaustor e fotoperíodo de 12 horas e foram alimentados com ração e água ad libitum.

2.1.3. Óleo essencial de macela-da-terra (*Egletes viscosa* Less.)

Capítulos florais secos de *E. viscosa* foram adquiridos em um supermercado na cidade de Fortaleza (Ceará, Brasil) em março/2016. Para a extração do óleo essencial, 300 g de capítulos florais foram misturados a 1,5 L de água destilada em um balão de fundo redondo (3 L) e submetidos à hidrodestilação por 4 h, 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) e detecção por ionização em chama (CG-DIC).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Teste de imersão das fêmeas de *R. sanguineus* s.l.

Para tanto utilizou-se o protocolo de imersão proposto por Drummond et al. (1973). Antes do início dos testes, as fêmeas completamente ingurgitadas foram separadas em 5 grupos experimentais (5 espécimes para cada concentração, totalizando 25 fêmeas ingurgitadas), com peso homogêneo garantido após pesagem 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, T2 e T3): fêmeas expostas às diferentes concentrações do óleo de macela, 5mg/mL (T1), 12.5 mg/mL (T2) e 25 mg/mL (T3).

As fêmeas ingurgitadas foram imersas por cinco minutos nas diferentes concentrações dos óleos essenciais (cada concentração = um tratamento) e, nos grupos controle em água destilada e em etanol 50%. 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 EI 202 BOD (*Biological Oxygen Demand*) a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$. As fêmeas dos grupos tratamento foram acondicionadas em câmara diferente daquela utilizada para os grupos controle evitando assim possíveis interferências devido à volatilidade dos compostos.

Nesta etapa, foi realizado o acompanhamento diário dos carrapatos que permaneceram sob observação durante 5 dias, visto que a maioria dos efeitos dos acaricidas não são imediatos e as alterações morfológicas geralmente são observadas após esse período. 2.2.2. Avaliação morfológica do ovário de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. expostas ao óleo de *E. viscosa*.

Decorridos 5 dias após o bioensaio de imersão, as fêmeas foram anestesiadas por choque térmico e dissecadas em solução salina (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L e KH₂PO₄ 2.72 g/L), onde tiveram o seu escudo dorsal removido segundo protocolo descrito por Pereira et al. (2017) e os órgãos internos expostos, incluindo os ovários que foram coletados e fixados em paraformaldeído 4% por 48 horas. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato onde permaneceram por 24 horas, foram desidratados 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 com resina e polimerizador.

Após polimerizados, os blocos foram seccionados em micrótomo LEICA RM 2255, (3 µm de espessura) e as secções foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. Metade da quantidade total de lâminas contendo as secções histológicas foram coradas pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE) segundo Junqueira e Junqueira (1983) e adaptado por Camargo-Mathias (2018). As lâminas restantes foram coradas pelo azul de bromofenol para detecção das proteínas totais, segundo Pearse (1985) e adaptado por Camargo-Mathias (2018).

Na sequência as lâminas foram secas ao ar livre, diafanizadas e montadas em *Entellan®*, para fotodocumentação em microscópio de luz de campo claro *LEICA DM750* alocado nas dependências do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

2.2.3. Bioensaio de exposição dos camundongos *Mus musculus* ao óleo essencial de macela via aspersão

Para esta etapa, 15 fêmeas de camundongos *Mus musculus* foram alocadas em 3 grupos experimentais: Grupos Controle (C1, C2/5 fêmeas por grupo): as fêmeas foram expostas via aspersão, à água destilada (C1) e ao etanol 50% (solvente do óleo) (C2); Grupo Tratamento (T1/5 fêmeas): foram expostas (aspersão) ao óleo essencial de *E. viscosa* na concentração de 25 mg/mL (óleo diluído em etanol 50%). Esta concentração foi a mais agressiva quando examinados os ovários das fêmeas dos carrapatos. O método, o intervalo entre as aspersões e a duração do experimento basearam-se em simular uma situação que ocorreria em campo.

As aspersões foram realizadas em 3 dias consecutivos (tempo máximo de aspersão indicado para utilização de acaricidas comerciais), com intervalos de 24 horas entre elas, fazendo uso de frascos do tipo spray, previamente esterilizados e contendo o óleo nas diferentes concentrações. As aplicações foram realizadas até que os animais estivessem totalmente molhados, segundo protocolo estabelecido por Cunha et al. (2017). Durante este bioensaio os animais (individualmente) tiveram seu peso aferido diariamente. Após terminadas as exposições, procedeu-se à observação dos animais durante 14 dias e, a intervalos de 2 em 2 dias, os mesmos foram individualmente pesados em balança analítica com o objetivo de se verificar possíveis alterações na massa corporal. No 14^o dia, todos os indivíduos foram eutanasiados, por superdosagem de analgésicos com *cloridrato de ketamina* (80 mg/kg MC/IP) e *cloridrato de xilasina* (20mg/kg MC/IP). Na dissecação fez-se a retirada do fígado de cada animal, o qual foi dividido em fragmentos e estes foram imediatamente fixados por 7 dias em paraformaldeído 4%.

Os procedimentos de eutanásia e remoção do fígado foram realizados pela veterinária Letícia Maria Gráballos Ferraz Hebling (CRMV 5412), e a metodologia foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UNESP/Rio Claro (CEUA-IB-UNESP/Rio Claro, protocolo n^o17/2019).

2.2.4. Avaliação morfológica do fígado de camundongos *Mus musculus* expostos ao óleo de macela

Após a fixação do material, este foi transferido para solução tampão fosfato de sódio, onde permaneceu por 24 horas. Na sequência, foi desidratado em série

crescente de álcool etílico (a 70, 80, 90, 95 e 100%) a intervalos de 1 hora e logo após, foi embebido em *historesina Leica*®. Na sequência procedeu-se à emblocagem do material em moldes plásticos contendo resina e polimerizador. Após endurecidos os blocos foram seccionados em micrótomo *LEICA RM 2255* (3µm de espessura) e as secções foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. Depois de secas as lâminas ao ar livre as mesmas foram coradas pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE) segundo Junqueira e Junqueira (1983) e adaptado por Camargo-Mathias (2018). Finalmente, as lâminas foram cobertas com *Entellan*® e lamínula (preparação permanente) para exame e documentação fotográfica em microscópio de luz de campo claro *LEICA DM750* alocado no Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil.

3. RESULTADOS

3.1. Morfohistologia do ovário de fêmeas ingurgitadas de R. sanguineus s.l. expostas ao óleo de macela

3.1.1. Coloração pela hematoxilina-eosina (HE) e pelo azul de bromofenol

Grupos Controle 1 e 2 (C1 e C2): Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que nos grupos controle a morfologia dos ovócitos, assim como era de se esperar, foi preservada, uma vez que os mesmos apresentaram todas as características descritas anteriormente por Oliveira et. al. (2005), ou seja:

- Ovócitos do tipo I, apresentaram-se elípticos, com vesícula germinativa e nucléolo evidentes e ocupando grande parte de um citoplasma homogêneo onde a granulação do vitelo, ainda não estava presente (**Fig. 1A e Fig. 1E**).

-Ovócitos II maiores do que aqueles do tipo I, ainda elípticos e com vesícula germinativa localizada centralmente imersa numa fina e homogênea granulação citoplasmática (**Fig. 1B e Fig. 1G**).

-Ovócitos mais maduros (III, IV e V) ao contrário dos estágios anteriores apresentaram início da deposição/síntese de grânulos vitelínicos (III) a qual foi completada naqueles em estágio V. Da mesma forma, nos ovócitos III foi observado o início da deposição do cório como mostram as figuras **1C-E**, a qual se completou nos ovócitos V (**Fig. 1C e Fig. 1H**).

-Ovócitos IV dos grupos controle, mostraram forma que passou de elíptica para arredondada, devido a síntese/deposição do vitelo este, composto por grânulos de tamanho e colorações variadas, dispostos aleatoriamente pelo citoplasma (**Fig. 1D e Fig. 1I**).

-Ovócitos V, foram as maiores células germinativas observadas, abrigando no citoplasma grandes grânulos de vitelo com tamanhos e conteúdos variados (**Fig. 1E e Fig. 1J**) e deixando encoberta a vesícula germinativa que não pode mais ser mais observada. Nestes ovócitos foi finalizada a deposição do cório.

Todos os estágios dos ovócitos dos grupos controle (C1 e C2) apresentaram intensa presença de proteínas totais, as quais foram marcadas em azul (**Fig 2. A-J**).

Grupo Tratamento 1: exposição ao óleo de macela à 5 mg/mL

A exposição das fêmeas ao óleo de macela na concentração de 5mg/mL mostrou que houve alteração nos ovócitos I, visto que os mesmos passaram a ter forma irregular, ainda continuaram não apresentando grânulos de vitelo, e mostraram início de vacuolização no citoplasma, que abrigou uma vesícula germinativa arredondada, contendo no seu interior, um nucléolo hipertrofiado e em forma de anel (**Fig. 1K**).

Os ovócitos II e III, assim como aqueles I, também tiveram sua morfologia alterada, passando de arredondados a irregulares. Nestes, os grânulos de vitelo puderam ser observados imersos num citoplasma vacuolizado. Nestes estágios verificou-se que também a vesícula germinativa esteve com sua morfologia alterada, apresentando-se também com forma irregular (**Fig. 1L-M**).

Os ovócitos IV, nas fêmeas expostas, de arredondados passaram a elípticos e no citoplasma os grânulos de vitelo estiveram preferencialmente localizados próximos à região de contato ovócito/pedicelo, estando a maior parte do citoplasma vacuolizada. A vesícula germinativa também estava irregular e o nucléolo não foi observado (**Fig. 1N**).

Os ovócitos dos estágios IV e V apresentaram diminuição do tamanho dos grânulos de vitelo quando comparados aos controles. Além disso, nos ovócitos em estágio IV observou-se no cório fraca marcação pelo azul de bromofenol, sugerindo uma alteração na deposição das proteínas nesta membrana (**Fig. 2N**).

Os ovócitos V foram as células germinativas que mais sofreram com a exposição ao óleo da macela, visto que estiveram completamente irregulares em sua forma. Ao contrário dos outros estágios, no citoplasma destes observou-se a presença

de grânulos de vitelo e a ausência de vacuolização. O cório, já completamente depositado, mostrou rompimento em algumas regiões do contorno do ovócito. Devido à grande quantidade e ao tamanho dos grânulos de vitelo, não foi observada a vesícula germinativa (**Fig. 1O**).

Grupo tratamento 2: exposição ao óleo de macela à 12,5 mg/mL

Ovócitos I, II e IV apresentaram as mesmas alterações observadas nestes mesmos estágios de desenvolvimento na exposição à concentração anterior (**Fig. 1P, Fig. 1Q e Fig. 1S**). Foi também observado que as proteínas se distribuíram aleatoriamente pelo citoplasma, sem localização preferencial (**Fig. 2P e 2Q**).

Ovócitos III apresentaram-se irregulares na forma e com a presença de grânulos de vitelo menores e menos corados, além de vacuolização citoplasmática. A deposição do cório nos ovócitos III já estava iniciada. A vesícula germinativa não foi observada (**Fig. 1R**).

Ovócitos V apresentaram forma irregular. Na região cortical dos mesmos observou-se a ausência de grânulos de vitelo, e assim o citoplasma mostrou-se negativo aos corantes aplicados, porém, aqueles que ocuparam o restante do citoplasma foram fortemente marcados pela eosina (**Fig. 1T e Fig. 1S**).

No cório foram observadas dobras, muito provavelmente devido ao encolhimento e diminuição do tamanho desses ovócitos. A vesícula germinativa não foi observada. Nos ovócitos nos estágios III, IV e V observou-se que a vacuolização foi bastante intensa. A marcação das proteínas pelo bromofenol foi mais fraca no citoplasma destas células (**Fig. 2R-S**).

Grupo tratamento 3: exposição ao óleo de macela à 25 mg/mL

A exposição a essa concentração do óleo de macela provocou nos ovócitos I, III e IV alteração na forma, visto que os mesmos passaram a irregular e tiveram mais intensa vacuolização citoplasmática quando comparados às concentrações anteriores, além da vesícula germinativa irregular e com ausência de nucléolo (**Fig. 1U, Fig. 1W e Fig. 1X**).

Os ovócitos I e II, também tiveram sua forma alterada (irregulares). Foi possível observar um citoplasma mais denso. A vesícula germinativa, assim como nos estágios mais avançados, também teve sua forma alterada, e ainda apresentando um nucléolo hipertrofiado e em forma de anel, morfologia característica de células que estão em processo de morte (**Fig. 1V**).

Os ovócitos V também irregulares, não apresentaram no seu córtex a presença de grânulos de vitelo. Nessa região os corantes não reagiram. Os poucos grânulos de vitelo observados estavam confinados na região central do ovócito e apresentando diversos tamanhos e forte positividade aos corantes aplicados (**Fig. 1T e Fig. 1Y**). O cório apresentou-se com dobras (**Fig. 1Y**).

Nos ovócitos deste grupo tratamento e em todos os estágios de desenvolvimento observou-se a diminuição do tamanho dos grânulos de vitelo e fraca marcação do citoplasma pelos corantes (**Fig 2U-Y**).

Fig. 3: Secções histológicas dos ovócitos nos estágios de I a V de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* s. l. controle (água e etanol 50%) e expostas às diferentes concentrações do óleo essencial de macela-da-terra (*Egletes viscosa* Less.). Coloração pela Hematoxilina-eosina (HE).

A-E: Grupo controle 1 (C1) (água destilada); **F-J:** Grupo controle 2 (C2) (etanol 50%, v/v); **K-O:** Grupo tratamento 1 (T1), exposto à concentração de 5 mg/mL do óleo de macela; **P-T:** Grupo tratamento 2 (T2), exposto a 12,5 mg/mL do óleo de macela; **U-Y:** Grupo tratamento 3 (T3), exposto à maior e mais efetiva concentração do óleo, 25 mg/mL.

cr: membrana do cório; **gv:** grânulos de vitelo; **nu:** núcleo; **va:** vacuolização; **vg:** vesícula germinal.

Barras(A-Y): 50µm

FIGURA 3

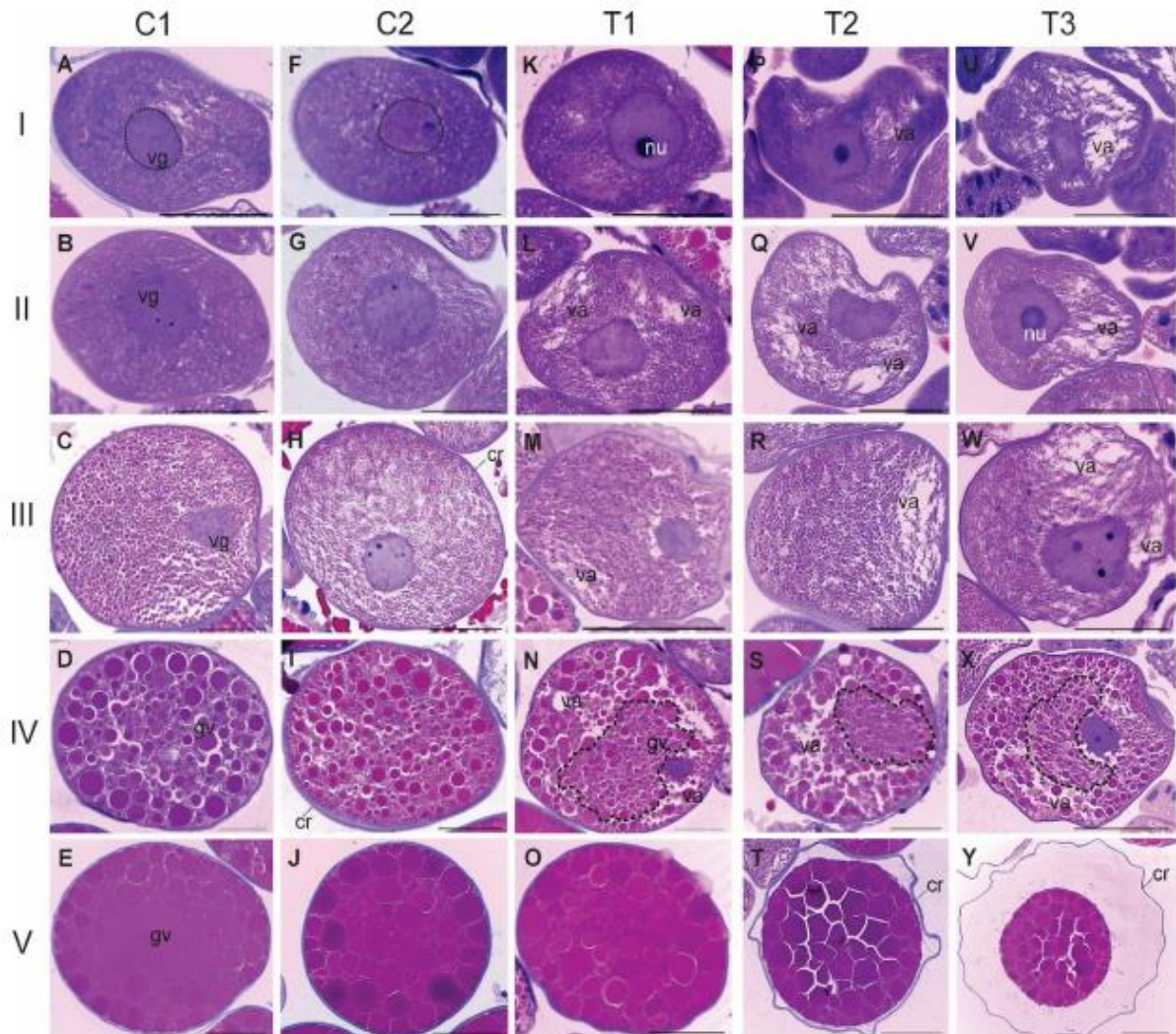


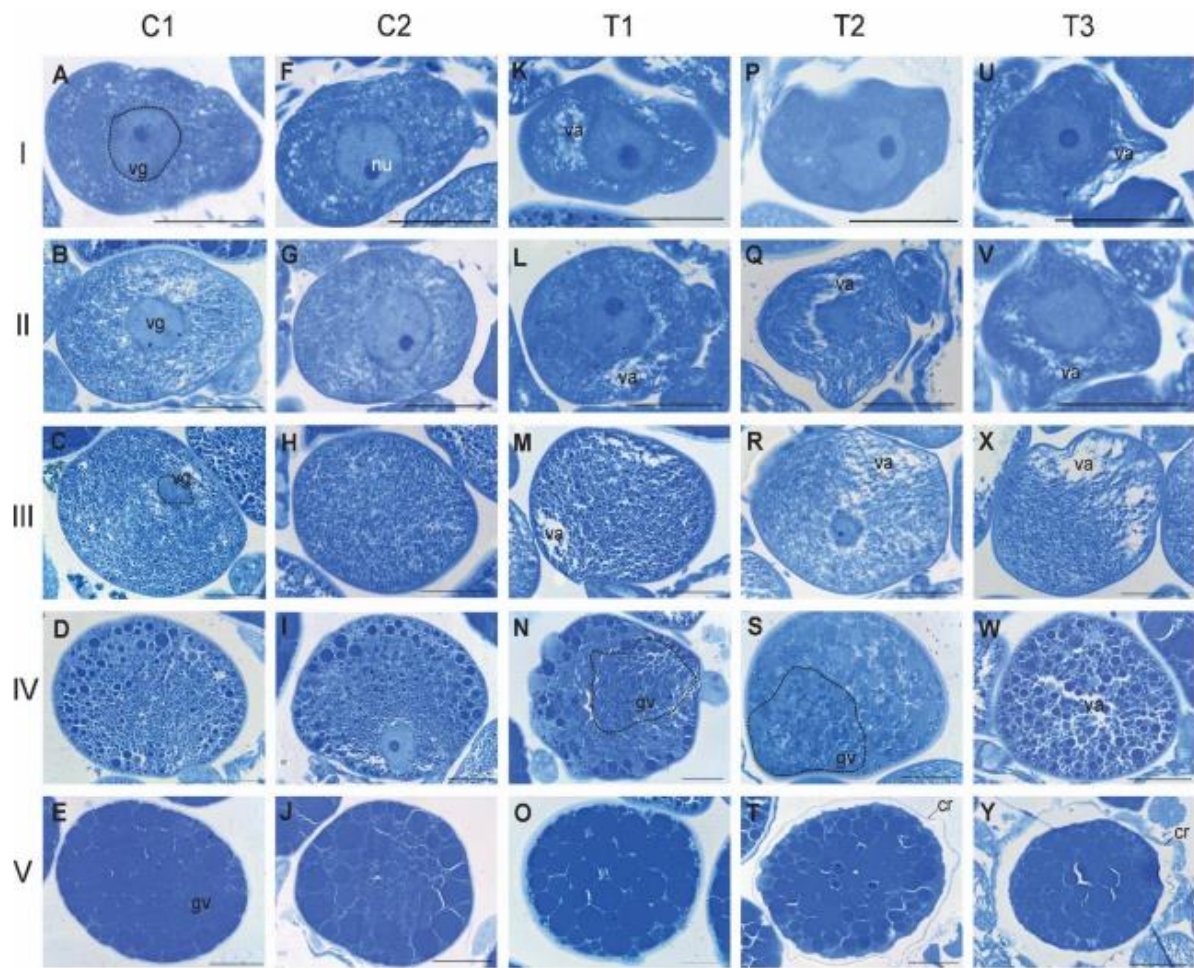
Fig. 4: Secções histológicas dos ovócitos nos estágios de I a V de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* s. l. controle (água e etanol 50%) e expostas às diferentes concentrações do óleo essencial de macela-da-terra (*Egletes viscosa* Less.). Coloração pelo Azul de bromofenol.

A-E: Grupo controle 1 (C1) (água destilada); **F-J:** Grupo controle 2 (C2) (etanol 50%, v/v); **K-O:** Grupo tratamento 1 (T1), exposto à concentração de 5 mg/mL do óleo de macela; **P-T:** Grupo tratamento 2 (T2), exposto a 12,5 mg/mL do óleo de macela; **U-Y:** Grupo tratamento 3 (T3), exposto à maior e mais efetiva concentração do óleo, 25 mg/mL.

cr: membrana do cório; **gv:** grânulos de vitelo; **nu:** núcleo; **va:** vacuolização; **vg:** vesícula germinal.

Barras(A-Y): 50µm

FIGURA 4



3.2. Morfohistologia do fígado de camundongos *Mus musculus* expostos ao óleo de macela via aspersão

Grupos Controle (C1 e C2)

Nos fígados dos animais alocados em ambos os grupos controle (C1 e C2), ou seja, expostos a água (**Fig. 3 A-B**) e ao etanol 50% (**Fig. 3 C-D**) respectivamente, observou-se o lúmen da veia centrolobular com as células endoteliais preservadas e a presença de hemácias no interior da mesma. Células de Kupffer, observadas aqui pela detecção de seus núcleos alongados também estiveram presentes (**figura 3B**).

Os cordões de hepatócitos mostraram que essas células se mantiveram preservadas, o que era esperado e de acordo com o descrito na literatura, ou seja, com forma cúbica, citoplasma eosinófilo e um ou dois núcleos centrais e arredondados (**Fig. 3A**)

Grupo Tratamento 25 mg/mL

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, verificou-se que a concentração do óleo essencial da macela (*Egletes viscosa*) mais agressiva para os ovócitos dos carrapatos, foi a de 25 mg/mL e, por essa razão, a mesma foi a escolhida para os estudos de exposição e toxicidade na avaliação do tecido hepático dos camundongos (*Mus musculus*).

A exposição mostrou que a veia centro lobular apresentou as células endoteliais ao redor do lúmen sem modificações quando comparadas às dos grupos de tratamento (**Fig. 3E, Fig. 3F**). Da mesma forma que no controle, no grupo exposto, a veia centrolobular mostrou um lúmen com grande quantidade de hemácias com aspecto íntegro.

Os cordões de hepatócitos mostraram-se arranjados na forma típica descrita por (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2017). Especificamente os hepatócitos nos fígados dos indivíduos desse grupo apresentaram-se mais fortemente positivos aos corantes empregados. Além disso, notou-se que o citoplasma dos mesmos se apresentou com maior densidade dos componentes, provavelmente em resposta à ação do composto tóxico (**Fig. 3E e Fig. 3F**). Comparando-se os grupos controle e tratamento notou-se que o limite celular dos hepatócitos expostos não ficou evidente como observado no controle, sugerindo que algumas células sofreram alterações, principalmente no seu tamanho, ou seja, sofreram hipertrofia, a qual pode ser observada em algumas destas células. As células de Kupffer não mostraram sinais de alterações (**Fig. 3 E-F**).

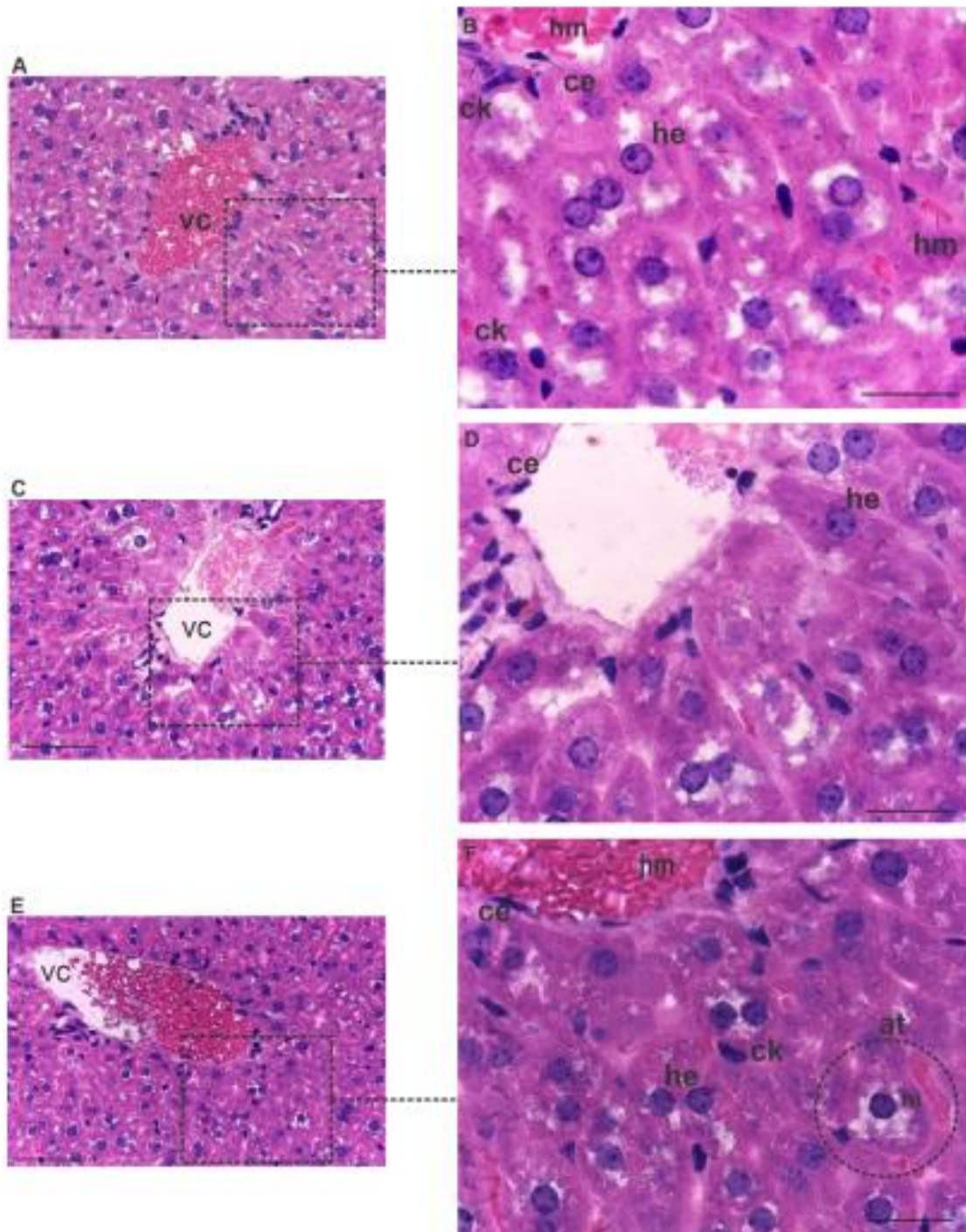
Fig.5: Secções histológicas dos fígados de camundongos *Mus musculus* expostos e não expostos ao óleo essencial de macela-da-terra (*Egletes viscosa* Less.). Coloração Hematoxilina-eosina (HE).

A-B: Controle água; **C-D:** Controle etanol 50%; **E-F:** Óleo de macela na concentração de 25mg/ml.

vc: veia centrolobular, **ce:** célula endotelial, **at:** alteração do tamanho da célula, **hi:** hipertrofia, **cK:** célula de Kupffer, **he:** hepatócito, **hm:** hemácia.

Barras (A, C, E): 50um; **(B, D, F):** 20um.

FIGURA 5



4. DISCUSSÃO

Os carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), popularmente conhecidos como carrapatos-do-cão, vem ganhando cada vez mais atenção nos cenários veterinário, médico e sanitário atuais, uma vez que infestam cães, inclusive aqueles que convivem nas residências com seus donos e dessa forma,

são potenciais transmissores de diversos patógenos causadores de enfermidades que afetam, não só aos outros animais, como também ao próprio homem (DANTAS-TORRES, 2010; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015).

Além disso, é crescente na literatura o número de estudos que buscam alternativas naturais de controle do carrapato, com a perspectiva de diminuir os impactos ambiental e animal causados por outras formas de controle, especialmente aquelas que fazem uso de produtos de natureza sintética, os quais dominam atualmente o mercado veterinário mundial (CAMARGO MATHIAS, 2018). Assim, pesquisadores de várias áreas e fazendo uso de diferentes ferramentas de estudo, vêm se debruçando na busca de formulações acaricidas que ainda sejam efetivas no combate aos carrapatos, porém, que não deixem resíduos tóxicos nos organismos não-alvos.

Nesta direção, o presente trabalho analisou quais seriam os efeitos em fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. expostas ao óleo essencial da macela (*Egletes viscosa* Less.), sobre a morfologia dos ovócitos das mesmas, com o objetivo de se avaliar se e como este óleo, agiria nestas células germinativas, imprescindíveis para que novos indivíduos fossem gerados por estes ectoparasitas. Além disso, sob a perspectiva do hospedeiro, no presente trabalho fez-se a avaliação hepática em camundongos também expostos ao mesmo óleo, com o objetivo de se verificar se esse bioativo causaria alterações morfohistológicas no fígado desses indivíduos.

Os resultados aqui obtidos demonstraram que os ovócitos das fêmeas expostas ao óleo de macela nas concentrações de 5, 12.5 e 25 mg/mL apresentaram alterações que foram observadas em todos os estágios de desenvolvimento, ou seja, desde aqueles em estágio I até aqueles no estágio V, alterações essas que incluíram de modo geral: hipertrofia do nucléolo, irregularidade na vesícula germinativa, zonas de vacuolização no citoplasma, encolhimento dos ovócitos e consequente enrugamento do cório, além de terem sido observadas em regiões desta membrana protetora, zonas de rompimento. Ainda segundo os resultados obtidos, observou-se que as alterações foram se intensificando à medida que a concentração do óleo também foi maior, estabelecendo-se então uma resposta dose-dependente.

Resultados semelhantes aos aqui encontrados já foram anteriormente descritos na literatura por Matos et al. (2014) e Lima-de Souza (2019) quando expuseram fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. à princípios ativos também obtidos de vegetais, a saber o timol e o carvacrol extraídos de plantas das

famílias Lamiaceae e Apiaceae, como, *Lippia triplinervis* (LAGE et al., 2013); *L. gracilis* (CRUZ et al., 2013); *Origanum onites* (COSKUN et al., 2008); e *O. bilgeri* (KOC et al., 2013). Esses autores obtiveram resultados que mostraram um crescente aumento da intensidade dos danos celulares à medida que a concentração do bioativo também foi maior, dado este corroborado no presente estudo.

Neste trabalho pode-se registrar que as fêmeas de carrapatos do cão expostas a todas as concentrações aqui testadas, apresentaram seus ovócitos com intensa vacuolização citoplasmática, principalmente na região periférica destas células. Ainda na maior concentração, ou seja, a de 25 mg/mL, ela foi mais extensa e provocou a perda (fusão/rompimento) de grande parte dos grânulos de vitelo, o que deixou a célula impedida de prosseguir no seu desenvolvimento e de gerar um novo indivíduo, dados que corroboraram aqueles obtidos nos trabalhos dos pesquisadores Oliveira et al. (2005), e Lima de Souza et al. (2019).

Dentre as alterações sofridas pelos ovócitos e resultantes da exposição dos carrapatos ao óleo de macela, ainda observou-se no interior da vesícula germinativa dessas células, nucléolos hipertrofiados e em forma de anel, alteração que caracteriza a ocorrência de morte celular, no caso, em decorrência da exposição ao óleo de macela na concentração de 25 mg/mL, concentração essa que foi a mais citotóxica, principalmente para os ovócitos nos estágios mais avançados de maturação, a saber, aqueles IV e V.

Resultados semelhantes para a morfologia de nucléolo na forma de anel também foram observados nos núcleos das células das glândulas salivares de *R. sanguineus* s. l. por Furquim et al. (2008), quando os autores também registraram a ocorrência de morte celular. Os dados histológicos aqui obtidos deixam claro que os danos citoplasmáticos, principalmente a intensa e extensa vacuolização, além da fusão/rompimento dos grânulos de vitelo, provocaram a consequente perda da forma dos ovócitos, que passaram de ovais ou arredondados para totalmente irregulares, inclusive com a presença de dobras não só na membrana plasmática e também no próprio cório, estrutura essa que em situação normal, deveria estar bastante rígida e impedindo que o ovócito perdesse não só sua estrutura original, de forma que ficasse vulnerável a entrada e saída de componentes na célula.

Assim, esses dados confirmaram que o referido bioativo foi potente a ponto de conseguir atravessar a barreira das membranas (cório e plasmática) e alterar a morfofisiologia dos componentes celulares, dados que também permitiram sugerir que

se houve rompimento do cório pode ter havido deficiência na síntese e secreção dessa membrana. A ocorrência dos danos observados no cório (menor rigidez e espessura) trouxeram como consequência a maior susceptibilidade destas células ao trânsito de moléculas nos dois sentidos de fora para dentro e vice-versa, visto que a célula teria o controle de permeabilidade diminuído, ou até mesmo perdido, ficando assim mais exposta. No caso dos ovócitos que chegassem a ser postos no ambiente, estes teriam sua permeabilidade e rigidez das membranas totalmente deficientes e desta forma ficariam mais expostos ao ambiente e a perda de água/desidratação, além de outros danos.

Destaque-se ainda que puderam ser observados em alguns ovócitos o rompimento do cório em determinados locais dessa membrana, confirmando a ação tóxica do bioativo sobre essas células. A maioria dos dados aqui obtidos foram corroborados por outros estudos desenvolvidos por outros autores, os quais também estudaram as alterações ocorridas em ovócitos de carrapatos após exposição à acaricidas de origem natural. Pode-se citar como exemplo os trabalhos desenvolvidos por Remedio, et al. (2015) que expuseram fêmeas de *R. sanguineus* s. I ao óleo de *Azadirachta indica* (neem) em diferentes concentrações demonstrando também que os ovários foram morfofisiologicamente alterados.

Outros autores expuseram fêmeas de *Amblyomma cajennense* ao jambú (*Acmella oleracea*) nas concentrações 3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL e, observaram a presença de alterações citoplasmáticas e nucleares nos ovócitos, alterações estas que também ocorreram de forma dose dependente (ANHOLETO, et. al, 2019). Assim, os dados aqui apresentados mostraram a ocorrência de alterações morfohistológicas e consequentemente fisiológicas nos ovócitos de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s. I. expostas a diferentes concentrações do óleo essencial de macela (*E. viscosa* Less.), o que permite considerar esse bioativo como uma perspectiva de controle de carrapatos do cão num futuro a médio prazo.

Além da histologia, no presente estudo fez-se também a histoquímica das proteínas totais, por meio da coloração de secções histológicas de ovários de fêmeas de carrapatos expostas ao óleo de macela, pelo azul de bromofenol. Os resultados mostraram que as proteínas também sofreram alterações, à medida que se aumentou a concentração do bioativo, sendo que a maior concentração (25 mg/mL) causou as maiores alterações morfohistológicas em todos os estágios do desenvolvimento dos ovócitos. As alterações mais frequentes que foram observadas disseram respeito a

redução da positividade ao corante no cório observada nos ovócitos IV e V, menores áreas com marcação positiva devido a extensa vacuolização citoplasmática, indicando o potencial desse óleo no controle de carrapatos do cão em bioensaios de laboratório. Outros autores encontraram resultados semelhantes com a exposição de carrapatos a outros bioativos (SAMPIERI, 2012; KONIG, ISAAC et al., 2020).

Como mencionado anteriormente, no presente trabalho também se fez uma avaliação do fígado de camundongos (modelos de hospedeiros) antes (controle) e depois (aspergidos) com o óleo de macela, para se verificar a ocorrência ou não de alterações nessa importante glândula dos vertebrados. O fígado é um órgão composto pelas células hepáticas (hepatócitos) e pelas células de Kupffer (macrófagos específicos deste órgão). A distribuição dos hepatócitos no órgão dá-se sob a forma de cordões ou placas, organizados de forma que fiquem direcionados da periferia do lóbulo para seu centro, facilitando assim que a circulação sanguínea aconteça de forma eficiente tanto na eliminação de produtos do metabolismo como no desempenho de todas as outras funções pelas quais o órgão é responsável (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Por entre os cordões de hepatócitos encontram-se vasos sanguíneos com diâmetros extremamente finos, os denominados sinusóides hepáticos, irregularmente dilatados e compostos por uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas, encontram-se as células de Kupffer, macrófagos específicos do fígado com funções de: metabolizar hemácias velhas, digerir hemoglobina, secretar proteínas relacionadas com os processos imunológicos e destruir bactérias que eventualmente penetrem no sangue portal a partir do intestino grosso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Pela importância do fígado no metabolismo dos mamíferos, esse foi o órgão escolhido para estudar o efeito do óleo de macela após a exposição nos camundongos ao mesmo.

Os resultados mostraram que nos indivíduos alocados no grupo exposto os citoplasmas dos hepatócitos foram marcados com maior positividade, indicando maior densidade dos componentes celulares, provavelmente em resposta à ação do composto tóxico, quando comparou-se com o grupo de animais não expostos. Nos resultados também ficou demonstrado que nas células hepáticas dos indivíduos do grupo exposto, os limites celulares não ficaram tão evidentes, o que reforçou a hipótese de que o bioativo provocou alterações, principalmente no tamanho das células, causando nestas uma hipertrofia que deixou seus limites celulares ainda mais

tênuas devido ao inchaço, e em muitas ocasiões, rompendo-os, dados estes aqui obtidos que corroboraram aqueles observados por outros autores, como Oliveira et al. (2012) em outros estudos com carrapatos expostos à produtos tóxicos. Apesar de ter sido observada alteração nos hepatócitos, verificou-se que as células de Kupffer não foram afetadas pela presença do bioativo, no caso, o óleo de macela, uma vez que não houve proliferação das mesmas no órgão.

No geral, o presente estudo evidenciou alterações morfohistológicas dose-dependentes relevantes no ovário de carrapatos *R. sanguineus*, expostos ao óleo essencial da macela, que incluíram: hipertrofia do nucléolo, irregularidade na vesícula germinativa, zonas de vacuolização no citoplasma, encolhimento dos ovócitos e enrugamento do cório, além de terem sido observadas regiões desta membrana protetora, que estavam rompidas.

Outros trabalhos que analisaram a toxicidade de acaricidas sintéticos e naturais sobre vertebrados, simulando nos bioensaios o papel do hospedeiro dos carrapatos (CUNHA, et al., 2017) mostraram que os acaricidas com ambas as bases moleculares (sintética e natural) foram potencialmente tóxicos para os animais, uma vez que seus fígados sofreram alterações morfofisiológicas observadas por meio do aumento da síntese de glicogênio, presença de vacuolização nas células, núcleos dos hepatócitos com marginalização e compactação da cromatina e hipertrofia do hepatócito, nas exposições ao fipronil (sintético) e ao timol (natural), dados esses que foram no presente estudo parcialmente corroborados, visto que o óleo de macela provocou nas células hepáticas alterações no tamanho destas deixando seus limites celulares mais tênues, além de uma maior densidade citoplasmática evidenciada pela maior positividade ao corante aplicado, dados que permitiram sugerir que ao contrário do timol o óleo de macela provocou alterações menos agressivas no fígado dos camundongos a ele expostos

REFERÊNCIAS

- ANHOLETO, LUIS ADRIANO. **O Jambu (*Acmella oleracea*) e sua ação acaricida: estudo dos efeitos sobre a morfofisiologia dos sistemas reprodutores masculino e feminino de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE) a ele expostos.** Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2019.
- 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.
- BECKER, S. et al. Resistance to deltamethrin, fipronil and ivermectin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto, Latreille (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1046-1050, 2019.
- 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.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives.** 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2018.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 146–156, 2005.
- CHABAUD, A. G. L'infestations par des ixodines provoque-t-elle une immunité chez l'hôte (2me note). **Annales de Parasitologie**, v.25, p. 474-9, 1950.
- COSKUN, S.; GIRISGIN, O.; KÜRKCUGLU, M.; MALYER, H.; GIRISGIN, A. O.; KIRIMER, N.; BASER, K. H. Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 103, n. 2, p. 259–261, 2008.
- CRUZ, E. M. DE O.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, D. A.; ARAUJO, S. A.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BACCI, L.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. H.; BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1–2, p. 198– 202, 2013.
- CUNHA ELRd, MATOR RdS, PEREIRA NRC, OLIVEIRA PRd, DAEMON E and CAMARGO-MATHIAS MI. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **J Histol Histopathol.** 2017; 4:9.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites Vectors**, n. 3, p. 26, 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.

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.

DRUMMOND, R. O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W.J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory test of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n.1, p. 130-133, Feb. 1973.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 538 p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: **Livraria Editora Santos**, 1983.

KOC, S.; OZ, E.; CINBILGEL, I.; AYDIN, L.; CENTIN, H. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari:Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1–3, p. 316– 319, 2013.

KONIGA, Isaac Filipe Moreira et al. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, Lavras, p. 2-9, set. 2019.

LABARTHE, N. V. Biological control of tick populations: review and reflections. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, p. 47-52, 1994.

LAGE, T. C. DE A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (*Verbenaceae*) on *Rhipicephalus microplus* (Acari : Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 112, p. 863–869, 2013.

LIMA-DE-SOUZA, JOSÉ RIBAMAR. **Avaliação dos efeitos subletais do Carvacrol na morfologia do integumento e do ovário de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus* (ACARI: IXODIDAE)**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2019.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2. ed. Fortaleza: IU, 2000. 346 p.

MATOS, R. S.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FURQUIM, K. C. S.; SAMPIERI, B. R.; REMEDIO, R. N.; ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, Berlin, v. 113, p. 4555-4565, 2014.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; NUNES, E. T.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis

of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari : Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 110, p. 146–156, 2005.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: J. & A. Churchill, 1985. 998p.

PEREIRA, M. C. et al. The use of imidazole-osmium (C₃H₄N₂/OsO₄) to stain lipids in salivary gland histological sections of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) female ticks. **Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 74, p. 68-74, 2016.

PEREIRA, M. C. et al. Detrimental effect of deltamethrin on the central nervous system (synganglion) of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 17, 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. Fortaleza: EMBRAPA, 2018.

REMEDIO, R. N.; NUNES, P. H.; ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGOMATHIAS, M. I. Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 431– 44, 2015.

ROSA-DE-OLIVEIRA, PATRÍCIA. **Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do Frontline®) nos ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) e no sangue periférico de roedores**. 2010. 174f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010.

SAMPIERI, Bruno Rodrigues et al. Effect of ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*) on the oocyte yolk components of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Rio Claro, p. 316-322, set. 2012.

SZABÓ, M. P. J. et al. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters, and guinea pigs to repeated infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.32, p. 4350, 1955a.

THEIS, J. H.; BUDWISER, P. D. *Rhipicephalus sanguineus*: sequential histopathology at the host-arthropode interface. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v.36, p 77-105, 1974