
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

COORIENTADOR: 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 isoxazolinas (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

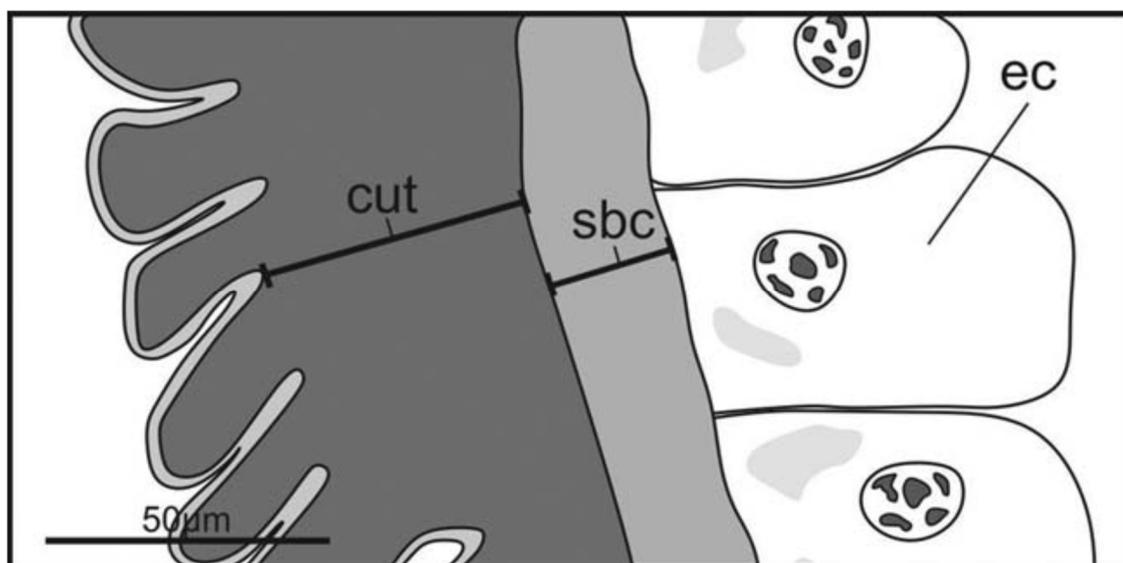
realizados, pouco ainda se sabe sobre a sua ação na morfologia interna e externa dos carrapatos a ele expostos.

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.



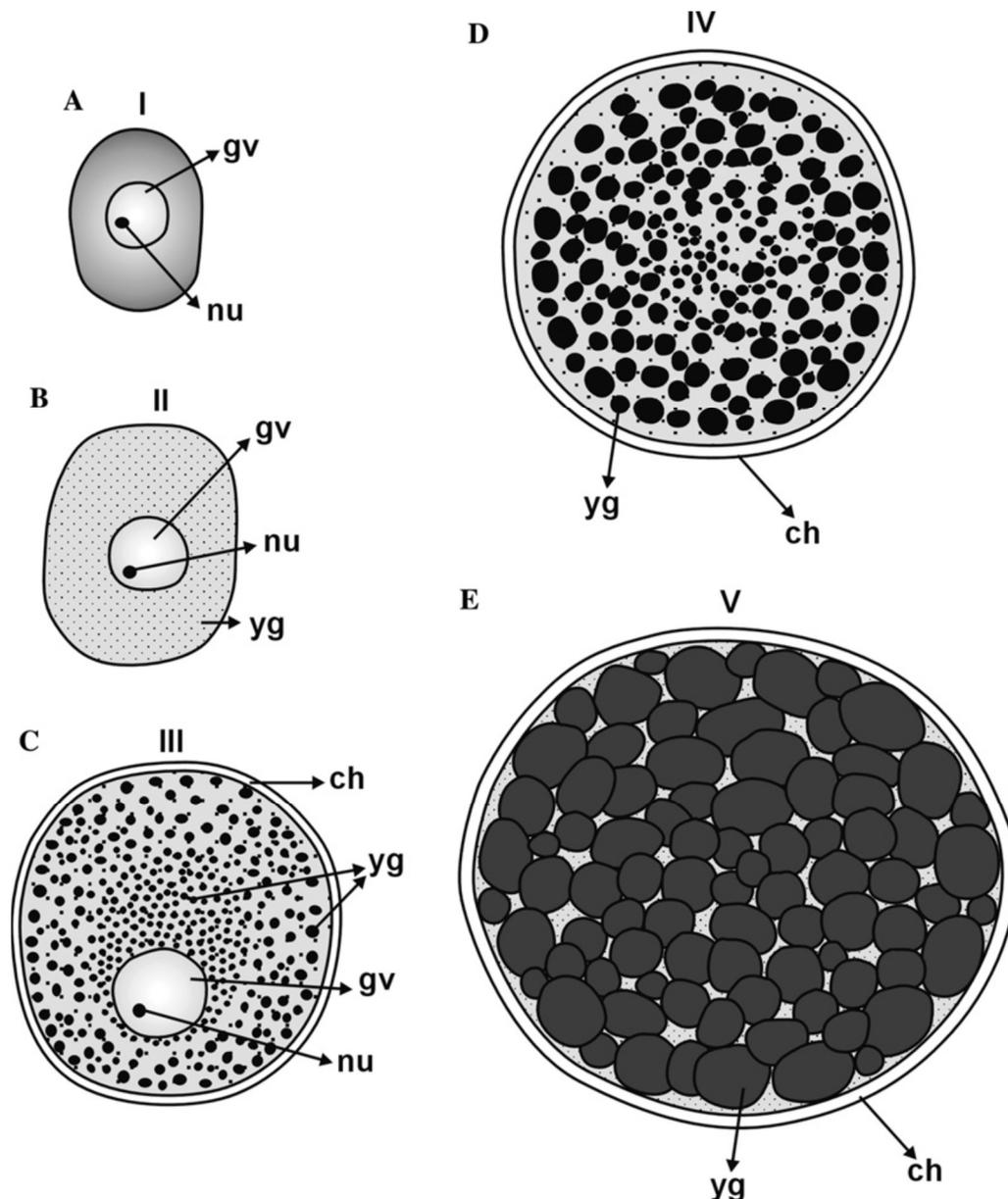
Atualmente, vários estudos fazendo uso de compostos naturais extraídos de plantas têm sido realizados e, muitos deles abordando o comportamento morfofisiológico do integumento, tendo em vista que este órgão é o primeiro a entrar em contato com os produtos acaricidas quando estes são aplicados topicamente. 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).

Objetivos

2. OBJETIVOS

De acordo com as informações expostas anteriormente e levando-se em consideração a importância médico-veterinária dos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s.l., além da necessidade de se buscar métodos alternativos de controle baseados em custos menores e causadores de menores prejuízos aos organismos não alvos, ao meio ambiente, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos causados pelo princípio ativo carvacrol (potencial acaricida) em concentrações diferentes, sobre a morfofisiologia do integumento e dos ovários de carrapatos do cão *R.sanguineus* s.l.

Objetivos específicos

- . Determinar a CL_{50} (concentração letal média) do carvacrol para fêmeas semi-ingurgitadas.
- . Avaliar por meio da aplicação de técnicas morfohistológicas quais alterações ocorreram nos ovários de fêmeas semi-ingurgitadas expostas ao carvacrol nas concentrações de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$.
- . Avaliar por meio da aplicação de técnicas histoquímica e ultramorfológica quais alterações ocorreram no integumento de fêmeas semi-ingurgitadas expostas ao carvacrol nas concentrações de 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) com 99% de pureza, utilizado no presente estudo foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (Cotia, SP, Brasil).

3.2. Obtenção das fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s.l.

Os procedimentos realizados neste estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil), protocolo número 3822, decisão número 012/2015.

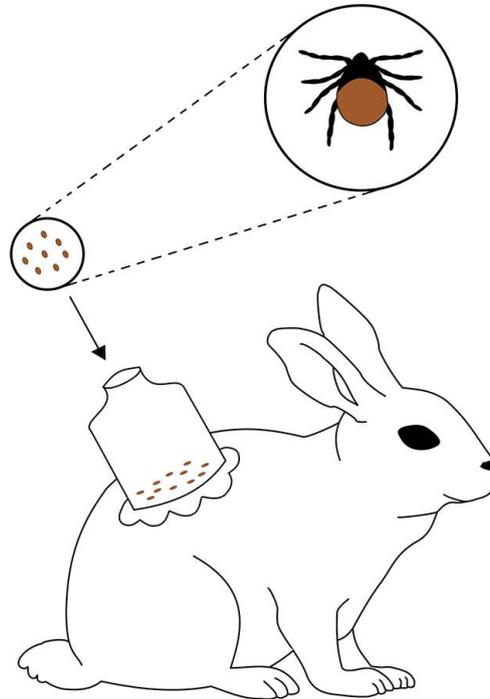
Foram utilizados carrapatos *R. sanguineus* s.l., coletados a partir de colônia mantida em condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em estufa BOD, em sala do Biotério do Departamento de Biologia (IB) – UNESP, campus de Rio Claro/SP, Brasil. Antes do experimento, os carrapatos sob estereomicroscópio (Carl Zeiss, Stemi 2000), foram observados e, somente aqueles aptos para se locomover e que não apresentavam mutilações foram utilizados.

Especificamente para obtenção das fêmeas semi-ingurgitadas (quatro e/ou cinco dias), machos e fêmeas foram alimentados por meio de infestações artificiais em coelhas da linhagem do Grupo Genético de Botucatu, pesando cada uma entre 3 a 3.5 Kg. As infestações se deram em sala alocada no Biotério do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, São Paulo, Brasil onde também está em atividade a Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM).

3.3. Infestações

Machos e fêmeas de *R. sanguineus* s.l. foram liberados no interior de câmaras alimentadoras (confeccionadas com tecido de algodão), previamente coladas no dorso das coelhas hospedeiras, com cola biológica composta por: água destilada (150 mL), glicerina (100 mL), gelatina (80 g) e óxido de zinco (60 g) (Fig.3.).

Figura 3. Esquema representativo da fixação da câmara de infestação no dorso do hospedeiro com cola biológica, segundo o autor.



As hospedeiras não tiveram contato prévio com carrapatos e foram mantidas em gaiolas galvanizadas individuais, além de terem recebido água e ração *ad libitum* (BECHARA et al., 1995). Após o período de alimentação (quatro a cinco dias) as fêmeas semi-ingurgitadas dos carrapatos foram coletadas com auxílio de pinça, e lavadas em água destilada para em seguida serem submetidas ao teste de imersão proposto por Drummond et al. (1973). As hospedeiras, após término dos experimentos, foram eutanasiadas por via intraperitoneal com ketamina e xilazina nas dosagens de 300 mg/kg e 30 mg/kg respectivamente.

3.3.1. Infestações Totais

Na primeira infestação foram utilizados 260 machos e 520 fêmeas de *R. sanguineus* s.l.; nas segunda e terceira infestações, 50 machos e 100 fêmeas. Nestes procedimentos foram utilizadas no total 8 coelhas (hospedeiras), que ao término das infestações foram eutanasiadas.

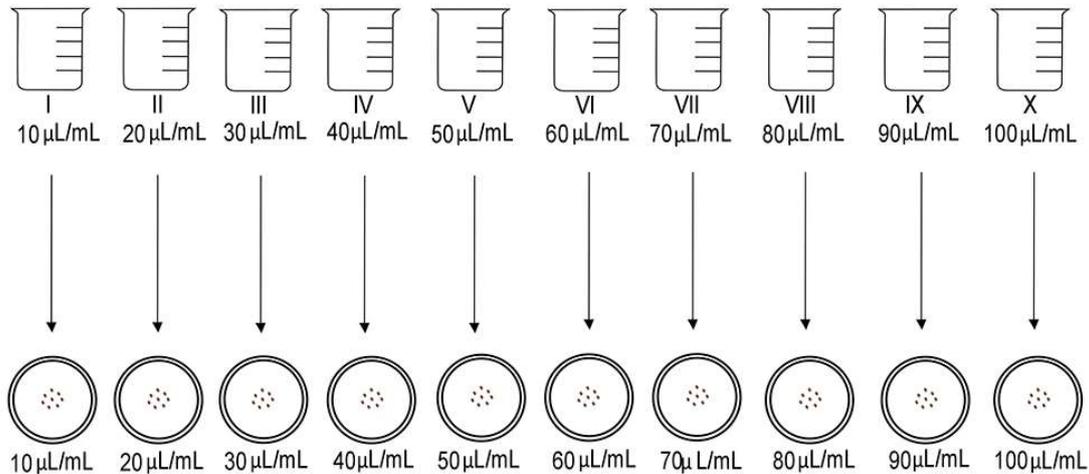
3.4. Bioensaios *in vitro* com carvacrol para determinação da CL50%

3.4.1. Bioensaio 1

Duzentas e quarenta fêmeas de carrapatos foram alocadas em 12 grupos experimentais sendo eles 2 controles (C_I e C_{II}) onde as fêmeas foram expostas à água destilada (C_I) e ao solvente etanol a 50° GL (C_{II}) e 10 tratamentos nos quais 10 indivíduos/grupo foram expostos às concentrações de 10-100 µL/mL do carvacrol diluído em solução hidroetanólica (etanol a 50° GL) respectivamente (Fig. 4). Essas diluições deram-se a partir de dados de experimentos realizados previamente por Senra et al. (2013). A homogeneização (carvacrol + solução hidroetanólica) deu-se em agitador magnético (Quimis) por 1 minuto na velocidade de 30 rpm.

Todos os testes foram realizados em duplicatas.

Figura 4. Exposição das fêmeas de *R. sanguineus* s.l. às diferentes concentrações do carvacrol (bioensaio 1), segundo o autor



Depois de retiradas das hospedeiras, após 5 dias de alimentação as 240 fêmeas foram, em peneira, lavadas em água corrente. Posteriormente foram secas em papel absorvente macio. No teste de imersão de adultos (TIA) (DRUMMOND et al., 1973) as fêmeas de todos os grupos foram imersas nas diferentes substâncias por 5 minutos. Aquelas dos grupos controle foram imersas em água destilada e etanol a 50°GL e, as do tratamento em diferentes concentrações de carvacrol (10-100 µL/mL) diluído em etanol

50°GL. Após decorridos 5 minutos, as fêmeas foram secas em papel absorvente, e colocadas em placas de Petri (90 x15 mm) identificadas, as quais foram colocadas em estufas Eletrolab EI 202 BOD(Biological Oxygen Demand) sob condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas). Os indivíduos dos grupos controle e tratamento foram colocados em estufas BOD diferentes para evitar contaminação pelo carvacrol, visto este ser volátil.

A mortalidade das fêmeas semi-ingurgitadas expostas ao carvacrol foi monitorada diariamente até serem completados 7 dias do bioensaio, conforme proposto por (OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008). Apenas fêmeas com capacidade de locomoção foram consideradas vivas.

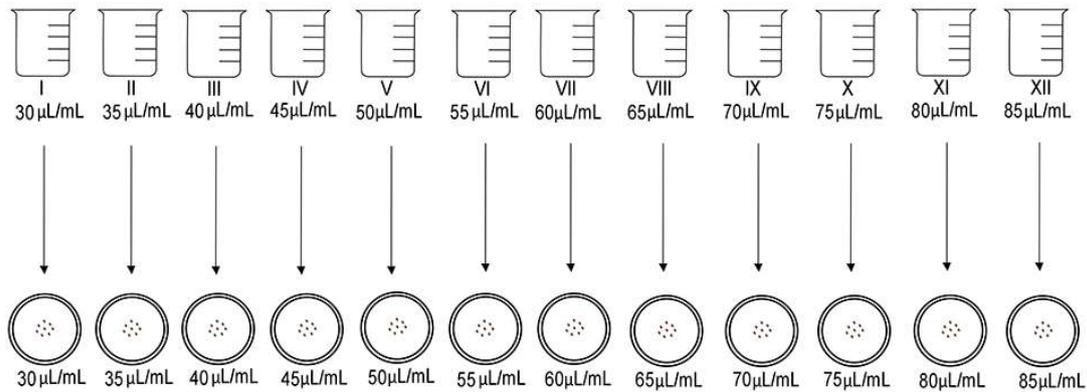
3.4.2. Bioensaio 2

Após a detecção do intervalo de mortalidade, o carvacrol foi novamente diluído em etanol 50°GL, obtendo-se diferentes concentrações (30 - 85 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Duzentas e oitenta fêmeas de carrapatos com massas corporais homogêneas, foram alocadas em 14 grupos experimentais, 10 indivíduos/grupo. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

Nos dois **Grupos Controle** (C_I e C_{II}), as fêmeas foram novamente expostas à água destilada (C_I) e ao solvente etanol a 50° GL (C_{II});

Os indivíduos que foram expostos ao carvacrol nas concentrações de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 $\mu\text{L}/\text{mL}$ em solução hidroetanólica (etanol a 50° GL), foram alocados em **12 grupos** (Fig. 5).

Figura 5. Exposição (bioensaio 2) das fêmeas de *R. sanguineus* s.l. às diferentes concentrações do carvacrol, segundo o autor.



As 280 fêmeas foram retiradas das hospedeiras, após cinco dias de alimentação, sendo em seguida colocadas em peneira (22x15x7 cm) e lavadas em água corrente. Depois, foram secas em papel absorvente macio para aplicação do teste de imersão (TIA) segundo Drummond et al. (1973). As fêmeas dos grupos controle foram imersas (5 minutos) em água destilada e em etanol a 50°GL. Após, foram secas em papel absorvente, e colocadas em placas de Petri (90 x 15 mm) identificadas, em estufa BOD sob condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas). As fêmeas dos grupos controle e tratamento foram colocadas em estufas BOD diferentes para evitar contaminação pelo carvacrol, visto este ser volátil. A mortalidade das fêmeas foi monitorada diariamente até serem completados 7 dias de bioensaio, conforme proposto por Oliveira et al. (2008). Após o sétimo dia, os dados de mortalidade obtidos foram submetidos a análise estatística por meio do programa Probit.

3.4.3. Análise Estatística

O intervalo de mortalidade para fêmeas de *R. sanguineus* s. l. obtidos nos bioensaios 1 e 2 foram submetidos a análise de variância one-way (ANOVA) com aplicação do teste post hoc de Tukey com níveis de significância estabelecidos em $p < 0,05$ por meio do software Graph-Pad Prism v.7 (GrapPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados de mortalidade do bioensaio 2 foram submetidos à análise Probit através do software POLO PC (LeOra SOFTWARE, 1987) para calcular a concentração letal de 50% (CL_{50}) e o intervalo de confiança de 95%.

3.5. Histologia dos ovários

A partir das concentrações utilizadas no estudo realizado por Senra et al. (2013) o qual utilizou estágios imaturos de *R. sanguineus* s.l., foram realizadas várias diluições do carvacrol em etanol 50°GL para obtenção das concentrações de 20, 50 e 100 µL/mL.

Em seguida, 20 fêmeas de *R. sanguineus* s.l. foram colocadas em cada uma das concentrações do carvacrol acima mencionadas, em Beckers previamente identificados, e aí ficaram imersas por 5 minutos (DRUMMOND et al.,1973). O mesmo procedimento foi realizado com os indivíduos do grupo controle (água destilada e etanol a 50°GL). Após a imersão, as fêmeas foram secas com papel absorvente, colocadas em placas de Petri identificadas, que foram cobertas com filme plástico com pequenos orifícios para a entrada de ar. As mesmas foram mantidas em estufas BOD a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas por sete dias para posterior análise morfohistológica. Os carrapatos do grupo controle foram mantidos em estufa BODs diferentes daquelas utilizadas para os grupos tratados, evitando possíveis interferências provenientes da evaporação do carvacrol.

Depois de decorridos sete dias de exposição, foram coletadas de cada grupo (controles e tratamentos) 5 fêmeas (semi ingurgitadas com quatro dias de alimentação). Na sequência as fêmeas foram anestesiadas por choque térmico (em freezer a 2°C por 1 minuto para diminuição do metabolismo sem causar a morte) para retirada dos ovários, os quais foram fixados em paraformaldeído a 4% por 72 horas. Depois foram transferidos para solução tampão fosfato de sódio (pH 7.2) por 24 horas para posteriormente serem desidratados em série crescente de álcool etílico (70, 80, 90 e 95%) a intervalos de 20 minutos. A infiltração deu-se em resina Leica (Leica Historesin Embedding Kit) e os ovários foram colocados em moldes plásticos mantidos a 4°C para retardar a pré-polymerização. O material foi seccionado com 3 µm de espessura em micrótomo Leica RM 2255 e as secções foram colocadas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina-eosina (HE). Posteriormente, as lâminas foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

3.6. Histologia do integumento

As 100 fêmeas de carrapatos foram alocadas em 5 grupos experimentais: dois controles (**C_I** e **C_{II}**), onde foram expostas, respectivamente, à água destilada (**C_I**) e ao etanol a 50°GL em água destilada (**C_{II}**); e três tratamentos (**T_I**-**T_{III}**), nos quais as fêmeas foram expostas às concentrações de 3 µL/mL (**T_I**); 12,5 µL/mL (**T_{II}**) e 25 µL/mL (**T_{III}**) de carvacrol, correspondendo respectivamente, a 5, 20 e 40% da concentração letal média (CL50) do carvacrol diluído em etanol a 50°G. Foram utilizadas 10 fêmeas por grupo, além do que todos os testes foram realizados em duplicatas.

Em cada grupo experimental, 20 fêmeas de *R. sanguineus* s.l. foram imersas nas diferentes soluções por 5 minutos (DRUMMOND et al., 1973). Após imersão, foram secas com papel absorvente e colocadas em placas de Petri identificadas, cobertas com filme plástico com pequenos orifícios para a entrada de ar. As placas foram mantidas em estufas BODs $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias para posterior análise morfo-histológica. As placas contendo as fêmeas do grupo controle foram mantidas em estufas BODs diferentes da utilizada para os grupos tratados, evitando possíveis interferências provenientes da evaporação do carvacrol.

Cinco fêmeas por grupo experimental depois de anestesiadas (choque térmico) foram dissecadas sob estereomicroscópio, em placas de Petri contendo tampão fosfato salino (PBS: NaCl 0.13M, Na₂HPO₄ 0.017M, KH₂PO₄ 0.02M, pH 7.2), para a remoção de fragmentos do integumento (região dorsal do aloescudo). Em seguida, o material foi fixado em paraformaldeído a 4% por 72 horas e, então, transferido para tampão fosfato de sódio (pH 7.2) por 24 horas. Na sequência, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcool etílico (70, 80, 90 e 95%) por 20 minutos cada. Após o material foi colocado em resina de embebição (Leica Historesin Embedding Kit) por sete dias e foi incluído em moldes plásticos contendo historesina. O material permaneceu em estufa por sete dias para polimerização da resina e, em seguida foi seccionado em micrótomo LEICA RM 2255 com secções de 3 µm de espessura, as quais foram colocadas em lâminas de vidro previamente limpas para serem coradas pela hematoxilina e eosina. Após coloração as lâminas foram secas ao ar livre, foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínula e em seguida examinadas e fotografadas em microscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

3.7. Histoquímica do integumento

Fragmentos do integumento de fêmeas de carrapatos dos grupos controle e tratamento foram submetido à técnica histoquímica para detecção de proteínas totais pelo xylidine Ponceau (MELLO; VIDAL, 1980).

3.7.1. Xylidine Ponceau

O material foi fixado em paraformaldeído a 4% por 72 horas e depois de seccionado foi corado pelo xylidine Ponceau por 30 minutos com posterior lavagem em água corrente. Depois de permanecer por 1 minuto em ácido acético 1%, as lâminas contendo as secções foram secas e montadas em bálsamo do Canadá para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio LEICA DM 750, equipado com câmera Leica ICC50 HD, por meio do software Leica LAS v.3.8, alocado nas dependências do Laboratório de Histologia, Departamento de Biologia da UNESP, Rio Claro, Brasil.

3.8. Microscopia Eletrônica de Varredura do integumento (MEV).

Cinco fêmeas de cada grupo experimental, depois de anestesiadas por choque térmico foram fixadas em solução de Karnovsky (paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2.5 % em tampão Sorensen 0.1M) durante 24 horas. Depois foram lavadas em água destilada, desidratadas em soluções crescentes de acetona (70%, 80%, 90% e 95%), e passadas duas vezes em acetona pura (100%), cada banho com duração de 10 minutos. Após o material foi processado em “Criptical Point Drying”, para completar a desidratação. O material foi então colado (com auxílio de fita adesiva dupla face) em suportes de alumínio (stubs), foi metalizado com ouro em “Sputtering”, examinado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura HITACHI TM3000 SEM.

Resultados

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo estão sendo apresentados sob a forma de quatro capítulos: a) artigos científicos nos status de publicado, submetidos e/ou em preparação para submissão em periódicos internacionais especializados na área e b) capítulo de livro publicado.

Capítulo 1

Status: Submetido (Under Review)

LIMA DE SOUZA, J. R.; Oliveira, P. R.; Anholetto, L. A.; Sodelli, L. F.; Remedio, R. N.; Camargo-Mathias, M. I. Determination of the median lethal concentration (LC₅₀) of the bioactive substance carvacrol for control of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae).

Capítulo 2

Status: Publicado

LIMA DE SOUZA, J. R.; Oliveira, P. R.; Anholetto, L. A.; Arnosti, A.; Daemon, E.; Remedio, R. N.; Camargo-Mathias, M. I. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae).

Periódico: Micron <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.09.015>

Capítulo 3

Status: Publicado

LIMA DE SOUZA, J. R.; Remedio, R. N.; Oliveira, P. R.; Arnosti, A.; Abreu, R. M. M.; Camargo-Mathias, M. I. Defense and Protection (Integument). In: Camargo-Mathias, M. I. (Ed.) Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2018. p. 35-38.

Capítulo 4

Status: Em preparação

LIMA DE SOUZA, J. R.; Oliveira, P. R.; Anholeto, L. A.; Sodelli, L. F.; Fernandes, A. R.; Furquim, K. C. S.; Remedio, R. N.; Camargo-Mathias, M. I. O biotiavo carvacrol como potencial acaricida: avaliação dos seus efeitos sobre o integumento de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1

Determination of the median lethal concentration (LC₅₀) of the bioactive substance carvacrol for control of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae).

JOSÉ RIBAMAR LIMA DE SOUZA¹, Patrícia Rosa Oliveira¹, Luís Adriano Anholetto¹,
Luís Fernando Sodelli¹, Rafael Neodini Remedio² e Maria Izabel Camargo-Mathias¹.

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

² Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras- UFLA, Lavras, MG, Brasil.

* Autor correspondente: E-mail: maria.izabel@unesp.br

ABSTRACT

Many active substances extracted from plants have been tested for use to control parasites. A standout is carvacrol, whose acaricidal activity has been confirmed against some tick species. The objective of this work was to determine the median lethal concentration (LC₅₀) of this bioactive substance when diluted in an aqueous solution of 50% ethanol on semi-engorged females of the species *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. For this purpose, 16 treatment groups, each containing 20 female ticks, were exposed to different concentrations of carvacrol, while 2 control groups were exposed either to water or a 50% hydroethanolic solution. Two bioassays were performed, the first to determine the mortality interval of carvacrol and the second to estimate the LC₅₀ of carvacrol, using the Probit software. The females exposed to the smaller concentrations of carvacrol (10 and 20 µL/mL) were not affected, while exposure to the highest concentration (100 µL/mL) caused the highest mortality rate (96%). The results revealed that carvacrol had a dose-dependent effect, and was most efficient (caused the highest mortality) in the first 72 hours of exposure. Finally, the LC₅₀ value of carvacrol to the semi-engorged female ticks was on the order of 62.48 µL/mL (confidence interval of 58.91- 66.56 µL/mL).

Keywords: Monoterpene, mortality rate, ticks, toxicology, acaricide.

1. Introduction

As the common “brown dog ticks”, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.) is a tick species whose preferred host is dogs, and it is of medical-veterinary interest due to its ability to transmit pathogens to the host, such as *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* [1], causing ailments such anemia and skin lesions, among others [2].

Various studies have been conducted to find alternative strategies to control these ectoparasites, to try to minimize the damages caused both to the environment and non-target organisms, but many avenues for further research remain unexplored. Most studies in this respect have been carried out in the laboratory in the area of immunology, involving experiments and tools focused on identifying, isolating and synthesizing proteins that can protect cells, tissues and organs from ticks, with the ultimate objective of developing vaccines [3].

Despite the frequent research in this area, the most efficient and widely used method to control ticks is still the application of synthetic chemical acaricides, which although efficient, cause collateral damages to the environment (leaving toxic residues) and to non-target organisms (including the hosts themselves). Various studies have reported that the misuse of these chemical products causes a series of diseases, both to target and non-target organisms, plus the problem of the selection of resistant tick strains [4,5], which after a certain period of exposure to the product no longer are affected, since they have developed internal mechanisms to defeat the acaricidal action. Hence, there is a need to find new chemical products with acaricidal action in very short periods (up to 5 years). Furthermore, strict protocols need to be developed for application of these chemicals so as not to cause serious consequences to non-target organisms and the environment [4].

To overcome the various problems described above, active substances from plants have been investigated to control ticks, with promising results, since several biological effects have been demonstrated (insecticidal, fungicidal, acaricidal, etc.). In particular, carvacrol, an active substance extracted from plants of the families Lamiaceae and Verbenaceae, has been found in many studies to have action against ticks of the genus *Rhipicephalus* [6–9].

In light of this information and given the urgent need to find strategies to control ticks that are efficient while causing minimum damage to the environment and non-target organisms, the objective of this study was to determine the LC₅₀ of carvacrol against semi-

engorged females of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* s.l. This substance has already been shown to have acaricidal action on different life stages of other parasite species.

2. Material and Methods

2.1. Chemical Substance

The acaricide carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol, CAS 499-75-2), with 99% purity, used in this study was obtained from Sigma-Aldrich (Cotia, SP, Brazil).

2.2. Ticks

We used 520 semi-engorged females of *R. sanguineus* s.l., with average weight of 29 ± 3.4 mg, obtained from a colony maintained under controlled conditions (28 °C, 85% relative humidity and photoperiod of 12 h) in a BOD incubator in the vivarium room of the Department of Biology of Paulista State University (UNESP), Rio Claro Campus, in the state of São Paulo, Brazil. We selected females without loss of members or malformation, as determined by viewing under a stereoscopic microscope (Carl Zeiss, Stemi 2000). They were maintained in an Eletrolab El 202 BOD incubator at 28 ± 1 °C and RH of $80 \pm 10\%$ until being transferred to feeding chambers attached on the backs of rabbits, according to the method described by [10] where they remained for 5 days.

2.3. Hosts

Female rabbits of the Botucatu genetic group were used, with weight between 3 and 3.5 Kg, obtained from the vivarium of UNESP – Botucatu Campus, SP, Brazil and were maintained in the vivarium at the university's Rio Claro Campus, under controlled conditions (28 ± 1 °C, 85% humidity and 12 h photoperiod). The rabbits had no previous contact with ticks or acaricides. During the entire experiment, the animals were kept individually in cages and received water and commercial feed *ad libitum*.

The study was approved by the ethics committee on animal research of UNESP (protocol 3822, issued in December 012/2015).

2.4. Adult Immersion Test (AIT).

2.4.1. Bioassay 1

To determine the mortality interval of the ticks, 240 females were allocated to 12 experimental groups: 2 control and 10 treatment groups, with 10 individuals per group. The tests were performed in duplicate.

In the control groups (C_I and C_{II}), the ticks were exposed to distilled water (C_I) or 50% hydroethanolic solution (C_{II}).

The treatment groups (designated T_I to T_x) were exposed to concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 µL/mL of carvacrol diluted in the 50% hydroethanolic solution. The concentrations were chosen based on experiments conducted previously. Each dilution (carvacrol + hydroethanolic solution) was homogenized in a magnetic stirrer (Quimis) for 1 minute at speed of 3 rpm.

Before the start of the tests, the 240 semi-engorged female ticks were removed from the hosts after having fed for 5 days and then were washed in a sieve with running water, followed by drying on soft absorbent paper. The adult immersion test (AIT) followed the protocol described by [11], where the ticks of the 10 treatment groups were immersed in the different concentrations of carvacrol (10-100 µL/mL diluted in 50% ethanol) for 5 minutes. Those in the control groups were immersed in distilled water or 50% ethanol for the same period. Then the ticks were dried on absorbent paper and placed in labeled Petri dishes (90 x 15 mm) and kept in BOD incubators under controlled conditions (28±1°C, 85% humidity and 12 h photoperiod). The control and treatment groups were kept in different incubators to prevent contamination of the former by the carvacrol, which is a volatile substance.

The mortality of the semi-engorged females and action of carvacrol were monitored daily for 7 days, as proposed by [12]. At the end of the seventh day the mortality interval was determined. Only ticks with ability to move about were considered to be alive.

2.4.2. Bioassay 2

After determination of the mortality interval, new carvacrol solutions were prepared by dilution in 50% hydroethanolic solution. Two hundred eighty female ticks with homogeneous weight were allocated in 14 experimental groups (2 control and 12 treatment groups), with 10 individuals/group. Again, the tests were conducted in duplicate.

In the two control groups (C_I and C_{II}), the ticks were exposed to distilled water (C_I) or 50% (C_{II}).

In the treatment groups (T_I to T_{XII}), the ticks were exposed to concentrations of 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 or 85 $\mu\text{L/mL}$ of carvacrol diluted in the 50% hydroethanolic solution.

As in the first bioassay, before the start of the tests, the 280 semi-engorged female ticks were removed from the hosts after having fed for 5 days and then were washed in a sieve with running water, followed by drying on soft absorbent paper. The adult immersion test (AIT) was performed as described by [11], where the ticks of the treatment groups were immersed in the different concentrations of carvacrol for 5 minutes, while those in the control groups were immersed in distilled water or 50% ethanol for the same period. Then the ticks were dried on absorbent paper and placed in labeled Petri dishes (90 x 15 mm) and kept in BOD incubators under controlled conditions ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% RH and 12-hour photoperiod). The control and treatment groups were again kept in different incubators to prevent contamination of the former by volatilization of carvacrol.

The mortality of the semi-engorged females and action of carvacrol were monitored daily for 7 days, as proposed by [12]. At the end of the seventh day the mortality data were submitted to statistical analysis by the Probit program.

2.4.3. Statistical Analysis

The mortality interval obtained for the female ticks in bioassay 1 and mortality data obtained in bioassay 2 were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by application of the post hoc Tukey test, in both cases at significance of $p < 0.05$, using the Graph-Pad Prism v.7 software (GrapPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The mortality data from bioassay 2 were also submitted to Probit analysis using the POLO PC software (LeOra Software, 1987) to calculate the median lethal concentration (LC_{50}) and the 95% confidence interval.

3. Results

3.1. Bioassay 1

In this test, the female ticks of the control groups (C_I and C_{II}) did not present mortality after seven days of exposure. Furthermore, no morphological alterations (integument) or behavioral changes were observed. A similar result was obtained for the ticks allocated in the treatment groups exposed to the two lowest concentrations (10 and 20 µL/mL) of carvacrol, with no mortality detected after seven days (Fig 1; Tab. 1).

In the groups exposed to concentrations of 30 and 40 µL/mL, mortality was observed as of the second day of the experiment, with values that remained stable until the seventh day (~7%). As before, no morphological changes in the integument or behavioral modifications were observed.

In contrast, in the group exposed to the carvacrol concentration of 50 µL/mL there was a progressive mortality rate (7%-13%), starting on the second day of the experiment and peaking on the sixth day (Fig. 1; Tab.1).

In the groups exposed to the concentrations of 60 µL/mL to 100 µL/mL, the mortality also increased progressively, from 60% to 96%, with the highest rate observed from the third day until the end of the experiment, confirming a dose-dependent relationship (higher mortality with greater concentration) (Tab.1). At these concentrations, the ticks began to die on the first day of the experiment, a situation that was maintained until the end of the experiment

At the concentrations of 80 and 90 µL/mL, on the first and second days 14 and 15 ticks died, while at the highest concentration (100 µL/mL), 16, 17 and 19 ticks died on the first, second and third days (Tab. 1).

Morphological alterations (wrinkles or folds) were also noted in the integument of the ticks exposed to carvacrol concentrations from 60 µL/mL and 100 µL/mL, along with behavioral changes, such as reduced locomotion, inverted prostration and in some cases total paralysis.

3.2. Bioassay 2

From the data obtained, it was possible to establish the mortality interval for the semi-engorged females of *R. sanguineus* s.l. when exposed to carvacrol. This interval included the concentrations from 30 to 85 µL/mL (Tab. 2), meaning that the females were sensitive to all the concentrations in this interval. There was also a (progressive) increase

in the mortality rate in this concentration range, which varied from 5 to 85% (Fig 2; Tab 2).

The ticks submitted to the lowest carvacrol concentrations (30 to 45 $\mu\text{L}/\text{mL}$) did not present morphological changes to the integument or behavioral changes. However, exposure to higher concentrations (50 to 85 $\mu\text{L}/\text{mL}$) caused dehydration of the integument (presence of wrinkles/folds) and behavioral changes: reduced locomotor activity, inverted prostration and repetitive movements. Besides this, the highest mortality rate (85%) was observed at the concentration of 85 $\mu\text{L}/\text{mL}$, which occurred on the second and third days of the experiment.

Based on the mortality data obtained in bioassay 2, we established that the 50% lethal concentration (LC_{50}) and the confidence interval were, respectively, 62.48 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (58.91- 66.56) (Tab. 3).

Table. 1.: Bioassay 1: percentage of dead *Rhipicephalus sanguineus* s.l. females ticks exposed to different concentration of carvacrol.

Concentration of carvacrol (µL/mL)	Percentage of dead ticks/ days treatment (%)						
	1 st day	2 nd day	3 rd day	4 th day	5 th day	6 th day	7 th day
Control H ₂ O	0	0	0	0	0	0	0
Control Ethanol 50%	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0
30	0	7	7	7	7	7	7
40	0	7	7	7	7	7	7
50	0	7	7	7	7	13	13
60	47	53	60	60	60	60	60
70	60	63	70	70	70	70	70
80	60	74	82	82	82	82	82
90	70	78	86	86	86	86	86
100	80	87	96	96	96	96	96

Table 2: Bioassay 2: percentage of dead *Rhipicephalus sanguineus* s.l. females ticks exposed to different concentration of carvacrol.

Concentration of carvacrol ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Percentage of dead ticks/ days treatment (%)						
	1 st day	2 nd day	3 rd day	4 th day	5 th day	6 th day	7 th day
Control H ₂ O	0	0	0	0	0	0	0
Control Ethanol 50%	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	5	5	5	5
35	0	0	0	5	5	5	5
40	0	0	0	5	5	5	5
45	0	7	7	7	7	13	13
50	0	10	10	10	10	15	15
55	5	15	25	25	25	25	25
60	15	30	45	45	45	45	45
65	20	35	55	55	55	55	55
70	40	60	70	70	70	70	70
75	40	65	70	70	70	70	70
80	60	70	80	80	80	80	80
85	65	75	85	85	85	85	85

Table 3: Probit analysis results based on the mortality of semi engorged *Rhipicephalus sanguineus* s.l. female ticks exposed to the carvacrol no Bioassay 2.

LC50	62.48 μ L/mL limits: 58.91- 66.56
Chi-square	6.01
Standard error	1.56
Slope	7.38
Degrees of freedom	4
t ratio	4.32
Regression equation	$Y = (-13.2599007 + 5) + 7.3838780 \log x$

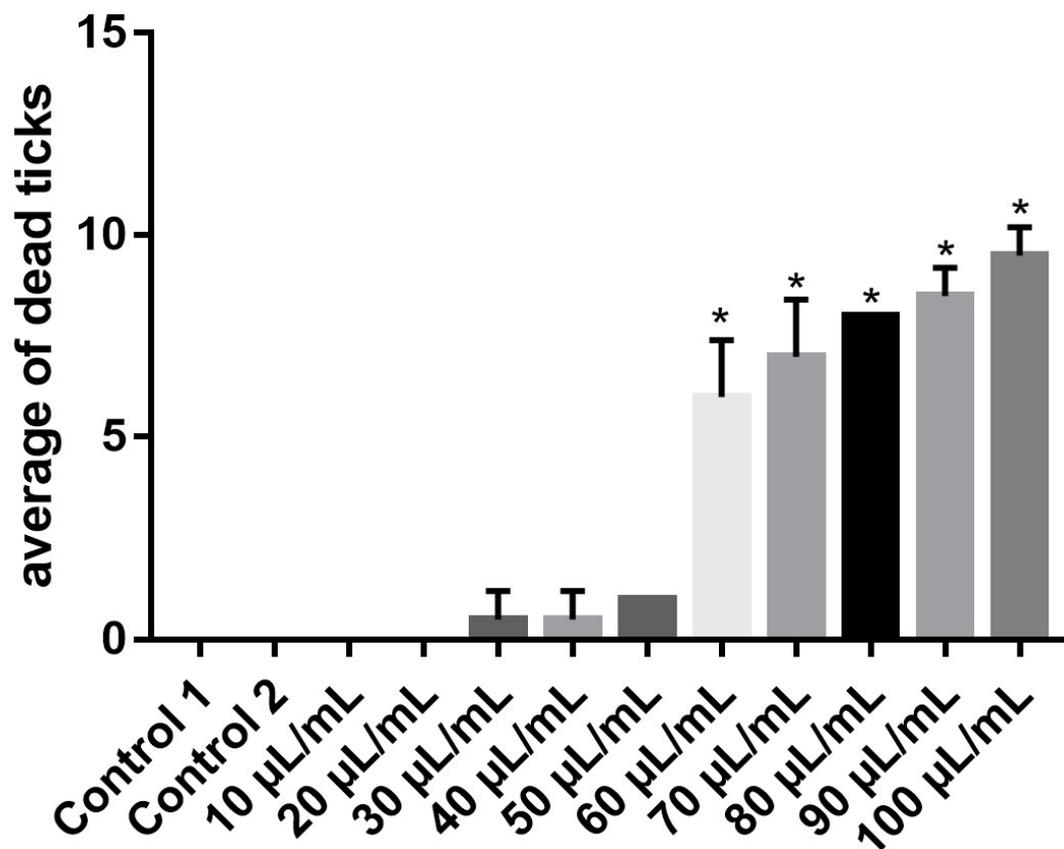


Figure 1. Bioassay 1: average of mortality *Rhipicephalus sanguineus* s.l. females ticks on the 7th day of exposure to different concentrations of carvacrol. * indicates statistically difference ($p < 0,05$). 1. Control 1= distilled water; Control 2= 50% ethanol.

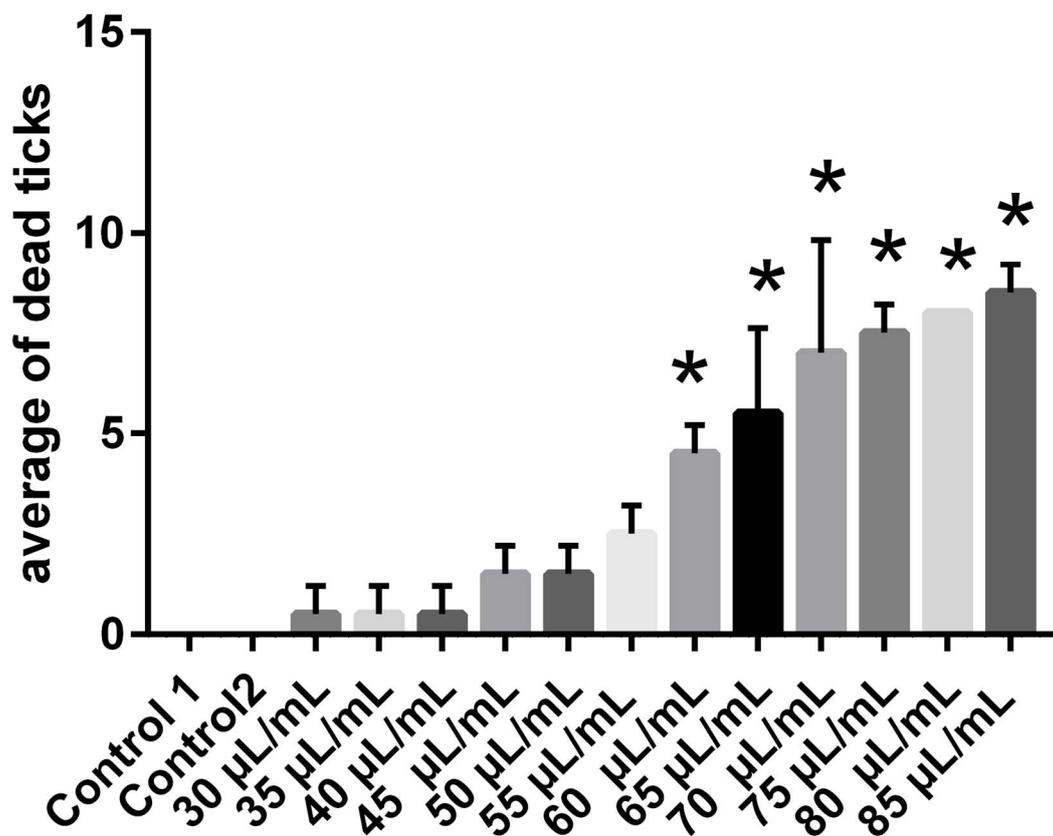


Figure 2: average of mortality (Mortality interval) *Rhipicephalus sanguineus* s.l. females ticks on the 7th day of exposure to different concentrations of carvacrol. * indicates statistically difference ($p < 0.05$). Control 1= distilled water; Control 2 = 50% ethanol.

4. Discussion

Several studies have shown that active substances obtained from essential oils extracted from plants of the genera *Origanum* and *Lippia* have potential acaricidal activity [7,13]. Among these substances is carvacrol, a volatile aromatic monoterpene with molecular formula $C_{10}H_{14}O$. It has been found to have various biological activities, such as bactericidal, insecticidal and acaricidal [9,14, 15]. In this scenario, considering the search for natural products that are efficient and sustainable, research in the area of toxicology has focused on these substances, as in the present study, for control of arthropod pests, including ticks.

In this study, bioassay 1 was performed to identify the mortality interval of semi-engorged females of *R. sanguineus* s.l. when exposed to carvacrol. The results demonstrated no sensitivity to this substance at the two lowest concentrations tested (10 and 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$), suggesting that these two concentrations cannot be considered potentially effective to cause death of the ticks. This result, however, does not exclude the possible occurrence of internal organ damage, and yes, it only showed that there was no death. In contrast, [14], who exposed immature stages (larvae and nymphs) of *Amblyomma cajennense* and *R. sanguineus* s.l. to the same carvacrol concentrations used here, found that the ticks were extremely sensitive, with a mortality rate of 100%.

Furthermore, in this study the exposure of the ticks to carvacrol concentrations from 30 to 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ caused a low mortality rate, of around 13%. Also, the females exposed to these concentrations did not show behavioral changes or morphological alterations of the integument, at least that could be observed macroscopically, indicating that at these concentrations the potential to eliminate ectoparasites is low. A low mortality rate (15%) was also observed by [15], when exposing engorged female cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) to the extract of *Azadirachta indica* at a concentration of 2%.

When the ticks were exposed to the higher carvacrol concentrations (60 to 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$), there was a gradual increase of the mortality rate, which varied from 47% to 96%, demonstrating a dose-dependent effect. This result corroborated the findings of [16] when exposing larvae and engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to the extract of *Acmella oleraceae* at concentrations of 25, 50 and 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

In bioassay 2, we exposed the *R. sanguineus* s.l. females to different carvacrol concentrations to estimate the LC_{50} . The results demonstrated sensitivity (mortality) to

carvacrol at all the concentrations tested (30 to 85 $\mu\text{L}/\text{mL}$). However, at the lowest concentrations (30 to 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$), the mortality started on the fourth day and remained until the seventh (last) day of the experiment. At the higher concentrations (55 to 85 $\mu\text{L}/\text{mL}$), mortality was observed starting on the first day and then increased until the third day, after which it remained constant until the seventh day. Specifically, exposure of the ticks to the concentrations ranging from 30 to 55 $\mu\text{L}/\text{mL}$ causing a mortality rate of 25%. Besides this, there were no behavioral or morphological alterations, i.e., the ticks were not affected by the compound. Other researchers have exposed *R. sanguineus* s.l. ticks to active substances from other plants, such as andiroba oil and spilanthol [17,18] and have observed toxicity to ticks at the lowest concentrations, unlike we observed for carvacrol.

The tests demonstrated that carvacrol at the highest concentrations (60 to 85 $\mu\text{L}/\text{mL}$) caused a gradual increase in the mortality rate of the female ticks. Besides mortality (45-85%), these concentrations also provoked behavioral changes in the ticks, such as excitation, repetitive movements, reduced locomotor activity, inverted prostration and even total paralysis of some individuals. The highest mortality rate caused by the concentration of 85 $\mu\text{L}/\text{mL}$ occurred on the third day of the experiment (72 h), demonstrating that besides the dose-dependent effect, that carvacrol has rapid toxic action, corroborating the findings of [7], who exposed *R. turanicus* adult females to pure carvacrol (97%) and observed a mortality rate of 73% in a period of 48 hours.

In the third step of this study, the efficacy of carvacrol to control semi-engorged females of *R. sanguineus* s.l. was demonstrated by application of statistical tests. The results showed that the 50% lethal concentration (LC_{50}) of carvacrol and the confidence interval were, respectively, 62.48 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 58.01-66.34 $\mu\text{L}/\text{mL}$, corroborating the data obtained by [16] when exposing engorged female cattle ticks *R. (Boophilus) microplus* to the extract of *A. oleracea* ($\text{LC}_{50} = 79.7 \mu\text{L}/\text{mL}$). The LC_{50} obtained in the present study confirmed the efficiency of carvacrol when compared, for example, to the extract of *Artemisia annua* L ($\text{LC}_{50} = 130.6 \mu\text{L}/\text{mL}$).

To summarize, the data obtained in this study provide relevant insights about the toxic potential of carvacrol when applied on semi-engorged females of the brown dog tick, *R. sanguineus* s.l., indicating that this substance can be considered a possible efficient and sustainable agent to control ticks in urban environments.

5. Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel – Brazil (CAPES) - “Finance Code 001”.

6. References

- [1] A. Estrada-Penã (2015). Ticks as vectors : taxonomy , biology and ecology, Sci. Tech. Rev. Off. Int. Des Epizoot., **34**: 53–65.
- [2] F. Dantas-Torres, B.B. Chomel and D. Otranto (2012). Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. Trends Parasitol., **28**: 437–446. doi:10.1016/j.pt.2012.07.003.
- [3] L.F. Parizi, N.W. Githaka, C. Logullo, S. Konnai, A. Masuda, K. Ohashi and S. Vaz (2012). The quest for a universal vaccine against ticks : Cross-immunity insights, Vet. J. **194**: 158–165. doi:10.1016/j.tvjl.2012.05.023.
- [4] R.Z. Abbas, M. Arfan, D.D. Colwell, J. Gilleard and Z. Iqbal (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management : The state of play, Vet. Parasitol., **203**: 6–20. doi:10.1016/j.vetpar.2014.03.006.
- [5] M.C. Mendes, C.K.P. Lima, A.H.C. Nogueira, E. Yoshihara, D.P. Chiebao, F.H.L. Gabriel, T.E.H. Ueno, A. Namindome and G.M. Klafke (2011). Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil, Vet. Parasitol. **178**: 383–388. doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.006.
- [6] J.A. Anderson and J.R. Coats (2012). Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods, Pestic. Biochem. Physiol., **102**: 124–128. doi:10.1016/j.pestbp.2011.12.002.
- [7] S. Koc, E. Oz, I. Cinbilgel, L. Aydin and H. Cetin (2013). Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae), Vet. Parasitol., **193**: 316–319. doi:10.1016/j.vetpar.2012.11.010.

- [8] M. Martinez-Velazquez, G.A. Castillo-Herrera, R. Rosario-Cruz, J.M. Flores-Fernandez, J. Lopez-Ramirez, R. Hernandez-Gutierrez and E. Del Carmen Lugo-Cervantes (2011). Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae), *Parasitol. Res.*, **108**: 481–487. doi:10.1007/s00436-010-2069-6.
- [9] E.M. de O. Cruz, L.M. Costa-Junior, J.A.O. Pinto, D. de A. Santos, S.A. Araújo, A.-B.M. de Fátima, L. Bacci, P.B. Alves, S.C. de H. Cavalcanti and A.F. Blank (2013). Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Vet. Parasitol.*, **195**:198–202. doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.046.
- [10] G.H. Bechara, M.P.J. Szabó and M.V. Garcia (1995). *Rhipicephalus sanguineus* Tick in Brazil: Feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions, *Brazil J. Vet. Parasitol.*, **4**: 61–66.
- [11] R.O. Drummond, E.S. Ernst, J.L. Trevino, W.J. Gladney and H.O. Graham (1973). *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides, *J. Econ. Entomol.*, **66**: 130–133.
- [12] P.R. Oliveira, G.H. Bechara and M.I. Camargo-Mathias (2008). Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari : Ixodidae) tick female, *Food Chem. Toxicol.*, **46**: 2459–2465. doi:10.1016/j.fct.2008.03.034.
- [13] M. Martinez-Velazquez, G.A. Castillo-Herrera, R. Rosario-Cruz, J.M. Flores-Fernandez, J. Lopez-Ramirez, R. Hernandez-Gutierrez and E. Del Carmen Lugo-Cervantes (2011). Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae), *Parasitol. Res.*, **108**: 481–487. doi:10.1007/s00436-010-2069-6.

- [14] T.O.S. Senra, F. Calmon, V. Zeringóta, C.M.O. Monteiro, R. Maturano, R. da S. Matos, D. Melo, G.A. Gomes, M.G. de Carvalho and E. Daemon (2013). Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae), *Parasitol. Res.*, **112**: 3471–3476. doi:10.1007/s00436-013-3527-8.
- [15] R. Srivastava, S. Ghosh, D.B. Mandal (2008). Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*, *Parasitol. Res.*, **104**:149–153. doi:10.1007/s00436-008-1173-3.
- [16] K.N.C. Castro, D.F. Lima, L.C. Vasconcelos, J.R.S.A. Leite, R.C. Santos, A.A. Paz Neto and L.M. Costa-Júnior (2014). Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*, *Parasitol. Res.*, **113**: 3697–3701. doi:10.1007/s00436-014-4034-2.
- [17] L.A. Anholeto, P.R. de Oliveira, R.A.F. Rodrigues, C. dos S. Spindola, M.B. Labruna, M.A. Pizano, K.N. de C. Castro and M.I. Camargo-Mathias (2016). Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks, *Ticks Tick. Borne. Dis.*, doi:10.1016/j.ttbdis.2016.09.018.
- [18] M.C.R. Vendramini, M.I. Camargo-Mathias, A.U. Faria, K.C.S. Furquim, L.P. Souza, G.H. Bechara and G.C. Roma (2012). Action of Andiroba Oil (*Carapa guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari : Ixodidae) Semi-engorged Females : Morphophysiological Evaluation of Reproductive System, *Microsc. Res. Tech.*, **75**: 1745–1754. doi:10.1002/jemt.22126.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2

Effects do carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari:Ixodidae)

José Ribamar Lima de Souza¹, Patrícia Rosa Oliveira¹, Luís Adriano Anholetto¹, André Arnosti¹, Erik Daemon², Rafael Neodini Remedio³ e Maria Izabel Camargo-Mathias¹

¹UNESP-Universidade Estadual Paulista, Avenida 24 A, 1515, 13506-900 – Rio Claro, SP, Brasil, CEP

²UFJF- Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n – São Pedro, MG, Brasil, CEP- 36036900

³UFLA- Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, s/n, MG, Brasil, CEP- 37200-000

* Autor correspondente: E-mail: maria.izabel@unesp.br



Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae)

José Ribamar Lima de Souza^a, Patrícia Rosa de Oliveira^a, Luís Adriano Anholetto^a, André Arnosti^a, Erik Daemon^{b,1}, Rafael Neodini Remedio^c, Maria Izabel Camargo-Mathias^{a,*}

^a Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University – UNESP, Rio Claro, SP, Brazil

^b Department of Zoology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora- UFJF-Juiz de Fora, MG, Brazil

^c Department of Health Sciences (DSA), Federal University of Lavras - UFLA – Lavras, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cytotoxicity

Morphology

Natural control

Acaricide

ABSTRACT

Currently, the most commonly used method to control ticks is the use of synthetic acaricides. However, these compounds are potentially harmful to hosts and the environment, in addition to causing the selection of resistant individuals. Therefore, several studies have been conducted to find sustainable methods to control ticks, such as *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, the most important vectors of pathogens for dogs. There has been increasing research on natural products with acaricidal action, especially with regard to plant-derived compounds as carvacrol, an aromatic monoterpene with several biological properties, including repellent and acaricidal activities, besides exerting cytotoxic effects on the exposed ticks. The objective of the present study was to evaluate the action of different carvacrol concentrations on the ovaries morphophysiology in semi-engorged *R. sanguineus* s.l. females to determine its effect on oocyte development. The results showed the occurrence of significant morphological alterations in the shape of oocytes (from round-shaped to irregular) and in the germinal vesicles, in addition to extensive cytoplasmic vacuolation. These effects were observed after the application of carvacrol at a concentration of 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$. The most significant alterations were observed at the highest concentration (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$), at which the oocytes could not develop further than stage II (total absence of oocytes III, IV and V). These data showed that even though carvacrol was unable to kill all ticks at these concentrations, surviving females could have had an altered reproduction, which would hinder the generation of new individuals, resulting in a long-term control. Data regarding the inhibition of oocyte development are unprecedented and indicate the use of carvacrol as a natural product with the potential to control *R. sanguineus* s.l. ticks.

1. Introduction

The search for new acaricide formulations to control *Rhipicephalus sanguineus* s.l. has been intensified, since it is an ectoparasite of significant environmental and sanitary importance, transmitting several biopathogens to animals and occasionally to human beings (Dantas-Torres, 2010; Paz et al., 2008). Different methods have been developed to control tick infestations, such as vaccines (Parizi et al., 2012), natural predators like the cattle egret (*Bubulcus ibis*) (Burtis et al., 2016), pheromone application (Benelli et al., 2016) and biological control with *Metahizium anisopliae* fungi (Webster et al., 2018).

Currently, the main control method for ticks is the use of synthetic acaricides. However, the prolonged or in inappropriate use of acaricides can cause the selection of resistant individuals and accumulation of

chemical residues in the environment (Rodríguez-Vivas et al., 2018). In addition, synthetic acaricides are expensive and require specialized handling (Abbas et al., 2014). In this sense, the use of essential oils and their secondary metabolites (active principles), such as neem oil (Choudhury, 2009; Denardi et al., 2010; Remedio et al., 2015; Srivastava et al., 2008), andiroba oil (Farias et al., 2009; Roma et al., 2013; Vendramini et al., 2012) and castor oil esters (Arnosti et al., 2011; Sampieri et al., 2013), is an excellent strategy for the control of ticks, since such compounds are inexpensive, cause no environmental damage, and have low potential for fostering the development of resistant strains (Rosado-Aguilar et al., 2010).

Carvacrol, the object of study here, is a volatile phenolic monoterpene, and the active principle found in essential oils of plants in the families Lamiaceae and Verbenaceae, which include the genera

* Corresponding author.

E-mail address: micm@rc.unesp.br (M.I. Camargo-Mathias).

¹ in memoriam.

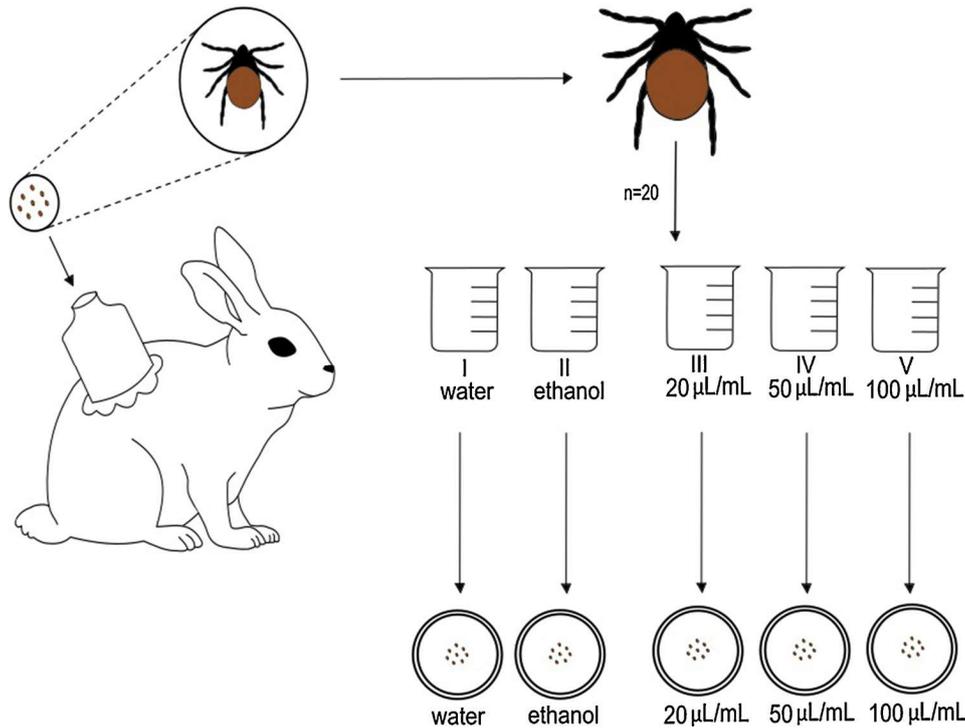


Fig. 1. Schematic drawing showing the steps of the method for exposure of semi-engorged females of *R. sanguineus* s.l. to carvacrol at various concentrations.

Origanum and *Lippia*, respectively (Cacciatore et al., 2015; Koc et al., 2013; Martinez-Velazquez et al., 2011; de Oliveira-Cruz et al., 2013). Several studies have demonstrated their various biological properties, such as antimicrobial, insecticide and acaricide (Jayakumar et al., 2012; Miladi et al., 2016; Tunç et al., 2016). Carvacrol showed extensive acaricidal activity against *Amblyomma americanum*, *Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus turanicus* and *R. sanguineus* s.l. (Cetin et al., 2010; Jordan et al., 2011; Koc et al., 2013; Senra et al., 2013).

One way to evaluate the potential of a compound in tick control is to study its effects on the morphology of tick internal organs, especially the ovary (Arnosti et al., 2011; Denardi et al., 2012; Oliveira et al., 2009; Roma et al., 2011; Sampieri et al., 2013; Vendramini et al., 2012). Accordingly, the objective of the present study was to investigate the effects of carvacrol at concentrations of 20, 50 and 100 µL/mL on the morphophysiology of the ovaries of semi-engorged *R. sanguineus* s.l. ticks.

2. Material and methods

2.1. Carvacrol

Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol, CAS 499-75-2, molecular formula $C_{10}H_{14}O$, 99% pure) was purchased from Sigma-Aldrich (Sao Paulo, SP, Brazil).

2.2. *Rhipicephalus sanguineus* s.l. ticks

Unfed females and males of *Rhipicephalus sanguineus* s. l. ticks were used in the bioassays. The ticks were obtained directly from the colony maintained in a Biological Oxygen Demand (BOD) incubator under controlled conditions (28 °C, 85% humidity, and 12-h photoperiod), in the Animal Facility of the Department of Biology – UNESP, Rio Claro campus/São Paulo, Brazil.

One hundred *R. sanguineus* s. l. couples were released in special feeding chambers attached with a non-toxic glue (Unna paste, composed by 100 mL of glycerin ($C_3H_8O_3$), 160 mL distilled water, 80 g agar-agar and 60 g zinc oxide) to the back of rabbits (Grupo Genético de

Botucatu) weighing 3–3.5 kg and without previous exposure to ticks or acaricides. The rabbits, provided by the Genetic Group of Botucatu Campus, SP, Brazil, were kept in cages and received water and commercial food *ad libitum*. After feeding for four days, the semi-engorged female (mean weight \pm SD = 26 ± 3.5 mg, $p > 005$) ticks were collected and subjected to the bioassays. All experimental procedures were performed according to Bechara et al. (1995) and were approved by the Ethics Committee in Animal Use (CEUA, UNESP Rio Claro/SP, Brazil), protocol No. 3822, 012/2015.

2.3. Experimental details

2.3.1. Bioassays (carvacrol)

The bioassays performed here were based on the highest carvacrol concentration used by Senra et al. (2013), who studied the effects of this compound on *R. sanguineus* s.l. larvae and nymphs. Using these data, five experimental groups were established, consisting of twenty individuals each.

Three treatment groups (T1-3) were exposed to 20, 50 and 100 µL/mL carvacrol, and two control groups were exposed to distilled water (C1) and solvent (50% ethanol) (C2). Ethanol was used as the solvent, because Chagas et al. (2003) found that up to 75%, it was not lethal to *R. (Boophilus) microplus* ticks, as were some other solvents.

Twenty *R. sanguineus* s.l. females were immersed in each solution for 5 min, according to the protocol established by Drummond et al. (1973). The same procedure was performed with the individuals from the control groups (distilled water and 50% ethanol). After immersion, the ticks were dried on absorbent paper, placed in labeled Petri dishes and covered with perforated plastic film for aeration (Fig. 1).

The samples were kept in an Eletrolab El 202 BOD incubator at 27 ± 1 °C and relative humidity of $80 \pm 10\%$ for 7 days. Control ticks were kept in a separate incubator so as to reduce the likelihood of cross-contamination with (the volatile) carvacrol.

2.3.2. Histology

Following thermal shock (females were kept in freezer at 2 °C for 1 min, this process lowers their metabolism without causing death), the

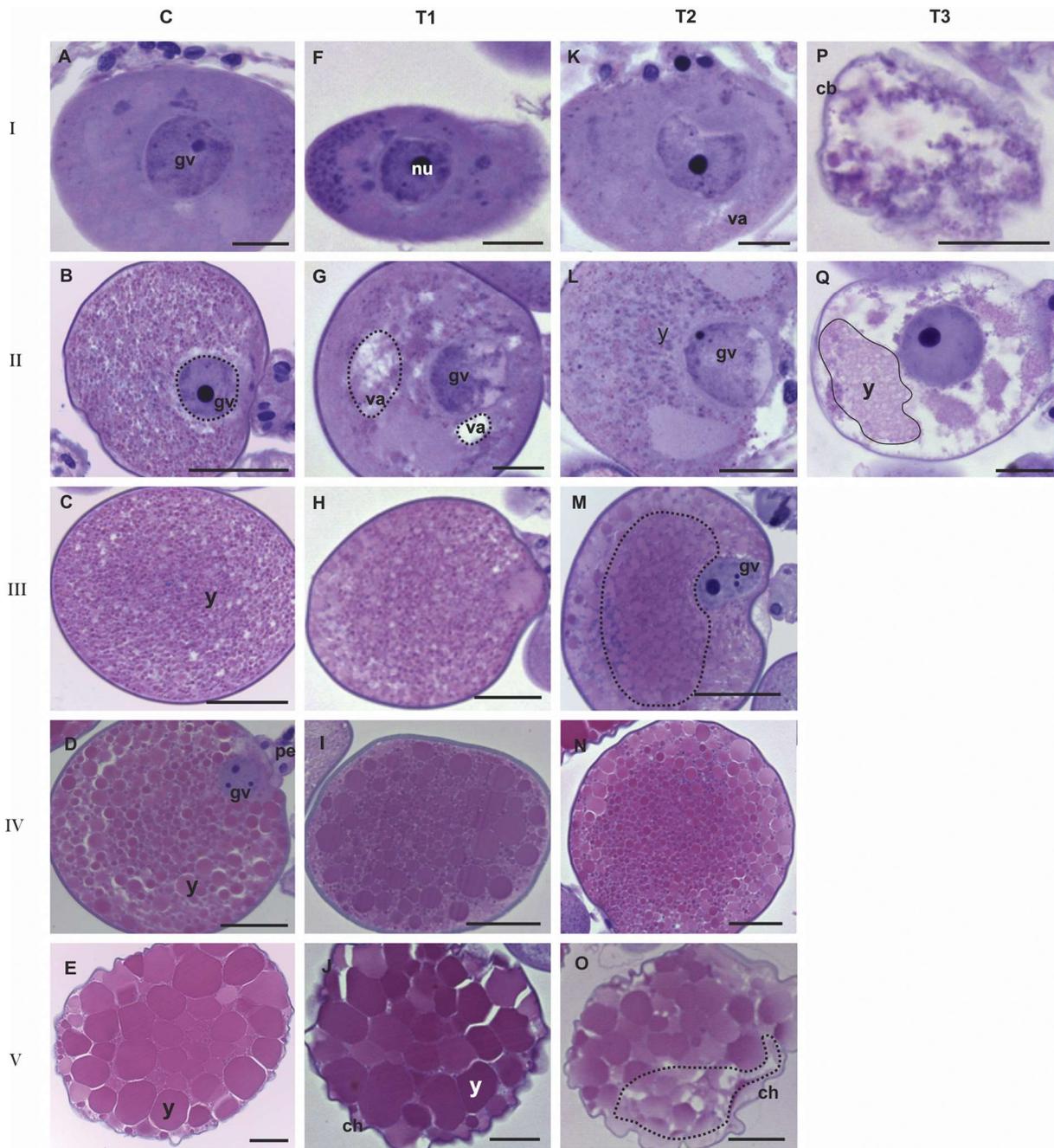


Fig. 2. Histological sections of oocytes in stages I to V of *R. sanguineus* s.l. semi-engorged females under control conditions and after exposure to various concentrations of carvacrol. (A–E) Control group with oocytes at various stages of development (I–V) showing preserved morphology. (F–J) Group exposed to a concentration of 20 µL/mL, where oocytes II show vacuolated cytoplasm (va) (G). (K–O) Group exposed to a concentration of 50 µL/mL, in which oocytes III yolk granules (Y) are preserved in the central region (M). (P–Q) Group exposed to a concentration of 100 µL/mL, with few yolk granules scattered throughout the cell (Q). cb = cell boundary; ch = chorion; gv = germinal vesicle; nu = nucleolus; va = vacuolation, y = yolk granules. Bars: A–B, F–G, K–L, P–Q = 20 µm. C–E, H–J, M–O = 50 µm.

ticks collected from the rabbits were dissected under a stereomicroscope in Petri dishes containing phosphate-buffered saline (PBS) solution (NaCl 0.13 M, Na₂HPO₄ 0.017 M, KH₂PO₄ 0.02 M, pH 7.2) for removal of ovary samples. The material was fixed in 4% paraformaldehyde for 7 days and transferred to sodium phosphate buffer (pH 7.2) for 24 h. The samples were dehydrated in a graded ethanol series (70, 80, 90 and 95%) at 20 min intervals. Afterwards, the material was embedded in Leica HistoResin and kept in fridge (2–8 °C) for 7 days. Then, the samples were placed in individually plastic molds previously filled with resin plus accelerator and polymerized in incubator at 37 °C.

After drying, the ovaries were sectioned (3-µm thickness) using a Leica RM 2255 microtome, mounted on clean glass slides, and stained with Harris hematoxylin and eosin (HE) for 10 and 5 min, respectively (Junqueira and Junqueira, 1983). The material was air-dried, mounted in Canada balsam and coverslipped for later analysis and documentation using a Leica DM750 light microscope.

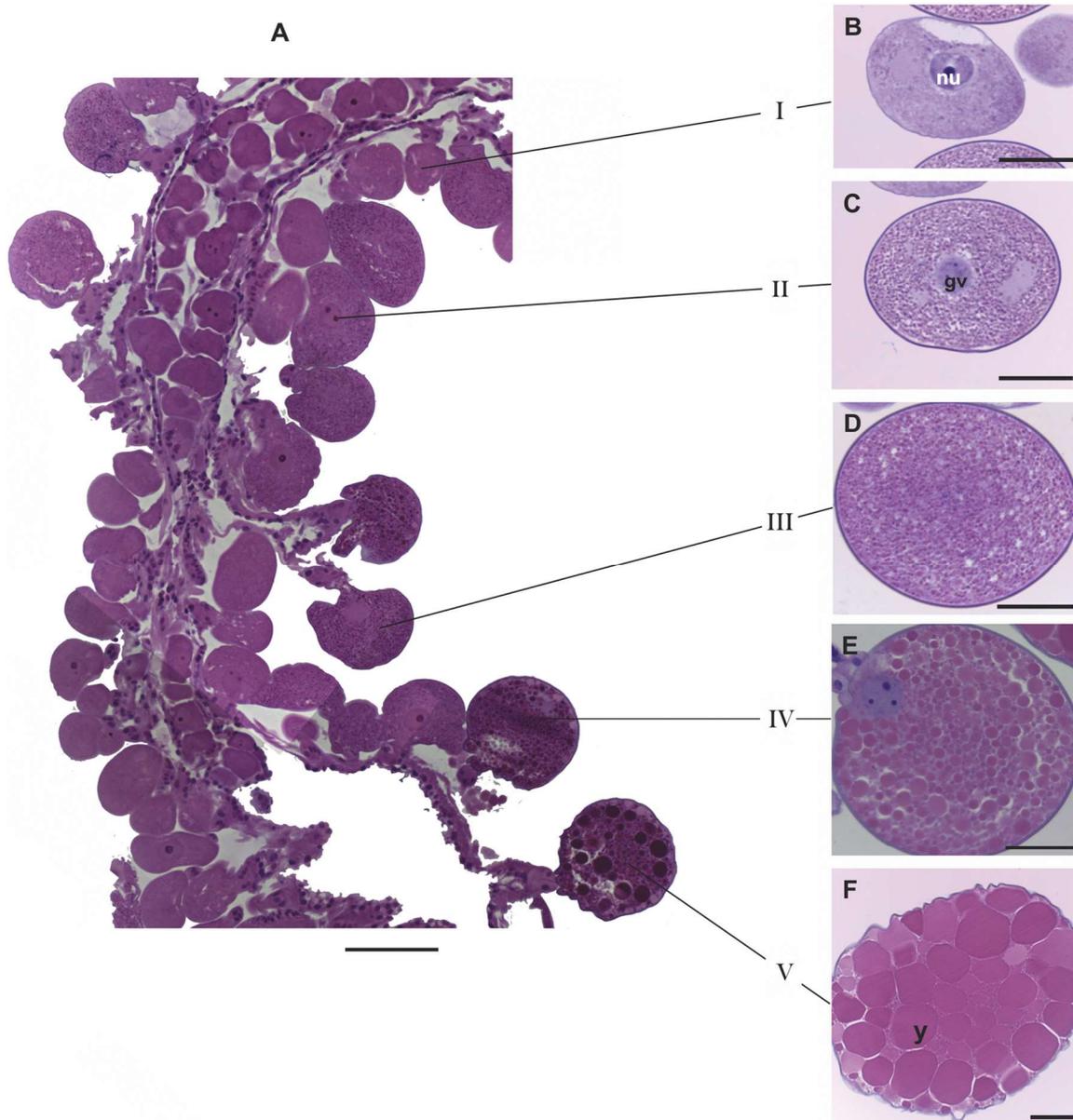


Fig. 3. Histological sections of the ovaries of *R. sanguineus* s.l. semi-engorged females belonging to the control group.

A. Overview of ovary with oocytes in all developmental stages (I–V).

B–G. Details of oocytes at various stages of development. Bars: A = 100 μ m, B–C = 20 μ m, D–E = 50 μ m, F = 100 μ m.

3. Results

3.1. Control groups (1 and 2)

The results showed no differences between ticks in the control groups (C1 and C2) (Figs. 2A–E and 3). Ovary morphology in the two groups was consistent with that described in the literature for this species (Oliveira et al., 2005). The pedicel cells, which attach the oocytes to the ovary wall, were intact. These cells were cubic, presented an oval basophilic nucleus containing granular material and a weakly stained cytoplasm. The ovary wall consisted of a simple epithelium, with cubic cells presenting preserved oocytes in all developmental stages (I to V).

3.2. Treatment group 1

The oocytes of the *R. sanguineus* s.l. females exposed to 20 μ L/mL

carvacrol showed few alterations when compared to the control groups. Oocytes I presented oval shape; however, some were irregular and showed cell boundary folds. Strongly basophilic granulation was observed throughout the cytoplasm along with an irregular germinal vesicle (Fig. 2F).

Most oocytes II showed intact cell boundary, with strong basophilic staining. The cytoplasm was extensively disorganized and displayed many vacuolated regions. The germinal vesicle was completely irregular, with granular chromatin and absence of nucleolus (Fig. 2G).

No alterations were observed in oocytes III and IV (Fig. 2H–I).

In oocytes V, the whole cell boundary was folded, which consequently caused the loss of the originally round shape of the oocytes at this stage of development. The yolk granules showed moderate to strong eosin staining. As observed in the oocytes exposed to carvacrol in the preceding stage (oocyte IV), the germinal vesicle was not observed, and the chorion was thinner, with folds, and strongly hematoxylin-labeled (Fig. 2J).

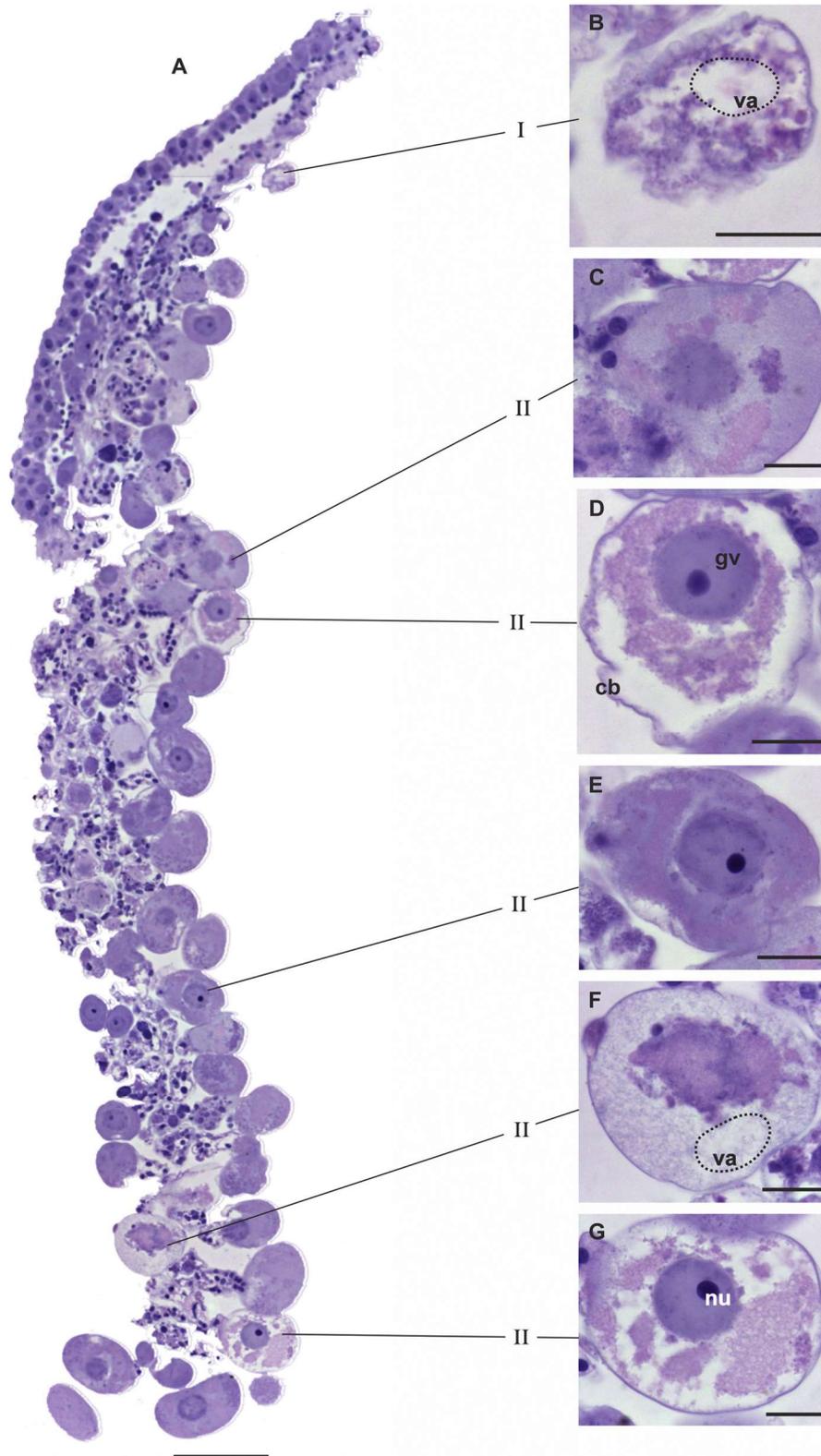


Fig. 4. A. Histological sections of the ovary of *R. sanguineus* s.l. semi-engorged females exposed to 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of carvacrol. B–G. Details of oocytes that could only reach stage II. cb = cell boundary, gv = germinal vesicle, nu = nucleolus, va = vacuolation. Bars: A = 100 μm , B–G = 20 μm .

3.3. Treatment group 2

The ovaries of the *R. sanguineus* s.l. females exposed to 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ carvacrol exhibited more significant morphological alterations. The cell boundary of oocytes I showed some irregular regions, cytoplasm with

extensively disorganized regions and vacuolation near the germinal vesicle. However, the germinal vesicle showed irregular morphology with some invaginated (folds) areas, with a consequent decrease in size, occupying less space in the cytoplasm. Additionally, the nucleolus was strongly stained by hematoxylin (Fig. 2K).

In oocytes II, yolk granules stained by hematoxylin and eosin were evident, unlike T1 group. Nevertheless, extensive vacuolation was observed in this group, mainly in the contact region between the oocyte and the pedicel cells. Areas without granules and weakly stained by hematoxylin were also seen throughout the cytoplasm. The germinal vesicle showed vacuolation in T1 oocytes, with small and strongly stained nucleoli close to the periphery of the nucleus (Fig. 2L).

Oocytes III were irregular, presenting folds. Vacuolation in the region of the cytoplasm of the oocyte that interfaces with the pedicel was observed.

Intact yolk granules were observed in the central region, while alterations were observed in the ones located in the peripheral regions of the cytoplasm. The germinal vesicle was irregular (Fig. 2M).

Oocytes IV showed less extensive alterations compared to those in T1, except for the presence of some slight cell boundary folds (Fig. 2N).

Oocytes V were irregular, thinner, displayed extensive folds, and had a weakly stained chorion. These oocytes showed the greater cytoplasmic vacuolation in comparison with the previous treatment. Additionally, the yolk granules were the most affected when compared with the ones from the other groups (Fig. 2O).

3.4. Treatment group 3

Treatment with 100 µL/mL carvacrol caused the most significant alterations in the ovaries. Only oocytes in stages I and II were found (Figs. 2P–Q and 4). In this group, significant alterations in oocytes I were observed after exposure to carvacrol. The cells were smaller than the control, with oval or irregular morphology and unpreserved boundaries. Extensive non-stained areas and chromatin marginalization were observed (Fig. 4B). Oocytes II were heavily damaged by carvacrol, presenting some of the alterations observed in oocytes I. The cytoplasm presented intensely eosin-stained areas, while others reacted weakly and showed moderate hematoxylin staining (Fig. 4C). Some cells showed small vacuolated areas, mainly peripheral (Fig. 4E). On the other hand, some other cells showed more extensive vacuolation throughout the cytoplasm. The yolk precursors and other cytosolic components were agglomerated, and marginalized chromatin was observed in the nucleus, strongly indicating the occurrence of cell death processes (apoptosis) (Fig. 4D, E, G).

4. Discussion

Carvacrol, an active principle extracted from plants of the family Lamiaceae and Verbenaceae, presents numerous biological activities, including acaricidal action against several tick species (Koc et al., 2013; de Oliveira-Cruz et al., 2013; Senra et al., 2013). The results obtained in the present study demonstrated for the first time that even at low concentrations (20 µL/mL), carvacrol was capable of causing oocyte alterations, especially in early developmental stages (I and II). In the treatment groups, the oocytes showed irregular shape, cytoplasmic vacuolation and alterations in the germinal vesicle. At the highest concentration (100 µL/mL), carvacrol inhibited oocyte development to stages III, IV and V.

Probably one of the reasons for such alterations is that the chorion (protective membrane) had not yet been completely deposited in early developmental stages (I and II). Oliveira et al. (2005) demonstrated that, in *R. sanguineus* s.l. ticks, chorion deposition initiates when oocytes reach stage III and is concluded at stage V. This would make undeveloped oocytes more susceptible to the absorption of external products from hemolymph. Similar results were found by Oliveira et al. (2008) and Roma et al. (2010), who subjected semi-engorged female ticks of *R. sanguineus* s.l. to the synthetic acaricides fipronil and permethrin, respectively.

When exposed to carvacrol (T1–T3), especially in the highest concentrations, many cells became irregular, with extensive folds. In addition, the chorion appeared to be thinner and, in some cases, even

ruptured, indicating that its deposition was probably impaired at later stages of development. These data are corroborated by de Oliveira et al., (2016) who subjected *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* female ticks to *Acmella oleracea* extracts.

Carvacrol was also responsible for important alterations in nuclear integrity and shape. This corroborates Vendramini et al. (2012) and Denardi et al. (2012), who tested the effects of andiroba and neem oil (natural acaricides), respectively, demonstrating that the germinal vesicle structure was affected in *R. sanguineus* s.l. female ticks. Similar alterations were reported by Roma et al. (2011) for *R. sanguineus* ticks treated with permethrin.

Cytoplasmic vacuolation was observed in all developmental stages, from the lowest to the highest concentration of carvacrol. In the present work, such alterations became more intense as the concentration of carvacrol. Here, the effect was related to dose, something also observed by Remedio et al., (2015) in *R. sanguineus* s.l. semi-engorged females subjected to neem seed oil. According to Roma et al. (2011), in ovaries from *R. sanguineus* s.l. ticks exposed to different concentrations of permethrin, this process may be a defense mechanism of the cell, which recycles or degrades damaged structures to maintain cell integrity and ensure the viability of the oocyte. Arnosti et al. (2011) and Vendramini et al. (2012) observed similar results in *R. sanguineus* s.l. semi-engorged females exposed to ricinoleic acid esters from castor oil and andiroba oil, respectively.

The presence of cytoplasmic vacuoles suggests that carvacrol may have altered oocyte permeability, allowing the entry of substances such as water or electrolytes into the ovaries. This morphological alteration certainly interfered with the reproduction process of the females and concomitantly may result in the generation of deficient offspring, or even inhibit the emergence of new individuals. The absence of oocytes in later developmental stages (III, IV and V) in the treatment with the highest concentration of carvacrol (100 µL/mL) confirms the ability of this compound to inhibit oocyte development. Similar data were found by Remedio et al. (2015).

5. Conclusion

This study has shown that carvacrol can alter ovary morphology in ticks. This suggests that surviving ticks may not reproduce properly when subjected to carvacrol, since in the highest concentration oocytes could not develop to more advanced stages. This means that a long-term control of *R. sanguineus* s.l. female ticks should be possible by using carvacrol in sublethal concentrations. Moreover, a combined action with other products is suggested, once it would allow better absorption and reduce concentrations.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development –CNPq/Grant n° 300625/20120/ M.I. Camargo-Mathias academic career research fellowships, for the financial support and to Mr. Gérson de Mello Souza for technical support.

References

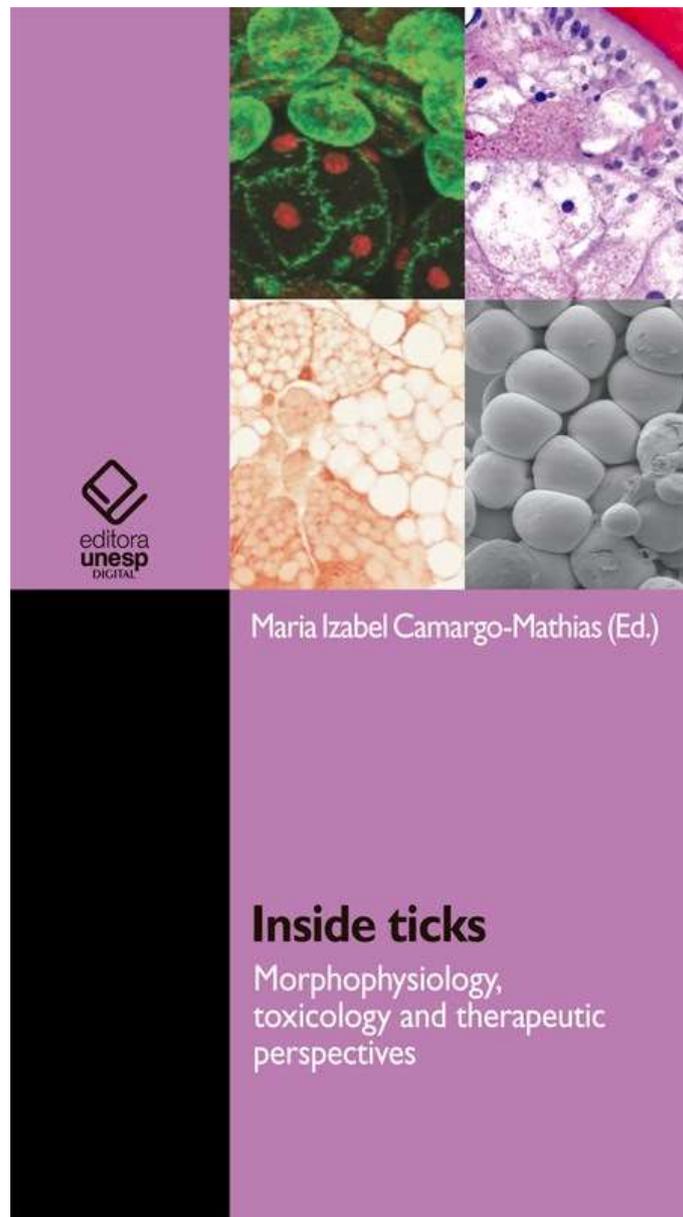
- Abbas, R.Z., Arfan, M., Colwell, D.D., Gilleard, J., Iqbal, Z., 2014. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. *Vet. Parasitol.* 203, 6. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>.
- Arnosti, A., Brienza, P.D., Furquim, K.C.S., Chierice, G.O., Bechar, G.H., Braggião, I.C., Camargo-Mathias, M.L., 2011. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae) ticks. *Exp. Parasitol.* 127, 575–580.
- Bechara, G.H., Szabó, M.P.J., Garcia, M.V., 1995. *Rhipicephalus sanguineus* Tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 4, 61–66.
- Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., Mehlhorn, H., 2016. Tick repellents and acaricides of

- botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? *Parasitol. Res.* 115, 2545–2560. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5095-1>.
- Burtis, J.C., Ostfeld, R.S., Yavitt, J.B., Fahey, T.J., 2016. The relationship between soil arthropods and the overwinter survival of *Ixodes scapularis* (Acari: ixodidae) under manipulated snow cover. *J. Med. Entomol.* 53, 225–229. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv151>.
- Cacciatore, I., Di Giulio, M., Fornasari, E., Di Stefano, A., Cerasa, L.S., Marinelli, L., Turkez, H., Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., Robuffo, I., Cellini, L., 2015. Carvacrol codrugs: a new approach in the antimicrobial plan. *PLoS One* 10, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120937>.
- Cetin, H., Gilek, J.E., Oz, E., Aydin, L., Devci, O., Yanikoglu, A., 2010. Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and γ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: ixodidae). *Vet. Parasitol.* 170, 287–290. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.031>.
- Chagas, A.C., de, S., Leite, R.C., Furlong, J., Prates, H.T., Passos, W.M., 2003. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. *Ciência Rural* 33, 109–114.
- Choudhury, M., 2009. Toxicity of neem seed oil against the larvae of *Boophilus decoloratus*, a one-host tick in cattle. *Indian J. Pharm. Sci.* 71, 562. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.58191>.
- Dantas-Torres, F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit. Vectors* 3, 26. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>.
- de Oliveira, P.R., de Castro, K.N.C., Anholetto, L.A., Camargo-Mathias, M.I., 2016. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. *Microsc. Res. Tech.* 79, 744–753. <https://doi.org/10.1002/jemt.22693>.
- de Oliveira-Cruz, E.M., Costa-Junior, L.M., Pinto, J.A.O., de Alexandria Santos, Darlison, de Araujo, Sandra Alves, de Fátima, A.-B.M., Bacci, L., Alves, P.B., de Cavalcanti, S.C.H., Blank, A.F., 2013. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 195, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.046>.
- Denardi, S.E., Bechara, G.H., Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., 2010. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari : Ixodidae) tick females. *Exp. Parasitol.* 126, 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.05.017>.
- Denardi, S.E., Bechara, G.H., de Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., 2012. Ultrastructural analysis of the oocytes of female *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari: Ixodidae) ticks subjected to the action of *Azadirachta indica* A. Juss (neem). *Ultrastruct. Pathol.* 36, 56–67. <https://doi.org/10.3109/01913123.2011.588819>.
- Drummond, R.O., Ernst, E.S., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, H.O., 1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 66, 130–133.
- Farias, M., Sousa, D., Arruda, A., Wanderley, A., Teixeira, W., Alves, L., Faustino, M., 2009. Potencial acaricida do óleo de andiroba *Carapa guianensis* Aubl. sobre fêmeas adultas ingurgitadas de *Anocenter nitens* Neumann, 1987 e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 61, 877–882.
- Jayakumar, S., Madankumar, A., Asokkumar, S., Raghunandhakumar, S., Gokula Dhas, K., Kamaraj, S., Josephine Divya, M.G., Devaki, T., 2012. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol. Cell. Biochem.* 360, 51–60. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1043-7>.
- Jordan, R.A., Dolan, M.C., Piesman, J., Schulze, T.L., 2011. Suppression of host-seeking *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: ixodidae) nymphs after dual applications of plant-derived acaricides in New Jersey. *J. Econ. Entomol.* 104, 659–664. <https://doi.org/10.1603/EC10340>.
- Junqueira, L.C.U., Junqueira, L.M.M.S., 1983. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. Santos. ed. São Paulo.
- Koc, S., Oz, E., Cinbilgel, I., Aydin, L., Cetin, H., 2013. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 193, 316–319. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.010>.
- Martinez-Velazquez, M., Castillo-Herrera, G.A., Rosario-Cruz, R., Flores-Fernandez, J.M., Lopez-Ramirez, J., Hernandez-Gutierrez, R., Del Carmen Lugo-Cervantes, E., 2011. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Parasitol. Res.* 108, 481–487. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2069-6>.
- Miladi, H., Zmantar, T., Chaabouni, Y., Fedhila, K., Bakhrouf, A., Mahdouani, K., Chaieb, K., 2016. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. *Microb. Pathog.* 99, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.008>.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Nunes, E.T., Camargo-Mathias, M.I., 2005. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari:ixodidae). *Exp. Parasitol.* 110, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.12.016>.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2008. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari : ixodidae) tick female. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2459–2465. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.034>.
- Oliveira, P.R., de, Bechara, G.H., Morales, M.A.M., Camargo-Mathias, M.I., 2009. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari : ixodidae) Ultrastructural evaluation of ovary cells. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1255–1264. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.019>.
- Parizi, L.F., Githaka, N.W., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., Vaz, S., 2012. The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. *Vet. J.* 194, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.05.023>.
- Paz, G.F., Labruna, M.B., Leite, R.C., 2008. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: ixodidae) de cães artificialmente infestados. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 139–144.
- Remedio, R.N., Nunes, P.H., Anholetto, L.A., Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., 2015. 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). *Parasitol. Res.* 114, 431–444. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4200-6>.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Jonsson, N.N., Bhushan, C., 2018. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology* 117, 3–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>.
- Roma, G.C., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2010. Permethrin-induced morphological changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : ixodidae) semi-engorged females. *Food Chem. Toxicol.* 48, 825–830. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.016>.
- Roma, G.C., Furquim, K.C.S., Henrique, G.H.B., Camargo-Mathias, M.I., 2011. Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: ixodidae) fully engorged females: I. Direct or indirect action of the acaricide in germ cells? *Exp. Appl. Acarol.* 53, 287–299.
- Roma, G.C., Camargo-Mathias, M.I., Faria, A.U., Oliveira, P.R., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., 2013. Morphological and cytochemical changes in synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari : ixodidae) female ticks from exposure of andiroba oil (*Carapa guianensis*). *Microsc. Res. Tech.* 76, 687–696. <https://doi.org/10.1002/jemt.22219>.
- Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A., Rodriguez-Vivas, R.I., Borges-Argaez, R., Garcia-Vazquez, Z., Mendez-Gonzalez, M., 2010. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:ixodidae). *Vet. Parasitol.* 168, 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.022>.
- Sampieri, B.R., Arnosti, A., Furquim, K.S., Chierice, G.O., Bechara, G.H., de Carvalho, P.L.P.F., Nunes, P.H., Camargo-Mathias, M.I., 2013. Effect of ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*) on the oocyte yolk components of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari : ixodidae). *Vet. Parasitol.* 191, 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.013>.
- Senra, T.O.S., Calmon, F., Zeringóta, V., Monteiro, C.M.O., Maturano, R., Matos, R., da, S., Melo, D., Gomes, G.A., de Carvalho, M.G., Daemon, E., 2013. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae). *Parasitol. Res.* 112, 3471–3476. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3527-8>.
- Srivastava, R., Ghosh, S., Mandal, D.B., 2008. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. *Parasitol. Res.* 104, 149–153. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1173-3>.
- Tunç, S., Duman, O., Polat, T.G., 2016. Effects of montmorillonite on properties of methyl cellulose/carvacrol based active antimicrobial nanocomposites. *Carbohydr. Polym.* 150, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.019>.
- Vendramini, M.C.R., Camargo-Mathias, M.I., Faria, A.U., Furquim, K.C.S., Souza, L.P., Bechara, G.H., Roma, G.C., 2012. Action of Andiroba Oil (*Carapa guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (latreille,1806) (Acari : ixodidae) Semi-engorged females : morphophysiological evaluation of reproductive system. *Microsc. Res. Tech.* 75, 1745–1754. <https://doi.org/10.1002/jemt.22126>.
- Webster, A., Araújo, U., João, S., Martins, R., Klafke, G., Reck, J., Schrank, A., 2018. Comparative study between Larval Packet Test and Larval Immersion Test to assess the effect of *Metarhizium anisopliae* on *Rhipicephalus microplus* tick larvae. *Exp. Appl. Acarol.* 74, 455–461. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0235-1>.

Capítulo 3

CAPÍTULO 3

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.



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

3

DEFENSE AND PROTECTION (INTEGUMENT)

*José Ribamar Lima de Souza, Rafael Neodini Remedio,
Patrícia Rosa de Oliveira, André Arnosti, Rusleyd Maria
Magalhães de Abreu, Maria Izabel Camargo-Mathias*

In ticks, the integument (Figure 10 A-F) is an organ of vital importance, externally covering the body and acting as a physical barrier against environmental hazards. The integument plays a key role in the biological success of the ticks, due to its versatility, physiological aspects and interaction with all the ectoparasite systems, covering and sustaining the body, protecting against mechanical impacts and regulating the hydric balance (Coons; Alberti, 1999; Sonenshine; Roe, 2014).

Histologically, the integument is constituted of a cuticle comprised of several sublayers secreted by cells that form single epithelium, which secretes all the material that will constitute the exoskeleton, responsible for the formation of epidermal appendages and dermal glands (Coons; Alberti, 1999; Hackman, 1982; Sonenshine; Roe, 2014).

The cuticle is an acellular structure comprised of two layers: a) the epicuticle, outer and thinner, with distensible and deep folds, and b) the procuticle, inner and thicker (Coons; Alberti, 1999).

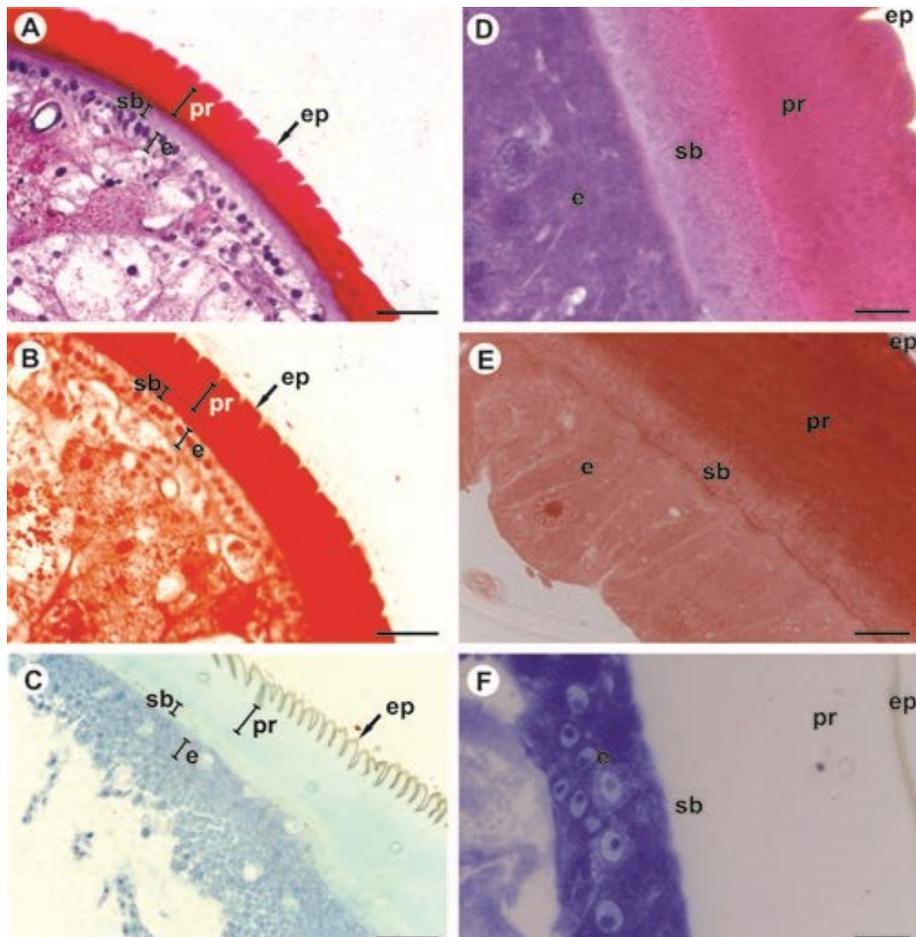
The distensibility of the integument allows the ticks (specially females in oogenesis) to increase the body volume during engorgement, accommodating the enlarged midgut, as well as the ovary in development, which contains oocytes in different stages of maturation (Bughdadi, 2008; Oliveira; Bechara; Morales; Camargo-Mathias, 2009; Remedio; Nunes; Camargo-Mathias, 2014).

According to Coons; Alberti, (1999), the epicuticle morphology does not present significant variations over the different developmental phases, being thinner or thicker in some species or regions of the body. Some cuticle characteristics are species-specific, e.g., argasidae ticks present a cement layer, while in Ixodidae this layer is absent. Additionally, according to Dillinger; Kesel, (2002), *Ixodes ricinus* females have their body enlarged without ecdysis, once their epicuticle is highly resistant and distensible.

The procuticle is the layer between the epicuticle and the epidermis, in some cases, sclerotized. The sclerotized parts (sclerites, plates and shield) are harder and thicker than the non-sclerotized one, also called soft parts (alloscutum and membranes) (Coons; Alberti, 1999). The procuticle is subdivided into two layers: the exocuticle, in contact with the epicuticle, and the endocuticle, close to the epidermal cells (Coons; Alberti, 1999). Both sublayers contain pore channels, whose function is still unclear; however, it has been suggested that they are involved in the exchange of gases, water and lipids between the internal compartments of the tick and the environment (Coons; Alberti, 1999). Cytoplasmic extensions can be found in the pore channels; however, these tunnels are commonly found empty. In *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

females, the pores are branched and less frequent (Beadle, 1972). In some cases, a subcuticular layer (deposition zone) is found between the epidermal cells and the stabilized procuticle, containing non polymerized precursors of chitin-protein complexes (Coons; Alberti, 1999).

Figure 10 – Histological sections of the integument of semi-engorged *R. sanguineus* s.l. females stained with: (A, D) Hematoxylin-eosin (HE); (B, E) stained with Ponceau Xylidine; (C, F) stained with Toluidine blue. ep = epicuticle; e = epidermis; sb = subcuticle; pr = procuticle



Bars: (A-C) 50 μ m; (D-F) 10 μ m

According to the literature, the morphology, sublayer division and the cuticle composition may undergo alterations in the different feeding stages (unfed, semi-engorged and fully engorged) and in the different phases of the

biological cycle (larva, nymph and adult); however, such alterations differ among the species. According to Remedio, Nunes, and Camargo-Mathias, (2014), the procuticle sublayer division is not observed in unfed *Rhipicephalus sanguineus* s. l. ticks, while this division is evident in the phase of full engorgement. In *R. (Boophilus) microplus*, the procuticle presents an inner and outer endocuticle during the four days of slow engorgement.

The single epithelium is constituted of cuboidal cells, with round-shaped nuclei, small nucleoli and condensed chromatin (Amasova, 1983; Coons; Alberti, 1999). However, during the feeding process the epithelial cells can undergo morphological alterations. The epithelial cells of *R. sanguineus* s. l. are larger in the stage of full engorgement. However, the opposite occurs in *R. (Boophilus) microplus*, i.e., the epithelial cells are larger in the initial phase of the feeding process (Beadle, 1972; Remedio; Nunes; Camargo-Mathias, 2014). Recent studies have demonstrated that morphological alterations occur when the ectoparasites are exposed to acaricides, confirming that these chemicals can pass through the cuticle and reach the epithelium, causing significant alterations in the cells (Lima de Souza; Remedio; Arnosti; Abreu; Camargo-Mathias, 2017).

Capítulo 4

CAPÍTULO 4

O bioativo carvacrol como potencial acaricida: avaliação dos seus efeitos sobre o integumento de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

JOSÉ RIBAMAR LIMA DE SOUZA¹, Patrícia Rosa Oliveira¹, Luís Adriano Anholetto¹, Luís Fernando Sodelli¹, Alan Roberto Fernandes¹, Rafael Neodini Remedio² e Maria Izabel Camargo-Mathias¹.

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

² Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras- UFLA, Lavras, MG, Brasil.

* Autor correspondente: E-mail: maria.izabel@unesp.br

RESUMO

Estudos têm sido realizados buscando métodos de controle para infestação de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) (carrapato do cão) com o objetivo de minimizar os danos causados pelos mesmos tanto aos seus hospedeiros, como ao meio ambiente, este último pelo uso indevido de produtos acaricidas. Nesse sentido, o carvacrol tem sido utilizado como uma alternativa natural contra os carrapatos, visto o mesmo possuir diversas propriedades dentre elas a de ser acaricida. Nessa direção o presente estudo buscou avaliar a ultramorfologia e a morfohistoquímica do integumento de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l. expostas à diferentes concentrações de carvacrol. Os resultados obtidos mostraram que a superfície do integumento das fêmeas expostas à maior concentração (25 μ L/mL), mostrou-se enrugada sugerindo uma desidratação do indivíduo ou ainda a mesma poderia ser resultado da desorganização das camadas cuticulares e epitelial do integumento em resposta a presença do produto tóxico. As alterações morfohistoquímicas das camadas do integumento foram significativas e mais intensas também naquelas fêmeas expostas às maiores concentrações (25 μ L/mL), confirmando a ação dose-dependente do carvacrol. Dentre as alterações celulares e tissulares, observou-se mudanças na forma, tamanho e arranjo das células epiteliais (camada epidérmica), as quais também apresentaram núcleos com a forma alterado e picnóticos, sinalizando que as mesmas estariam passando por processo de morte. Esse epitélio passou de simples cúbico a estratificado, também em resposta à presença do bioativo no sistema. Assim, as informações aqui obtidas sinalizaram que o carvacrol poderá ser num futuro próximo uma alternativa para um controle de carrapatos eficiente e mais sustentável.

Palavras-chave: Carvacrol, cutícula, dose-dependente, morte celular, estratificação epitelial.

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) de linhagem tropical tem frequentemente atraído o interesse de órgãos públicos da saúde, devido ao fato dos mesmos serem ectoparasitas, obrigatoriamente hematófagos e ainda com a característica de transmitir aos seus hospedeiros patógenos de importância médica-veterinária, como: *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii*, *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis* (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; ESTRADA, 2015).

Ao longo dos anos, o controle dos carrapatos *R. sanguineus* s.l. têm sido realizado com acaricidas formulados a partir de bases químicas sintéticas. No entanto, devido ao uso excessivo e inadequado, este método tem demonstrado produzir muitos efeitos colaterais que incluem: a) a seleção de indivíduos resistentes às bases químicas; b) a contaminação do meio ambiente; c) ao alto custo na aplicação, ressaltando a falta de mão de obra especializada e d) a toxicidade nos organismos não-alvos por meio da liberação e acúmulo de seus resíduos (ABBAS et al. 2014). Sendo assim, torna-se necessária a busca por métodos de controle que sejam mais eficazes, com preços mais acessíveis para o mercado consumidor de acaricidas e que causem danos mínimos ao meio ambiente e aos organismos não alvos, incluindo o homem.

Nessa perspectiva, o uso de bioativos presentes nos extratos e óleos de diversas espécies de plantas, têm sido cogitados para o uso no controle de carrapatos, visto terem potencial de interferir no metabolismo de diversos órgãos destes ectoparasitas, modificando a fisiologia dos mesmos e tornando-os mais vulneráveis, além de impedir que seus processos de alimentação e de reprodução sejam bem sucedidos. Afora isso, o uso de bioativos promove menor impacto ambiental, uma vez que são facilmente degradáveis gerando menor acúmulo de resíduos no solo, ar e água (ANHOLETO et al. 2016; LIMA DE SOUZA et al. 2017; REMÉDIO et al. 2014; ROSADO-AGUILAR et al. 2017).

Sob essa perspectiva, os estudos que vem sendo desenvolvidos em laboratório já tem demonstrado que plantas das famílias Lamiaceae e Verbanaceae seriam fortes candidatas para fornecerem bioativos com ação acaricida, visto as mesmas apresentarem como principal princípio ativo o monoterpene carvacrol, molécula que comprovadamente possui diversas propriedades biológicas, dentre elas a acaricida (KOC et al. 2013; MARTINEZ-VELÁZQUEZ et al. 2011).

O integumento (exoesqueleto) tem como função revestir externamente todo o corpo do carrapato, oferecendo-lhe sustentação, proteção contra impactos mecânicos e regulação do seu balanço hídrico. Morfologicamente o integumento dos carrapatos apresenta dobras profundas que, nas fêmeas tem a capacidade de se distender durante o processo de alimentação (ingurgitamento) o que permite que ela aumente em muitas vezes o seu tamanho original. Além disso, a distensão do corpo facilitará o desenvolvimento dos ovários por ocasião da reprodução (Sonenshine e Roe, 2014; Camargo-Mathias, 2018). Desta forma, o integumento, por estar revestindo o carrapato externamente torna-se o primeiro órgão a entrar em contato com os princípios ativos (sintéticos ou naturais) dos acaricidas, visto os mesmos geralmente serem aplicados de forma tópica.

Histologicamente o integumento dos carrapatos está formado por diversas camadas, a saber: cutícula, camada subcuticular e epiderme (células epidérmicas), esta última responsável pela produção de todas as outras camadas, além de dar origem as glândulas, cerdas e sensilas (Remedio et al. 2014). A cutícula, especificamente, encontra-se formada por duas subcamadas: a epicutícula e a procutícula (Hackman, 1982; Coons e Alberti, 1999).

Desta forma diante das informações expostas anteriormente, o presente estudo teve como objetivo principal, avaliar os efeitos (acaricida) do carvacrol diluído em etanol a 50° GL sobre a morfofisiologia do integumento de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. a ele expostas.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção do Carvacrol

O carvacrol (**5-isopropil-2-metilfenol**, CAS 499-75-2), um monoterpene aromático de fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$, foi obtido da empresa Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), com 99% de pureza.

2.2. Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s.l.

Machos e fêmeas em jejum foram obtidos de colônia mantida em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) sob condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas), em sala do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro/SP, Brasil. Um total de 25 casais de *R. sanguineus* s.l. foram liberados (em duas infestações) dentro de câmaras alimentadoras (confeccionadas com tecido de algodão) que foram coladas no dorso de

duas coelhas do Grupo Genético de Botucatu com peso entre 3 a 3.5 Kg, obtidas do Biotério da UNESP – Campus de Botucatu/SP – Brasil e que não foram previamente expostas a infestação por carrapatos. As mesmas foram mantidas em gaiolas individuais, com água e ração *ad libitum*. Após cinco dias de alimentação, fêmeas (semi-ingurgitadas) de carrapatos foram, com auxílio de pinça, coletadas dos hospedeiros e submetidas aos bioensaios. Todo procedimento de infestação foi realizado segundo metodologia descrita por Bechara et al. (1995).

Os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA, UNESP, Rio Claro, Brasil), protocolo número 3822, decisão número 012/2015.

2.3. Delineamento Experimental

2.3.1. Bioensaio (Carvacrol)

As cem fêmeas dos carrapatos foram alocadas em cinco grupos experimentais: dois Controles (C1 e C2), onde foram expostas, respectivamente, à água destilada (C1) e ao etanol a 50°GL em água destilada (C2); e três Tratamentos (T1-T3), nos quais foram expostas às concentrações de 3 µL/mL (T1); 12,5 µL/mL (T2) e 25 µL/mL (T3), correspondendo respectivamente, a 5, 20 e 40% da concentração letal média (CL50) do carvacrol diluído em etanol a 50°GL.

Em cada grupo experimental, 20 fêmeas de *R. sanguineus* foram imersas nas diferentes soluções por 5 minutos, seguindo o protocolo de Drummond et al. (1973). Após a imersão, elas foram secas com papel absorvente e colocadas em placas de Petri identificadas, cobertas com filme plástico contendo pequenos orifícios para a entrada de ar. As placas foram mantidas em estufa BOD climatizada Eletrolab El 202 a 28±1°C e UR 80±10%, durante sete dias. Aquelas do grupo controle foram mantidas em estufa diferente da utilizada para os grupos tratados, evitando possíveis interferências provenientes da evaporação do carvacrol.

2.3.2. Histologia

Cinco fêmeas por grupo experimental foram dissecadas sob estereomicroscópio, em placas de Petri contendo tampão fosfato salino (PBS: NaCl 0.13M, Na₂HPO₄ 0.017M, KH₂PO₄ 0.02M, pH 7.2), para a remoção de fragmentos do integumento (região dorsal do aloescudo). Em seguida, o material foi fixado em paraformaldeído a 4% por 72

horas e, então, transferido para o tampão fosfato de sódio (pH 7.2) por 24 horas. Na sequência, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcool etílico (70, 80, 90 e 95%, por 20 minutos cada). Após, o material foi colocado em resina de embebição (Leica Historesin Embedding Kit) por sete dias e foi incluído em moldes plásticos contendo historesina. O material permaneceu em estufa por sete dias para polimerização da resina e, em seguida foi seccionado em micrótomo LEICA RM 2255. Secções de 3 µm de espessura foram, então, colocadas em lâminas de vidro previamente limpas para serem coradas pela hematoxilina e eosina. Após coloração as lâminas foram secas ao ar livre, foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínula e em seguida, foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz LEICA DM750.

2.3.3. Histoquímica

Parte do material foi submetido à técnica histoquímica para detecção de proteínas totais pelo Xylidine Ponceau (MELLO; VIDAL, 1980).

2.3.4. Xylidine Ponceau (MELLO;VIDAL, 1980).

O material foi fixado em paraformaldeído a 4% por 72 horas e depois de seccionado foi corado pelo xylidine Ponceau por 30 minutos com posterior lavagem em água corrente. Depois de permanecer por 1 minuto em ácido acético 1%, as lâminas contendo as secções foram secas e montadas em bálsamo do Canadá para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio Leica DM150, equipado com câmera Leica ICC50 HD, por meio do software Leica LAS v.3.8, alocado nas dependências do Laboratório de Histologia, UNESP, Rio Claro, Brasil.

2.3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Cinco fêmeas por grupo experimental foram fixadas em solução de Karnovsky (paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2.5 % em tampão Sorensen 0.1M) durante 24 horas, sendo logo depois lavadas em água destilada. Em seguida, foram desidratadas em soluções crescentes de acetona (70%, 80%, 90% e 95%), e passadas duas vezes em acetona pura (100%) tendo cada banho duração de 10 minutos. Após, o material foi processado em “Criptical Point Drying”, para completar a desidratação. Terminada esta etapa, o material foi colado com auxílio de fita adesiva dupla face em suportes de alumínio (stubs), foi metalizado com ouro em “Sputtering”, examinado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura HITACHI TM3000 SEM.

3. Resultados

Os resultados obtidos no presente estudo que caracterizou ultramorfológica, histológica e histoquimicamente o integumento da região dorsal do aloescudo de fêmeas semi-ingurgitadas (5 dias de alimentação) de carrapatos *R. sanguineus* s.l. expostas e não expostas ao carvacrol em diferentes concentrações foram:

3.1. Ultramorfologia

Os indivíduos dos grupos controle (C1 e C2) e aqueles alocados nos grupos Tratamento (T1 e T2), apresentaram a superfície do integumento com esculturas quitinosas na sua superfície externa, bem como a presença de cerdas e de aberturas de glândulas dermais por onde a secreção produzida é liberada para o exterior, (Fig.1. B-D; G-I; L-N). Nos indivíduos do grupo Tratamento 3 (T3) pode-se observar que as esculturas (sulcos) na superfície do integumento estavam menos profundas, provavelmente em resposta à exposição ao carvacrol.(Fig. 1. Q-S).

3.2. Histologia

Grupos controles (C1 e C2)

Os resultados dos indivíduos do grupo controle C1 (expostos à água destilada) e C2 (expostos ao etanol 50°GL.) mostraram que a cutícula formada pela epicutícula (camada mais externa) e procutícula (camada mais interna) apresentaram-se fortemente coradas pela eosina e as regiões próximas da camada subcuticular mostraram marcação mediana pela eosina (Fig.1. E). A camada subcuticular que é acelular não foi marcada por nenhum dos corantes utilizados, ou seja, não foi positiva nem a eosina e nem a hematoxilina (Fig.1). As células formam o epitélio da epiderme simples e cúbico. As mesmas tiveram seu citoplasma levemente acidofílico, além de núcleos esféricos com cromatina descondensada e nucléolos evidentes (corados pela hematoxilina) (Fig.1. E) (Tab.1)..

3.1.2. Grupo Tratamento 1

As fêmeas de *R. sanguineus* s.l. semi-ingurgitadas expostas a 3µL/mL de carvacrol diluído em etanol 50°GL apresentaram algumas alterações relacionadas com a constituição das diferentes camadas cuticulares quando fez-e a comparação com os indivíduos dos grupos controle (C1 e C2).

A epicutícula não exibiu modificações após o tratamento, ao contrário da procutícula que foi fortemente marcada pela eosina diferindo do que foi observado nos indivíduos dos grupos controle (C1 e C2) e o que impediu de se fazer a distinção entre as camadas da procutícula (exocutícula e endocutícula). A exposição ao carvacrol não alterou a camada subcuticular, porém, aquela epidérmica apresentou a porção apical das células que a compõem, com acúmulo de pequenas granulações e eosinófilica localizada no contato epitélio/camada subcuticular, provavelmente secreção que estaria sendo produzida para ser depositada na camada cuticular (Fig. 1. J) (Tab. 1). Já nessa concentração parece ter havido interferência do carvacrol no arranjo das células epiteliais, uma vez que o epitélio dá sinais de estratificação (Fig.1 J).

3.1.3. Grupo Tratamento 2

Neste grupo as fêmeas foram expostas ao carvacrol na concentração de 12,5µL/mL e as alterações observadas foram mais pronunciadas quando comparadas aos grupos anteriores. A epicutícula sofreu alterações assim como a procutícula, sendo que a primeira mostrou muitas saliências e reentrâncias na superfície voltada para o exterior (Fig. 1 O). A segunda por sua vez foi fortemente marcada pela eosina (Fig. 1 O). A camada subcuticular foi fortemente marcada pela hematoxilina ao contrário do observado nos grupos anteriores. Quanto ao citoplasma das células epidérmicas, este apresentou-se fortemente marcada pela eosina, além de ter na região apical das células agregados de grânulos, provavelmente de natureza proteica, os quais seriam incorporados à cutícula (Fig.1. O) (Tab. 1). Aqui já foi observada uma desorganização do arranjo das células epiteliais as quais além de apresentarem células com núcleos irregulares e picnóticos, parecendo ter perdido o contato com a membrana basal que daria suporte a todas as camadas cuticulares (Fig.1 O).

3.1.3. Grupo Tratamento 3

O integumento das fêmeas expostas ao carvacrol na concentração de 25µL/mL apresentou alterações mais significativas em relação àquelas observadas nos grupos anteriormente analisados. A superfície da epicutícula exibiu dobras pronunciadas e irregulares muito mais significativas do que aquelas do grupo anteriormente descrito. A distinção entre todas as camadas cuticulares não foi mais possível. A subcutícula ao contrário do grupo anterior mostrou-se negativa aos corantes aplicados (Fig.1. T) (Tab.1).

Neste grupo a estratificação da camada epitelial ficou mais evidente, e o aspecto de desorganização celular deixou claro indícios da ação tóxica do carvacrol (Fig.1. T).

Histoquímica

3.1.4. Xylidine Ponceau

A referida técnica foi utilizada para se detectar a presença de proteínas totais no integumento, as quais nos grupos controle (C1 e C2) e na maioria das camadas foram fortemente marcadas em laranja exceto a camada subcuticular que apresentou fracamente positividade (Fig.1 F) (Tab. 1.). As células epiteliais tiveram os núcleos fortemente marcados pelas histonas bem como o próprio citoplasma mostrou-se moderadamente corado (Fig.1 F) (Tab1). Essa técnica também permitiu confirmar que todo o material granular que foi observado nas secções histológicas era de natureza proteica (Figs.1 K e P).

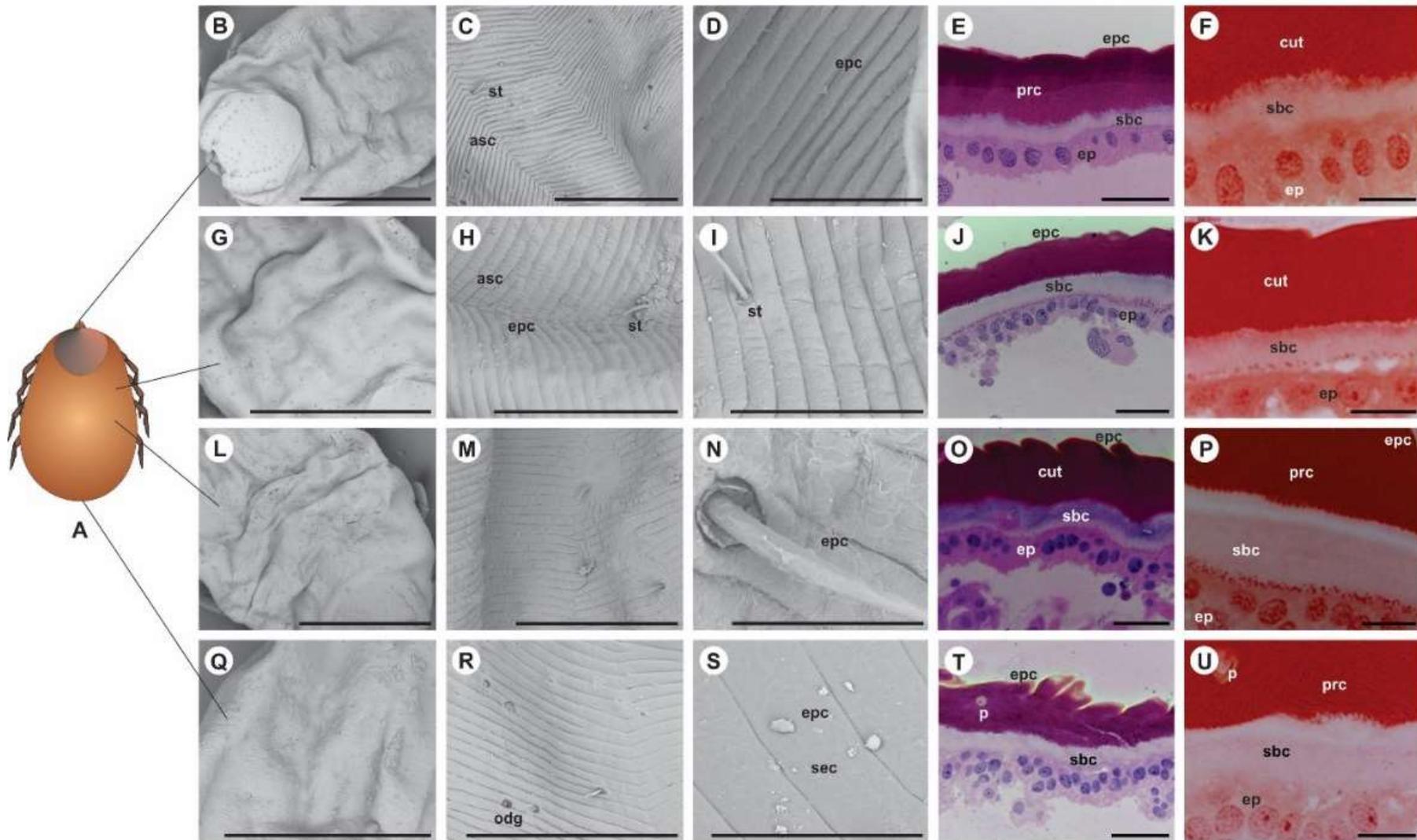
No grupo tratamento 1, as células da camada epitelial apresentaram-se com citoplasma mais fortemente marcados do que aquelas dos grupos controle e nos tratamentos 2 e 3 observou-se que a camada epitelial foi menos marcada pelo xylidine do que a dos grupos controle e do tratamento 1 (Fig.)

Tabela 1. Resumo dos resultados histológicos e histoquímicos observados no integumentode fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. espostos e não expostos ao carvacrol.

	Hematoxilina				Eosina				Xylidine Ponceau			
	GC	T1	T2	T3	GC	T1	T2	T3	GC	T1	T2	T3
Epicutícula	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Procutícula	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Subcutícula	-	-	+++	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Núcleos	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	+++	+++	+++	++
Citoplasma	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	+++	++	++	+

- negativo, + fracamente positivo, ++ moderadamente positivo, +++ fortemente positivo

FIGURA 1 A. Representação esquemática de fêmeas *R.sanguineus* sensu lato, Segundo autor. **B-D.** MEV da superfície das fêmeas dos Grupos Controle. **G-I.** MEV da superfície das fêmeas expostas ao Tratamento 1. **L-N.** MEV da superfície das fêmeas expostas ao Tratamento 2. **Q- S** MEV da superfície das fêmeas expostas ao Tratamento 3. **E-F, J-K, O-P, T-U** Secções histológicas do integumento das fêmeas de *R. sanguineus*. **E, J, O, T** Coloração pela HE. **E=** Controle, **J=** Tratamento 1, **O=** Tratamento 2, **T=** Tratamento 3. **F, K, P, U** Coloração pelo xylidine Ponceau. **F=** Controle, **K=** Tratamento 1, **P=** Tratamento 2, **U=** Tratamento 3. **Barras:** B, G, L, Q= 2mm; C= 500 μm ; D, M, S= 100 μm ; H, I, R= 500 μm ; N=50 μm . E,J,O,T= 40 μm ; F,K,P ,U=100 μm . asc= aloescudo; cut=cutícula; ep= epitelio; epc=epicutícula; odg=glândulas dermais; p= poro; prc=procutícula; sbc=subcuticular; sec= grânulo secretor.



4. DISCUSSÃO

Produtos naturais, principalmente aqueles extraídos de plantas vem sendo utilizados como método alternativo de controle de carrapatos, por serem além de eficientes, biodegradáveis e terem um custo mais baixo quando comparados aos produtos químicos de natureza sintética (Chagas et al. 2012). Sob essa perspectiva, o carvacrol, monoterpene produzido por plantas aromáticas das famílias Lamiaceae e Verbanaceae vem, pelas sua propriedade acaricida, sendo cogitado como uma possível estratégia de controle

O integumento é um órgão que forma o exoesqueleto dos carrapatos, sendo responsável por compor a primeira barreira entre o seu meio externo e o interno. Como barreira esta deve ser extremamente eficiente para evitar que seja transposta pelos produtos impedindo que os mesmos consigam penetrar no interior do corpo do carrapato (Hackman, 1982; Coons e Alberti, 1999).

Nessa direção os resultados obtidos no presente estudo trouxeram à luz informações importantes sobre como o carvacrol em concentrações subletais, penetrou no integumento e alterou a morfofisiologia deste em fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. a ele expostas, confirmando ainda que sua ação foi dose dependente, ou seja, à medida que a concentração do produto aumentou, os danos ao integumento também foram mais severos, corroborando dados obtidos nos estudos desenvolvidos por Denardi et al. (2010) e por Remédio et al. (2014). Os resultados aqui apresentados foram obtidos através da aplicação de técnica histológica que possibilita observação de que nas fêmeas alocadas nos grupos controle (C1 e C2) a morfologia original do integumento foi preservada, visto que as três camadas que o compõem puderam ser distinguidas entre si, a saber: cuticular (mais externa), subcuticular (intermediária) e epidérmica (mais interna e composta por um epitélio simples cúbico), corroborando a descrição anteriormente realizada por Remedio et al., (2014) (Fig. 1. E). Ao contrário, aqueles dos grupos tratamentos T1, T2 e T3, cujos indivíduos foram expostos às concentrações subletais de carvacrol (3µL/mL, 12,5µL/mL e 25µL/mL) apresentaram alterações morfológicas e fisiológicas significativas.

Ultramorfologicamente, as fêmeas expostas às menores concentrações (3µL/mL e 12,5µL/mL) não apresentaram alterações quando comparadas ao controle, mas aquelas expostas à maior concentração (25µL/mL) apresentaram os sulcos (escultura) da sua superfície profundos sinalizando uma possível ação tóxica do carvacrol já na superfície

do exoesqueleto, dados que corroboraram aqueles obtidos por Remedio et. al. (2014) quando expuseram carrapatos também da espécie *R. sanguineus* s.l. ao extrato de folhas neem nas concentrações de 10 e 20%.

As alterações histológicas no integumento das fêmeas já puderam ser notadas nas menores concentrações de exposição (3 μ L/mL e 12,5 μ L/mL), uma vez que entre a camada de células epiteliais e aquela subcuticular foram observados agregados de grânulos de natureza proteica, os quais provavelmente estariam sendo produzidos com maior frequência pelas células epiteliais para serem incorporados à cutícula, resposta do organismo à ação do produto tóxico, tentando assim manter a integridade da cutícula, ou mesmo provocar nessa um espessamento, preservando assim o meio interno do ectoparasita. Em relação a camada epidérmica, as células epiteliais já começaram nestas concentrações mais baixas a apresentar sinais de desorganização, além das células mostrarem núcleos alterados e picnóticos, bem como a perda do contato com a membrana basal, corroborando também os dados de Remedio et al. (2017), quando expuseram a mesma espécie de carrapatos ao extrato de folhas de neem em diferentes concentrações.

Na maior concentração de carvacrol (25 μ L/mL) aqui utilizada para expor as fêmeas de *R. sanguineus* s.l. foram encontradas as alterações histológicas mais agressivas e significativas quando comparadas aos grupos anteriores, alterações estas que foram mais marcantes na camada epidérmica (células epiteliais). Esta que originalmente era composta por um epitélio simples cúbico, passou a ser estratificada, apresentando células com vários tamanhos e com núcleos picnóticos, o que sinalizou, além da desorganização estrutural da camada a ocorrência de morte celular, mostrando que o bioativo foi capaz de alterar a permeabilidade da cutícula, atravessando-a e conseguindo chegar às células epiteliais. Esses dados foram semelhantes àqueles obtidos em estudos anteriormente realizados por Lima de Souza et al. (2017) quando expuseram fêmeas de *R. sanguineus* s.l. ao óleo de neem enriquecido com azadiractina em diferentes concentrações.

A aplicação da técnica histoquímica para detecção de proteínas totais (xylidine Ponceau) mostrou que a camada cuticular tanto nos grupos controle quanto nos tratamentos mostrou-se íntegra. A camada epitelial, na exposição à menor concentração de carvacrol 3 μ L/mL apresentou células com citoplasma fortemente marcado pelo corante, indicando que as mesmas estariam ativas na síntese proteica, ou seja, produzindo elementos que seriam incorporados às outras camadas cuticulares. Ao contrário, quando

fez-se a exposição ao carvacrol na concentração de 25µL/mL, essas células(núcleo e citoplasma) foram fracamente marcadas, sinalizando baixa atividade na síntese proteica (diminuição da função secretora), o que poderia ser resultado da ação do carvacrol sobre as mesmas que já deveria ter interferido no desempenho do aparato da síntese protéica.

De forma geral, o presente estudo, através do uso da morfologia, confirmou que essa técnica foi uma ferramenta essencial para demonstrar como o bioativo carvacrol atuou sobre os carrapatos da espécie *R. sanguineus* s.l. a ele expostos, conseguindo ultrapassar a barreira cuticular e chegando até a camada epitelial, alterando a sua morfofisiologia. Essas informações tornam-se de extrema importância, visto que nessa busca por novas estratégias de controle de carrapatos, fomentam a realização de novos estudos com esse bioativo, o que poderá significar num futuro próximo uma estratégia alternativa para o controle destes ectoparasitas.

5. REFERÊNCIAS

- Abbas, R.Z., Arfan, M., Colwell, D.D., Gilleard, J., Iqbal, Z., 2014. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Vet. Parasitol.* 203, 6–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>
- Anholeto, L.A., Oliveira, P.R. de, Rodrigues, R.A.F., Spindola, C. dos S., Labruna, M.B., Pizano, M.A., Castro, K.N. de C., Camargo-Mathias, M.I., 2016. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae) ticks. *Ticks Tick. Borne. Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.018>
- Bechara, G.H., SZABÓ, M.P.J., FERREIRA, B.R., GARCIA, M.V., 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Brazil J. Vet. Parasitol.* 4, 61–65.
- Camargo- Mathias, M.I., 2018. *Inside Ticks: Morphophysiology, Toxicology and Therapeutic Perspectives.*, 1ª. ed. Editora Unesp, São Paulo.
- Chagas, A.C. de S., Barros, L.D. de, Contiguiba, F., Furlan, M., Giglioti, R., Oliveira, M.C. de S., Bizzo, H.R., 2012. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acarie:Ixodidae). *Parasitol. Res.* 110, 295–303. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2488-z>
- Coons, L., Alberti, G., 1999. The acari-ticks, in: Harrison, F., Foelix, R. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Wiley-Liss: New York, pp. 267–514.
- Dantas-torres, F., Otranto, D., 2015. Further thoughts on the taxonomy and vector

role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. Vet. Parasitol. 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.014>

Denardi, S.E., Bechara, G.H., Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., 2010. *Azadirachta indica* A . Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae) tick females. Exp. Parasitol. 126, 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.05.017>

Estrada, A., 2015. Ticks as vectors : taxonomy , biology and ecology. Sci. Tech. Rev. Off. Int. des Epizoot. 34, 53–65.

Hackman, R.H., 1982. Structure and function in tick cuticle. Annu. Rev. Entomol. 75–95.

Koc, S., Oz, E., Cinbilgel, I., Aydin, L., Cetin, H., 2013. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari:Ixodidae). Vet. Parasitol. 193, 316–319. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.010>

Lima-de-Souza, J.R., Remedio, R.N., Arnosti, A., de Abreu, R.M.M., Camargo-Mathias, M.I., 2017. 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) females. Microsc. Res. Tech. 80, 838–844. <https://doi.org/10.1002/jemt.22871>

Martinez-Velazquez, M., Castillo-Herrera, G.A., Rosario-Cruz, R., Flores-Fernandez, J.M., Lopez-Ramirez, J., Hernandez-Gutierrez, R., Del Carmen Lugo-Cervantes, E., 2011. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitol. Res. 108, 481–487. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2069-6>

Mello, M.L., Vidal, B.C., 1980. Práticas de Biologia Celular. CAMPINAS-SP.

Ramírez, C., Ibarra, F., Pérez, H.I., Manjarrez, N., Salgado, H.J., Ortega, L., 2016. Assessment and determination of LC50of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Parasite Epidemiol. Control 1, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.02.006>

Remedio, R.N., Nunes, P.H., Anholetto, L.A., 2014. Morphological Alterations in the Synganglion and Integument of *Rhipicephalus sanguineus* Ticks Exposed to Aqueous Extracts of Neem Leaves (*Azadirachta indica* A . JUSS). Microsc. Res. TECHNIQUE 77, 989–998. <https://doi.org/10.1002/jemt.22427>

Rosado-Aguilar, J.A., Arjona-Cambranes, K., Torres-Acosta, J.F.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Bolio-González, M.E., Ortega-Pacheco, A., Alzina-López, A., Gutiérrez-Ruiz, E.J., Gutiérrez-Blanco, E., Aguilar-Caballero, A.J., 2017. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. *Vet. Parasitol.* 238, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.023>

Sonenshine, D.E., Roe, R.M., 2014. Biology of Ticks, in: Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds.), *Biology of Ticks*. New York, pp. 99–121.

Discussão geral

4. DISCUSSÃO GERAL

A literatura vem disponibilizando artigos que trazem resultados sobre o uso de princípios ativos extraídos de plantas e que são utilizados para o controle de carrapatos com relativa eficiência do ponto de vista ambiental, visto serem biodegradáveis. Dentre esses bioativos encontra-se o carvacrol que têm se destacado por apresentar uma série de propriedades, dentre elas a de acaricida, já comprovada em diversos testes de mortalidade com diferentes espécies de carrapatos (RAMÍREZ et al., 2016; SENRA et al., 2013).

Sob essa perspectiva o presente estudo, teve como objetivos avaliar a eficácia do carvacrol como acaricida, utilizando para tanto fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* s.l. para trazer à luz informações que pudessem subsidiar, num futuro próximo a sua utilização em larga escala. Para tanto foram realizados bioensaios que estabeleceram a concentração letal média (CL50) do carvacrol, bem como realizados bioensaios para avaliar as alterações morfofisiológicas nas células germinativas (ovários) e no integumento por meio do teste de imersão de adultos (TIA) (DRUMMOND et al., 1973).

Os resultados aqui obtidos mostraram que a concentração letal média para fêmeas de *R. sanguineus* s.l. semi-ingurgitadas com 5 dias de alimentação e expostas ao carvacrol foi de 62,48 μ L/mL (CL50), valor este encontrado por meio da realização de dois bioensaios: um para determinar o intervalo de mortalidade (30-85 μ L/mL) e o outro para calcular a concentração letal média (CL50) por meio de análises do Probit. O dado, aqui encontrado para a CL50 foi semelhante àquele obtido por Ramírez et al. (2016) que determinaram que a concentração letal média do carvacrol seria de 59,72 μ L/mL quando a ele fossem expostas larvas de carrapatos da espécie *R. (Boophilus) microplus*.

Os dados obtidos neste trabalho também confirmaram que o carvacrol é um bioativo que age de forma dose-dependente, uma vez que as maiores taxas de mortalidade ocorreram quando da exposição (bioensaio 1) das fêmeas à maior concentração (100 μ L/mL) e com eficácia já nas primeiras 72 horas, vindo corroborar aqueles dados relatados por Koc et al. (2013) para fêmeas de *R. turanicus* em jejum expostas ao óleo extraído da planta *Origanum bilgeri* P.H. cujo principal componente também é o carvacrol.

Os testes de exposição ao carvacrol aqui realizados nas concentrações de 20, 50 e 100 μ L/mL para avaliar a morfofisiologia dos ovários das fêmeas desta espécie, com 4 dias de alimentação e com peso médio aproximado de 26 mg/indivíduo, mostraram a

ocorrência de alterações morfológicas nos ovócitos quando comparou-se com os indivíduos dos grupos controle. Essas modificações consistiram de: perda da forma original arredondada dos ovócitos que passaram a irregulares; a vesícula germinal também começou a sofrer mudanças no seu contorno, passando esta a ter um aspecto irregular e, finalmente no citoplasma dos ovócitos desses indivíduos observou-se extensa vacuolização. Essas alterações sinalizaram fortemente que o carvacrol seria realmente tóxico para os carrapatos e ainda que o mesmo agiria de forma dose dependente, visto que as maiores e mais intensas alterações ocorreram quando da exposição à maior concentração, ou seja à de 100 μ L/mL. Muito embora essa maior concentração tenha sido também a mais agressiva, já naquelas menores (20 e 50 μ L/mL) essas mesmas alterações já davam indícios de estarem se instalando nas células, embora de maneira menos intensa e, principalmente nos ovócitos em estágios I e II de desenvolvimento. Muito provavelmente a maior susceptibilidade dos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento a ação do carvacrol tenha se dado ao fato de que nessa fase ainda não teria ocorrido a deposição do cório, membrana protetora que impediria que o seu conteúdo interno, principalmente o DNA fosse alterado devido às variações climáticas externas. Desta forma, os dados aqui obtidos corroboraram aqueles encontrados por Oliveira et al. (2005) quando fizeram a exposição de fêmeas desta mesma espécie de carrapatos ao fipronil e por Arnosti et al. (2011) os quais utilizaram o ester do ácido ricinoléico do óleo de mamona misturado à ração fornecida aos coelhos hospedeiros e também observaram as mesmas alterações.

Foi aqui também detectado que nos ovócitos em estágios mais avançados do desenvolvimento (III, IV e V), a exposição às concentrações mais baixas do carvacrol (20 e 50 μ L/mL) provocaram alterações na sua forma (passou a irregular), vacuolizando o citoplasma e provocando dobras no limite celular. Considerando que nestes estágios de desenvolvimento dos ovócitos a deposição do cório já deveria ter iniciado parcial (III e IV) ou totalmente (V) os dados permitiram inferir que o carvacrol seria potente o suficiente para transpor a barreira coriônica e assim chegar até o interior dos ovócitos, provocando nestes uma desorganização tanto citoplasmática quanto nuclear. O carvacrol já no interior dos ovócitos, muito provavelmente tenha agido também sobre os processos de síntese e deposição do próprio cório, visto que esta membrana protetora nos ovócitos III, IV e V mostrou-se mais fina e com irregularidades (dobras) caracterizando a perda de sua constituição original que conseqüentemente tornou-a deficiente na sua função de

barreira protetora do conteúdo interno do ovócito, dados estes que corroboraram os de Denardi et al. (2011) quanto estudaram *A. cajennense*.

Quando as fêmeas foram expostas à maior concentração (100µL/mL) de carvacrol, observou-se que os ovários destas apresentavam somente ovócitos nos estágios I e II, estando ausentes aqueles mais desenvolvidos (III, IV e V). Essa concentração foi certamente aquela mais agressiva para o sistema reprodutor feminino, uma vez que impediu que os ovócitos continuassem o seu desenvolvimento até chegar a maturação completa (estágio V). Morfológicamente estes ovócitos exibiram tamanho bastante reduzido, perda da forma original passando a ficar com aspecto irregular, além de sua vesícula germinal apresentar cromatina marginalizada forte indicativo morfológico do desencadeamento do processo de morte celular. A não maturação dos ovócitos indiretamente mostrou que também o processo de vitelogênese foi afetado pela exposição ao carvacrol e, nessa direção, inferiu-se que não só a célula germinativa foi afetada mas também aquelas do pedicelo, visto serem essas últimas as responsáveis por aderir os ovócitos à parede do ovário, além de participarem do processo de deposição do vitelo no interior dos ovócitos em carrapatos (Oliveira et al. 2009; Remedio et al. 2015). Finalmente esses dados demonstraram a eficiência do carvacrol, visto que se ele foi eficiente em interromper a produção de ovócitos, a geração de uma nova prole também ficou comprometida.

Com relação ao integumento de fêmeas *R. sanguineus* s.l. semi-ingurgitadas com 5 dias de alimentação, e que foram expostas as concentrações subletais 3, 12,5 e 25µL/mL de carvacrol diluído em etanol 50°GL foram observadas alterações quando comparadas aos grupos controle.

A investigação ultramorfológica revelou resultados que permitiram fazer uma associação com aqueles dados obtidos por meio da aplicação das técnicas histológica e histoquímica. A investigação no nível ultramorfológico mostrou que externamente a superfície dos indivíduos expostos, não sofreu danos mais significativos, exceto que na exposição à concentração de 25 µL/mL a mesma tornou-se mais enrugada do que aquela dos indivíduos não expostos, sugerindo que tenha ocorrido: a) uma desidratação do indivíduo ou b) a desorganização interna do integumento, principalmente no epitélio da epiderme, o que causaria esse enrugamento. Remedio et al. (2014) em estudo que fez a exposição de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. ao extrato de folhas de neem nas concentrações 10 e 20%, obtiveram resultados semelhantes.

Os dados histológicos do integumento de fêmeas submetidas às menores concentrações (3 e 12,5µL/mL) do carvacrol mostraram que as camadas cuticular e subcuticular, além das células epiteliais sofreram alterações. Nesse sentido, pode-se inferir que o carvacrol foi capaz de atravessar a barreira da epicutícula e atingir as células epiteliais causando danos às mesmas (núcleos alterados e picnóticos), porém como estratégia de defesa dos ectoparasitas essas células muito provavelmente começaram a secretar com mais intensidade componentes da cutícula que, dessa foram, provocariam nesta um espessamento e, conseqüentemente inibiria a entrada de substâncias tóxicas para o interior do indivíduo, o que foi confirmado pela presença de agregados de grânulos proteicos na interface entre a camada epidérmica e a subcuticular. Corroborando esses dados, aqueles obtidos por Lima de Souza et al. (2017) quando utilizaram o óleo de neem enriquecido com azadiractina em diferentes concentrações na exposição de fêmeas semi-ingurgitadas da mesma espécie.

Na maior concentração (25µL/mL) testada neste estudo, o integumento das fêmeas exibiu alterações significativas, visto que a epicutícula passou a apresentar dobras irregulares e não foi mais possível distinguir as camadas da procutícula (exocutícula e endocutícula). Com relação as células epiteliais houve um rearranjo epitelial, de forma que o epitélio passou de simples cúbico a estratificado, além de desorganizado. A estratificação provavelmente também seria uma resposta do indivíduos à presença do carvacrol, uma vez que essa estratificação significou que este epitélio, antes secretor, passou a atuar como um epitélio de revestimento, protegendo o interior do ectoparasita, inibindo ou mesmo impedindo a entrada do bioativo.

Assim sendo, diante de todas as informações aqui postas, o carvacrol mostrou-se ser um bioativo que num futuro próximo poderá ser utilizado no controle de carrapatos, tendo em vista que utilizado em diferentes concentrações foi capaz de causar alterações no integumento (ação direta) e nas células germinativas (ação indireta) impedindo o desenvolvimento de novos indivíduos nos carrapatos *R. sanguineus* s.l..

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.; KÜRKCULOĞLU, 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**, Berlim, 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**, Berlim, 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.

ANEXO

unesp


 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
 Campus de Rio Claro

 COMISSÃO DE ÉTICA
 NO USO DE ANIMAL
 CEUA - IB - UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 12/2015

Instituição: UNESP - IB - CRC	Departamento: Biologia
Data de Registro CEUA: 30.04.15	

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação dos Efeitos da Azadiractina na Morfologia do Integumento e do Ovário de fêmeas de Carrapatos Rhipicephalus sanguineus (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE)", protocolo nº 3822, sob responsabilidade de Maria Izabel Souza Camargo (Pesquisador Responsável) e José Ribamar Lima de Souza (Orientando) , que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 1676.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Subprojeto(s) vinculado(s): ==,==

Colaboradores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP - Campus de Rio Claro, em sua 24ª reunião ordinária, realizada em 17/06/15.

<input checked="" type="checkbox"/>	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
<input type="checkbox"/>	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
<input type="checkbox"/>	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
<input type="checkbox"/>	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
<input type="checkbox"/>	Não Aprovou.
<input type="checkbox"/>	Retirou, devido à permanência das pendências.

Vigência do Projeto: 01/04/2015 a 02/04/2019

Espécie/linhagem: Coelhos - New Zealand White Número de animais: 06

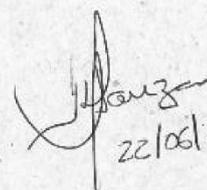
Peso: 2 kg Idade: Sexo: fêmea

Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): Biotério de Botucatu- UNESP

Objetivo Acadêmico:	<input type="checkbox"/> TCC
	<input type="checkbox"/> Mestrado
	<input checked="" type="checkbox"/> Doutorado
	<input type="checkbox"/> Outros - (Iniciação Científica)

Rio Claro, 18/06/2015


 Prof. Dr. José Paulo Leite Guadanucci
 Coordenador


 22/06/2015