

EFEITOS DO CARVACROL ISOLADO E ENCAPSULADO NO TECIDO OVARIANO DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Camila de Paula Rodrigues¹, 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/n°, Guararema- 29500-000 - Alegre-ES, Brasil. camila.p.rodrigues@edu.ufes.br, 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 carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasito que traz grandes prejuízos à pecuária bovina e comumente é controlado com acaricidas químicos, prejudiciais ao ambiente e ao hospedeiro. Na busca por métodos alternativos, o carvacrol se destaca por sua ação carrapaticida, embora sua alta volatilidade dificulte seu uso em campo. Buscando formulações que contorne essa questão, este projeto comparou, sob microscopia de luz, a atividade de diferentes concentrações do carvacrol isolado e quando em complexo de inclusão com hidroxipropil- β -ciclodextrina no tecido ovariano de *R. (B.) microplus*. O carvacrol isolado foi capaz de provocar mais alterações celulares que quando encapsulado, principalmente na menor concentração testada (0,5%), sugerindo que ao mesmo tempo que encapsulamento possa ter protegido o composto da volatilidade, dificultou sua ação sobre os ovócitos, causando menores danos no tempo utilizado neste estudo. Assim, mais testes considerando o tempo de ação se fazem necessários para melhor caracterizar os efeitos teciduais da molécula encapsulada sobre o desenvolvimento ovocitário dessa espécie.

Palavras-chave: Carrapaticida. Carrapato-do-boi. Histologia. Ovário. Complexo de inclusão.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Morfologia

Introdução

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1888), popularmente conhecido como carrapato-do-boi, está entre os animais de grande importância médico-veterinária e econômica, sendo, de acordo com Andreotti; Garcia; Koller (2019), seu controle necessário por conta dos prejuízos causados à produção de leite, pelos danos ao couro do animal e pela transmissão de doenças. Seu combate costuma ser feito com uso de acaricidas químicos sintéticos que, além de deixar resíduos no ambiente, fazem com que a espécie desenvolva resistência quando usado excessivamente (Gomes; Koller; Barros, 2011). Por esse motivo, vê-se a necessidade de outros meios de controle que não causem impactos negativos no ambiente e no hospedeiro e que sejam eficientes contra esses artrópodes.

O carvacrol é um terpeno derivado de plantas das famílias Lamiaceae e Verbenaceae que tem mostrado resultados positivos como carrapaticida em espécies de *Rhipicephalus* (Pereira-Junior *et al.*, 2020; Pereira; Silva; Marques, 2022; Souza, 2019a), mas por ser instável e volátil, sua aplicação e uso eficiente são dificultados. Pensando em uma forma da molécula estar protegida da degradação pelo calor, evaporação e oxidação, Assunção, em 2021, buscou analisar a aplicabilidade do complexo de inclusão carvacrol/hidroxipropil- β -ciclodextrina (CAR:HP- β CD) no controle de larvas de *R. (B.) microplus*, e observou que a complexagem desta formulação teve um efeito larvicida mais efetivo, garantindo maior tempo de ação do carvacrol.

Sendo assim, o presente estudo objetivou verificar, sob análise histológica, os efeitos do carvacrol isolado e quando em complexo de inclusão na estrutura ovariana de fêmeas semi-ingurgitadas do carrapato-do-boi, buscando identificar formulações capazes de provocar alterações teciduais a ponto de comprometer a reprodução dos carrapatos e sejam passíveis de serem aplicadas em campo, como método alternativo, eficiente e ambientalmente favorável para o controle destes artrópodes.

Metodologia

Cerca de 35 fêmeas partenógenas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram coletadas de bovinos infestados artificialmente na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil (Protocolo de aprovação na Comissão de Ética no uso de animais: nº 4667181218/2019).

Os carrapatos foram lavados em água corrente, secos em papel absorvente, pesados individualmente e separados, em placas de Petri, em 7 grupos de 5 fêmeas cada. Os grupos tratamentos foram: (G1) controle água, (G2) controle DMSO 5%, (G3) controle complexo de inclusão (CI), (G4) Carvacrol 0,5%, (G5) Carvacrol 1%, (G6) Carvacrol 0,5% + CI, (G7) Carvacrol 1%+ CI. As soluções-teste foram preparadas no laboratório de Química e Bromatologia (CCENS/UFES) e gentilmente cedidas pelo Prof. Vagner Tebaldi de Queiroz do Departamento de Física e Química. O carvacrol (CAR; PubChem SID 24857025, Sigma-Aldrich), Dimetilsulfoxido (DMSO PA 99,9%, Cromoline Química Fina LTDA); e o etanol (95% PA – Dinâmica) utilizados são de origem comercial.

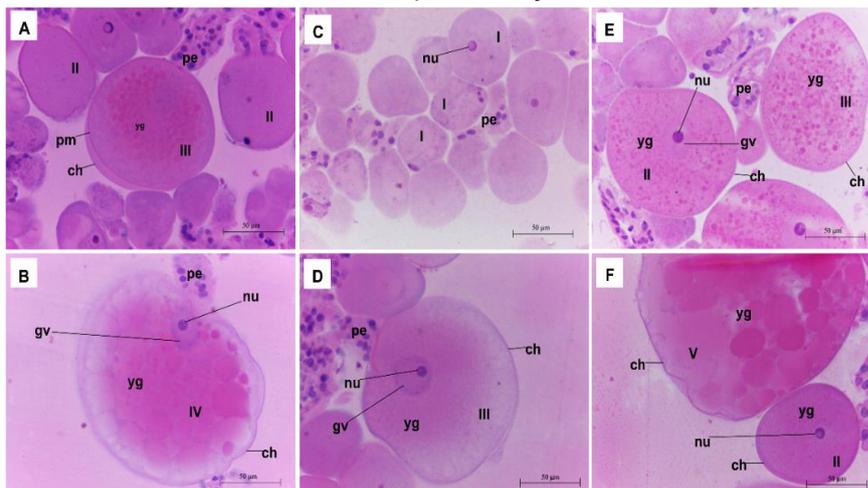
Após 5 minutos de imersão nos tratamentos, as fêmeas foram dissecadas em placas de Petri contendo solução fisiológica tamponada com fosfato-PBS (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L). Os ovários foram retirados com o auxílio de estereomicroscópio, pinças e micro-tesouras, e fixados em solução de paraformaldeído a 4%, por 24h. Em seguida, passaram por desidratação em série crescente de álcool etílico (70%, 80% e 90%), foram submetidos a resina de embebição e incluídos em moldes contendo resina e catalisador. Os blocos foram seccionados em cortes de 6µm, que posteriormente foram corados por Hematoxilina de Harris e Eosina Aquosa (HE), durante 10 e 5 minutos, respectivamente.

Após a secagem, todas as lâminas foram diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá, para análise sob microscopia de luz Leica DM750. As imagens foram capturadas com o uso do programa LEICA LAS EZ 3.0.0: Leica Microsystems com calibração adequada.

Resultados

Os indivíduos dos grupos controle água destilada (G1), DMSO 5% (G2) e complexo de inclusão (G3) não apresentaram diferenças entre si (Figura 1). As células do pedicelo e o formato dos ovócitos não sofreram alterações. No citoplasma foram observados grânulos bem definidos, sendo identificados os estágios de desenvolvimento dos ovócitos descritos por Saito *et al.*, (2005). A vesícula germinal de todos os ovócitos foi preservada, muitas com nucléolo em formato de anel. Naqueles em estágio II, o cório já aparece depositado. Pequena retração citoplasmática foi observada, em alguns ovócitos em estágios II, III e IV.

Figura 1 - Secções do ovário de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* dos grupos controle. (A-B) Água destilada; (C-D) DMSO 5%; (E-F) Complexo de inclusão. I: ovócito I; II: ovócito II; III: ovócito III; IV: ovócito IV; V: ovócito V; ch: cório; gv: vesícula germinal; nu: nucléolo; pe: pedicelo; pm: membrana plasmática; yg: grânulos de vitelo. Barras: 50 µm. Coloração: HE.



Fonte: A própria autora (2024).

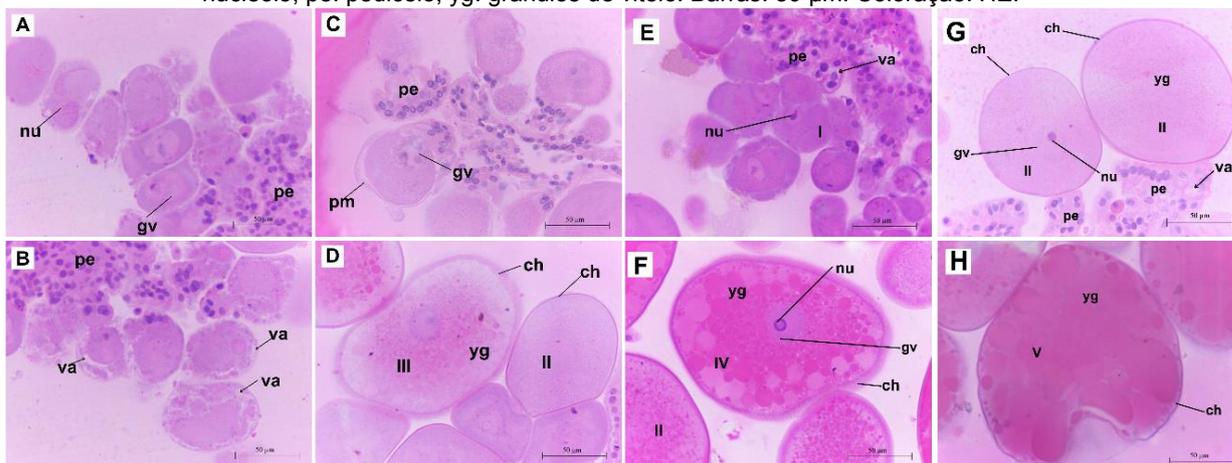
Nos ovócitos tratados com carvacrol 0,5% (G4) (Figura 2: A-B), foram vistas irregularidades na membrana plasmática e citoplasma desorganizado, dificultando a identificação do estágio de desenvolvimento. Manchas acidófilas e extensa vacuolização citoplasmática também foram observadas, além de vesícula germinal dilatada com nucléolo fragmentado ou ausente. As células do pedicelo apresentaram núcleos maiores, mais densos e um citoplasma mais acidófilo.

Nos ovócitos expostos ao carvacrol 1% (G5) (Figura 2: C-D) a maioria dos ovócitos em estágios I e II apresentou retração da membrana plasmática, fina granulação basofílica no citoplasma, dilatação da vesícula germinal, cromatina desarranjada e nucléolo ausente. Em alguns ovócitos tipo II, o cório era fino e fracamente basofílico, e em ovócitos tipo III e IV o cório era espesso. Ovócitos tipo V demonstraram regiões de retração na membrana. Nas células do pedicelo foram notados núcleos dilatados e vacuolizações no citoplasma acidófilo.

Os ovócitos I do grupo submetido ao carvacrol 0,5% + CI (G6) (Figura 2: E-F) apresentaram membrana irregular, citoplasma acidófilo e nucléolo ausente, fragmentado ou em anel. Ovócitos do tipo II não tiveram alterações, entretanto, alguns apresentaram cório mais espesso. Nos ovócitos III e IV, embora o citoplasma estivesse preservado, retração citoplasmática, espessamento do cório, e nucléolos em anel foram vistos. Alguns ovócitos tipo V, apresentaram retrações no limite celular e cório mais delgado em comparação aos demais estágios do mesmo tratamento. As células do pedicelo exibiram núcleos dilatados e vacuolização citoplasmática intensa.

Nos ovócitos de fêmeas tratadas com carvacrol 1% + CI (G7) (Figura 2: G-H), a maioria das características celulares foram preservadas, sendo o cório basofílico já depositado desde o estágio II. Ovócitos tipo I apresentaram nucléolo em anel. Ovócitos tipos II, III e IV foram preservados. Em ovócitos tipo V, observaram-se invaginações citoplasmáticas, além de vesícula germinal e nucléolo não visíveis. Algumas células do pedicelo apresentaram núcleo basofílico dilatado, vacuolização e acidofilia citoplasmática.

Figura 2. Secções do ovário de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* dos grupos submetidos ao carvacrol isolado e encapsulado. (A-B) carvacrol 0,5%; (C-D) carvacrol 1%; (E-F) carvacrol 0,5% + CI; (G-H) carvacrol 1% + CI. I: ovócito I; II: ovócito II; III: ovócito III; IV: ovócito IV; V: ovócito V; ch: cório; gv: vesícula germinal; nu: nucléolo; pe: pedicelo; yg: grânulos de vitelo. Barras: 50 µm. Coloração: HE.



Fonte: A própria autora (2024).

Discussão

Na literatura, diversos estudos têm indicado o carvacrol como eficiente carrapaticida contra as diferentes espécies de carrapatos (Tabari *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2019b; Pereira-Junior *et al.*, 2020) e as análises morfológicas do presente estudo confirmaram que esse composto majoritário encontrado em várias plantas, tanto em sua forma livre quanto encapsulada, foi capaz de penetrar no corpo das fêmeas de *R. (B.) microplus*. No tecido ovariano detectou-se alterações principalmente nos ovócitos menos desenvolvidos (estágios I e II), assim como observado por König *et al.*, (2019) em fêmeas ingurgitadas da mesma espécie submetidas a concentrações subletais de acetilcarvacrol.

No tratamento com carvacrol a 0,5%, alterações mais significativas foram vistas nos ovócitos, como retrações na membrana, citoplasma desorganizado e regiões vacuolizadas. Segundo Denardi *et al.*, (2012), a presença de vacúolos citoplasmáticos pode indicar uma tentativa de isolamento e degradação das áreas do citoplasma que foram danificadas, como forma de preservar a viabilidade do ovócito e, as irregularidades observadas na membrana plasmática seriam consequências do estresse causado às células. Nos demais grupos de tratamento (G5, G6 e G7) também foram observados ovócitos com irregularidades na membrana plasmática, indicando que mesmo em outras concentrações ou na forma encapsulada, o carvacrol afeta a membrana celular.

O presente estudo também verificou que o carvacrol livre, mesmo na menor concentração testada, foi capaz de inibir o desenvolvimento das células germinativas, já que não foram encontrados ovócitos em estágios avançados de desenvolvimento. Remedio *et al.*, (2014) também relataram inibição do desenvolvimento ovocitário em fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* ao expô-las ao óleo de semente de nim, assim como Souza *et al.*, (2019b) que verificaram que o carvacrol a 100 µL/mL inibiu o desenvolvimento dos ovócitos aos estágios III, IV e V, nesta mesma espécie.

Em todos os grupos tratados com carvacrol isolado, independente da concentração, alterações na vesícula germinal, como dilatação, desarranjo da cromatina e nucléolo fragmentado, ausente ou em anel foram observadas, indicando processos degenerativos que podem levar à morte celular. Arnosti *et al.*, (2011) também relataram a presença de nucléolos sob esta mesma configuração ao evidenciar os efeitos tóxicos dos ésteres de ácido ricinoléico de *Ricinus communis* sobre as células germinativas de *R. sanguineus*. Os grupos controle (G1, G2 e G3) e os grupos tratados com a associação carvacrol/composto de inclusão em ambas as concentrações (G6 e G7) também apresentaram nucléolo em formato de anel. O cório, estrutura que confere proteção ao ovócito e oxigenação ao embrião (Oliveira *et al.*, 2008; Sampieri *et al.*, 2012), neste estudo, foi observado em ovócitos a partir do estágio II de desenvolvimento nos grupos controle e nos grupos tratados, contrariando Saito *et al.*, (2005) que afirmam que a deposição do cório em *R. (B.) microplus* se inicia em ovócitos no estágio III. Na maioria dos grupos tratados e nos grupos controle, o cório apresentou aspecto fino, mas no tratamento com carvacrol 0,5% + CI, ovócitos II, III e IV exibiram cório mais espesso. König *et al.*, (2019) relataram que a deposição precoce e o espessamento do cório seriam meios de proteção do ovócito contra o composto, mas que também poderiam prejudicar as trocas gasosas necessárias ao embrião, comprometendo sua sobrevivência. Entretanto, em seus estudos com *R. sanguineus*, Souza *et al.*, (2019) observaram que ao submeter as fêmeas a 100 µL/mL de carvacrol, o cório se mostrou fino e até mesmo rompido, indicando que este terpeno também poderia prejudicar a deposição desta camada nos estágios mais desenvolvidos.

As células do pedicelo de todos os grupos tratados com carvacrol (G4, G5, G6 e G7) apresentaram núcleo dilatado e vacuolização no citoplasma acidófilo, alterações que indicam a ocorrência de necrose celular (Junqueira; Carneiro, 2023) e que prejudicam a síntese de substâncias necessárias para nutrir os ovócitos. Campos (2018) também relatou essas alterações nas células do pedicelo de fêmeas de *R. (B.) microplus* expostas à associação 1,8-cineol 10% + óleo de mamona 0,3%, e sugeriu que este composto afetou o desenvolvimento ovocitário das fêmeas testadas.

Nos grupos tratados com carvacrol em associação com complexo de inclusão (G6 e G7), os efeitos observados nos ovócitos foram menos intensos quando comparados aos tratamentos com o carvacrol isolado (G4 e G5). Segundo Lima *et al.*, (2019), as técnicas de encapsulamento podem aumentar a liberação controlada de um composto, diminuir a sua volatilidade e reduzir seus efeitos adversos; no entanto, pode apresentar duas desvantagens: uma possível redução na liberação do composto e uma taxa de difusão modificada, o que pode justificar a ação menos danosa do carvacrol encapsulado observada no presente estudo.

Entretanto, Amorim *et al.*, (2023), apontaram a ocorrência de danos mais severos no tegumento das fêmeas da mesma espécie, quando essas foram expostas a diferentes concentrações do carvacrol complexado, comparativamente ao carvacrol livre, inferindo ter havido potencialização da ação do composto ativo, diante da diminuição da sua volatilidade. Assim, vê-se que a ação da molécula varia com o tecido alvo, tendo o carvacrol, um bioativo lipossolúvel, penetrado mais rapidamente pelo tegumento e atingido diretamente os ovócitos. Sua versão de molécula encapsulada, que apontou prolongar o tempo de ação do carvacrol em testes com larvas de *R. (B.) microplus* (Assunção, 2021), poderia ser capaz de causar maiores danos, caso o tempo entre exposição das fêmeas e dissecação dos ovários fosse aumentado.

Conclusão

Este estudo demonstrou que o carvacrol é capaz de afetar o sucesso reprodutivo de *R. (B.) microplus*, uma vez que provocou efeitos como: alterações na morfologia ovariana, vacuolização citoplasmática, inibição do desenvolvimento dos ovócitos e interferências na deposição de cório e vitelo, mesmo em baixas concentrações, não sendo dose-dependente. Quando encapsulado, foi capaz de gerar alterações, entretanto, em menor intensidade, sugerindo a necessidade de futuros estudos para melhor entender o comportamento da molécula encapsulada nos tecidos do animal e elucidar seus efeitos sobre a ação do carvacrol, considerando variação no tempo de exposição ao tratamento antes da dissecação.

Referências

- AMORIM, L. V. *et al.* Análise histológica do tegumento de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao carvacrol livre e encapsulado. In: XXVII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XXIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e XIII Encontro de Iniciação à Docência, 2023. **Anais**. Universidade do Vale do Paraíba, 2023. Disponível em: https://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2023/anais/arquivos/0949_0747_02.pdf. Acesso em: 15 jun 2024.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. (Ed.). **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 240 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1107092/carrapatos-na-cadeia-produtiva-de-bovinos>. Acesso em: 15 jun. 2024.
- ARNOSTI, A. *et al.* Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 127, p. 575-580, 2011.
- ASSUNÇÃO, G. R. **Desenvolvimento e avaliação in vitro de complexo de inclusão carvacrol: hidroxipropil-ciclodextrina sobre Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae)**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2021.
- DENARDI, S. E. *et al.* Ultrastructural analysis of the oocytes of female *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks subjected to the action of *Azadirachta indica* A. Juss (neem). **Ultrastructural Pathology**, [s.l.], v. 36, p. 56-67, 2012.
- 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: 15 jun. 2024.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**, Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2023. E-book. 387 p. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527739344/>. Acesso em: 15 ago. 2024.
- KONIG, I.F.M. *et al.* Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: ixodidae). **Ticks And Tick-Borne Diseases**, [s.l.], v. 10, p. 766-774, 2019.
- LIMA, A.S. *et al.* Repellent effects of encapsulated carvacrol on the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 56.3, 881-885p, 2019.
- OLIVEIRA, P. R. *et al.* Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. **Food Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2459-2465, 2008.

PEREIRA-JUNIOR, A. M. *et al.* Efficacy of carvacrol on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* engorged female ticks (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): effects on mortality and reproduction. **Natural Product Research**, 34(23), 3428-3431, 2020.

PEREIRA, J. R.; SILVA, S. M. P.; MARQUES, M. O. M. Efficacy of essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae) for controlling the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* on naturally parasitized animals under field conditions. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 311, p. 109788, 2022.

REMEDIO, R. N. *et al.* 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**, [s.l.], v. 114, p. 431-444, 2014.

SAITO, K.C. *et al.* Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. [s.l.], v. 129, p. 299-311, 2005.

SAMPIERI, B.R. *et al.* Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*). **Microscopy Research and Technique**, [s.l.], v. 75, p. 683–690, 2011.

SOUZA, J. R. L. **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)**. 2019a. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2019a.

SOUZA, J. R. L. *et al.* Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Mícron**, [s.l.], v. 116, p. 66-72, 2019b.

TABARI, M. A. *et al.* Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 245, p. 86-91, 2017.

Agradecimentos

À UFES pela estrutura para a execução deste projeto; ao Prof. Fábio Barbour Scott (UFRRJ) e sua equipe do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, pela disponibilidade dos carrapatos da colônia; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) pelo apoio financeiro.