

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TEGUMENTO DE FÊMEAS DE *Rhipicephalus microplus* EXPOSTAS AO CARVACROL LIVRE E ENCAPSULADO

Larissa Vieira Amorim¹, Gabriela Rocha Assunção¹, Daniela de Oliveira Rocha²,
Barbara Rauta de Avelar², Adilson Vidal Costa¹, Vagner Tebaldi de Queiroz¹,
Erika Takagi Nunes¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, s/nº, Guararema- 29500-000 - Alegre-ES, Brasil. larissa.v.amorim@hotmail.com, gabrielarochaassuncao@gmail.com, avcosta@hotmail.com, vagner.queiroz@ufes.br, erika.nunes@ufes.br

²Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Instituto de Veterinária, Rod. BR 465, km 7, 23890-000- Seropédica-RJ, Brasil, danielarocha.ufrj@gmail.com, barbararauta@gmail.com

Resumo

O controle do parasito *Rhipicephalus microplus* ainda é um desafio para o setor pecuário no Brasil. Os relatos recorrentes de populações resistentes aos carrapaticidas comerciais e o impacto ambiental, ao animal e ao ser humano, causado por substâncias químicas, têm estimulado estudos experimentais com substâncias alternativas para seu controle. Considerando a volatilidade de alguns compostos majoritários, o presente estudo objetivou analisar os efeitos do carvacrol, isolado e quando encapsulado em hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-βCD), no tegumento de fêmeas adultas desta espécie de ectoparasito. Para tal, partenóginas do carrapato-do-boi foram submetidas a diferentes concentrações desses compostos e seu tegumento, posteriormente dissecado e processado para inclusão em historesina. Os resultados mostraram que indivíduos tratados com carvacrol complexado sofreram danos teciduais mais severos que os com carvacrol livre, além disso, as alterações morfológicas observadas sugerem uma ação dose-dependente dos compostos.

Palavras-chave: Carrapato-do-boi. Compostos majoritários. Óleos essenciais. Carrapaticida. Histologia.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Morfologia.

Introdução

Os carrapatos *Rhipicephalus microplus* (Ixodidae) são os ectoparasitas hematófagos mais importantes da pecuária brasileira. O tegumento destes artrópodes atua como regulador do balanço hídrico e na proteção dos órgãos internos, sendo composto por epiderme, cutícula, apêndices epidérmicos e glândulas dérmicas (LIMA-DE-SOUZA, 2019).

Considerando a importância do controle de *R. microplus*, o uso de diversas classes químicas de acaricidas sintéticos, ainda é o método mais utilizado (RODRÍGUEZ-VIVAS *et al.*, 2014). No entanto, sua aplicação sobre o hospedeiro e parasitos pode ocasionar a absorção pelos tecidos, atuando como toxina no sistema nervoso; além disso, os impactos desses químicos tornam-se um obstáculo para sua utilização, exigindo cautela com a segurança humana, animal e ambiental (TAYLOR, 2001). Outro fator a ser considerado é sua eficácia, que tem se tornado cada vez menor, com relatos de populações de carrapatos resistentes aos acaricidas comerciais devido ao uso excessivo (GOMES; KOLLER; BARROS, 2011).

Na busca por alternativas de controle, pesquisas têm mostrado que óleos essenciais e seus compostos majoritários são eficazes no combate a ectoparasitos, pois apresentam um lento desenvolvimento de parasitos resistentes, não agredem o meio ambiente e são mais seguros para os hospedeiros por possuírem baixa toxicidade; assim, observa-se um crescente apelo comercial, ainda que sejam necessários mais estudos na área (AGNOLIN *et al.*, 2014; ADENUBI *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2016).

O carvacrol, ou cimofenol, é uma das opções estudadas como carrapaticida fitoterápico, sendo geralmente obtido a partir da extração de plantas da família Lamiaceae como o *Origanum vulgare* L. e

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Thymus vulgaris (BAKKALI *et al.*, 2008). Entretanto, poucos estudos prévios, como o de Cruz *et al.* (2013) e Muniz (2018), demonstraram a ação acaricida do carvacrol em *R. (B.) microplus*.

Devido à alta volatilidade e natureza hidrofóbica do carvacrol, seu uso ainda enfrenta obstáculos. Em virtude disso, Assunção (2021) avaliou o carvacrol em complexo de inclusão com hidroxipropil- β -ciclodextrina no controle de larvas de *R. (B.) microplus*, tendo verificado a proteção do composto ativo e aumento do tempo de ação do carvacrol, resultando em 99,69% de mortalidade larval 30 horas após a exposição.

Com base nisso, o presente trabalho visou analisar os efeitos do tratamento com carvacrol isolado e encapsulado em hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre a estrutura histológica do tegumento de fêmeas adultas dessa espécie, buscando informações que contribuirão para o desenvolvimento de formulações que promovam o controle de carrapatos de forma ambientalmente favorável e que auxiliem na diminuição dos casos de resistência.

Metodologia

O Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD; M = 1460 g/mol; PubChem SID 24895425, Sigma-Aldrich), o carvacrol (CAR; PubChem SID 24857025, Sigma-Aldrich), Dimetilsulfoxido (DMSO PA 99,9%, Cromoline Química Fina LTDA) e o etanol (95% PA – Dinâmica) são de origem comercial. As soluções-testes foram preparadas no laboratório de Química e Bromatologia (CCENS-UFES) e após o preparo permaneceram em estufa por 30 horas a 30°C e 40%.

Foram coletadas cerca de 45 fêmeas semi ingurgitadas de *R. microplus*, com pesos médios de 0,036g-0,248g, de bovinos artificialmente infestados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil (aprovada pela Comissão de Ética no uso de animais/UFRRJ com o seguinte número de protocolo: n° 4667181218/2019). Os carrapatos foram higienizados e divididos em 9 grupos de 5 fêmeas para cada tratamento que serão denominados de: (G1) controle água, (G2) controle DMSO a 5%, (G3) controle complexo de inclusão (CI), (G4) Carvacrol a 0,25%, (G5) Carvacrol a 0,5%, (G6) Carvacrol a 1%, (G7) Carvacrol + CI a 0,25%, (G8) Carvacrol + CI a 0,5%, (G9) Carvacrol + CI a 1%.

Cada grupo foi imerso nas soluções com os tratamentos acima por cinco minutos, posteriormente as soluções foram drenadas, as fêmeas foram secas com papel absorvente, pesadas individualmente e acondicionadas em placas de petri. E foram mantidas por 72 horas em câmara climática do tipo D.B.O (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $80 \pm 10\%$ UR, quando foram insensibilizadas a frio e, dissecadas em placas de Petri contendo solução fisiológica tamponada com fosfato-PBS (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L).

Com o auxílio de estereomicroscópio, pinças e micro-tesouras, o tegumento foi retirado e a fixação foi realizada em solução de paraformaldeído a 4%, por 24 horas, em seguida o material passou pelos processos de desidratação em gradiente crescente de álcool etílico (70%, 80% e 90%), foi submetido a resina de embebição e incluído em moldes contendo resina com catalisador, sendo, após a polimerização dos blocos, seccionado em micrótomo Leica.

Para análise histológica, cortes de 5 μm foram coletados em lâminas de vidro e posteriormente corados por Hematoxilina de Harris e Eosina aquosa (HE), durante 10 e 5 minutos, respectivamente. Por fim, as lâminas foram analisadas sob microscópio de luz Leica DM750 equipado com câmera fotográfica Leica ICC50 HD acoplada ao computador e fotodocumentadas utilizando o software LAZ EZ 3.0 Leica.

Resultados

Os indivíduos do grupo controle água (G1) apresentaram cutícula acelular corada por eosina, com suas divisões evidentes: a epicutícula (externa), e a procutícula (mais espessa e interna). Esta última, subdividida em exocutícula e endocutícula. A camada subcuticular não foi marcada por HE. Na epiderme, células sem limites visíveis foram observadas compondo, em algumas regiões, um epitélio simples cúbico-prismático e em outras, estratificado. O citoplasma foi visto moderadamente basófilo, os núcleos esféricos, centrais, descondensados e com um ou dois nucléolos evidentes; ductos glandulares foram vistos na cutícula (Fig. 1A). Quando submetidos ao DMSO a 5% (G2) o epitélio foi observado com uma camada de células cúbicas-prismáticas e a camada subcuticular com

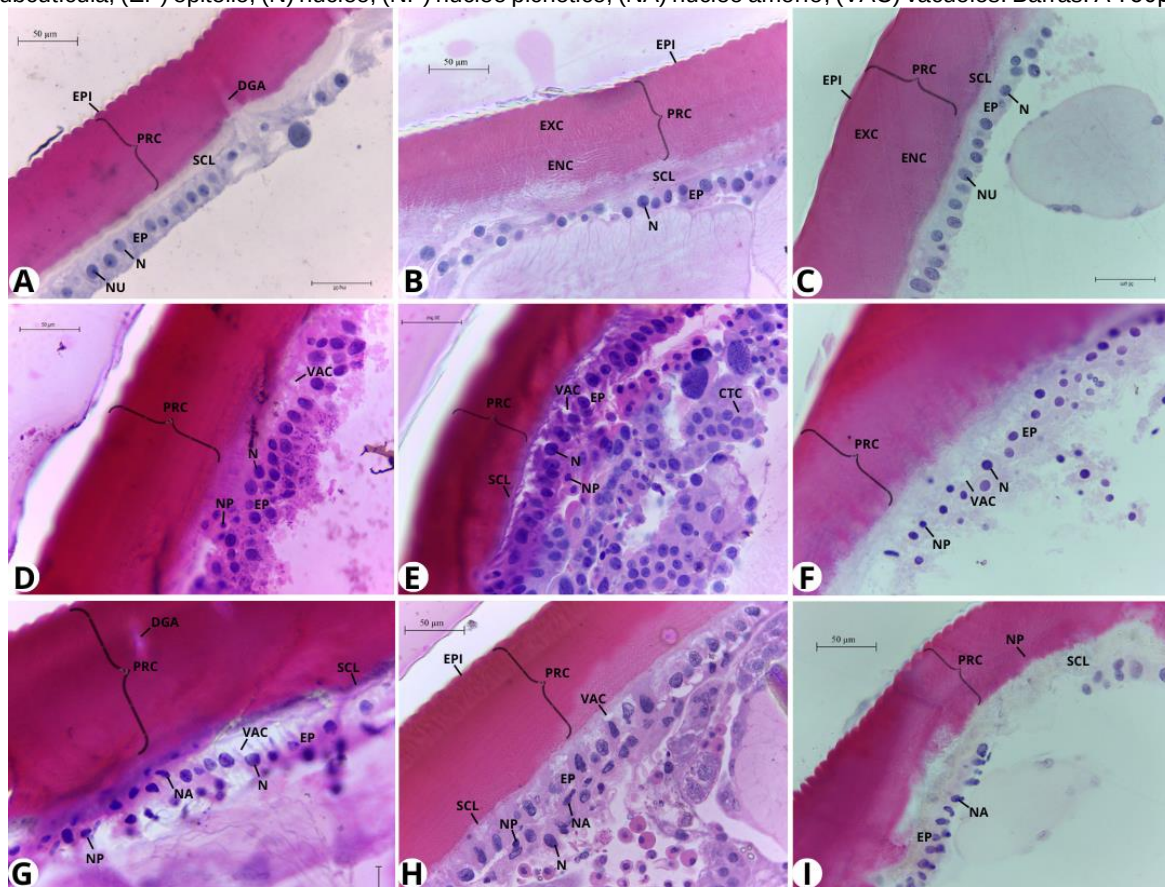
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

espessamento moderado e leve basofilia (Fig. 1B). Nos indivíduos tratados com complexo de inclusão (G3), observou-se leve basofilia na camada subcuticular, epitélio variando de simples cúbico a prismático, com núcleos descondensados, esféricos ou ovais (Fig. 1C).

Nos indivíduos tratados com carvacrol a 0,25% (G4) a cutícula foi vista fortemente eosinófila e sem as divisões; a subcutícula foi pouco evidente. A epiderme apresentou-se ora estratificada cúbica e ora simples colunar; citoplasma intensamente corado por eosina, granular e com alguns vacúolos; e núcleos de formatos e tamanhos variados, com cromatina condensada e alguns em picnose; os nucléolos foram raramente visualizados. No grupo submetido ao carvacrol a 0,5% (G5) houve aumento significativo de vacúolos e intensa acidofilia citoplasmática nas células epidérmicas, além de núcleos de tamanhos variados e alguns picnóticos e muitas células conjuntivas. Aqueles tratados com carvacrol a 1% (G6) teve a maior parte das células epiteliais degeneradas, com núcleos picnóticos e diversos vacúolos no citoplasma.

No tegumento dos indivíduos expostos ao carvacrol complexado a 0,25% (G7) a cutícula foi observada mais acidófila que os demais tratamentos, dificultando a visualização das camadas e a subcutícula basófila. Na epiderme, células em várias fases de degeneração e formatos irregulares, com citoplasma acidófilo dotados de grandes vacúolos apicais; núcleos amorfos e, em maioria, em picnose. No tratamento com carvacrol + CI a 0,5% (G8) a camada subcuticular foi vista diminuída em alguns indivíduos. O epitélio foi visto com células vacuolizadas, ou ainda, com rompimento da membrana plasmática e cromatina nuclear em grumos. O grupo exposto ao carvacrol + CI a 1% (G9), apresentou alterações na subcutícula e o epitélio teve trechos rompidos, com células de citoplasma fracamente acidófilo e muito vacuolizado, além de núcleos irregulares e menores.

Figura 1 - Tegumento de fêmeas do *R. (B.) microplus* submetido a diferentes tratamentos: (A) Controle água, (B) Controle DMSO a 5%, (C) Controle complexo de inclusão (CI), (D) Carvacrol a 0,25%, (E) Carvacrol a 0,5%, (F) Carvacrol 1%, (G) Carvacrol + CI a 0,25%, (H) Carvacrol + CI a 0,5% e (I) Carvacrol + CI a 1%. Legendas: (EPI) epicutícula, (PRC) procutícula, (EXC) exocutícula, (ENC) endocutícula, (DGA) ducto glândular aberto, (SCL) subcutícula, (EP) epitélio, (N) núcleo, (NP) núcleo picnótico, (NA) núcleo amorfo, (VAC) vacúolos. Barras: A-I 50µm.



Fonte: O autor.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

O tegumento tem grande importância para a sobrevivência dos carrapatos devido suas funções de proteção, sustentação e regulação do balanço hídrico, sendo formado por camadas que foram evidentes e preservadas nos indivíduos dos grupos controles. A cutícula acelular foi vista dividida em epicutícula externa, formada por lipídeos, polifenol e cuticulina (Hackman e Filshie, 1982), e abaixo dela a procutícula que se subdivide em exocutícula e endocutícula. Segundo Lima-de-Souza *et al.* (2017), essa camada representa a primeira barreira que os produtos tóxicos enfrentam para adentrar no corpo do parasito.

A camada subcuticular nas fêmeas dos grupos controle apresentou-se moderadamente espessa enquanto a epidérmica, apenas no grupo submetido ao DMSO 5% (G2), algumas células desorganizadas como também observado por Chagas *et al.* (2003) em fêmeas tratadas com DMSO a 25%. Ainda na epiderme observou-se um epitélio simples cúbico-prismático semelhante ao encontrado por Lima-de-Souza *et al.* (2019) em fêmeas de *R. sanguineus*, e em pequenas regiões estratificado. Esta camada, de acordo com Hackman (1982) é a responsável por secretar a cutícula.

O carvacrol livre (G4, G5 e G6), mesmo nas concentrações mais baixas, causou alterações na cutícula, possivelmente devido à intensa deposição de quitina-proteína na tentativa de proteção diante da exposição ao composto. A camada subcuticular diminuiu severamente de espessura conforme as doses foram aumentando e tornou-se mais basófila. Coons e Alberti (1999) presumem que ela possui precursores não polimerizados do complexo quitina-proteína, logo, este achado sugere que teriam sido utilizadas pela epiderme para a síntese da cutícula.

Os danos mais severos observados no tegumento das fêmeas expostas a diferentes concentrações de carvacrol complexado (G7, G8 e G9) em relação ao carvacrol livre, indicam uma potencialização do seu efeito acaricida. As cutículas mais espessas e acidófilas sugerem uma maior quantidade de quitina-proteínas sintetizadas pelo epitélio como forma protetiva. Também foi observado um aumento no tamanho das células glandulares comparadas àquelas dos grupos controle e muitos canais glandulares abertos. Oliveira *et al.* (2020) explicaram que a alta atividade de secreção de lipídios por essas glândulas, está relacionado com a tentativa de fortalecer a barreira impermeabilizante da cutícula e dificultar a entrada do composto nas camadas mais profundas do tegumento.

Já na camada da epiderme das fêmeas expostas ao carvacrol complexado foram encontradas muitas alterações, sendo ora pseudoestratificada, ora estratificada e muito desorganizada, com células amorfas e em diferentes fases de degeneração, com características sinalizadoras de morte celular como citado por Roma *et al.* (2013) e também evidenciado no trabalho de Lima-de-Souza *et al.* (2019), com fêmeas de *R. sanguineus* expostas ao carvacrol. A vacuolização citoplasmática, núcleos com morfologia variada ou em picnose e outras alterações mostraram ser dose-dependente, corroborando com Lima-de-Souza *et al.* (2017) que analisou os efeitos do óleo de neem enriquecido com azadiractina no tegumento de *R. sanguineus*.

As principais alterações morfológicas evidenciadas principalmente nas camadas mais profundas do tegumento sugerem que o carvacrol livre e complexado conseguiram atravessar a camada lipídica da epicutícula e as camadas mais polares da cutícula, e assim, provocar danos na epiderme.

Conclusão

Neste estudo foram verificados efeitos citotóxicos do carvacrol livre e complexado com hidroxipropil- β -ciclodextrina no tegumento de fêmeas do *R. microplus*, indicando como potencial estratégia para o controle de carrapatos e como um futuro substituto para acaricidas químico, ainda que careça de mais pesquisas na área. Os danos mais severos ao tegumento de fêmeas expostas a diferentes concentrações de carvacrol em complexo de inclusão em relação ao carvacrol livre, indica que a característica volátil do carvacrol foi melhor controlada e seu efeito carrapaticida potencializado. Além disso, as alterações vistas no tegumento quando em diferentes concentrações do carvacrol, sugerem uma ação dose-depende do carvacrol, necessitando mais estudos para elucidar seu mecanismo de ação.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Referências

- ADENUBI, O. T. *et al.* Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 178-193, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.010>. Acesso em: 21 de maio de 2023.
- AGNOLIN, C. A. *et al.* Eficácia acaricida do óleo de citronela contra o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev. Bras. de Saúde e Prod. Anim.**, Salvador, v. 15, n. 3, p. 604-612, 2014. Disponível em: <http://www.rbspa.ufba.br>. Acesso em: 21 de maio de 2023.
- ASSUNCAO, G. R. **Desenvolvimento e avaliação in vitro de complexo de inclusão carvacrol: hidroxipropil-ciclodextrina sobre *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2021. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2021.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>. Acesso em: 21 de maio de 2023.
- CHAGAS, A. C. *et al.* Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, v. 33, p. 109-114, 2003.
- COONS, L. B.; ALBERTI, G. Acari: Ticks. In: HARRISON, F. W., FOELIX, R. **Microscopic anatomy of invertebrates**. USA: Wiley-Liss, 1999. v. 8b, n. 5, p. 267-514.
- CRUZ, E. M. *et al.* Acaricidal activity of Lippia gracilis essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1-2, p. 198-202, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.046>. Acesso em: 25 de maio de 2023.
- GOMES, A.; KOLLER, W. W.; BARROS, A. T. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1447–1452, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000105>. Acesso em: 11 de maio de 2023.
- HACKMAN, R. H. Structure and function in tick cuticle. **Annual Reviews Entomology**, p.75-95, 1982.
- HACKMAN, R. H., FILSHIE, B. K., 1982. The tick cuticle. In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Eds.), **Physiology of Ticks**. Pergamon Press, Oxford, p. 1–42.
- LIMA-DE-SOUZA, J. R. *et al.* 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.
- LIMA-DE-SOUZA, J. R. **Avaliação dos efeitos subletais do carvacrol na morfologia do integumento e do ovário de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (SL) (LATREILLE, 1806)(Acari: Ixodidae)**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2019.
- MUNIZ, N. C. **Efeito do carvacrol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) em condições seminaturais e citogenotoxicidade sobre *Brachiaria ruziziensis* R. Germain & Evrard (Poacea)**. 2018. 44 p. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Biológicas) - Universidade federal de Juiz de fora (UFJF), Juiz de fora, 2018.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

OLIVEIRA, M. V. *et al.* Sublethal concentrations of acetylcarvacrol affect reproduction and integument morphology in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae).

Experimental and Applied Acarology, v. 82, p. 265-279, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00538-7>. Acesso em: 18 de julho de 2023.

RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I. *et al.* *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 113-122, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014044>. Acesso em: 11 de maio de 2023.

ROMA, G. C. *et al.* Research in veterinary Science action of andiroba oil and permethrin on the central nervous and reproductive systems of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks females. A confocal study. **Research on Veterinary Sciences**, v. 95, n. 2, p. 529–536, 2013.

SOARES, A. M. *et al.* Assessment of different *Lippia sidoides* genotypes regarding their acaricidal activity against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 25, n. 4, p. 401-406, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016087>. Acesso em: 21 de maio de 2023.

TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasitocides. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 3, p. 253-268, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/tvj.2000.0549>. Acesso em: 11 de maio de 2023.

Agradecimentos

A UFES pelo suporte, estrutura e pelo apoio financeiro, permitindo a execução desse trabalho. Ao Prof. Fábio Barbour Scott (UFRRJ), a sua equipe e ao Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, pela disponibilidade dos carrapatos da colônia de *Rhipicephalus microplus*.