

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 22/01/2021.

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

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SUBLETAIS DO CARVACROL NA MORFOLOGIA
DO INTEGUMENTO E DO OVÁRIO DE FÊMEAS DE CARRAPATOS
Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s.l.) (LATREILLE, 1806) (ACARI:
IXODIDAE)**

JOSÉ RIBAMAR LIMA DE SOUZA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular

Janeiro - 2019

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SUBLETAIS DO CARVACROL NA
MORFOLOGIA DO INTEGUMENTO E DO OVÁRIO DE FÊMEAS DE
CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.) (LATREILLE, 1806)
(ACARI: IXODIDAE)

JOSÉ RIBAMAR LIMA DE SOUZA

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

Orientadora: Dra. Maria Izabel Souza Camargo
Co-orientador: Dr. Rafael Neodini Remedio.

L732a

Lima-de-Souza, José Ribamar

Avaliação dos efeitos subletais do carvacrol na morfologia do integumento e do ovário de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.) (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) / José Ribamar Lima-de-Souza. -- Rio Claro, 2019

101 p. : il., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo

Coorientador: Rafael Neodini Remedio

1. Controle. 2. Carvacrol. 3. *Rhipicephalus sanguineus* s.l. 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 TESE: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SUBLETAIS DO CARVACROL NA MORFOLOGIA DO INTEGUMENTO E DO OVÁRIO DE FÊMEAS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.) (LATREILLE, 1806) (ACARI, IXODIDAE)

AUTOR: JOSÉ RIBAMAR LIMA DE SOUZA

ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

COORDENADOR: RAFAEL NEODINI REMEDIO

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


Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
Departamento de Biologia / IB Rio Claro


Profa. Dra. CELESTE PAOLA D'ALESSANDRO
x / Pós-Doutoranda da Escola Superior de Agricultura


Profa. Dra. ROGILENE APARECIDA PRADO
x / x


Prof. Dr. FÁBIO RAU AKASHI HERNANDES
Departamento de Zoologia / IB Rio Claro


Profa. Dra. RUSLEYD MARIA MAGALHÃES DE ABREU
Centro de Ciências Biológicas e da Natureza / UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

Rio Claro, 22 de janeiro de 2019

*Dedico de todo coração esta tese à minha querida irmã e amiga Maria
José Lima de Souza "Mazé" (in memoriam). Te amo eternamente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, por permitir e abençoar essa longa caminhada profissional.

Agradeço minha querida e amada esposa Laysa pelo apoio incondicional durante esses quatro anos de muita luta, sem você meu amor não seria possível essa conquista, bem como meus filhos Jéssica, Hadriel, Pedro e Bernardo.

A todos os membros da família Lima de Souza, na qual sem este apoio mesmo de longe jamais teria alcançado este objetivo. Família é o pilar de toda uma estrutura física, biológica e espiritual.

A minha orientadora Dra. Maria Izabel Souza Camargo, pela oportunidade e todos os ensinamentos nessa caminhada. Bel gratidão é a palavra.

A todos meus colegas do grupo, em especial ao Luís Adriano e Patrícia Rosa pela amizade, companheirismo e ensinamentos ao longo dessa trajetória. Ao meu grande amigo Luís Sodelli pelas longas conversas e orientações nessa caminhada.

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

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) é um ectoparasita de importância médico-veterinária, inclusive pela sua capacidade de atuar como vetor de diversos patógenos aos seus hospedeiros. Nesse sentido, faz-se necessário o controle do mesmo o qual tem sido frequentemente realizado com acaricidas químicos sintéticos, os quais tem a desvantagem de provocar danos aos organismos não alvos, bem como ao meio ambiente (acúmulo de resíduos). Assim sendo, a busca por métodos eficientes de controle, porém que sejam também sustentáveis é uma constante e nessa perspectiva, princípios ativos extraídos de plantas têm sido utilizados. Dentre eles está o carvacrol que apresenta diversas propriedades biológicas, dentre elas a de ser acaricida. No presente estudo foi realizada uma avaliação para se obter informações de como o carvacrol agiria sobre o integumento e sobre as células germinativas femininas de carrapatos da espécie *R. sanguineus* s.l. quando a ele expostas. Os resultados obtidos mostraram que o integumento e os ovócitos foram significativamente alterados devido à exposição, mesmo nas concentrações mais baixas aqui testadas. Ressalte-se que na maior concentração (100µL/mL) os ovários apresentaram apenas ovócitos em estágios I e II, visto o carvacrol ter atuado sobre a vitelogênese, inibindo-a, o que impediu essas células de chegarem até o estágio V (prontas para fecundação) e conseqüentemente de serem viáveis para gerarem novos indivíduos. Em relação ao integumento as alterações mais significativas foram observadas também na exposição das fêmeas à maior concentração (25µL/mL), visto as modificações ocorridas nas diversas camadas do integumento, inclusive naquela epitelial. Nesta última o bioativo atuou desorganizando o epitélio e provocando neste uma estratificação, não observada nos indivíduos controle. Além desses resultados, no presente estudo estabeleceu-se o valor da concentração letal média (CL50) do carvacrol quando diluído em etanol 50°GL, que foi de 62,48 µL/mL. Assim, os resultados aqui obtidos sinalizaram que o carvacrol é um bioativo tóxico para os carrapatos *R. sanguineus* s.l., uma vez que a exposição ao mesmo alterou tanto o integumento como as células germinativas femininas destes, o que deixou os indivíduos mais vulneráveis às adversidades do ambiente, além de ter inibido a produção de células germinativas femininas viáveis, o que traria como consequência a não geração de uma nova prole.

Palavras-chave: Controle, carvacrol, *Rhipicephalus sanguineus* s.l.

ABSTRACT

Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s.l.) ticks, recognized vectors of several pathogens, are ectoparasites of significant medical and veterinary importance. The most widely used strategy to control these arthropods is the use of synthetic acaricides, which bring serious damages to non-target organisms and the environment (residue accumulation) as well. Thus, the search for efficient and sustainable control methods is ongoing, and several plant extracts have been tested. Carvacrol is one of such extracts, presenting different biologic properties, including acaricidal action. In the present study, the action of carvacrol on the integument and on the female germ cells of *R. sanguineus* s.l. ticks was evaluated. The results showed that the integument and the oocytes were significantly altered following exposure, even at low concentrations. At the highest concentration tested (100 μ L/mL), the ovaries presented exclusively oocytes in stages I and II, once carvacrol affected the vitellogenesis, inhibiting it and preventing these cells from reaching stage V, in which they would be ready for fecundation and consequently capable to generate new individuals. Regarding the integument, the most significant alterations were observed in the exposure to the highest concentration (25 μ L/mL), with modifications in the different layers, including the epithelial one. The bioactive disorganized the epithelium and caused stratification, which was not observed in the individuals belonging to the control group. In addition to providing these results, the present study established the median lethal concentration (LC50) of carvacrol when diluted in ethanol 50°GL, which corresponds to 62.48 μ L/mL. Therefore, the results obtained herein indicate that carvacrol is toxic to *R. sanguineus* s.l., ticks, once the exposure to the bioactive altered both the integument and the female germ cells, making the individuals vulnerable to environmental adversities. Moreover, carvacrol inhibited the production of viable female germ cells, consequently preventing the generation of new individuals.

Keywords: Control, carvacrol, *Rhipicephalus sanguineus* s.l.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das camadas da cutícula de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> s.l., segundo Remedio et al. (2014). cut= cutícula; sbc= subcuticular; ec=células epiteliais.....	16
Figura 2. Representação esquemática dos vários estágios dos ovócitos de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> s.l., conforme Oliveira et al. (2008). ch=cório; gv= vesícula germinal; nu=nucléolos; yg=grânulos de vitelo.....	18
Figura 3. Esquema representativo da fixação da câmara de infestação no dorso do hospedeiro com cola biológica, segundo o autor.....	24
Figura 4. Exposição das fêmeas de <i>R. sanguineus</i> s.l. às diferentes concentrações do carvacrol (bioensaio 1), segundo o autor.....	25
Figura 5. Exposição (bioensaio 2) das fêmeas de <i>R. sanguineus</i> s.l. às diferentes concentrações do carvacrol, segundo o autor.	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
Carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato (s.l.).....	12
Controle de <i>R. sanguineus</i> s. l.	13
Carvacrol	14
Morfologia do Integumento dos Carrapatos.....	15
Morfologia do Ovário dos Carrapatos	16
2. OBJETIVOS	21
Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Carvacrol.....	23
3.2. Obtenção das fêmeas de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.....	23
3.3. Infestações	23
3.3.1. Infestações Totais.....	24
3.4. Bioensaios <i>in vitro</i> com carvacrol para determinação da CL50%.....	25
3.4.1. Bioensaio 1	25
3.4.2. Bioensaio 2	26
3.4.3. Análise Estatística	27
3.5. Histologia dos ovários	28
3.6. Histologia do integumento	29
3.7. Histoquímica do integumento.....	30
3.7.1. Xylidine Ponceau.....	30
3.8. Microscopia Eletrônica de Varredura do integumento (MEV).	30
4. RESULTADOS	32
CAPÍTULO 1	35
Determination of the median lethal concentration (LC ₅₀) of the bioactive substance carvacrol for control of the brown dog tick <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato (Acari:Ixodidae).....	35
CAPÍTULO 2	54
Effects do carvacrol on oocyte development in semi-engorged <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato (Acari:Ixodidae).....	54
CAPÍTULO 3	63
Capítulo de livro intitulado “ Protection and Defense (Integument) ” publicado no livro “ Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives ” Organizado pela Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias e publicado pela Editora Unesp, 2018 e de autoria de : JOSÉ RIBAMAR LIMA DE SOUZA, Rafael Neodini Remedio,	

Patrícia Rosa de Oliveira, André Arnosti, Rusleyd Maria Magalhães de Abreu e Maria Izabel Camargo-Mathias.....	63
CAPÍTULO 4.....	69
O bioativo carvacrol como potencial acaricida: avaliação dos seus efeitos sobre o integumento de fêmeas de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato.	69
4. DISCUSSÃO GERAL	87
5. CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	94
ANEXO.....	101

Introdução geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.)

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas, obrigatoriamente hematófagos, reservatórios e vetores capazes de transmitir diversos tipos de patógenos (bactérias, vírus, protozoários) quando estão alimentando-se em seus hospedeiros preferenciais ou ocasionais (BENELLI et al., 2016; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015).

Dentre os carrapatos Ixodidae, também conhecidos como ‘carrapatos duros’, devido a presença de uma placa ou escudo dorsal esclerotizado, destacam-se diversos gêneros como: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes*, e *Rhipicephalus*, que agregam inúmeras espécies de grande importância veterinária, médica e econômica (DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012; HEKIMOĞLU et al., 2016; NAVA et al., 2015).

A espécie *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.), conhecida como “carrapato-vermelho-do-cão” ou “carrapato-marrom-do-cão”, tem sua classificação taxonômica dentro do complexo de 12 espécies baseadas em critérios morfológicos, biológicos e genéticos (CHITIMIA-DOBLER et al., 2017; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; MORAES-FILHO et al., 2011; NAVA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2005). Esta espécie está representada na América do Sul por duas linhagens distintas: a) linhagem tropical (Argentina, Brasil, Colômbia, Paraguai e Peru e b) linhagem temperada (Argentina, Brasil, Chile e Uruguai) (MORAES-FILHO et al., 2011; NAVA et al., 2015).

Durante o processo de parasitismo (hematofagia), o *R. sanguineus* s.l. causa nos cães, danos diretos como anemia e espoliação na pele e transmitem a estes patógenos como: *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis* e *Anaplasma platys* (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; ESTRADA, 2015; PAT-NAH et al., 2015). Esta espécie ainda é vetora de *Rickettsia conorii* na Europa e da *R. rickettsii* no Arizona – EUA (BORGES et al., 2007; DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012). Além disso, a literatura tem reportado que *R. sanguineus* s.l. pode ser também no Brasil um potencial vetor de riquetsias, visto que casos de febre maculosa causadas por *R. rickettsii* e *R. parkeri* tem sido reportados em algumas regiões (BARBOSA-SILVA et al., 2017; MOERBECK et al., 2016).

Um conjunto de fatores define o sucesso biológico de *R. sanguineus* s.l. e dentre eles podem ser citados: ampla distribuição geográfica, poucos inimigos naturais, elevados níveis de infestação, bem como mudanças climáticas, desmatamento, as quais vem favorecendo o maior contato com os hospedeiros alvos (cão) e não-alvos (outros mamíferos incluindo os humanos). Assim sendo, a ampla adaptação desses Arthropoda aos diferentes ambientes, tem contribuído

para sua proliferação exponencial, o que provoca a necessidade de se buscar estratégias de controle que sejam eficientes (CAMARGO- MATHIAS, 2018; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015).

Controle de *R. sanguineus* s. l.

O controle de carrapatos, em geral, tem sido realizado principalmente pela utilização de acaricidas os quais são sintetizados a partir de diversas bases químicas (organofosforados, piretróides, amitraz, lactonas macrocíclicas) e, mais recentemente os reguladores de crescimento e as isoxazolininas (OLIVEIRA et al., 2012); MCTIER et al., 2016). No entanto, o uso indiscriminado e muitas vezes inadequado de produtos desta natureza tem causado uma série de desvantagens como: a) a presença de resíduos contaminantes no ambiente; b) a toxicidade para os organismos não-alvos; c) o custo elevado; d) a necessidade de mão de obra especializada; e) a seleção de linhagens de carrapatos resistentes (ABBAS et al., 2014; BENELLI et al., 2016; GUERRERO et al., 2014; NAQQASH et al., 2016). Nessa perspectiva a literatura tem reportado diversos casos de resistência aos diversos grupos de acaricidas químicos sintéticos como: permetrina (EUA), amitraz (Panamá), amitraz e permetrina (México) (EIDEN et al., 2016; MILLER et al., 2001; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2017).

Devido a esses inconvenientes, bem como as novas normas de preservação do meio ambiente, nos dias de hoje tem sido necessário buscar alternativas que possam controlar esses ectoparasitas de forma mais eficiente e que seja ao mesmo tempo sustentável, na tentativa de minimizar os danos colaterais causados pelos acaricidas químicos. Os estudos mais recentes nesta direção tem apontado para o fato de que produtos sintetizados por diversas plantas (extratos, óleos essenciais, princípios ativos) teriam potencial acaricida e ainda seriam biodegradáveis e não se acumulariam no meio ambiente (ROSADO-AGUILAR et al., 2017). Essa estratégia vem chamando a atenção

dos estudiosos no assunto, entretanto há a necessidade de se levar em conta alguns fatores como: facilidade de cultivo das plantas em questão, idade e localização geográfica das mesmas, bem como a composição do solo e as condições climáticas sob as quais as mesmas são cultivadas, não deixando de lado ainda os diversos métodos de extração dos princípios ativos, os quais podem ter sua concentração alterada (KOC et al., 2013). Estudos que já foram realizados com os óleos e princípios ativos extraídos de plantas já demonstraram resultados promissores no controle de *R. sanguineus* s.l. Dentre eles podem ser citados: o óleo de neem (DENARDI et al., 2011; LIMA-DE-SOUZA et al., 2017), o óleo de andiroba (VENDRAMINI et al., 2012), o timol (MATOS et al. 2014); o carvacrol (SENRA et al., 2013), os ésteres do ácido ricinoléico (ARNOSTI et al., 2011; SAMPIERI et al., 2013).

Carvacrol

O carvacrol (C₁₀H₁₄O) é um monoterpene aromático oxigenado, volátil, de odor forte, sintetizado a partir do γ -terpineno e do p-cimeno (CACCIATORE et al., 2015; NOSTRO; PAPALIA, 2012). É um princípio ativo comumente encontrado em uma grande variedade de plantas aromáticas e medicinais das famílias Lamiaceae e Verbanaceae, as quais incluem, espécies 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), com reconhecida ação sobre carrapatos de diferentes espécies. De acordo com Senra et al. (2013) quando o carvacrol é exposto em doses subletais para o controle de carrapatos causa nestes efeitos de inibição, e impedem a oviposição inibindo consequentemente a geração de uma nova prole (PANELLA et al., 2005). Além disso o carvacrol tem mostrado ser um agente acaricida que afeta a todos os estágios de desenvolvimento de carrapatos quando aplicado isoladamente e/ou em associação com outros componentes. Segundo Cetin et al. (2010) fêmeas de *Hyalomma marginatum* expostas ao carvacrol tiveram taxa de mortalidade de 60% em 24h. Neste último caso foram aqueles carrapatos que não se movimentaram durante o tratamento, mas que responderam com movimentos de pernas quando estimulados com alfinete. Dolan et al. (2009) também demonstraram a capacidade de o carvacrol causar rápido *knockdown* e controle a curto prazo de carrapatos das espécies *I. scapularis* e *A. americanum*. Embora diversos estudos fazendo uso do carvacrol para controlar os carrapatos tenham sido

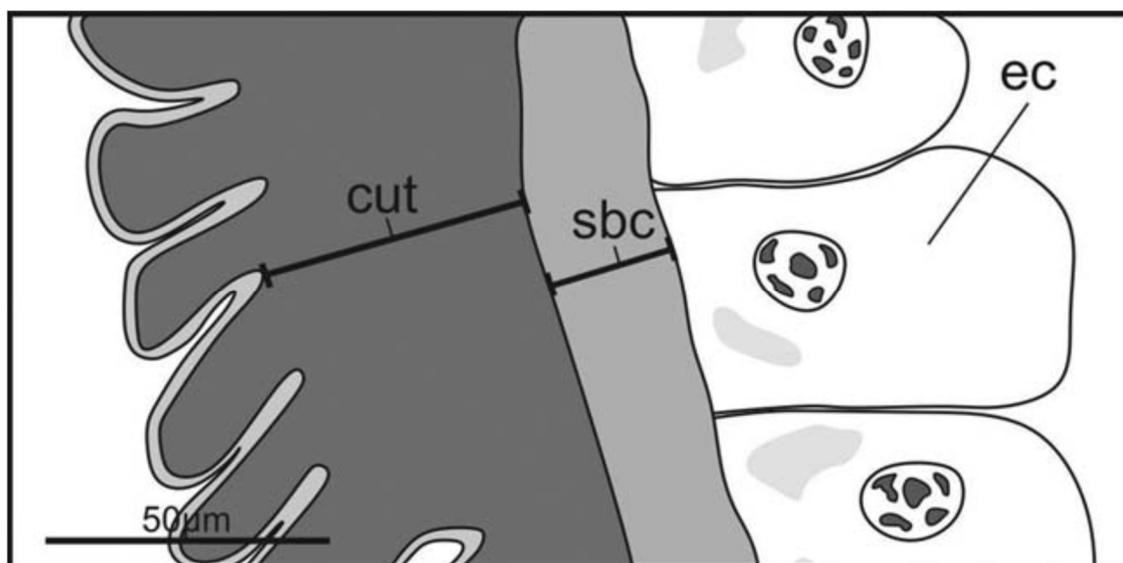
realizados, pouco ainda se sabe sobre a sua ação na morfologia interna e externa dos carrapatos a ele expostos.

Morfologia do Integumento dos Carrapatos

Nos carrapatos, assim como nos artrópodes em geral, o sucesso biológico está associado também a eficiência protetora do integumento (exoesqueleto) responsável por recobrir externamente o corpo destes animais, bem como por evitar a perda/entrada excessiva de água, além de fornecer proteção contra choques mecânicos (SONENSHINE; ROE, 2014). Este órgão está histologicamente organizado pela cutícula, subcutícula, epiderme, numerosos apêndices epidérmicos e glândulas dérmicas (CAMARGO-MATHIAS, 2018; SONENSHINE; ROE, 2014).

A cutícula dos carrapatos está dividida em duas regiões: a epicutícula, mais fina e externa e a procutícula, mais espessa e interna (AMOSOVA, 1983; SONENSHINE; ROE, 2014). Esta última pode ser subdividida em outras duas camadas, dependendo do estágio de alimentação do indivíduo: a exocutícula, localizada próxima a epicutícula, e a endocutícula, em contato direto com as células epidérmicas (REMEDIO; NUNES; CAMARGO-MATHIAS, 2014). Abaixo da cutícula encontra-se um epitélio simples, composto por células cubóides, além de glândulas dérmicas, cerdas e sensilas (Fig. 1) (SONENSHINE; ROE, 2014).

Figura 1. Representação esquemática das camadas da cutícula de fêmeas de *R. sanguineus* s.l., segundo Remedio et al. (2014). cut= cutícula; sbc= subcuticular; ec=células epiteliais.



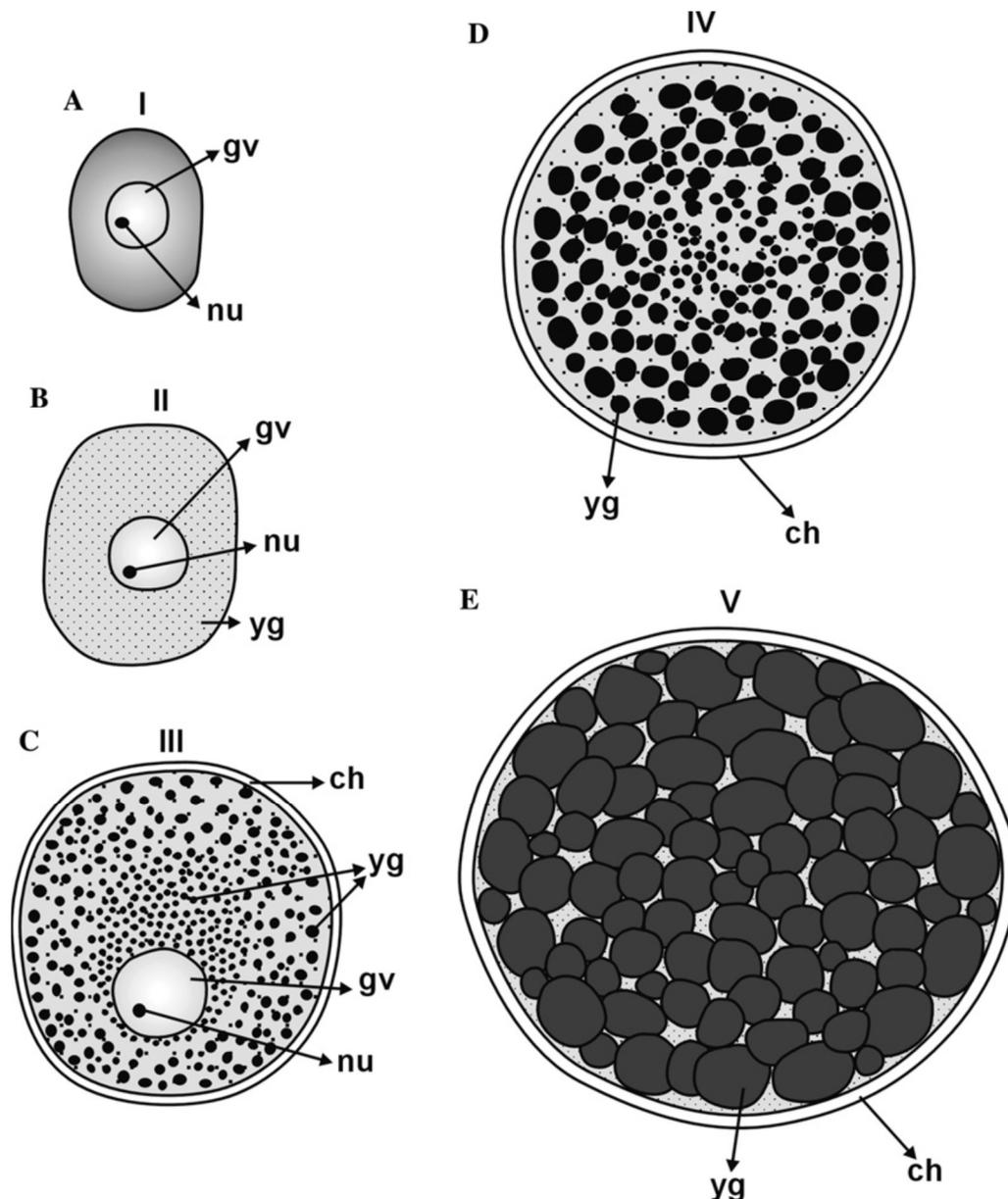
Atualmente, vários estudos fazendo uso de compostos naturais extraídos de plantas têm sido realizados e, muitos deles abordando o comportamento morfofisiológico do integumento, tendo em vista que este órgão é o primeiro a entrar em contato com os produtos acaricidas quando estes são aplicados topicamente. Remedio, Nunes; Camargo-Mathias et al. (2014), realizaram bioensaios nos quais fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l. foram expostas ao extrato aquoso das folhas de neem, e verificaram a presença de alterações morfológicas de caráter dose-dependente no órgão, principalmente nas células epidérmicas. Essas alterações foram, por exemplo: extensa vacuolização citoplasmática e variações na espessura da camada subcuticular. Recentemente Lima de Souza et al. (2017), utilizando o óleo de neem enriquecido com azadiractina sobre carrapatos da mesma espécie, demonstraram que os mesmos foram capazes de atravessar a cutícula e chegar até o epitélio, causando assim danos às células epiteliais.

Morfologia do Ovário dos Carrapatos

Segundo dados da literatura, embora existam algumas diferenças morfológicas e histológicas no sistema reprodutor feminino dos carrapatos (OLIVEIRA et al., 2005;

SAITO et al., 2005), estes ectoparasitas apresentam o ovário como um tubo em forma de U (parede composta por células epiteliais que delimitam um lumen) localizado na região posterior do corpo. A ele liga-se um par de ovidutos, útero e vagina (SONENSHINE; ROE 2014). De acordo com Denardi et al. (2004), os ovários dos ixodídeos são do tipo panoístico, assim como o encontrado em alguns insetos, porém ao contrário destes, não possuem células nutridoras nem foliculares. Externamente à parede do ovário, estão presos os ovócitos (nos vários estágios de desenvolvimento) por meio dos pedicelos (agrupamentos de células epiteliais) (SAITO et. al., 2005; OLIVEIRA et. al., 2006). Os estágios de desenvolvimento dos ovócitos baseiam-se na morfologia dos mesmos, considerando-se: sua forma, presença/tamanho e localização da vesícula germinal (núcleo), aspecto do vitelo (granulação mais fina ou mais espessa), bem como presença ou ausência do cório, membrana protetora do ovócito (Fig. 2) (CAMARGO-MATHIAS, 2018).

Figura 2. Representação esquemática dos vários estágios dos ovócitos de fêmeas de *R. sanguineus* s.l., conforme Oliveira et al. (2008). ch=cório; gv= vesícula germinal; nu=nucléolos; yg=grânulos de vitelo.



A exposição de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. aos diversos acaricidas de origem natural, ou seja, princípios ativos extraídos de plantas sob a forma de extratos e óleos, vem confirmando o potencial destes como estratégia de controle de carrapatos de várias espécies, informações estas que vem estimulando o desenvolvimento de estudos, inclusive deste projeto, abordando essa temática. Denardi et al. (2010, 2011) utilizando o

extrato aquoso de *Azadirachta indica* (neem) em concentrações de 10% e 20% demonstraram a ocorrência de alterações na morfologia das células do pedicelo, bem como extensa vacuolização no citoplasma do ovócito e na vesícula germinal de *R. sanguineus* s.l. e Remedio et al. (2015) expondo *R. sanguineus* s.l ao óleo de neem em diferentes concentrações demonstraram também que os ovários foram morfológicamente alterados e ainda que essas alterações foram dose-dependentes (quanto maior foi a dose, maiores foram os danos provocados).

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo mostrando ação acaricida do carvacrol sobre o integumento e sobre as células germinativas femininas de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* s.l. permitiram concluir que:

- 1) A concentração letal média do carvacrol (CL50) quando diluído em etanol 50°GL foi de 62,48µL/mL para fêmeas semi-ingurgitadas (5 dias de alimentação) de *R. sanguineus* s.l.
- 2) O carvacrol agiu sobre o integumento e sobre os ovários (ovócitos) de *R. sanguineus* de forma dose dependente, ou seja, quanto maior foi a concentração de exposição maiores foram os danos observados em ambos os órgãos.
- 3) Na exposição à concentração de 100µL/mL os ovócitos só conseguiram se desenvolver até o estágio II não tendo sido observada presença de nenhum outro estágio.
- 4) O integumento das fêmeas de *R. sanguineus* s.l. expostas à concentração de 25µL/mL foi o que sofreu maior alteração morfológica, uma vez que o epitélio formado por células secretoras passou de secretor simples (uma só camada) para estratificado (várias camadas) de revestimento, indicativo histológico de que o bioativo atuou nessa estrutura, modificando-a.

Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management : The state of play. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 2014.

AMOSOVA, L.I. The integument. In: Balashov, Y. S. Ed. An atlas of ixodid tick ultrastructure . USA, p. 23-31, 1983.

ARNOSTI, A.; BRIENZA, P. D.; FURQUIM, K. C. S.; CHIERICE, G. O.; BECHARA, G. H.; BRAGGIÃO, I. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 127, n. 2, p. 575–580, 2011.

BARBOSA-SILVA, A.; DUARTE, M. M.; CAVALCANTE, R. C.; OLIVEIRA, S. V.; VIZZONI, V. F.; DURÉ, A. I. L.; IANI, F. C. M.; MACHADO-FERREIRA, E.; GAZÊTA, G. S. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 173, n. May, p. 30–33, 2017.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; FERREIRA, B. R.; GARCIA, M. V. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazil Journal Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 61–65, 1995.

BENELLI, G.; PAVELA, R.; CANELE, A.; MEHLHORN, H. Tick repellents and acaricides of botanical origin : a green roadmap to control tick-borne diseases? **Parasitology Research**, v. 115, n. 7, p. 2545–60, 2016.

BORGES, L. M. F.; SOARES, S. F.; FONSECA, I. N.; CHAVES, V. V.; LOULY, C. C. B. **Revista de Patologia Tropical**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 87–95, 2007.

CACCIATORE, I.; GIULI, M. D.; FORNASARI, E.; STEFANO, A. D.; CERASA, L. S.; MARINELLI, L.; TURKEZ, H.; CAMPLI, E. D.; BARTOLOMEO, S. D.; ROBUFFO, I.; CELLINI, L. Carvacrol codrugs: A new approach in the antimicrobial plan. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–20, 2015.

CAMARGO- MATHIAS, M. I. **Inside Ticks: Morphophysiology, Toxicology and Therapeutic Perspectives**. In: Camargo-Mathias, M. I. (Org.). São Paulo: Ed. Unesp, 2018. p. 200.

CETIN, H.; CILEK, J. E.; OZ, E.; AYDIN, L.; DEVECI, O.; YANIKOGLU, A. Acaricidal activity of *Satureya thymbra* L. Essential oil and its major components, carvacrol and γ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.170, p. 287-290, 2010.

CHITIMIA-DOBLER, L.; LANGGUTH, J.; PFEFFER, KATTNER, S.; KÜPPER, T.; FRIESE, D.; DOBLER, G.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Genetic analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks parasites of dogs in Africa north of the Sahara based on mitochondrial DNA sequences. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 239, p. 1–6, 2017.

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**, Berlin, 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**, Amsterdam, v. 195, n. 1–2, p. 198–202, 2013.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne disease: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, p. 10–14, 2015.

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; NUNES, E. T.; SAITO, K. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajannense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.125, p. 379-395, 2004

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. *Azadirachta indica* A. juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks females. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 126, p. 462-470, 2010.

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Inhibitory action of neem aqueous extract (*Azadirachta indica* A. juss) on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae)

ticks. **Microscopy Research Technique**, New York, v. 74, p. 889–899, 2011.

DOLAN, M.C.; JORDAN, R. A.; SCHULZE, T. L.; SCHULZE, C. J.; MANNING, M. C.; RUFFOLO, D.; SCHMIDT, J. P.; PIESMAN, J.; KARCHESY, J. Ability of two natural products, nootkatone and carvacrol, to suppress *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* Acari: Ixodidae) in a Lyme Disease endemic area of New Jersey. **Medical Entomology**, v. 102, n. 6, 2009.

DRUMMOND, R. O.; ERNST, E. S.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, H. O. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–133, 1973.

EIDEN, A. L.; KAUFMAN, P. E.; ALLAN, S. A.; OI, F. Establishing the discriminating concentration for permethrin and fipronil resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae), the brown dog tick. **Pest Management Science**, v. 72, n. 7, p. 1390–1395, 2016.

ESTRADA, A. Ticks as vectors : taxonomy , biology and ecology. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 34, n. 1, p. 53–65, 2015.

GUERRERO, F. D.; PEREZ, L. A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JOSSON, N.; MILLER, R. J.; ANDREOTTI, R. Biology of Ticks. In: SONENSHINE, D. E.; ROE, R. (Eds.). **Biology of Ticks**. 2^a ed. New York: [s.n.]. p. 353–381, 2014.

HEKIMOĞLU, O.; SAGLAM, I. K.; OZER, N.; ESTRADA-PENÃ, A. New molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 798–807, 2016.

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**, Amsterdam, v. 193, n. 1–3, p. 316–319, 2013.

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, J. R.; REMEDIO, R. N.; ARNOSTI, A.; ABREU, R. M. M.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. The effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. JUSS) enriched with different concentrations of azadirachtin on the integument of semi-

engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) female. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 80, p. 838-844, 2017.

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.

MELLO, M. L.; VIDAL, B. C. Práticas de Biologia Celular. Campinas, Ed: Blücher, p.71, 1980.

MCTIER, T. L.; CHUBB, N.; CURTIS, M. P.; HEDGES, L.; INSKEEP, G. A.; KNAUER, C. S.; MENON, S.; MILLS, B.; PULLINS, A.; ZINSER, E.; WOODS, D. J.; MEEUS, P. Discovery of sarolaner: A novel, orally administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.222, p. 3-11, 2016.

MILLER, R. J.; GEORGE, J. E.; GUERRERO, F.; CARPENTER, L.; WELCH, J. B. Characterization of Acaricide Resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) Collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. **Journal of Medical Entomology J.**, v. 38, n. 382, p. 298–302, 2001.

MOERBECK, L.; VIZZONI, V. F.; MACHADO-FERREIRA, E.; CAVALCANTE, R. C.; OLIVEIRA, S. V.; SOARES, C. A. G.; AMORIM, M.; GAZÊTA, G. S. 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. 0, n. 0, p. 1–9, 2016.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, Basel, v. 117, n. 1, p. 51–55, 2011.

NAQQASH, M. N.; GÖKÇE, A.; BAKHSH, A.; SALIM, M. Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. **Parasitology Research**, Berlin, v. 115, p. 1363-1373, 2016.

NAVA, S.; ESTRADA-PENÃ, A.; PETNEY, T.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; VENZAL, J. M.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 208, n. 1–2, p. 2–8, 2015.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 28–35, 2012.

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.

OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. *Amblyomma triste* (Kock, 1844) (Acari; Ixodidae): Morphological description of the ovary and of vitellogenesis. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 113, p. 179-185, 2006.

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.; BECHARA, G. H.; MORALES, M. A. M.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1255-1264, 2009.

OLIVEIRA, P. R.; FERREIRA, M.; DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Action of the Chemical Agent Fipronil (Active Ingredient of Acaricide Frontline 1) on the Liver of Mice : An Ultrastructural Analysis. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 205, n. May 2011, p. 197–205, 2012.

PANELLA, N. A.; DOLAN, M. C.; KARCHESY, J. J.; XIONG, Y.; PERALTA-CRUZ, J.; KHASAWNEH, M.; MONTENIERI, J. A.; MAUPIN, G. O. Use of Novel Compounds for Pest Control : Insecticidal and Acaricidal Activity of Essential Oil Components from Heartwood of Alaska Yellow Cedar. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 352-358, 2005.

PAT-NAH, H.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; BOLIO-GONZALEZ, M. E.; VILLEGAS-PEREZ, S. L.; REYES-NOVELO, E. Molecular diagnosis of ehrlichia canis in dogs and ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 52, n. 1, p. 101–104, 2015.

RAMÍREZ, C.; IBARRA, F.; PÉREZ, H. I.; MANJARREZ, N.; SALGADO, H.

J.; ORTEGA, L. Assessment and determination of LC50 of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasite Epidemiology and Control**, p. 72-77, 2016.

REMEDIÓ, R. N.; NUNES, P. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. The extensible integument of *Rhipicephalus sanguineus* female ticks in different feeding stages: a morphological approach. **Acta Zoologica**, v. 0, p. 1-9, 2014.

REMEDIÓ, R. N.; NUNES, P. H.; ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, 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**, Berlin, v. 114, p. 431-444, 2015.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; OJEDA-CHI, M. .; TRINIDAD-MARTINEZ, I.; PÉREZ de LÉON, A.A. First documentation of ivermectin resistance in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 233, 2017.

ROSADO-AGUILAR, J. A.; AGUILAR-CABALLERO, A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; BORGES-AGAEZ, R.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; MENDEZ-GONZALEZ, M. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 238, n. March, p. 66-76, 2017.

SAITO, K. C.; BECHARA, G. H.; NUNES, E. T.; OLIVEIRA, P. R.; DENARDI, S. E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 129, n. 3 Amsterdam, 1, 2005.

SAMPIERI, B. R.; ARNOSTI, A.; FURQUIM, K. C. S.; CHEIRICE, G. O.; BECHARA, G. H.; CARVALHO, P. L. P. F.; NUNES, P. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. 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**, Amsterdam, v. 191, n. 3-4, p. 315-322, 2013.

SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; MATOS, R. S.; MELO, D.; GOMES, G. A.; CARVALHO, G. A.; DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 112, p. 3471-3476, 2013.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. Biology of Ticks. In: SONENSHINE, D. E.;

ROE, R. M. (Eds.). . **Biology of Ticks**. 2nd. ed. New York: [s.n.]. p. 99–121, 2014.

VENDRAMINI, M. C. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FARIA, A. U.; FURQUIM, K. C. S.; SOUZA, L. P.; BECHARA, G. H.; ROMA, G. C. Action of Andiroba Oil (*Carapa guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) (Acari: Ixodidae) Semi-engorged Females: Morphophysiological Evaluation of Reproductive System. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 75, p. 1745–1754, 2012.