

EFEITOS DO CARVACROL LIVRE E ENCAPSULADO NA HISTOLOGIA TEGUMENTAR DE TELEÓGINAS DE *Rhipicephalus 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/nº, Guararema – 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, camiladpr20@gmail.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

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é um ectoparasito responsável por prejuízos à cadeia produtiva de bovinos e seu controle por acaricidas químicos, causa danos ao hospedeiro e são ecologicamente inviáveis. Assim, o carvacrol vem ganhando destaque como carrapaticida, entretanto, a alta volatilidade dificulta seu uso. Na busca por uma formulação que preserve a molécula e prolongue seu tempo de ação, este estudo analisou, sob microscopia de luz, os efeitos de diferentes concentrações de carvacrol livre e em complexo de inclusão com hidroxipropil-β-ciclodextrina no tegumento de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. De maneira geral, as camadas cuticulares não sofreram alterações, tendo o carvacrol, tanto em sua forma livre como encapsulada, atingido a epiderme, levando ao desprendimento epitelial quando a 0,5%, além de alterações celulares e nucleares, essas especialmente nos grupos com o carvacrol complexado; não ficou evidente diferença dose-dependente. Assim, sugere-se que o encapsulamento possa melhor contribuir para otimizar a atividade carrapaticida.

Palavras-chave: Teleóginas; Carrapaticida; Carrapato-do-boi; Morfologia; Cutícula.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Morfologia

Introdução

O “carrapato-do-boi” *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) é um ectoparasito hematófago de grande importância médico-veterinária, sendo necessário seu controle em função de ser responsável por inúmeros prejuízos como a desvalorização dos subprodutos da pecuária bovina e até mesmo o óbito do animal, além de ser vetor de patógenos causadores da Tristeza Parasitária Bovina (*Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*) (Grisi *et al.*, 2014; Reck *et al.*, 2014; Martins, 2019).

Seu tegumento é o primeiro local de contato com acaricidas de uso tópico e é responsável por sua proteção e regulação do equilíbrio hídrico, funções vitais para sua sobrevivência (Oliveira *et al.*, 2011). O uso indiscriminado de acaricidas químicos sintéticos para o controle das infestações causa danos ao meio ambiente, toxicidade ao hospedeiro e criação de cepas resistentes, sendo necessário métodos alternativos para seu combate que minimizem tais danos (Andreotti; Garcia; Koller, 2019).

O terpeno carvacrol, encontrado em plantas das famílias Lamiaceae e Verbenaceae, tem se mostrado potencial carrapaticida em espécies de *Rhipicephalus* (Pereira-Junior *et al.*, 2020; Pereira; Silva; Marques, 2022; Souza, 2019), entretanto, sua alta volatilidade e baixa estabilidade comprometem sua eficiência. Assim, como uma maneira de proteger essa molécula, Assunção (2021) testou o encapsulamento do carvacrol em hidroxipropil-β-ciclodextrina (CAR:HP-βCD) e verificou que esse complexo prolonga o tempo de ação e melhora o efeito larvicida do carvacrol.

Buscando identificar formulações mais naturais que sejam efetivas no controle deste parasito e viáveis para seu uso em campo, o presente estudo visou comparar por meio de análise histológica os

efeitos do carvacrol isolado e em complexo de inclusão CAR:HP- β CD no tecido tegumentar de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*.

Metodologia

45 fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram coletadas de bovinos infestados artificialmente na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, Brasil (Protocolo de aprovação na Comissão de Ética no uso de animais: nº 2787140723/2023). Depois de lavadas em água, secas, e pesadas individualmente, foram formados 9 grupos experimentais com 5 fêmeas cada: (G1) controle água, (G2) controle DMSO 5%, (G3) controle complexo de inclusão (CI), (G4) Carvacrol 0,25%, (G5) Carvacrol 0,5%, (G6) Carvacrol 1%, (G7) Carvacrol 0,25% + CI, (G8) Carvacrol 0,5% + CI e (G9) 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), Dimetilsulfóxido (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, foi realizada a dissecação das fêmeas 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) e fragmentos do tegumento de cada indivíduo fixado em solução de paraformaldeído a 4%, por 24h. Após a desidratação em série de álcool etílico (70%, 80% e 90%), os fragmentos foram submetidos a resina de embebição e incluídos em moldes com resina e catalisador. Cortes de 5µm foram submetidos ao protocolo de coloração por Hematoxilina de Harris e Eosina Aquosa (HE), por 10 e 5 minutos, respectivamente. Após montagem das lâminas com bálsamo do Canadá foi feita a análise e captura de imagem sob microscópio de luz Leica DM750.

Resultados

Nos indivíduos do grupo controle água destilada (G1) (Fig. 1A), a epicutícula é eosinófila e as camadas da procutícula (exo- e endocutícula) são diferenciadas. A subcutícula é fina e basófila. A epiderme é formada por uma única camada de células cúbicas, entretanto, em um dos indivíduos vê-se regiões de epitélio pseudoestratificado. O citoplasma é acidófilo e vacuolizado, com núcleos esféricos/ovalados, cromatina descondensada e nucléolo evidente.

O grupo G2 (Fig. 1B) exibiu as mesmas características, entretanto, o epitélio simples variou entre cúbico e pavimentoso.

No grupo G3 (Fig. 1C), a procutícula é vista como uma única camada, e a subcutícula é mais espessa e não foi corada. O epitélio apresenta regiões pseudoestratificadas, citoplasma vacuolizado, cromatina nuclear densa, e nucléolos não visíveis.

Nos indivíduos do grupo tratado com carvacrol 0,25% (G4) (Fig. 1D), a epicutícula é fina e acidófila, e em um dos indivíduos, a procutícula é observada como uma só camada. A subcutícula ora estava mais espessa e sem coloração, ora mais delgada e basófila. O epitélio simples tem células cúbicas, e por vezes, de aspecto irregular. O citoplasma é acidófilo, vacuolizado e com presença de grânulos. Os núcleos são ovais ou achatados, variam em tamanho, e por vezes, com dois nucléolos.

O grupo tratado com carvacrol 0,5% (G5) (Fig. 1E) apresentou epicutícula acidófila e camadas da procutícula pouco diferenciadas. A subcutícula basófila é espessa em um dos indivíduos, e o epitélio varia entre pseudoestratificado e estratificado. Em um dos indivíduos há desprendimento do epitélio, o citoplasma é acidófilo, com presença de vacúolos, núcleos ovalados e mais densos e nucléolo evidente.

No grupo exposto ao carvacrol 1% (G6) (Fig. 1F), a epicutícula é pouco visível, a procutícula é bem diferenciada e a subcutícula é fina e basófila. O epitélio varia entre simples cúbico e pseudoestratificado, com intenso acúmulo de grânulos quando comparado aos demais grupos. O citoplasma é acidófilo e vacuolizado, com núcleos ovais e achatados, cromatina densa e nucléolo visível.

O grupo tratado com carvacrol 0,25% + CI (G7) (Fig. 1G) apresentou epicutícula fina e acidófila e procutícula com suas camadas distintas. A subcutícula é fina e basófila e o epitélio varia entre simples cúbico-pavimentoso e estratificado, com citoplasma vacuolizado, núcleos de morfologia e grau de condensação variados e sem nucléolo.

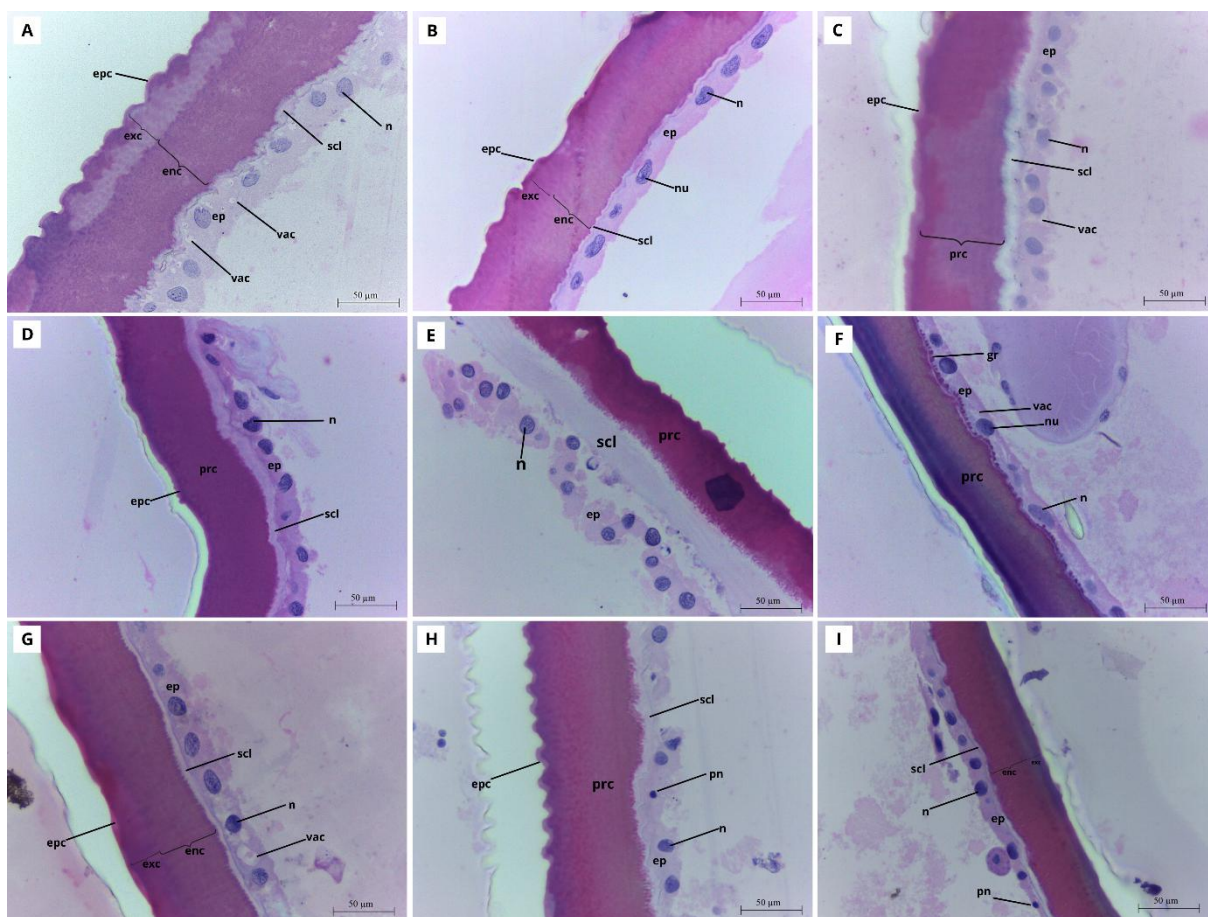
No grupo tratado com carvacrol 0,5% + CI (G8) (Fig. 1H), a epicutícula é fina e acidófila. Em um dos indivíduos a procutícula não possui divisões, a subcutícula espessa é basófila e o epitélio é simples

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

pavimentoso. Nos demais, a endocutícula acidófila distinguiu-se da exocutícula basófila, e houve desprendimento da camada epitelial que variou de simples cúbico à pseudoestratificado. O citoplasma é acidófilo, vacuolizado, com núcleos de tamanhos variados e picnóticos.

O grupo tratado com carvacrol 1% + CI (G9) (Fig. 1I) apresentou epicutícula fina e nem sempre visível. A procutícula acidófila tem suas camadas bem individualizadas. A subcutícula é fina e basófila, e o epitélio varia entre simples cúbico, pseudoestratificado e pavimentoso, com citoplasma acidófilo e vacuolizado. Um dos indivíduos apresentou acúmulo de grânulos na porção celular apical. Núcleos achatados, dilatados ou picnóticos também foram observados.

Figura 1 - Secções histológicas do tegumento de teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A: Água destilada (G1); B: DMSO 5% (G2); C: Complexo de inclusão (G3); D: Carvacrol 0,25% (G4); E: Carvacrol 0,5% (G5); F: Carvacrol 1% (G6); G: Carvacrol 0,25% + CI (G7); H: Carvacrol 0,5% + CI (G8); I: Carvacrol 1% + CI (G9); enc: endocutícula; ep: epitélio; epc: epicutícula; exc: exocutícula; n: núcleo; np: núcleo picnótico; nu: nucléolo; prc: procutícula; scl: subcutícula; vac: vacuolização. Barras: 50 µm. Coloração: HE.



Fonte: A autora (2025).

Discussão

O uso de extratos vegetais vêm ganhando destaque por ser uma alternativa efetiva e biodegradável no controle de carrapatos (Arnosti *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2013; Remedio *et al.*, 2014), e o carvacrol, um monoterpene encontrado em plantas, têm sido amplamente estudado quanto a sua eficácia carrapaticida (Tabari *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2021). O presente estudo mostrou que esse, tanto em sua forma livre, quanto encapsulada com hidroxipropil-β-ciclodextrina, foi capaz de penetrar a cutícula e alterar a morfologia especialmente do epitélio, o que pode comprometer o papel tegumentar na proteção e regulação hídrica do animal.

A cutícula, neste estudo, foi frequentemente observada como uma epicutícula externa fina e acidófila, e uma procutícula interna dividida em exocutícula e endocutícula, assim como descrito por Camargo-Mathias em 2018. A acidofilia pode ser explicada por sua constituição que, segundo Beadle (1974) é formada por uma linha de cuticulina e uma camada de cera granular. Já sua espessura, deve-se ao desdobramento que ocorre durante a alimentação, como também observado, por Remedio, Nunes e Camargo-Mathias (2014), no tegumento de fêmeas de *R. sanguineus* ingurgitadas.

A subcutícula é uma região composta por precursores não polimerizados do complexo quitina-proteína (Coons; Albert, 1999). No grupo controle complexo de inclusão (G3), assim como nos grupos tratados com carvacrol livre (G4 e G5) e com carvacrol encapsulado (G8), foram vistas extensas regiões de subcutícula mais espessa, assim como Abreu *et al.* (2020) também registraram para fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* submetidas à água ozonizada, afirmando ser resultado da interferência tóxica do ozônio que atravessou a cutícula e atuou no epitélio. Entretanto, são necessários estudos acerca dos mecanismos de ação do hidroxipropil- β -ciclodextrina, a fim de melhor compreender o espessamento tegumentar nos indivíduos do grupo G3, expostos a esta molécula.

No presente estudo, o carvacrol pode ter estimulado a síntese de grânulos pelas células epiteliais, (como visto nos grupos G4, G6 e G9) que, quando depositadas na subcutícula, provocariam o espessamento. Esse acúmulo de grânulos também foram relatados por Souza *et al.*, (2021) em fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* a concentrações subletais de carvacrol, sendo essa secreção produzida com maior frequência pelas células epiteliais, para ser incorporada à cutícula, como resposta do organismo à ação tóxica da substância.

Remedio *et al.* (2014) submetendo fêmeas de *R. sanguineus* a extratos aquosos de folha de neem também relataram variações na espessura da subcutícula, associando sua diminuição dependente da concentração do extrato, entretanto, o mesmo não fora aqui observado.

Com relação à camada epitelial, foi observada uma variedade tanto na espessura quanto no formato das células. Beadle (1974) relata em seu estudo com *R. (B.) microplus* e *R. (B.) decoloratus* que carrapatos totalmente ingurgitados, tem uma menor atividade das células epiteliais, já que, nessa fase, a síntese dos componentes cuticulares já foi interrompida. Além disso, descreve um maior achatamento das células por serem forçadas contra a procutícula em função da rápida expansão do intestino na fase final de alimentação. Isso é corroborado neste estudo, onde regiões de epitélio pavimentoso foram encontradas tanto em indivíduos do grupo controle como naqueles de alguns grupos tratados com carvacrol encapsulado.

Camargo-Mathias *et al.* (2024) ao expor carrapatos *R. linnaei* a extratos de *Cannabis sativa* (Linnaeus, 1753) inferiram que a estratificação epitelial seria responsável pela proteção das células secretoras de cutícula por dificultar a entrada de substâncias tóxicas. Neste estudo, indivíduos dos grupos G1, G3, G5, G6, G8 e G9 apresentaram epitélio pseudoestratificado, enquanto outros do G5 e G7 exibiram sinais de estratificação, intensa desorganização epitelial e regiões em que as células epiteliais não foram observadas.

As células epiteliais, especialmente de indivíduos tratados com carvacrol encapsulado (G8 e G9) apresentaram alterações nucleares quanto aos tamanhos, formatos e condensação da cromatina, estando alguns picnóticos, como também visto por Souza (2019) no tegumento de fêmeas de *R. sanguineus* submetidas ao carvacrol. Esses achados confirmam a melhor efetividade do carvacrol complexado já relatada por Assunção (2021) em larvas, mostrando que a cápsula promove uma liberação controlada da molécula, prolongando o seu tempo de ação.

Além disto, vacuolização citoplasmática foi frequentemente observada nos grupos aqui testados, corroborando Beadle (1974) que relata que o citoplasma das células epiteliais do tegumento de adultos de *R. (B.) microplus*, é extremamente vacuolar. Entretanto, os grupos G7 e G8, tratados com carvacrol encapsulado, exibiram vacúolos em maior quantidade em comparação aos demais grupos, acompanhados de intensa desorganização epitelial. Oliveira *et al.* (2020) também relataram a ocorrência de vacúolos citoplasmáticos em fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* tratadas com acetilcarvacrol, e argumentou que a ocorrência desses vacúolos são uma estratégia de sobrevivência da célula, que isola organelas ou partes do citoplasma que estejam danificadas.

Conclusão

Este estudo mostrou que, mesmo nas menores concentrações, tanto na forma livre, e mais evidentemente quando encapsulado, o carvacrol é capaz de interferir na barreira protetora dos carrapatos, uma vez que provocou efeitos como: desorganização e alterações na morfologia da camada epitelial, responsável pela formação da cutícula, interferência na síntese e deposição de quitina o que promoveu o espessamento da camada subcuticular. Assim, ainda que mais experimentos sejam necessários para confirmar as melhores concentrações e formulações, este estudo confirma o carvacrol ser capaz de causar alterações que possam comprometer a sua sobrevivência, se mostrando como uma alternativa natural aos acaricidas químicos.

Referências

- ABREU, M. R. de *et al.* Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: ixodidae) to ozonated water. **Ozone: Science & Engineering**, [S.L.], v. 42, n. 6, p. 507-516, 2020.
- 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 ago. 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.
- BEADLE, D. J. Fine structure of the integument of the ticks, *Boophilus decoloratus* Koch and *B. microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 1974.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I., ed. **Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives** [online]. São Paulo: Editora Unesp, 199 p. 2018.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I. *et al.* *Cannabis sativa* (Linnaeus, 1753): the use of its extract against *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) ticks. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 332, p. 110314, dez. 2024.
- COONS, L. B.; ALBERTI, G. Acari: Ticks. In: HARRISON, F. W., FOELIX, R. **Microscopic anatomy of invertebrates**. USA: Wiley-Liss, v. 8b, n. 5, p. 267-514, 1999.
- CRUZ, E. M. O. *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.
- GRISI, L. *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p.150-156, 2014.
- MARTINS, I. V. **Parasitologia veterinária**, Vitória: EDUFES, 2019. E-book. 320 p. Disponível em: <https://edufes.ufes.br/items/show/527>. Acesso em: 15 ago. 2025.
- OLIVEIRA, M. V. S. *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**, [S.L.], v. 82, n. 2, p. 265-279, 2020.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

OLIVEIRA, P. R. *et al.* Morphological characterization of the nymphs *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Description of the testes, integument, malpighian tubules, and midgut on the detachment day. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 6, p. 727-736, 2011.

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**, v. 34, n. 23, p. 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.

RECK, J. *et al.* Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? **Preventive Veterinary Medicine**, v. 1, p. 59-62, 2014.

REMEDIÓ, R. N. *et al.* Morphological alterations in the synganglion and integument of *Rhipicephalus sanguineus* ticks exposed to aqueous extracts of neem leaves (*Azadirachta indica* A. JUSS). **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n.12, p. 989-998, 2014.

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. 96, n. 3, p. 319-327, 2014.

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)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2019.

SOUZA, J. R. L. *et al.* The bioactive compound carvacrol as a potential acaricide: An assessment of its effects on the integument of female *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks. **Microscopy Research and Technique**, v. 85, n. 5, p. 1784-1790, 2021.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, ao Prof. Fábio Barbour Scott (UFRRJ) e sua equipe pela disponibilidade dos carrapatos da colônia e a Viviane Tavares de Paula pelo suporte técnico.