



ALINE CHAVES REIS SPURI

**Evaluation of the effects of *Satureja montana* and *Callistemon viminalis*
essential oils on the ovary morphology of *Rhipicephalus microplus* female
ticks (*Acari: Ixodidae*)**

LAVRAS-MG

2022

ALINE CHAVES REIS SPURI

**Evaluation of the effects of *Satureja montana* and *Callistemon viminalis*
essential oils on the ovary morphology of *Rhipicephalus microplus* female
ticks (*Acari: Ixodidae*)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio

Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Avelaira Barbosa

Coorientador

LAVRAS-MG

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Reis, Aline Chaves.

Evaluation of the effects of *Satureja montana* and *Callistemon viminalis* essential oils on the ovary morphology of *Rhipicephalus microplus* female ticks (*Acari: Ixodidae*) / Aline Chaves Reis. - 2022.

117 p. : il.

Orientador(a): Rafael Neodini Remedio.

Coorientador(a): Rodrigo Avelaira Barbosa.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Controle de carrapato. 2. Pesticida alternativo. 3. Toxicidade.
I. Remedio, Rafael Neodini. II. Barbosa, Rodrigo Avelaira. III. Título.

ALINE CHAVES REIS SPURI

Evaluation of the effects of *Satureja montana* and *Callistemon viminalis* essential oils on the ovary morphology of *Rhipicephalus microplus* female ticks (*Acari: Ixodidae*)

Avaliação dos efeitos dos óleos essenciais de *Satureja montana* e *Callistemon viminalis* na morfologia ovariana de carrapatos fêmeas *Rhipicephalus microplus* (*Acari: Ixodidae*)

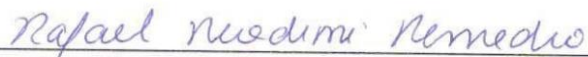
Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de Abril de 2022.

Dr. Rafael Neodini Remedio UFLA

Dra. Ana Paula Peconick UFLA

Dra. Patrícia Rosa de Oliveira UFBA



Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio

Orientador

LAVRAS-MG

2022

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado é uma longa viagem, que inclui uma trajetória permeada por inúmeros desafios, incertezas, alegrias e muitos percalços, porém, reúne a contribuição de várias pessoas, fundamentais para encontrar o melhor rumo em cada momento da caminhada. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio e força de várias pessoas, a quem dedico especialmente este trabalho.

Primeiramente, agradeço à Deus, por essa oportunidade, por me capacitar a vencer mais esse desafio e por me dar além do que mereço. Agradeço ao meu esposo Thales, pelo amor, carinho e apoio nos momentos mais difíceis, por ter tido paciência e compreensão durante todo esse processo sempre me motivando a seguir em frente. Agradeço aos meus pais, Rosângela e Elierson pelo incentivo e pelas palavras nas horas mais complicadas. Ao meu irmão Leonídio e minha cunhada Amanda pela torcida e vibração de sempre com minhas vitórias. Aos meus avós Reciolina e Sebastião e meus padrinhos Jésus e Regina que sempre rezaram para essa conquista, e ela enfim chegou!

Agradeço aos meus amigos Geovanna, Thalita, Aline, Clarinha, Emília, Grazi, Ana, Ju e Lu, que não me abandonaram em momento algum, sempre me incentivando a prosseguir independente das dificuldades. É muito bom saber que tenho vocês sempre comigo.

Agradeço aos meus sogros Fatinha e José Maria (*in memoriam*), meus cunhados Thuler e Jéssica pelo encorajamento nessa caminhada, que não foi fácil. O estímulo e força de todos vocês foram muito importantes!

Agradeço de maneira especial ao meu orientador, professor Rafael Remedio, que esteve sempre disponível as minhas questões, sugerindo novos pontos de vista e apontando novos caminhos. Sua orientação significou não apenas estímulo intelectual ao trabalho, como apoio nas fases mais difíceis. Ao meu coorientador, professor Rodrigo Avelaira, pelas palavras tão gentis e carinhosas nos momentos mais delicados e pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço, ainda mais, a quem de fato me “jogou” e me “tirou” dessa, meu amigo, confidente, compadre e irmão que a vida me deu, Isaac Konig. Obrigada Isaac, por não ter poupado esforço nenhum para que essa conquista viesse. Obrigada pela disponibilidade de sempre, obrigada

por ter caminhado junto comigo (e até mesmo me carregado) durante esse trajeto, tornando a caminhada mais divertida e confortante. Obrigada por desejar sempre o meu melhor e pelo esforço que fez para que eu pudesse superar cada obstáculo e chegar até aqui! Sem você eu não teria conseguido! Essa conquista não é minha, é nossa.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Prof^a Ana Paula Peconick e Prof^a Patrícia Rosa de Oliveira, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação. Aos professores que também participaram da minha banca de qualificação, Adriana Degrossoli e José Ribamar Lima de Souza, que tanto contribuíram com meu trabalho.

Agradeço à UFLA, ao Departamento de Medicina (em especial ao amigo e chefe de Departamento, professor Vitor Luis Tenório Mati) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por fornecerem o espaço e todas as condições para a realização desse trabalho.

No mais, obrigada a todos por me darem a força necessária para enfrentar as adversidades, sem desistir.

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* causa prejuízos para a agropecuária devido a transmissão de patógenos aos bovinos bem como a diminuição dos produtos de origem animal. Devido a sua importância médico-veterinária e problemas associados a resistência, esses ectoparasitos são alvos de diversos métodos de controle. O óleo essencial da espécie *Satureja montana* é, em geral, rico em carvacrol e borneol, apresentando comprovada atividade pesticida. A espécie *Callistemon viminalis*, por sua vez, apresenta óleo essencial composto por 1,8-cineol e α -pineno, também com atividades acaricidas e repelentes comprovadas. Com base nessas informações, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes concentrações dos óleos essenciais de *S. montana* e *C. viminalis* diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% na morfologia do ovário de fêmeas de *R. microplus* ingurgitadas. Para isso, os carrapatos foram submetidos ao Teste de Imersão de Adultos. Após sete dias, os carrapatos foram dissecados para a coleta dos ovários. O material foi processado e incluído em historesina, seccionado, corado e analisado por meio de análises morfométrica e semiquantitativa. Foram observadas alterações morfológicas semelhantes para os dois óleos essenciais, entre elas: vacuolização citoplasmática, irregularidade e espessamento do córion, irregularidade no formato dos ovócitos, vacuolização nucleolar, alterações celulares na parede epitelial do oviduto e pedicelo e alterações no conteúdo de proteínas e carboidratos. Para o óleo essencial de *C. viminalis* também foi possível observar a diminuição do tamanho do núcleo e o aumento da vacuolização. Desta forma, os resultados demonstraram o potencial dos óleos essenciais como fitopesticidas promissores no controle desses ectoparasitos em longo prazo, por impactarem o sistema reprodutivo.

Palavras-chave: Carrapato-do-boi. Controle de carrapato. Morfologia. Morfometria. Pesticida alternativo. Toxicidade.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus ticks cause damage to agriculture due to the transmission of pathogens to cattle as well as reduction in products of animal origin. Due to their medical-veterinary importance and problems associated with resistance, these ectoparasites are targets of several control methods. The essential oil of *Satureja montana* is, in general, rich in carvacrol and borneol, with proven pesticidal activity. *Callistemon viminalis*, in turn, has an essential oil composed of 1,8-cineole and α -pinene, also with proven acaricidal and repellent activities. Based on this information, this study aimed to evaluate the effects of different concentrations of *S. montana* and *C. viminalis* essential oils diluted in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) on the ovary morphology of engorged *R. microplus* females. For this, the ticks were submitted to the Adult Immersion Test. After seven days, the ticks were dissected to collect the ovaries. The samples were processed and embedded in historesin, sectioned, stained and analyzed through morphometric and semiquantitative analyses. Similar morphological changes were observed for the two essential oils, including: cytoplasmic vacuolization, irregularity and thickening of the chorion, irregularity in the shape of the oocytes, nucleolar vacuolization, cellular changes in the epithelial wall of the oviduct and pedicel, and changes in the content of proteins and carbohydrates. For the essential oil of *C. viminalis*, it was also possible to observe a decrease in the size of the nucleus and an increase in vacuolization. Thus, the results demonstrated the potential of essential oils as promising phytopesticides in the long-term control of these ectoparasites, as they impact ticks reproductive system.

Keywords: Cattle tick. Tick control. Morphology. Morphometry. Alternative pesticide. Toxicity.

SUMÁRIO

PARTE I	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1. Carrapatos	12
2.1.1. <i>Rhipicephalus microplus</i>	13
2.1.2. Morfologia do ovário de carrapatos	14
2.2. Controle de carrapatos	17
2.2.1. Controle alternativo	18
2.2.2. Óleos essenciais	20
2.3. Controle baseado na reprodução.....	21
2.4. <i>Satureja montana</i> L.	25
2.5. <i>Callistemon viminalis</i>	26
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo Geral	29
3.2. Objetivos Específicos	29
REFERÊNCIAS	30
PARTE II – Cytotoxic effects of <i>Satureja montana</i> L. essential oil on oocytes of engorged <i>Rhipicephalus microplus</i> female ticks (Acari: Ixodidae)	47
ABSTRACT	50
1. INTRODUCTION	51
2. MATERIALS AND METHODS	54
2.1. Obtaining the essential oil of <i>Satureja montana</i> L.....	54
2.2. Chemical characterization of the essential oil of <i>Satureja montana</i> L.....	54
2.3. <i>Rhipicephalus microplus</i> ticks.....	55
2.4. Adult Immersion Test.....	55
2.5. Histological and Histochemical analysis.....	56

2.6. Semiquantitative and morphometric analysis.....	56
3. RESULTS.....	58
3.1. Chemical characterization of the essential oil of <i>Satureja montana</i> L.	58
3.2. Adult Immersion Test.....	58
3.3. Histological and Histochemical analysis.....	60
3.3.1. Control Groups I (H ₂ O) and II (DMSO 10%).....	60
3.3.2. Treatment Group I (3,0 µL/mL)	61
3.3.3. Treatment Group II (4,0 µL/mL)	62
3.3.4. Treatment Group III (5,0 µL/mL)	62
3.4. Semiquantitative analysis.....	66
3.5. Morphometric analysis.....	68
4. DISCUSSION.....	69
REFERENCES.....	73
PARTE III – Efeito tóxico do óleo essencial de <i>Callistemon viminalis</i> no ovário de fêmeas ingurgitadas de carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i> (Acari: Ixodidae).....	80
RESUMO.....	82
ABSTRACT.....	83
1. INTRODUÇÃO.....	84
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	86
2.1. Obtenção do óleo essencial.....	86
2.2. Carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i>	86
2.3. Teste de Imersão de Adultos.....	86
2.4. Análises histológicas e histoquímicas.....	87
2.5. Análises morfométrica e semiquantitativa.....	87
2.6. Análise estatística.....	88
3. RESULTADOS.....	89
3.1. Mortalidade de <i>Rhipicephalus microplus</i>	89

3.2. Análise histopatológica.....	90
3.2.1. Grupos Controle (CI e CII)	90
3.2.2. Grupo Tratamento I.....	91
3.2.3. Grupo Tratamento II.....	91
3.2.4. Grupo Tratamento III.....	92
3.3. Análises semiquantitativa e morfométrica.....	96
4. DISCUSSÃO.....	101
REFERÊNCIAS.....	106
PARTE IV.....	113
1. DISCUSSÃO GERAL.....	114
2. CONCLUSÃO GERAL.....	116
REFERÊNCIAS.....	117

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, a pecuária é uma das atividades do agronegócio mais importantes e vantajosas financeiramente, possuindo uma população global de aproximadamente 1.49 bilhão de cabeças de gado (PÉREZ DE LEÓN; MITCHELL; WATSON, 2020). O Brasil ocupa a segunda posição em maior rebanho bovino do mundo, com aproximadamente 213,8 milhões de cabeças (DE SOUZA et al., 2019).

Dentre as mais de 900 espécies de carrapatos conhecidas no mundo, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* representa o principal ectoparasito de bovinos nas regiões tropicais e subtropicais (ESTRADA-PEÑA, 2015). Estudos demonstraram que, embora previamente classificado no gênero *Boophilus* (MURRELL; BARKER, 2003), a análise molecular e morfológica revelou que o gênero *Rhipicephalus* era parafilético em relação ao gênero *Boophilus* (MURRELL; CAMPBELL; BARKER, 2000) passando dessa forma *Boophilus* à subgênero. *Rhipicephalus microplus*, popularmente conhecido como carrapato-do-boi, é o carrapato mais importante da pecuária, sendo responsável por grandes prejuízos na bovinocultura. Além da perda de sangue e da transmissão de doenças como babesiose e anaplasmose, causa danos ao couro e estresse aos animais; porém, o que mais preocupa atualmente é a rapidez em que ocorre a seleção de carrapatos resistentes aos produtos químicos comumente utilizados para seu controle (DZEMO; THEKISOE; VUDRIKO, 2022).

O controle químico pelo uso de acaricidas sintéticos tem sido a principal forma de conter os ectoparasitos por mais de um século, porém o seu uso indiscriminado pode ocasionar a seleção de indivíduos resistentes (FURLONG, 1993; SANGSTER, 2001; TAYLOR, 2001) e contaminar a carne, leite e derivados e o meio ambiente. Esses fatores apontam para a necessidade de pesquisar métodos alternativos que sejam seguros e eficazes no controle de ectoparasitos (WILLADSEN, 2006).

Desde os tempos primordiais, as plantas aromáticas já eram comumente utilizadas por suas funções medicinais. Elas são utilizadas há muito tempo (EL-AKHAL et al., 2014; NADIO et al., 2015) e suas propriedades inseticidas e repelentes são comprovadas por vários pesquisadores (AMIRAT; TEBBOUB, 2011; CANTRELL; DAYAN; DUKE, 2012; OGENDO et al., 2008;

TAPONDJOU et al., 2005). Nos últimos anos, tem-se dado maior interesse pela utilização de plantas aromáticas devido as suas diversas propriedades antioxidantes (BAGORA, 2014; BOURKHISS et al., 2010), diuréticas (ZAKARIYA et al., 2020), antimicrobianas (BENCHEQROUN et al., 2012), antifúngicas (JAHANI; PIRA; AMINIFARD, 2020) e antiparasitárias (NEIRA; STASHENKO; ESCOBAR, 2014).

Satureja montana pertence à família Lamiaceae que compreende cerca de 30 espécies, cujo centro de distribuição está localizado na parte oriental da área mediterrânea. São plantas aromáticas semiarbustivas anuais ou perenes que habitam regiões áridas, ensolaradas, pedregosas e rochosas (CUNHA; ROQUE, 2007). Flores, folhas, caules e sementes de *Satureja* spp. são tradicionalmente usados por suas propriedades analgésica, antisséptica, antioxidante, antiprotozoária, antidiarreica, anti-inflamatória, antinociceptiva, anticolinesterásica e vasodilatadora (TEPE; CILKIZ; 2016), já que são ricos em monoterpenos ou compostos relacionados, como timol, borneol, carvacrol e cimenos (PELLEGRINI et al., 2018).

As plantas da espécie *Callistemon viminalis* pertencem à família Myrtaceae, e são conhecidas devido a sua importância médica. Trata-se de uma espécie vegetal ornamental que pode possuir vários compostos, como por exemplo o 1,8-cineol, limoneno, α -terpineol e α -pineno (LUNGUINHO et al., 2021). Na Roma Antiga, Grécia e Egito, os óleos essenciais e extratos dessa planta também foram utilizados como perfumes, temperos, desodorantes e produtos farmacêuticos (BARIŞ et al., 2006). Vários estudos anteriores descreveram a composição química do óleo essencial das folhas de *C. viminalis*, juntamente com suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, inseticidas e repelentes (PIRES et al., 2013; SALES et al., 2017; YADAV et al., 2014).

Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos morfológicos provocados pelos óleos essenciais de *S. montana* e *C. viminalis* no ovário de fêmeas de carrapatos *R. microplus*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Carrapatos

Carrapatos são ectoparasitos com ampla distribuição mundial, podendo infestar desde a classe dos anfíbios aos mamíferos terrestres (SAUER; BOWMAN; ESSENBERG, 1995). Em pelo menos um estágio da vida são parasitos hematófagos obrigatórios (NAVA et al., 2010). Todas as espécies de carrapatos se desenvolvem através de quatro estágios distintos: ovo, larva, ninfa e adulto (SONENSHINE; ROE, 2014).

Globalmente, os carrapatos são considerados o segundo vetor de patógenos mais importante, ficando atrás apenas dos mosquitos (PAROLA; RAOULT, 2001). Esses ectoparasitos são uma preocupação na saúde humana e animal, principalmente pelo seu potencial de transmitir agentes infecciosos (incluindo bactérias, vírus, protozoários e nematóides) (COLWELL; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2011). Além disso, picadas de carrapatos podem causar paralisia, toxicoses e reações alérgicas (KLOTZ; KLOTZ; PINNAS, 2009).

Os carrapatos são divididos em duas famílias principais: Argasidae, com aproximadamente 216 espécies cujos representantes não possuem escudo dorsal e, por esse motivo, são conhecidos como “carrapatos moles”; e Ixodidae, constituída por cerca de 731 espécies que apresentam uma estrutura esclerotizada na região dorsal, conhecida como escudo, que garante resistência para seu corpo (“carrapatos duros”). Conta ainda com uma família monoespecífica adicional (Nutalliellidae), formada por carrapatos que compartilham traços com esses dois grupos (DANTAS-TORRES, 2018), sendo por isso conhecidos como “fósseis vivos”, o que os coloca em uma posição basal na árvore evolutiva dos carrapatos (SONENSHINE; ROE, 2014).

A família Ixodidae inclui os gêneros *Amblyomma*, *Anocentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*, esse último englobando o antigo gênero *Boophilus*, agora subgênero (DANTAS-TORRES et al., 2019). No Brasil, a fauna de carrapatos é composta por 72 espécies, sendo 47 da família Ixodidae e 25 da família Argasidae (LABRUNA et al., 2016; MUÑOZ-LEAL et al., 2017). O gênero *Rhipicephalus* possui dois representantes amplamente distribuídos no Brasil: *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) e *R. microplus*, possuindo grande importância veterinária devido a transmissão de vários patógenos (ANDREOTTI et al., 2014).

2.1.1. *Rhipicephalus microplus*

O carrapato-do-boi, *R. microplus*, é um parasito monoxeno (Figura 1) de grande importância econômica, sendo uma das espécies de Ixodidae mais amplamente distribuídas. Esse ectoparasito afeta bovinos suscetíveis (COLWELL; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2011; UTECH; WHARTON; KERR, 1978) e é especialmente prejudicial para o gado leiteiro. Trata-se de um carrapato distribuído em todo o mundo e encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais (DUCORNEZ et al., 2005; SABATINI et al., 2001). Causam consideráveis prejuízos econômicos na pecuária por provocar perda de sangue, estresse geral e irritação, diminuição da produtividade, depressão da função imunológica, danos a pele e transmissão de patógenos (ALIM et al., 2012; DE CASTRO, 1997; VALENTE et al., 2014) além de causar a diminuição da produção de carne e leite (MARTINS, 2006).

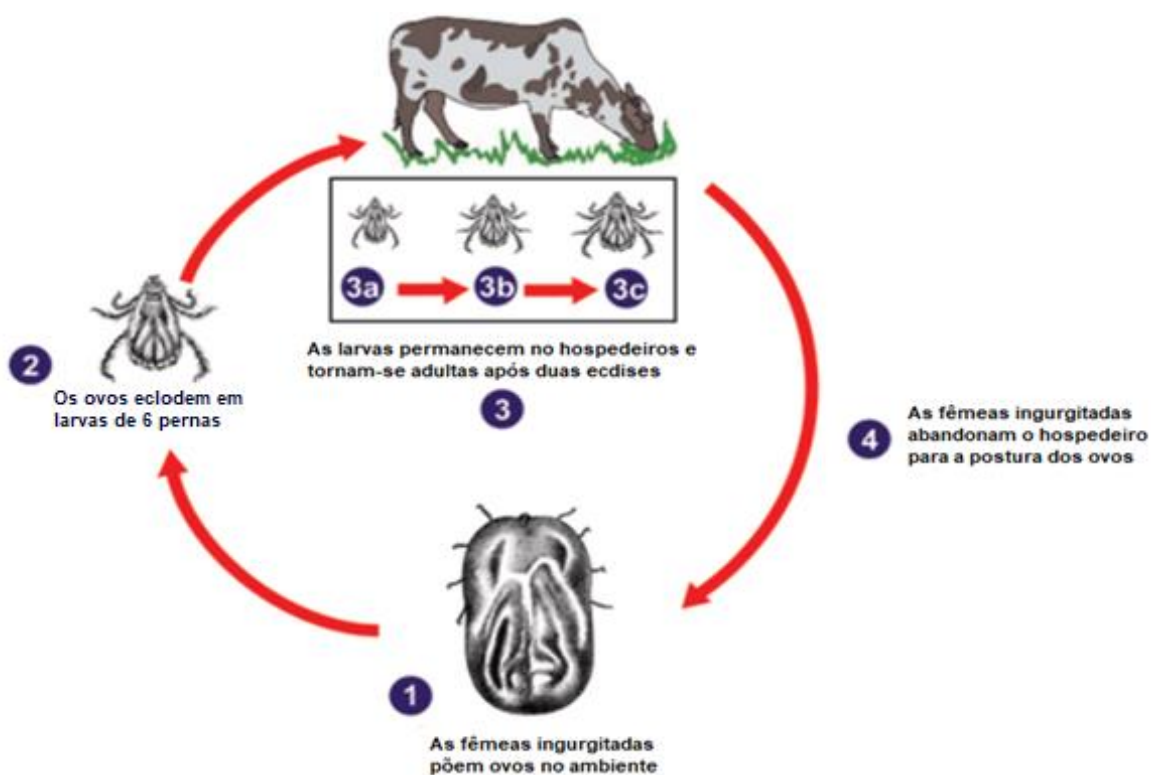


Figura 1. Os carrapatos monoxenos permanecem no mesmo hospedeiro nos seus três estágios (larva, ninfa e adulto), deixando-o apenas antes da postura dos ovos. 1: As fêmeas ingurgitadas colocam os ovos no ambiente, de onde eclodem larvas com seis pernas. 2: As larvas procuram e fixam-se no hospedeiro e, após duas ecdises (3a. e 3b), tornam-se adultas (3c). As fêmeas se desprendem do hospedeiro para postura dos ovos. 4: O ciclo se repete. Fonte: Modificado de CDC, 2017.

Sendo o Brasil o maior exportador de carne bovina, o segundo maior produtor de carne e sexto maior produtor de leite (USDA, 2014), essa espécie de carrapato causa um grande impacto econômico na pecuária brasileira. De acordo com Grisi et al. (2014) o impacto anual corresponde a US\$3,24 bilhões de dólares, representando 75% da perda econômica total nesse setor. Ainda, quando são considerados os custos com acompanhamento veterinário, esse valor atinge números maiores. Um único carrapato adulto que parasita uma vaca reduz sua produção de leite na ordem de 8,9 mL/dia (HURTADO; GIRALDO-RÍOS, 2018; JONSSON; MATSCHOSS, 1998). Considerando que o gado é parasitado por centenas de carrapatos ao mesmo tempo, o volume total de leite perdido é considerável. Além desse fator, ocorre ainda redução da qualidade da carne e desvalorização do couro devido as marcas deixadas na fixação desses ectoparasitos (BRAZ et al., 2019).

Rhipicephalus microplus também aumenta a probabilidade de transmissão de doenças importantes, como babesiose, causada pelos protozoários *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* (HOMER et al., 2000), e anaplasmoze, transmitida pela bactéria intracelular *Anaplasma marginale* (AUBRY; GEALE, 2011), constituindo um conjunto de doenças popularmente conhecidas como tristeza parasitária bovina (SILVA et al., 2021). Ademais, para o tratamento dessas doenças são utilizadas drogas contendo aceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarbe, amicarbalina, clindamicina, quinina e azitromicina, que provocam efeitos colaterais graves como diarreia, cólica e salivação (URQUHART et al., 1998; VANNIER; KRAUSE, 2009).

2.1.2. Morfologia do ovário de carrapatos

Segundo Sonenshine e Roe (2014), o sistema reprodutor feminino dos carrapatos geralmente consiste em um grande ovário em forma de “U” localizado na região posterior do corpo, com um par de ovidutos, um útero, um tubo de conexão muscular, vagina e abertura genital e, após a fertilização, o ovário aumenta consideravelmente de tamanho.

Os aspectos morfológicos, histológicos, histoquímicos e ultraestruturais do sistema reprodutivo de carrapatos fêmeas de *R. microplus* foram descritos por Saito et al. (2005). Morfológicamente, os ovários desses carrapatos são formados por um tubo único (oviduto) com

formato de “ferradura”, sobre o qual está fixada uma grande quantidade de ovócitos. Esses ovócitos se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento, aderidos ao oviduto por meio do pedicelo. Os ovócitos aderidos ao oviduto estão distribuídos em duas regiões: aqueles em estágios iniciais de desenvolvimento são encontrados na região distal ao oviduto, enquanto que na região proximal se encontram os ovócitos maiores e mais maduros. No ovário de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* é possível verificar a presença de cinco diferentes estágios de desenvolvimento dos ovócitos (I-V) (Figura 2) (SAITO et al., 2005). Os ovócitos vão aumentando de tamanho durante a vitelogênese, período no qual as substâncias essenciais como as proteínas e carboidratos se concentram nos ovócitos (XAVIER et al., 2018).

As menores células da linhagem germinativa são os ovócitos I, que histologicamente apresentam uma vesícula germinal (núcleo) em posição central contendo o nucléolo. Os ovócitos são envolvidos apenas por uma fina membrana plasmática. Os ovócitos II, por sua vez, apresentam finas granulações em seu citoplasma. Nos ovócitos III, a vesícula germinal se aproxima da porção basal do ovócito e os grânulos de vitelo se tornam maiores (SAITO et al., 2005). Nessa fase, se inicia a deposição do córion, uma camada que envolve o ovócito, confere proteção e permite trocas gasosas quando o ovo alcança o meio externo (SAMPIERI et al., 2012). Os ovócitos IV apresentam grânulos mais grosseiros e eosinofílicos, com tamanhos variados, sendo o núcleo de difícil visualização devido ao aumento dos grânulos de vitelo. No último estágio de desenvolvimento dos ovócitos (estágio V), o córion está bastante visível e completamente depositado, e os grânulos de vitelo estão maiores e mais homogêneos. Essas células apresentam maiores dimensões em relação aos estágios anteriores. Nesse estágio, os ovócitos chegam ao oviduto e são, enfim, depositados pelas fêmeas devido a uma pressão crescente e contínua contra a parede do ovário, alcançando o meio externo onde ocorrerá a eclosão das larvas, reiniciando um novo ciclo (DENARDI et al., 2004).

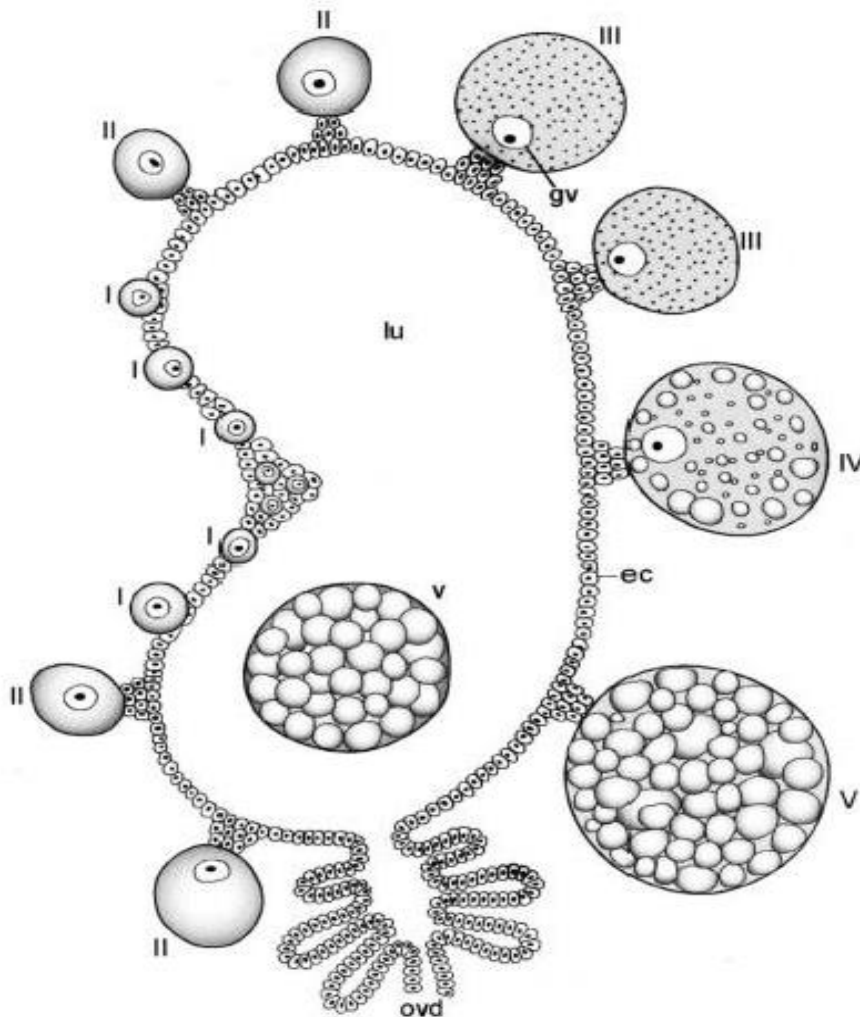


Figura 2. Ovário de *Rhipicephalus microplus*. I – ovócito I; II – ovócito II; III – ovócito III; IV – ovócito IV; V – ovócito V; ec – epitélio; lu – lúmen; ovd – oviduto; gv – vesícula germinal. Fonte: Saito et al. (2005).

Sabe-se que uma única fêmea é capaz de fazer a postura de milhares de ovos que contribui imensamente para a perpetuação desse parasito (SENBILL et al., 2018). Dessa forma, vários estudos ao longo da última década têm se baseado em análises morfológicas para demonstrar alterações no ovário de carrapatos (CAMARGO-MATHIAS et al., 2017; DENARDI et al., 2011; KONIG et al., 2019, 2020; OLIVEIRA et al., 2016, 2017; REMEDIO et al., 2014). Portanto, métodos de controle baseados na vitelogênese se destacam como altamente recomendados para mitigar a infestação de carrapatos.

2.2. Controle de carrapatos

A maneira tradicional de controle de carrapatos é através do uso de acaricidas químicos sintéticos (DE MENEGHI, 2016; HIGA et al., 2019) como os piretróides (SHARMA et al., 2018; SHARMA; SINGH, 2017), carbamatos, organofosforados, organoclorados, formamidina, neonicotinóides e fenilpirazol, além de lactonas macrocíclicas e benzoilfeniluréias (DE MENEGHI, 2016; RAJPUT et al., 2006). Existem também outras formas de controle como a vacinação, controle biológico e o uso de produtos de origem natural (TAK; ISMAN, 2017; WASSERMANN et al., 2016).

Para o controle desses ectoparasitos, os criadores comerciais de gado confiam extensivamente no uso de produtos químicos sintéticos, porém, com seu uso intensivo e indiscriminado, em todo o mundo, a resistência de carrapatos a várias classes de acaricidas tem sido amplamente relatada (ABBAS et al., 2014; FERNÁNDEZ-SALAS; RODRIGUEZ-VIVAS; ALONSO-DÍAZ, 2012). A resistência aos acaricidas é definida como uma característica hereditária específica em uma população de carrapatos, selecionada como resultado do contato da população com um acaricida, o que resulta em um aumento significativo na porcentagem da população que sobrevive após a exposição a uma determinada concentração desse acaricida (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2017). Em todo o mundo (Figura 3), a resistência do carrapato a todas as classes de acaricidas convencionais tem sido amplamente relatada (ABBAS et al., 2014). Nesse contexto, derivados vegetais podem ser uma alternativa para o controle de cepas resistentes (ADENUBI et al., 2018).



Figura 3. Distribuição geográfica da resistência à acaricidas sintéticos mais comumente utilizados contra carrapatos *Rhipicephalus* em todo o mundo (*R. microplus*: EUA, México, Jamaica, República Dominicana, Cuba, Guatemala, Honduras, El Salvador, Panamá, Costa Rica, Colômbia, Venezuela, Bolívia, Uruguai, Brasil, Argentina, Austrália, Nova Caledônia, Índia, Ira, Benin, Tanzânia, África do Sul e Zâmbia; *R. bursa*: Índia e Irã; *R. decoloratus*: Etiópia, Zimbábue, Tanzânia, África do Sul e Zâmbia; *R. appendiculatus*: Tanzânia, Zâmbia, Uganda e Quênia; *R. evertsi*: Tanzânia, África do Sul e Etiópia; *R. pulchellus*: Etiópia; *Rhipicephalus ssp.* Gana).
 Fonte: Rodriguez-Vivas et al. (2017).

2.2.1. Controle alternativo

Sabe-se que a prática mais utilizada para o controle de carrapatos *R. microplus* se dá pela aplicação de acaricidas químicos. Porém, atualmente, essa estratégia de controle tem demonstrado eficácia limitada a populações específicas de carrapatos devido a seleção da resistência provocada pelo uso extensivo desses acaricidas, além de trazer danos ao rebanho e desequilíbrios ecológicos. Devido a esses fatores, a sociedade, associações ambientais e órgãos governamentais nacionais e internacionais têm expressado preocupação com os possíveis efeitos teratogênicos, mutagênicos, carcinogênicos e/ou alergênicos decorrentes de resíduos em produtos de origem animal (DE MELLO; DA SILVEIRA, 2012). Por essas razões, há necessidade de mais pesquisas sobre práticas e métodos ecologicamente apropriados para o controle de carrapatos (BENELLI et al., 2016).

Pesquisas orientadas para métodos alternativos de controle do carrapato que sejam consistentes com os princípios da agricultura sustentável incluem o uso de antígenos do carrapato

como vacinas (SHAHEIN et al., 2013), fungos entomopatogênicos (NANA et al., 2015; 2016), gerenciamento integrado contra carrapatos (WEBSTER et al., 2015) e alternativas baseadas em plantas (BENELLI et al., 2017; BENELLI; PAVELA, 2018).

Estudos comprovam que cerca de 80% da população mundial faz uso de plantas e de seus extratos para cuidados com a saúde (WERKA; BOEHMEB; SETZER, 2007). Compostos de origem natural são vantajosos devido ao seu custo relativamente baixo, degradação mais rápida e manuseio mais fácil. Além disso, esses compostos apresentam menor toxicidade para o meio ambiente, humanos e outros animais quando comparados aos compostos sintéticos (TAK; ISMAN, 2017). Ainda, produtos extraídos de plantas têm potencial reduzido para a seleção de cepas de carrapatos resistentes, uma vez que geralmente são formados por diferentes substâncias que agem sinergicamente com diferentes modos de ação (ROSADO-AGUILAR et al., 2010).

Nos últimos anos, o mercado de produtos agroquímicos convencionais de combate a insetos e pragas agrícolas experimentou uma queda significativa devido ao desenvolvimento de pesticidas botânicos que vem conquistando a confiança dos agricultores e têm sido cada vez mais empregados em programas de Manejo Integrado de Pragas (BENELLI et al., 2018 a,b; ISMAN; MACHIAL, 2006; JHALA; BALODA; RAJPUT, 2020; THAKORE, 2006).

Dentre os produtos de origem natural para o controle de carrapatos, alguns extratos vegetais vêm se destacando como, por exemplo: o extrato metanólico de *Acmella oleracea*, a planta do jambú da Amazônia, que já demonstrou em estudos ser eficaz contra carrapatos *Amblyomma sculptum* nas formas de larvas e ninfas (MARCHESINI et al., 2018). Extratos das sementes de *Annona muricata* em solução a 2% extraídas com etanol mataram 100% de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2009). Extratos aquosos de cascas de frutas de *A. squamosa* demonstraram eficácia para o controle dos carrapatos adultos *Haemaphysalis bispinosa* e para larvas de *R. microplus*, sendo que a toxicidade é ainda maior se o material da folha for extraído com hexano (MADHUMITHA et al., 2012). Outra planta com poder acaricida é a *Nicotiana tabacum*, que já demonstrou ser letal para 50% dos carrapatos adultos *R. decoloratus* e *R. pulchellus*, em um período de 24 horas de exposição quando extraída com metanol (KEMAL et al., 2020).

2.2.2. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são definidos pelas normas ISO 4720:2018 (ISO, 2018) e ISO 9235:2013 (ISO, 2013) como “produto obtido por destilação a vapor de partes de plantas (folhas, flores, ramos), por prensagem a frio de epicarpós (casca) de citrinos ou por destilação a seco, após separação da fase aquosa (se existir) por processos físicos”. Dessa forma, são misturas complexas obtidas de folhas, flores ou botões, bulbos, sementes, rizomas e frutos de plantas aromáticas. Conhecidos desde a antiguidade e, portanto, usados na medicina tradicional ou na culinária, eles são frequentemente incluídos em produtos farmacêuticos de venda livre, em cosméticos e perfumes como fragrâncias e em muitos alimentos e bebidas como agentes aromatizantes (CARSON; HAMMER, 2010).

Os óleos essenciais são incolores ou ligeiramente amarelados e voláteis, apresentam vários metabólitos com diferentes propriedades biológicas, consistindo de uma grande variedade de terpenos e fenilpropanóides (BENELLI; PAVELA, 2018). Geralmente são caracterizados por possuírem dois ou três componentes principais aos quais normalmente são atribuídas suas atividades (BARBIERI et al., 2018). Os óleos essenciais pertencem à classe dos metabólitos secundários e desempenham um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes, e também representam uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas (FIGUEIREDO et al., 2008). São conhecidos há séculos pelas várias propriedades que possuem. Esses óleos protegem as plantas de ataques bacterianos, fúngicos ou virais (ARSHAD et al., 2014) e atraem os insetos que causam a dispersão do pólen (BAKKALI et al., 2008; KHATER, 2012). Além disso, algumas espécies vegetais (como a *Melinis minutiflora*) possuem atividade repelente *in natura* contra parasitos, por exemplo dificultando a adesão da larva (ISMAN, 2016; MWANGI et al., 1995).

A composição dos óleos essenciais varia entre diferentes espécies de plantas ou mesmo dentro da mesma espécie (JULIANI et al., 2004). Além disso, a composição química dos óleos essenciais de uma mesma espécie vegetal pode variar nos diferentes estágios de crescimento da planta, bem como país de origem, época da colheita, temperatura, forma de extração, idade da planta, entre outros fatores (ISMAN, 2016).

Esses óleos são conhecidos por possuírem propriedades antioxidante (BAGORA, 2014; BOURKHISS et al., 2010), expectorante (IANNARELLI et al., 2018), diurética (ETOU OSSIBI et al., 2020), atividade antimicrobiana (RADŪNZ et al., 2019), antifúngica (WAN et al., 2019) e antiparasitária (SANTOS SALES et al., 2018), entre outras. Os óleos essenciais têm diferentes modos de ação, produzindo várias mudanças biológicas nos organismos-alvo. Uma característica importante dos óleos essenciais e seus componentes é a hidrofobicidade, o que lhes permite acumular-se nos lípidos das membranas celulares, interferindo na permeabilidade celular (BURT, 2004; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012). Alguns dos principais efeitos biológicos dos óleos essenciais podem ser citotoxicidade (POWERS et al., 2018), fototoxicidade (ERDOGAN; AYAS; GOKSEN, 2017), carcinogenicidade (BAKKALI et al., 2008), neurotoxicidade (HASS, 2010) e também podem apresentar ação antimutagênica (TAHERKHANI, 2015).

Segundo Benelli e Pavela, (2018), em seu trabalho de revisão sistemática, foi observado que todos os óleos testados nos estudos revisados demonstraram eficácia repelente, independente da espécie e estágio de desenvolvimento dos carrapatos; constatou ainda que testes de curto prazo avaliando o efeito repelente indicou que os óleos em concentrações acima de 1% já causavam mais de 70% de repelência e que concentrações superiores a 10% em geral levam a repelência total.

Dessa forma, a tendência atual de redução do uso de produtos sintéticos (principalmente pesticidas e conservantes químicos sintéticos) em favor de alternativas naturais faz dos óleos essenciais e seus componentes escolhas possíveis para essa questão (LUBBE; VERPOORTE, 2011; SIMAS et al., 2017).

2.3. Controle baseado na reprodução

Atualmente, têm-se estudado produtos acaricidas que afetem diretamente o sistema reprodutivo dos carrapatos, resultando em impactos na formação de sua progênie. Sabe-se que uma única fêmea é capaz de gerar milhares de descendentes (TROUGHTON; LEVIN, 2007) e, por esse motivo, o uso de métodos de controle que prejudiquem o desempenho reprodutivo desses animais pode ser uma alternativa interessante para diminuir infestações.

Dentre os estudos baseados na reprodução, diversos trabalhos publicados demonstraram ótimos resultados com a utilização de produtos naturais a fim de avaliar o potencial desses compostos como estratégia de controle de ectoparasitos. Anholetto et al. (2018), por exemplo, analisaram os efeitos de diferentes concentrações de extrato etanólico de *Acmella oleracea* sobre o desenvolvimento de células germinativas de fêmeas semi-ingurgitadas de *Amblyomma cajennense*; Politi et al. (2019) verificaram a ação do extrato etanólico de *Tagetes patula* no ciclo de vida de *R. microplus*, bem como analisaram sua ação nas células ovarianas de fêmeas ingurgitadas, confirmando que esse extrato interfere em todas as fases de desenvolvimento do ixodídeo, desde a forma de ovo até a forma adulta, e têm efeito repelente pronunciado; Rey-Valeirón et al. (2018) avaliaram o efeito acaricida do óleo essencial de *Schinus molle* sobre fêmeas adultas ingurgitadas e estágios larvais de *R. sanguineus*, verificando que a concentração de 2% (20 mg/mL) causou 99,31% de mortalidade das larvas, além de ter provocado inibição da oviposição e diminuição da eficiência reprodutiva de adultos; Villarreal et al. (2017), por sua vez, testaram os óleos de *Cuminum cyminum* L. (cominho), *Bertholletia excelsa* (castanha do Brasil) e de *Helianthus annuus* (semente de girassol) contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* para investigar sua eficácia acaricida, demonstrando que o óleo essencial de *C. cyminum* apresentou alta atividade acaricida (100%) sobre as fêmeas ingurgitadas e sobre suas características reprodutivas a partir da concentração de 100 mg/mL.

O óleo essencial de *Lavandula angustifolia*, demonstrou atividade bioacaricida contra fêmeas ingurgitadas de *R. annulatus* causando mortalidade considerável em concentrações superiores a 4%. Com esse tratamento foi verificada a redução do peso dos ovos dos carrapatos de maneira dependente da concentração (PIRALI-KHEIRABADI; TEIXEIRA DA SILVA, 2010). Também foi confirmada a ação acaricida do óleo essencial das folhas de *Laurus nobilis* e suas frações contendo sabineno, β -pineno, 1,8-cineol, α -pineno e α -terpineol contra *R. microplus*. Nesse trabalho, as frações foram testadas a fim de elucidar quais compostos eram responsáveis pelo potencial larvicida, resultando ser mais ativo nessa análise o α -terpineol, sendo observado na concentração de 50 μ L/mL do óleo essencial, a mortalidade de fêmeas ingurgitadas, redução da massa de ovos e inibição da eclosão (FERNANDEZ et al., 2020). Além disso, foram avaliadas a atividade acaricida dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (2,80 mg/mL) e *Lippia gracilis* (4,66

mg/mL) e seus principais componentes: timol (5,49 mg/mL) e carvacrol (4,46 mg/mL) contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo observados nos ovócitos vacuolização citoplasmática, deformação do córion, desorganização dos grânulos de vitelo e irregularidades na periferia celular, causando processo incompleto de vitelogênese por alterar a morfologia dos órgãos reprodutores, diminuindo a viabilidade ovariana (PENHA et al., 2021).

Remedio et al. (2014) analisaram os ovócitos de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. semi-ingurgitadas submetidas ao óleo de semente de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) através de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão a fim de verificar sua atividade acaricida. Foram observados desorganização citoplasmática, vacuolização celular, irregularidade nuclear e nucleolar, dilatação das cristas mitocondriais, alterações na matriz mitocondrial e inchaço do retículo endoplasmático rugoso, sugerindo que o tratamento afetou a viabilidade dos embriões, contribuindo para o controle reprodutivo da espécie.

Em se tratando de princípios ativos isolados de óleos essenciais, Queiroz et al. (2020) verificaram, nos ovócitos de fêmeas adultas de *R. microplus*, a ação da combinação de 1,8-cineol a 10% com óleo de rícino a 0,3%. Nesse trabalho, os ovócitos nos estágios I e II demonstraram presença de inúmeros vacúolos em todo o citoplasma celular, sendo mais frequentes na proximidade do núcleo. Além disso, o nucléolo em sua maioria apresentou-se fragmentado. Os ovócitos no estágio III demonstraram córion rompido e descolado, e os estágios mais maduros (IV e V) demonstraram formato alterado e grânulos de vitelo aparentemente em processo de degradação. Também foram observadas alterações no pedicelo que sustenta esses ovócitos, como vacuolização citoplasmática, núcleo picnótico e alterações nas membranas celulares. Esses autores sugeriram, portanto, que o tratamento com a associação de um óleo com um princípio ativo isolado pode provocar uma queda reprodutiva desses ectoparasitos devido aos danos morfológicos provocados no tecido ovariano.

Silva Matos et al. (2014) observaram alterações danosas ao sistema reprodutivo de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* tratadas com o princípio ativo timol a 5,0 mg/mL. Foram visualizados grandes vacúolos nas células germinativas nos diferentes estágios de desenvolvimento e invaginações que representam deformações na membrana coriônica. Além disso, o timol também alterou o teor de cálcio dos grânulos de vitelo. A partir dos resultados obtidos nesse estudo,

concluiu-se que o timol interferiu no desenvolvimento dos ovócitos, que apresentaram sinais de degeneração. Essas alterações podem prejudicar a geração da prole e promover o controle em longo prazo dessa espécie.

Quanto a utilização de extratos vegetais, Minho et al. (2020) também confirmaram a eficácia do extrato hexânico de *S. lentiscifolius* (aroeira-vermelha) no controle de larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Foi demonstrado uma alta eficácia na redução da oviposição de fêmeas e eclosão larval. No teste de pacote larval, verificou-se 100% de mortalidade das larvas e o teste de repelência larval causou 82,2% de repelência a 50 mg/mL.

Ainda, outro estudo conduzido por Oliveira et al. (2016) avaliaram a eficiência acaricida do extrato hexânico de jambú (*Acmella oleraceae*) em fêmeas semi-ingurgitadas de *R. microplus*. Os carrapatos foram expostos a 12,5 mg/mL; 25,0 mg/mL e 50,0 mg/mL do extrato de *A. oleraceae* diluído em solução de etanol a 50% acrescido de DMSO (dimetilsulfóxido) a 1%. Através das análises foi possível verificar que mesmo na menor concentração, os danos foram bastante prejudiciais ao ovário, provocando extensas vacuolizações citoplasmáticas e nucleolares principalmente nos ovócitos mais jovens (I e II). Nas concentrações mais altas, os ovócitos sofreram maiores danos morfológicos. Os autores propuseram que a vacuolização nucleolar se resume em um processo que direciona a morte da célula. Em se tratando da vacuolização citoplasmática, sugere-se que seja resultante da tentativa da célula expulsar os compostos tóxicos ou mesmo a ocorrência da destruição de organelas celulares que foram afetadas pela substância (OLIVEIRA et al., 2016). De fato, esses autores argumentam que a vacuolização citoplasmática pode resultar tanto da perda de permeabilidade seletiva de membranas quanto da formação de vacúolos autofágicos. Para König et al. (2019), a desregulação da permeabilidade seletiva poderia levar a perda de conteúdo citoplasmático ou a passagem de líquidos extracelulares para o interior dos ovócitos. Todavia, a diminuição da área citoplasmática observada por análises morfométricas foi fator determinante para esses autores sugerirem que a perda de conteúdo citoplasmático poderia estar ocorrendo em ovócitos vacuolizados.

2.4. *Satureja montana* L.

O gênero *Satureja* contém cerca de 200 espécies de ervas aromáticas e medicinais (JAFARI; GHAVIDEL; ZARSHENAS, 2016) que crescem espontaneamente nas regiões do Oriente Médio e da Europa mediterrânea, Ásia Ocidental, Norte da África e América do Sul (CHORIANOPOULOS et al., 2004). É comumente conhecida como segurelha de inverno ou segurelha da montanha. É uma pequena erva nativa perene de regiões áridas, ensolaradas e rochosas (Figura 4) (KREMER et al., 2015; MILOS et al., 2001) e pertence a família Lamiaceae, que pode ser considerada uma das mais ricas em plantas medicinais (ELGNDI et al., 2017).



Figura 4. *Satureja montana* L. Fonte: INPN, 2003.

As espécies do gênero *Satureja* são amplamente utilizadas como aromatizantes e medicamentos devido aos constituintes presentes em seu óleo essencial (JAFARI; GHAVIDEL; ZARSHENAS, 2016; TEPE; CILKIZ, 2016), que possui variadas propriedades. Isso a torna promissora em diferentes áreas, como agentes de sabor na indústria de processamento de alimentos e cosméticos (LEREBOUR; LARTAUD; LACTROIX, 2016; OLIVEIRA et al., 2011).

O óleo essencial de *S. montana* L. pode apresentar principalmente os compostos carvacrol, timol, p-cimeno, borneol e linalol (DUNKIČ et al., 2012; SILVA et al., 2009). Essa espécie possui propriedades biológicas que estão relacionadas a presença de seus principais compostos presentes

em seu óleo essencial (MIRJANA; NADA, 2004; RADONIC; MILOS, 2003). Foi comprovado que seu óleo inibe patógenos de origem alimentar, como *Listeria monocytogenes*, tornando-se, portanto, digno de uso como conservante alimentar (DJENANE et al., 2011), sendo apreciado em nível industrial, com uma produção nos Estados Unidos de US\$90.000 dólares por ano (LAWRENCE, 1993).

Há relatos que seu óleo essencial possui atividade antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, antiespasmódica, antiviral e antidiarreica (JAFARI; GHAVIDEL; ZARSHENAS, 2016; TEPE; CILKIZ, 2016). Além disso, também apresenta propriedade inseticida (TEPE, 2015), nematicida (ANDRÉS et al., 2012; FARIA et al., 2015, 2016; TEPE, 2015) e fungicida (SÁNCHEZ et al., 2016; SOARES et al., 2016).

O óleo essencial de *S. thymbra*, por exemplo, apresentou toxicidade significativa por fumigação contra os ácaros da espécie *Tetranychus urticae* ($LC_{50} = 44,06 \mu\text{L/L}$), bem como alta ação repelente a $44,06 \mu\text{L/L}$ após 24h (FARAHANI; BANDANI; AMIRI, 2020) e mortalidade de 96,6% de ninfas e adultos de *T. urticae* na concentração de $3,13 \mu\text{L/L}$ após 96h (ASLAN et al., 2004). Além disso, o óleo essencial foi responsável por 100% de mortalidade em carrapatos *Hyalomma marginatum* a $40 \mu\text{L/L}$ em 3h (CETIN et al., 2010). Em um estudo conduzido com óleos essenciais das espécies *S. montana*, *Myristica fragrans* e *Cymbopogon flexuosus*, a maior ação repelente contra *R. sanguineus* foi observada para o óleo essencial de *S. montana*, que exibiu porcentagem de repelência (%R) superior a 80% a $14 \mu\text{L/mL}$. Essa atividade permaneceu efetiva por até 3h na concentração mais alta testada ($56 \mu\text{L/mL}$), com %R superior a 60% (REZENDE et al., 2021).

2.5. *Callistemon viminalis*

O gênero *Callistemon* consiste em cerca de 34 espécies em todo o mundo. Estudos fitoquímicos de diversas espécies de *Callistemon* revelaram a presença de diferentes monoterpenos e flavonóides. As espécies desse gênero são usadas para silvicultura, produção de óleo essencial, plantações de árvores agrícolas, recuperação de terras degradadas e como bioindicadores para gestão ambiental e horticultura ornamental, entre outras aplicações (SPENCER; LUMLEY, 1991).

Callistemon viminalis, conhecida popularmente por escova-de-garrafa (Figura 5), pertence à família Myrtaceae. É amplamente distribuída, sendo mais prevalente na Ásia tropical, Austrália, Sri Lanka, América do Sul e Índia (ABDELHADY; MOTAAL; BEERHUES, 2011; SRIVASTAVA et al., 2003). É mais comum ao longo dos cursos de água, onde formam arbustos ou uma pequena árvore de até 8m de altura; porém, espécimes de até 18m também foram registrados. Essa árvore é extremamente adaptável ao cultivo, e para que se tenham melhores resultados, deve ser plantada em terra úmida e drenada com incidência solar total ou parcial (KUMAR et al., 2011). É uma planta medicinal importante para o tratamento de dores de estômago, infecções dérmicas e respiratórias (ADONIZIO et al., 2006). Alguns dos constituintes do seu óleo essencial são os compostos 1,8-cineol, limoneno, α -terpineol e α -pineno (LUNGUINHO et al., 2021).



Figura 5. *Callistemon viminalis*. Fonte: Do autor (2022).

Entre os vários usos dessa espécie, pode ser relatada ação inseticida contra *Ephesia kuehniella* (GHASEMI et al., 2014), atividade antioxidante e hepatoprotetora (ELDIB; ELSHENAWY, 2008), além de propriedades antitrombinas (CHISTOKHODOVA et al., 2002). *C. viminalis* é comestível, e rotineiramente são feitos chás com suas folhas (ZUBAIR et al., 2013).

Além disso, os seus frutos, cascas e folhas já demonstraram atividades moluscicidas contra caramujos *Biomphalaria* (GOHAR et al., 2014).

O óleo essencial das folhas das plantas da espécie *C. citrinus* foi testado em fêmeas e machos adultos de *Callosobruchus macullatus* para verificar efeitos inseticidas e repelentes sobre essa espécie. Os resultados mostraram que 1,8-cineol (34,2%) e α -pineno (29,0%) foram os principais componentes do óleo, que foi considerado tóxico para insetos adultos quando aplicado por fumigação. Os valores de CL_{50} foram de 12,88 e 84,4 $\mu\text{L/L}$ para machos e fêmeas, respectivamente, e um aumento no tempo de exposição de 3 para 24h causou um aumento na mortalidade de 50% para 100% nos machos e de 15,5% para 85,2% nas fêmeas, na concentração mais alta (500 $\mu\text{L/L}$). O óleo essencial também apresentou efeito repelente contra *C. macullatus* (ZANDI-SOHANI; HOJJATI; CARBONELL-BARRACHINA, 2013).

Relato na literatura também comprova atividade acaricida significativa da espécie *C. viminalis* contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* ($CL_{50} = 8,936 \mu\text{L/mL}$) e efeito repelente até 1h após aplicação contra adultos em jejum de *R. sanguineus* s.l. Os resultados encontrados nesse trabalho sugeriram que a toxicidade do óleo essencial de *C. viminalis* para essas espécies de carrapatos pode ocorrer via inibição da acetilcolinesterase, sendo considerado uma alternativa promissora no controle desses ectoparasitos (LUNGUINHO et al., 2021).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de *Satureja montana* L. e *Callistemon viminalis* na morfologia do ovário de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus*.

3.2. Objetivos Específicos

1. Analisar, após a exposição a diferentes concentrações dos óleos essenciais de *S. montana* L. e *C. viminalis*, diluídos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, a morfologia do ovário de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* por meio de técnica histológica de rotina.

2. Mensurar, por meio de análise morfométrica o tamanho dos ovócitos das fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* expostas a diferentes concentrações do óleo essencial de *S. montana* L. diluído em DMSO 10%.

3. Determinar, por meio de análise morfométrica, possíveis diferenças na área ocupada pelo núcleo dos ovócitos e por regiões de vacuolização citoplasmática, bem como no tamanho dessas células, em fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* expostas a diferentes concentrações do óleo essencial de *C. viminalis* diluído em DMSO 10%.

4. Classificar os possíveis efeitos tóxicos observados no ovário dos carrapatos expostos a diferentes concentrações do óleo essencial de *S. montana* L. e *C. viminalis*, diluídos em DMSO 10%, a partir de um protocolo de análise semiquantitativa baseado no grau de importância e na extensão das alterações nos tecidos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, R. Z. et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**. v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 2014.
- ABDELHADY, M. I. S.; MOTAAL, A. A.; BEERHUES, L. Total phenolic content and antioxidant activity of standardized extracts from leaves and cell cultures of three *Callistemon* species. **American Journal of Plant Sciences**. v. 02, n. 06, p. 847–850, 2011.
- ADENUBI, O. T. et al. In vitro bioassays used in evaluating plant extracts for tick repellent and acaricidal properties: A critical review. **Veterinary Parasitology**, v. 254, n. March, p. 160–171, 2018.
- ADONIZIO, A. L. et al. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 3, p. 427–435, 2006.
- ALIM, M. A. S. et al. Prevalence of hemoprotozoan diseases in cattle population of Chittagong division, Bangladesh. **Pakistan Veterinary Journal Pak**, p. 221–224, 2012.
- AMIRAT, N. S; TEBBOUB, M. S. Insecticidal effects of chemotyped essential oils of two aromatic plants *Lavandula stoechas* and *Origanum glandulosum* from the Jijel region. **Année Internationale des Forets**, p. Available from: <http://www.rencontre-medsuber.com/>. 2011.
- ANDREOTTI, R. et al. *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) as a Potential New Alternative for the Mitigation of Tick Infestation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 3, n. 4, p. 3–7, 2014.
- ANDRÉS, M. F. et al. Nematicidal activity of essential oils: A review. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 371–390, 2012.
- ANHOLETO, L. A. et al. Morphological alterations in the ovaries of *Amblyomma cajennense* semi-engorged ticks exposed to ethanolic extract of *Acmella oleracea*. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 11, p. 1347–1357, 2018.
- ARSHAD, Z. et al. Role of Essential Oils in Plant Diseases Protection: A Review. **International Journal of Chemical and Biochemical Sciences**, v. 6, p. 11–17, 2014.

ASLAN, I.; et al. Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bremisia tabaci* Genn. **Industrial Crops and Products is an International Journal**. 19, 167–173. 2004.

AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of Bovine anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, n. 1, p. 1–30, 2011.

BAGORA, B. Study of the antioxidant, anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-migratory properties of essential oils of some medicinal plants in Burkina Faso on cell lines of prostate cancer and glioblastomas. [Dissertation] University of Koudougou, Burkina Faso, p. 141, 2014.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BARBIERI, N. et al. Effect of cyclodextrins and Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) chemotypes on the microencapsulation of essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 121, n. April, p. 114–123, 2018.

BARIŞ, Ö. et al. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). **Turkish Journal of Biology**, v. 30, n. 2, p. 65–73, 2006.

BENCHEQROUN, H. K. et al. Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. **Bulletin de la Societe Royale des Sciences de Liege**, v. 81, p. 4–21, 2012.

BENELLI, G. R. et al. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? **Parasitology Research**, v. 115, n. 7, p. 2545–2560, 2016.

BENELLI, G. R. et al. Commentary: making green pesticides greener? The potential of plant products for nanosynthesis and pest control. **Journal of Cluster Science**, p. 3–16. 2017.

BENELLI, G. R.; PAVELA, R. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks—A systematic review. **Acta Tropica**, v. 179, n. December 2017, p. 47–54, 2018.

BENELLI, G. R. et al. The crop-residue of fiber hemp cv. Futura 75: from a waste product to a

source of botanical insecticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 11, p. 10515–10525, 2018a.

BENELLI, G. R. et al. Acute and sub-lethal toxicity of eight essential oils of commercial interest against the filariasis mosquito *Culex quinquefasciatus* and the housefly *Musca domestica*. **Industrial Crops and Products**, v. 112 b, n. November 2017, p. 668–680, 2018b.

BOURKHISS, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of different parts of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters of Morocco. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, p. 141–154, 2010.

BRAZ, V. et al. Inhibition of energy metabolism by 3-bromopyruvate in the hard tick *Rhipicephalus microplus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 218, n. December 2018, p. 55–61, 2019.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F. et al. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 18, n. 4, p. 44–48, 2009.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. Chemistry and bioactivity of essential oils. **Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents (UK)**. 2010.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. et al. Deltamethrin as inductor agent of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental and Applied Acarology** 72. pp. 161-169, 10.1007/s10493-017-0144-8. 2017.

CANTRELL, C. L.; DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 6, p. 1231–1242, 2012.

CETIN, H. et al. Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and gamma-terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. 170, 287–290. 2010.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) - CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/ticks/index.html>. 2017.

CHISTOKHODOVA, N. et al. Antithrombin activity of medicinal plants from central Florida. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 277–280, 2002.

CHORIANOPOULOS, N. et al. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: Chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8261–8267, 2004.

COLWELL, D. D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 14–21, 2011.

CUNHA, A. P. R.; ROQUE, O. Plantas Aromáticas em Portugal Caracterização e Utilizações. **Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa**, 2007.

DANTAS-TORRES, F. Species Concepts: What about Ticks? **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1017–1026, 2018.

DANTAS-TORRES, F. et al. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 6, 2019.

DE CASTRO, J. J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 2–3, p. 77–97, 1997.

DE MELLO, I. N. K.; DA SILVEIRA, W. F. Resíduos de agrotóxicos em produtos de origem animal. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 2, p. 94–104, 2012.

DE MENEGHI, D. F. S. Experiences in Tick Control by Acaricide in the Traditional Cattle Sector in Zambia and Burkina Faso: Possible Environmental and Public Health Implications. **Frontiers in Public Health** v. 4, n. November, p. 1–11, 2016.

DE SOUZA, N. R. D. et al. Sugarcane ethanol and beef cattle integration in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, n. p. 448–457, 2019.

DENARDI, S. E; et al. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics

in the *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) **Veterinary Parasitology**, 125, pp. 379-395. 2004.

DENARDI, S. E. et al. Inhibitory action of neem aqueous extract (*Azadirachta indica* A. Juss) on the Vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. **Microscopy Research and Technique**. 74, 889–899. <https://doi.org/10.1002/jemt.20973>. 2011.

DJENANE, D. et al. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. **Food Control Journal**, v. 22, n. 7, p. 1046–1053, 2011.

DUCORNEZ, S. et al. Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 3–4, p. 285–292, 2005.

DUNKIČ, V. et al. Chemotaxonomic and micromorphological traits of *Satureja montana* L. and *S. subspicata* Vis. (Lamiaceae). **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, n. 12, p. 2825–2842, 2012.

DZEMO, W. D.; THEKISOE, O.; VUDRIKO; P. Development of acaricide resistance in tick populations of cattle: A systematic review and meta-analysis. **Heliyon**. Vol. 8, Issue 1, 2022.

EL-AKHAL, F. et al. Valorisation en tant que bioinsecticide de deux huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* cultivées au centre du Maroc. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 5, n. January, p. 2319–2324, 2014.

ELDIB, R.; ELSHENAWY, S. Phenolic constituents and biological activities of the aerial parts of *Callistemon viminalis*. **Molecules**. p. 223- 235., 2008.

ELGNDI, M. A. et al. Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja montana* L., *Coriandrum sativum* L. and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, n. March, p. 128–137, 2017.

ERDOGAN, E. A.; AYAS, D.; GOKSEN, G. In Vitro Phototoxicity and Antimicrobial Activity of Volatile Oil Obtained from Some Aromatic Plants. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 20, n. 3, p. 758–768, 2017.

ESTRADA-PENÃ, A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology, **Revue scientifique et technique**. Off. Int. Epiz., v. 34, n.1, p.53-65, 2015.

ETOU OSSIBI, A. W. et al. Chemical composition and diuretic potential of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf. (Poaceae) in the mouse. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 13, n. 6, p. 2777, 2020.

FARAHANI, S.; BANDANI, A.; AMIRI, A. Toxicity and repellency effects of three essential oils on two populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Persian Journal of Acarology**. 9, 67–82, 2020.

FARIA, J. M. S. et al. Nematotoxic and phytotoxic activity of *Satureja montana* and *Ruta graveolens* essential oils on *Pinus pinaster* shoot cultures and *P. pinaster* with *Bursaphelenchus xylophilus* in vitro co-cultures. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 59–65, 2015.

FARIA, J. M. S. et al. Bioactivity of *Ruta graveolens* and *Satureja montana* Essential Oils on *Solanum tuberosum* Hairy Roots and *Solanum tuberosum* Hairy Roots with *Meloidogyne chitwoodi* Co-cultures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 40, p. 7452–7458, 2016.

FERNÁNDEZ-SALAS, A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; ALONSO-DÍAZ, M. A. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3–4, p. 338–342, 2012.

FERNANDEZ, C. M. M. et al. Essential oil and fractions isolated of Laurel to control adults and larvae of cattle ticks. **Natural Product Research**, v. 34, n. 5, p. 731–735, 2020.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, n. April, p. 152–163, 2008.

FURLONG, J. Controle dos carrapatos dos bovinos na região sudeste do Brasil. **Caderno da escola de veterinária UFMG**. Belo Horizonte, v. 8, p. 49–61, 1993.

GHASEMI, V. et al. Effect of essential oils from *Callistemon viminalis* and *Ferula gummosa* on toxicity and on the hemocyte profile of *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 47, n. 3, p. 268–278, 2014.

GOHAR, A. A. et al. Molluscicidal Activity of the Methanol Extract of *Callistemon viminalis* (Sol. ex Gaertner) G. Don ex Loudon Fruits, Bark and Leaves against *Biomphalaria alexandrina* Snails. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 7–11, 2014.

GRISI, L. et al., Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. v. 23, p. 150–156, 2014.

HASS, J. Isolamento e avaliação biológica de compostos fenólicos de espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

HIGA, L. O. S. et al. Effects of cypermethrin, chlorpyrifos and piperonyl butoxide-based pour-on and spray acaricides on controlling the tick *Rhipicephalus microplus*. **Systematic & Applied Acarology**. 2019.

HOMER, M. J. et al. Babesiosis. **Clinical microbiology**, v. 13, n. 3, p. 451–469, 2000.

HURTADO, O. J. B; GIRALDO-RÍOS, C. Economic and health impact of the ticks in production animals. **Ticks and tick-borne pathogens**, 2018.

IANNARELLI, R. et al. Aniseed (*Pimpinella anisum* L.) essential oil reduces pro-inflammatory cytokines and stimulates mucus secretion in primary airway bronchial and tracheal epithelial cell lines. **Industrial Crops and Products**, v. 114, n. January, p. 81–86, 2018.

INPN (Inventaire National du Patrimoine Naturel). Disponível em: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/120908?lg=en. 2003.

ISMAN, M. B.; MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. Chapter 2. **Advances in Phytomedicine**, v. 3, n. C, p. 29–44, 2006.

ISMAN, M. B. Pesticides based on plant essential oils: Phytochemical and practical considerations. **ACS Symposium Series**, v. 1218, p. 13–26, 2016.

ISO 2013. ISO (International Organization for Standardization) 9235:2013 - **Aromatic natural raw materials** - Vocabulary. International Organization for Standardization, Geneva, 2013.

ISO 2018. ISO (International Organization for Standardization) 4720:2018. **Essential oils** -

nomenclature. Geneva, 2018.

JAFARI, F.; GHAVIDEL, F.; ZARSHENAS, M. M. A Critical Overview on the Pharmacological and Clinical Aspects of Popular Satureja Species. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 9, n. 3, p. 118–127, 2016.

JAHANI, M.; PIRA, M.; AMINIFARD, M. H. Antifungal effects of essential oils against *Aspergillus niger* in vitro and in vivo on pomegranate (*Punica granatum*) fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 264, p. 109188, 2020.

JHALA, J.; BALODA, A. S.; RAJPUT, V. S. Role of bio-pesticides in recent trends of insect pest management: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. 9(1): 2237-2240. 2020.

JONSSON, N. N.; MATSCHOSS, A. L. Attitudes and practices of Queensland dairy farmers to the control of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Australian veterinary journal**, v. 76, n. 11, p. 746–751, 1998.

JULIANI, H. R. et al. Essential Oils from Argentinean Aromatic Plants. **Acta Horticulturae**. p. 491-498, 2004.

KEMAL, J. et al. In Vitro Acaricidal Activity of Selected Medicinal Plants Traditionally Used against Ticks in Eastern Ethiopia. **Journal of Parasitology Research**, 2020.

KHATER. H. Prospects of botanical biopesticides in insect pest management. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, n. July, 2012.

KLOTZ, J. H.; KLOTZ, S. A.; PINNAS, J. L. Animal Bites and Stings with Anaphylactic Potential. **Journal of Emergency Medicine**, v. 36, n. 2, p. 148–156, 2009.

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**, v. 10, n. 4, p. 766–774, 2019.

KONIG, I. F. M. et al. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological

damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 129, p. 102780, 2020.

KREMER, D. et al. Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Satureja montana* L. and *S. Subspicata* Vis. (Lamiaceae). **Current Drug Targets**, v. 16, n. 14, p. 1623–1633, 2015.

KUMAR, P. et al. A green approach for the synthesis of gold nanotriangles using aqueous leaf extract of *Callistemon viminalis*. **Materials Letters**, v. 65, n. 4, p. 595–597, 2011.

LABRUNA, M. B. et al. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2016.

LAWRENCE, B. M. A planning scheme to evaluate new aromatic plants for the flavour and fragrance industries. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. In: J. Jan, 1993.

LEREBOUR, G.; LARTAUD, P.; LACTROIX, B. Cosmetic Use of a Geraniol-rich Essential Oil of *Satureja montana*. **As Deodorant Active Agent**, 2016.

LUBBE, A.; VERPOORTE, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 785–801, 2011.

LUNGUINHO, A. da Silva et al. Acaricidal and repellent activity of the essential oils of *Backhousia citriodora*, *Callistemon viminalis* and *Cinnamodendron dinisii* against *Rhipicephalus* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 1, p. 1, 2021.

MADHUMITHA, G. et al. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding parasites. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 2189–2199, 2012.

MARCHESINI, P. et al. Activity of the extract of *Acmella oleracea* on immature stages of *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 254, n. March, p. 147–150, 2018.

MARTINS, R. Estudo in vitro da ação acaricida do óleo essencial da gramínea Citronela de Java

(*Cymbopogon winterianus* Jowitt) no carrapato *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.3, n.1, 2006.

MILOS, M. et al. Localities and seasonal variations in the chemical composition of essential oils of *Satureja montana* L. and *S. cuneifolia* Ten. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 3, p. 157–160, 2001.

MINHO, A. P. et al. In vitro screening of plant extract on *Haemonchus contortus* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Journal of Essential Oil Research**, p. 1–10, 2020.

MIRJANA, S.; NADA, B. Chemical composition and antimicrobial variability of *Satureja montana* L. essential oils produced during ontogenesis. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 4, p. 387–391, 2004.

MUÑOZ-LEAL, S. et al. Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: Ornithodoros) associated with stream-breeding frogs (Anura: Cycloramphidae: Cycloramphus) in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 5, p. 682–692, 2017.

MURRELL, A.; CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S. C. Phylogenetic analyses of the Rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2000.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 169–172, 2003.

MWANGI, E. N. et al. Repellence of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* by the grass *Melinis minutiflora*. **Tropical animal health and production**, 211-216. 1995.

NADIO, N. A. et al. Insecticidal properties and repellent of essential oil of *Ocimum sanctum* L. to *Dysdercus voelkeri* Schmidt (Heteroptera; Pyrrhocoridae). **Sci Vie de la Terre Agronomie**, p. 65–72, 2015.

NANA, P. et al. Efficacy of spot-spray application of *Metarhizium anisopliae* formulated in emulsifiable extract of *Calpurnia aurea* in attracting and infecting adult *Rhipicephalus appendiculatus* ticks in semi-field experiments. **Journal of Pest Science**, v. 88, n. 3, p. 613–619,

2015.

NANA, P. et al. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* with *Calpurnia aurea* leaf extracts and virulence against *Rhipicephalus pulchellus*. **Journal of Applied Entomology**, v. 140, n. 8, p. 590–597, 2016.

NAVA, S. et al. Description of a New Argasid Tick (Acari : Ixodida) from Bat Caves in Brazilian Amazon description of a new argasid tick (Acari : Ixodida) from bat caves in brazilian amazon. **Journal of Parasitology**. v. 96, n. 6, p. 1089–1101, 2010.

NEIRA, L. F.; STASHENKO, E.; ESCOBAR, P. Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. **Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud**, v. 46, n. 1, p. 15–22, 2014.

OGENDO, J. O. et al. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, n. 4, p. 328–334, 2008.

OLIVEIRA, P. R. et al. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy research and technique**, v. 79, n. 8, p. 744–753, 2016.

OLIVEIRA, P. R. et al. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks: Ultra-structural evaluation. **Acta Tropical**, 166, pp. 139-154, 10.1016/j.actatropica.2016.11.017. 2017.

OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 546–555, 2011.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 897–928, 2001.

PELLEGRINI, M. et al. Characterization of essential oils obtained from *Abruzzo autochthonous* plants: Antioxidant and antimicrobial activities assessment for food application. **Foods**, v. 7, n. 2,

2018.

PENHA, T. et al. Effects of acaricidal essential oils from *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their main components on vitellogenesis in *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 299, n. March, 2021.

PÉREZ DE LEÓN, A. A.; MITCHELL, R. D.; WATSON, D. W. Ectoparasites of Cattle. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 173–185, 2020.

PIRALI-KHEIRABADI, K.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. *Lavandula angustifolia* essential oil as a novel and promising natural candidate for tick (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus*) control. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 184–186, 2010.

PIRES, H. C. et al. Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e flores de *Callistemon viminalis* (sol. ex gaertn.) G. Don ex. Loudon (Myrtaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 597–601, 2013.

POLITI, F. A. S. et al. Evaluation of *Tagetes patula* (Asteraceae) as an ecological alternative in the search for natural control of the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 77, n. 4, p. 601–618, 2019.

POWERS, C. N. et al. Antifungal and cytotoxic activities of sixty commercially-available essential oils. **Molecules**, v. 23, n. 7, 2018.

QUEIROZ, V. T. et al. 1,8-cineole and castor oil in sodium lauryl ether sulphate disrupt reproduction and ovarian tissue of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 34, n. 3, p. 316–326, 2020.

RADONIC, A.; MILOS, M. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Satureja montana* L. **Free Radical Research**, v. 37, n. 6, p. 673–679, 2003.

RADÜNZ, M. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum* L.) essential oil. **Food Chemistry**, v. 276, p. 180–186, 2019.

RAJPUT, Z. et al. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock.

Journal of Zhejiang University SCIENCE B. v. 7, n. 11, p. 912–921, 2006.

REMEDIÓ, 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**, v. 114, n. 2, p. 431–444, 2014.

REY-VALEIRÓN, C. et al. Acaricidal effect of *Schinus molle* (Anacardiaceae) essential oil on unengorged larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 76, n. 3, p. 399–411, 2018.

REZENDE, D. A. C. S. et al. Repellent Effect on *Rhipicephalus sanguineus* and Inhibition of Acetylcholinesterase by Volatile Oils. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 470–476, 2021.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I. et al. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, 117(1), 3–29. doi:10.1007/s00436-017-5677-6. 2017.

ROSADO-AGUILAR, J. A. et al. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 3–4, p. 299–303, 2010.

SABATINI, G. A. et al. Tests to determine LC₅₀ and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 53–62, 2001.

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**, v. 129, n. 3–4, p. 299–311, 2005.

SALES, T. A. et al. Essential Oils from the Leaves and Flowers of *Callistemon viminalis*: Chemical Characterization and Evaluation of the Insecticide and Antifungal Activities. **American Journal of Plant Sciences**, v. 08, n. 10, p. 2516–2529, 2017.

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, v. 75, n. 5, p. 683–690, 2012.

SÁNCHEZ, C. et al. Alternative means to control postharvest blue mould decay of “Rocha” pears. **Acta Horticulturae**, v. 1144, p. 365–369, 2016.

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 98, n. 1–3, p. 89–109, 2001.

SANTOS SALES, V. et al. Antiparasitic activity and essential oil chemical analysis of the piper *Tuberculatum jacq* fruit. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 1, p. 268–275, 2018.

SAUER, R. L. M; BOWMAN, A. S.; ESSENBERG, R. C. **Tick salivary gland physiology**. 1995.

SENBILL, L. K. H. et al. Life cycle of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini 1888 (Acari : Ixodidae) under laboratory conditions **Systematic and Applied Acarology**, 23 (2018), pp. 1169-1179

SHAHEIN, Y. E. et al. Identification of four novel *Rhipicephalus annulatus* upregulated salivary gland proteins as candidate vaccines. **Protein Journal**, v. 32, n. 5, p. 392–398, 2013.

SHARMA, N.; SINGH, V. Comparative efficacy of commercial preparation of deltamethrin and cypermethrin against *Ornithodoros spp.* of North Gujarat Probit mortality. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 1139–1142, 2017.

SHARMA, N. et al. Comparative resistance status of Hyalomma ticks against Synthetic Pyrethroids (deltamethrin and cypermethrin) from Banaskantha, Gujarat, India Comparative resistance status of *Hyalomma anatolicum* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks against. **International Journal of Acarology**. v. 7954, 2018.

SILVA, F. V. M. et al. Phytochemical profile and anticholinesterase and antimicrobial activities of supercritical versus conventional extracts of *Satureja montana*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 24, p. 11557–11563, 2009.

- SILVA, T. F. et al. Bovine parasite sadness: Review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e15410111631, 2021.
- SILVA MATOS, R. et al. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research** vol. 113, pages 4555–4565. 2014.
- SIMAS, D. L. R. et al. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 98, p. 108–115, 2017.
- SOARES, C. et al. Inhibitory effect of essential oils on growth and on aflatoxins production by *Aspergillus parasiticus*. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, n. 4, p. 525–534, 2016.
- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136–141, 2012.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, MICHAEL. **Biology of ticks**. v. 2, p. 491, 2014.
- SPENCER, R. D; LUMLEY, P. F. “*Callistemon*”, em Flora of New South Wales. **Flora of New South Wales**. Callistemon, Vol. 2, New South Wales University Press, Sydney, 1991.
- SRIVASTAVA, S. K. et al. Essential oil composition of *Callistemon viminalis* leaves from India. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, n. 5, p. 361–363, 2003.
- TAHERKHANI, M. Anti Cancer, Cytotoxic Activity, Mutagenic and Anti-mutagenic Activities of *Artemisia aucheri* Essential Oil. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 18, n. 6, p. 1329–1337, 2015.
- TAK, J. H.; ISMAN, M. B. Acaricidal and repellent activity of plant essential oil-derived terpenes and the effect of binary mixtures against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. July, p. 786–792, 2017.
- TAPONDJOU, A. L. et al. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, n. 1, p. 91–102, 2005.

- TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasiticides. **Veterinary Journal**, v. 161, n. 3, p. 253–268, 2001.
- TEPE, B. Inhibitory effect of Satureja on certain types of organisms. **Records of Natural Products**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2015.
- TEPE, B.; CILKIZ, M. A pharmacological and phytochemical overview on Satureja. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 3, p. 375–412, 2016.
- THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Industrial Biotechnology**, v. pp. 194-20, 2006.
- TROUGHTON, D. R.; LEVIN, M. L. Life Cycles of Seven Ixodid Tick Species (Acari: Ixodidae) Under Standardized Laboratory Conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 5, p. 732–740, 2007.
- URQUHART, G. M, et al. **Parasitologia Veterinária**. 1998.
- USDA. (United States Department of Agriculture). v. Foreign Ag, 2014.
- UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H.; KERR, J. D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, n. 4, p. 885–895, 1978.
- VALENTE, P. P. et al. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 113, n. 1, p. 417–423, 2014.
- VANNIER, E.; KRAUSE, P. J. Update on Babesiosis. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p. 1–9, 2009.
- VILLARREAL, J. P. et al. Evaluation of phytotherapy alternatives for controlling *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in vitro. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 299–306, 2017.
- WAN, J. et al. Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential

oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. **Food Chemistry**, v. 291, n. April, p. 199–206, 2019.

WASSERMANN, M. et al. Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 768–771, 2016.

WEBSTER, A. et al. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary Parasitology**. Vol. 207, Issues 3–4, Pages 302–308. 2015.

WERKA, J. S; BOEHMEB, A. K.; SETZER, W. M. Biological Activities of Essential Oils from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communications**, v. 2, p. 1215–1219, 2007.

WILLADSEN, P. Tick control: Thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1–2, p. 161–168, 2006.

XAVIER, M. A. et al. A proteomic insight into vitellogenesis during tick ovary maturation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

YADAV, R. et al. Differential larval toxicity and oviposition altering activity of some indigenous plant extracts against dengue and *Chikungunya* vector *Aedes albopictus*. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v. 8, n. 2, p. 174–185, 2014.

ZANDI-SOHANI, N.; HOJJATI, M.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. Insecticidal and Repellent Activities of the Essential Oil of *Callistemon citrinus* (Myrtaceae) Against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 1, p. 89–94, 2013.

ZAKARIYA, I. et al. Acute diuretic activity of the aqueous ethanol root extract of *Corrigiola telephiiifolia* pourr. In rats. **Pharmacognosy Journal**, v. 12, n. 6, p. 1552–1558, 2020.

ZUBAIR, M. et al. Antioxidant potential and oil composition of *Callistemon viminalis* leaves. **The Scientific World Journal**. 2013.

Parte II

Artigo “Cytotoxic effects of *Satureja montana* L. essential oil on oocytes of engorged
Rhipicephalus microplus female ticks (*Acari: Ixodidae*)”

Publicado na revista *Microscopy Research and Technique*

DOI: 10.1002/jemt.23693.

ISSN:1097-0029 Classificação: B1 JCR: 2.769

Cytotoxic effects of *Satureja montana* L. essential oil on oocytes of engorged *Rhipicephalus microplus* female ticks (Acari: Ixodidae)

Aline Chaves Reis¹, Isaac Filipe Moreira König², Danúbia Aparecida de Carvalho Selvati Rezende², Raquel Romano Palmeira Gonçalves³, Allan da Silva Lunguinho², Jenifer Caroline Silva Ribeiro⁴, Maria das Graças Cardoso² e Rafael Neodini Remedio^{1*}

¹Department of Health Sciences, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil

²Department of Chemistry, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil

³Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil

⁴Department of Animal Science, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil

*Corresponding Author at: Federal University of Lavras (UFLA), Av. Dr. Sylvio, Menicucci, 1001, Department of Health Sciences, Lavras, MG, Brazil. E-mail address: rafael.remedio@ufla.br.

Highlights

The essential oil of *Satureja montana* L. affects the ovary morphology of the cattle tick.

The main morphological alterations found were cytoplasmic vacuolation, irregular and thicker chorion and irregular oocyte shape.

These alterations may impair the development of eggs.

ABSTRACT

In addition to pesticidal activity, the capacity of natural compounds to inhibit the reproduction of parasites emerge as an important alternative tick control method. In this context, *Satureja* spp. stand out due to their recognized pesticidal properties. Among parasites of veterinary importance, the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, is responsible for great economic losses in livestock and transmission of relevant pathogens. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of the essential oil of *Satureja montana* L. on the ovary morphology of *R. microplus* engorged females through histological and histochemical techniques. The most remarkable morphological changes found were: cytoplasmic vacuolation of germ cells, irregular and thicker chorion, irregular oocyte shape, ring-shaped nucleolus, decrease in protein and carbohydrate content in oocytes, in addition to cellular changes in the oviduct and pedicel. All morphological changes were assessed using a semiquantitative method already established in the literature. Ticks exposed to 5,0 $\mu\text{L/mL}$ of essential oil showed the most significant changes when compared to control groups. Thus, the essential oil of *S. montana* L. damaged the reproductive system of *R. microplus*, which may impair ticks offspring production and promote a long term control of this species.

Keywords: Cattle tick. Essential oil. Ovary Morphology. *Satureja montana* L. Tick control.

1. INTRODUCTION

Ticks are ectoparasites capable of infesting all classes of terrestrial vertebrates (SONENSHINE; ROE, 2014). Among various tick species, *Rhipicephalus microplus*, commonly known as cattle tick, is considered one of the most important threats to livestock activity in tropical and subtropical areas of the world, particularly in Brazil (DE CLERCQ et al., 2012; HIGA et al., 2015; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2017). In fact, it is estimated that infestation by this tick species leads to annual economic losses of 3.24 billion dollars in Brazil (GRISI et al., 2014) due to weight loss, decreased production of milk and meat, spoliation of blood and transmission of pathogens (JONSSON, 2006).

The main current tick control method is based on the use of synthetic acaricides (GUERRERO et al., 2012). However, the prolonged or inappropriate use of these chemicals accelerates the selection of resistant individuals (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2011). In addition, these compounds are relatively expensive, require specialized handling and can accumulate in the environment (ABBAS et al., 2014; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2017; TSABOULA et al., 2016). For these reasons, there is a need for further research on practical and ecologically appropriate methods for tick control (PAVELA et al., 2016). In fact, plant extracts and essential oils can replace or even be used in combination with synthetic acaricides (ADENUBI et al., 2018; BORGES et al., 2011). Natural compounds are advantageous due to their relatively low cost, faster degradation, and easier handling. Additionally, these compounds are generally less toxic to the environment, humans and other animals when compared to synthetic compounds (TAK; ISMAN, 2017). Finally, products extracted from plants have reduced potential for the selection of resistant tick strains, since they are usually formed by different substances that act synergistically (ROSADO-AGUILAR et al., 2010).

The genus *Satureja* (Lamiaceae) comprises various species, located mainly in the eastern part of the Mediterranean (DUNKIĆ et al., 2012; SERRANO et al., 2011). Several studies have reported the biocidal properties of *Satureja* spp. extracts, as well as the similarity in their chemical constitution (Table 1). Among these species, *Satureja montana* L., popularly known as winter savory or mountain savory, stands out as an aromatic and medicinal plant with several biological

activities, being used in the food industry as flavoring, in the manufacture of liqueurs and in perfumery (PICCAGLIA et al., 1991). In the pharmacological industry, its essential oil is particularly used due to the presence of monoterpenes, such as thymol and carvacrol, in addition to other phenols. These compounds have antioxidant (OLIVEIRA et al., 2012), antimicrobial (OLIVEIRA et al., 2011), repellent and acaricidal effects (PEREIRA-JUNIOR et al., 2019; TABAN et al., 2017).

Plant extracts and essential oils can also be used for long-term control of tick infestations as they may affect the morphophysiology of organs particularly important for tick survival (CAMARGO-MATHIAS, 2018). Among these organs, the ovary is crucially important since exposure to phytoacaricides may impair offspring production (LIMA DE SOUZA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2016). Considering that a single female of *R. microplus* is capable of laying thousands of eggs (TROUGHTON; LEVIN, 2007), the reproductive control of this ectoparasite through natural compounds emerge as a promising alternative to mitigate tick infestation. Finally, although *S. montana* L. and other *Satureja* spp. are well known for their pesticidal activities, the effects of their essential oils on the reproductive system of ectoparasites have never been assessed.

Thus, the present study aimed to evaluate the morphological effects of the essential oil of *S. montana* L. on the ovary of engorged *R. microplus* female ticks. Histological sections of the ovaries were analyzed through conventional light microscopy using histological and histochemical techniques. Morphological changes were assessed using morphometry and a semiquantitative analysis protocol established in the literature.

Table 1. Chemical constitution and insecticidal and acaricidal activities of some species of the genus *Satureja* sp.

Species	Plant parts	Major constituents	Biological activity	References
<i>Satureja thymbra</i> L.	Aerial part/ Flowering aerial part	Carvacrol and γ -terpinene	Acaricidal effects against <i>Hyalomma marginatum</i> / Insecticidal effects against <i>Culex pipiens</i> .	Cetin et al., 2010 Michaelakis et al., 2007
<i>Satureja montana</i> L.	Flowering aerial parts	Carvacrol, <i>p</i> -cimene, timol, carvacrol methyl ether and γ - terpinene	Larvicidal effects against <i>Culex quinquefasciatus</i> Insecticidal effects against <i>Trialeurodes</i> <i>vaporariorum</i> . Insecticidal effects against <i>Culex pipiens</i>	Benelli et al., 2017 Šućur et al., 2015 Michaelakis et al., 2007
<i>Satureja hortensis</i> L.	Leaves/ Aerial part	Carvacrol, timol and γ -terpinene	Feeding inhibitory effect on larvae of <i>Glyphodes</i> <i>pyloalis</i> Walker Insecticidal effects against <i>Callosobruchus</i> <i>maculatus</i> Insecticidal effects against <i>Tribolium castaneum</i> , <i>Ephestia kuehniella</i> and <i>Plodia interpunctella</i> Insecticidal effects against <i>Bruchus dentipes</i>	Yazdani et al., 2013 Heydarzade and Moravvej, 2012 Maedeh et al., 2011 Tozlu et al., 2011
<i>Satureja spinosa</i>	Aerial part before flowering	Timol, carvacrol, <i>p</i> - cimene and γ -terpinene	Insecticidal effects against <i>Culex pipiens</i> .	Maedeh et al., 2011
<i>Satureja parnassica</i> <i>ssp. Parnassica</i>	Aerial part before flowering	Timol, carvacrol, <i>p</i> - cimene and γ -terpinene	Insecticidal effects against <i>Culex pipiens</i> .	Maedeh et al., 2011
<i>Satureja khuzestanica</i>	Aerial part	Carvacrol, timol, linalool and borneol	Insecticidal effects against <i>Tribolium castaneum</i>	Taban et al., 2017
<i>Satureja bachtiarica</i> <i>Satureja rechingeri</i>	Aerial part Aerial part	Carvacrol and mircene Carvacrol, <i>p</i> -cimene and γ -terpinene	Insecticidal effects against <i>Tribolium castaneum</i> Insecticidal effects against <i>Tribolium castaneum</i>	Taban et al., 2017 Taban et al., 2017

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Obtaining the essential oil of *Satureja montana* L.

The essential oil of *Satureja montana* L. was obtained in the Laboratory of Organic Chemistry at Federal University of Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brazil. For the experiment, leaves of *S. montana* L. were purchased at the Belo Horizonte Municipal Market, Minas Gerais – Brazil, in July 2018.

The dried leaves were packed in a paper bag and kept in the absence of light at room temperature until extraction of the essential oil. The leaves were identified and used for the extraction of essential oil by hydrodistillation, using a modified Clevenger apparatus adapted to a round-bottomed flask with a capacity of 6 liters, for 2h. The hydrolate was centrifuged in a horizontal crosshead centrifuge (Fanem Baby I Model 206 BL), at 965.36g for 15 minutes. The essential oil was collected with a Pasteur pipette and placed in a glass bottle. Subsequently, the bottle containing the essential oil was wrapped with aluminium foil and stored under refrigeration until experimental analysis.

2.2. Chemical characterization of the essential oil of *Satureja montana* L.

The chemical components present in the essential oil were identified by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS), using a Shimadzu apparatus, model QP 5050A. Conditions: fused silica capillary column (30 mx 0.25 mm) with DB5 bonded phase (5% phenyl, 95% dimethylpolysiloxane) (0.25 µm film thickness). The carrier gas used was helium, with an outflow of 1.0 mL/min. The volume of the injected sample was 0.1 µL, diluted in hexane. The partition rate was 1:20 and a column pressure of 71.0 kPa. The oven temperature was programmed to 60°C, 1 min, increase to 246°C (3° C/min), then 10°C up to 300°C, for 7 min. The injector and detector temperature were 220°C and 240°C, respectively. The conditions of the mass spectrometer were: scan detector 1,000; scan interval of 0.50 fragments and fragments detected in the range of 45 to 500 Da. For the purpose of comparing the constituent retention indices, data from the literature were used (ADAMS, 2017). The retention index was adapted to the equation of

Van den Dool and Kratz (1963) in relation to a homologous series of n-alkanes (nC₉-nC₁₈). Two libraries NIST107 and NIST21 were also used to compare the spectra.

Quantitative analyzes were performed by gas chromatography using a flame ionization detector (FID), Shimadzu CG-17A. The conditions of analysis were as used for GC-MS and the quantification of each constituent was obtained through the normalization of areas (%).

2.3. *Rhipicephalus microplus* ticks

Engorged *R. microplus* females were manually collected from naturally infested cattle in the municipality of Nepomuceno (Latitude: 21° 12' 40" South, Longitude: 45° 13' 46" West), state of Minas Gerais, southeastern Brazil. The cattle had no contact with acaricides for at least 30 days prior to the experiment. The ticks were washed in a sieve under tap water, dried on absorbent paper and analyzed under a stereomicroscope (Opticam OPZTS) in order to exclude ticks with any physical deformity. Ticks with normal phenotypic characteristics were weighed and selected for the experiment.

2.4. Adult Immersion Test

The Adult Immersion Test was performed according to the methodology proposed by Drummond et al. (1973). This experiment was carried out in the Laboratory of Parasitic Diseases at UFLA, Minas Gerais, Brazil. For the experiment, 100 *R. microplus* engorged females were randomly divided into five experimental groups. In the control group I (CI), ticks were exposed to distilled water, whereas in the control group II (CII) the animals were exposed to the solvent, 10% DMSO solution. In the treatment groups, the ticks were treated with the following concentrations of the essential oil of *S. montana* L. diluted in 10% DMSO solution: 3,0 µL/mL (TI), 4,0 µL/mL (TII) and 5,0 µL/mL (TIII). For each group, the ticks were immersed for five minutes in beakers containing 20 mL of each solution described above, both for the control groups and for the treatments. Subsequently, the ticks were dried on absorbent paper, placed in Petri dishes at room temperature and observed daily for seven days, as suggested by Oliveira, Bechara and Camargo-

Mathias (2008). At the end of seven days, five ticks that remained alive in each group were randomly selected for histological analysis.

2.5. Histological and Histochemical analysis

This experiment was conducted in the Laboratory of Cytology and Histology at UFLA, Minas Gerais, Brazil. For the experiments, ticks were dissected in Petri dishes using buffered saline solution (NaCl 0.13M, Na₂HPO₄ 0.017M, KH₂PO₄ 0.02M, pH 7.2), under a stereomicroscope (Opticam OPZTS), to collect ovaries. Then, the samples were fixed in 4% paraformaldehyde solution for 72 hours and transferred to 70% ethanol solution. The ovaries were then dehydrated in a gradual series of ethanol (70, 80, 90 and 95%) for 20 minutes in each solution. Subsequently, the material was embedded in *Leica* historesin for 24 hours at 4°C and transferred to plastic molds for inclusion.

After these procedures, a minimum of 24 histological sections (4 µm) of the ovaries were obtained for each sample using a microtome (Luptec MRP09) and distributed on four glass slides. Then, two glass slides for each sample were subjected to hematoxylin and eosin staining (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Additionally, one glass slide for each sample was subjected to Periodic acid-Schiff (PAS) technique (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) and bromophenol blue staining (PEARSE, 1985). Subsequently, the glass slides were dried and covered with Entellan® and coverslip. Then, the histological sections were examined and photographed using a trinocular image capture system (Olympus Optical Ltd. Brazil, São Paulo, SP, Brazil) and camera (SCOS Color for microscopy of light).

2.6. Semiquantitative and morphometric analysis

The semiquantitative analysis was performed according to the methodology proposed by König et al. (2019) and adapted by König et al. (2020). Each morphological change was previously classified according to an importance factor (w) ranging from 1 to 3 (KONIG et al., 2019, 2020). Lesions with w = 1 correspond to minimal and reversible changes, whereas those with w = 2 are considered moderate, generally reversible in most cases after neutralizing the stressor. Finally, serious changes, generally irreversible and that cause partial or total loss of organ function, were classified with w = 3. Furthermore, the extent of each change was classified by scores (α) ranging

from 0 to 5. Zero represents morphological features similar to control groups, whereas five means that the morphological alteration is present in more than 80% of the tissue. The index of each morphological alteration was given by the formula: $\text{Index}_{\text{alt}} = w \times \alpha$. For each individual, the sum of all $\text{Index}_{\text{alt}}$ values resulted in the individual index ($\text{Index}_{\text{ind}}$). Finally, the individual indices were compared statistically by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post-hoc* multiple comparison test ($\alpha < 0.05$), using Graph Pad Prism software (version 7.00).

For morphometric analysis, oocytes were first classified according to their stage of development (I-V), as described by Saito et al. (2005). Then, the cytoplasmic area of ten oocytes at each developmental stage was measured for each animal using the ImageJ (NIH) software. For the analysis of oocytes in immature stages (I, II and III), only those in which it was possible to observe the germinal vesicle (nucleus) were measured. For stages IV and V, the oocytes were randomly selected for measurements, since in these stages the germinal vesicle is rarely observed (BARBOSA et al., 2016). The data was compared by Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey's *post-hoc* test ($\alpha < 0.05$) using Graph Pad Prism software (version 7.00).

3. RESULTS

3.1. Chemical characterization of the essential oil of *Satureja montana* L.

The major constituents of the essential oil of *S. montana* L. found in the present study were camphene, *p*-cymene, borneol, γ -terpineol and carvacrol. The complete chemical composition of the oil is shown in Table 2.

3.2. Adult Immersion Test

Tick weights did not differ statistically ($p>0.05$). No mortality was observed in control groups after seven days of observation following Adult Immersion Test. The mortality rates for ticks submitted to sublethal concentrations of the essential oil of *S. montana* L. are listed in the Table 3.

Table 2 – Chemical composition of the essential oil of *Satureja montana* L.

Retention index	Chemical compounds	Percentage (%)
921	Tricyclene	0.2129
924	α -thujene	0.1065
932	α -pinene	3.1160
946	Camphene	5.3505
974	β -pinene	0.3428
1014	α -terpinene	0.2915
1020	<i>p</i>-cymene	9.5736
1024	Limonene	0.5580
1026	Eucalyptol	0.8958
1054	γ -terpinene	0.6151
1065	<i>Cis</i> -sabinene hydrate	0.1901
1095	Linalool	1.5852
1141	Camphor	1.2358
1165	Borneol	36.1825
1174	Terpinen-4-ol	2.0146
1199	γ-terpineol	12.6643
1283	Isobornyl acetate	1.7906
1298	Carvacrol	11.0739
1374	α -copaene	0.1515
1387	β -bourbonene	0.0922
1417	Trans β -caryophyllene	2.4136
1439	Aromadendrene	0.2160
1484	Germacrene D	0.1540
1513	γ -cadinene	0.3093
1522	δ -cadinene	0.3489
1577	Spathulenol	0.4706
1582	Caryophyllene oxide	1.3486
-	NIC	2.0416

*NIC – Non-identified compounds.

Table 3. Tick weight and percentage of alive and dead ticks seven days after the Adult Immersion Test.

Groups	Ticks			
	Total	Weight \pm SD (mg)	Dead (%)	Alive (%)
H₂O	20	181.1 \pm 0.3	0	100
DMSO	20	185.7 \pm 0.6	0	100
3,0 μL/mL	20	174.9 \pm 0.4	0	100
4,0 μL/mL	20	200.7 \pm 0.3	5	95
5,0 μL/mL	20	195.4 \pm 0.3	15	85

Average mass did not differ significantly (ANOVA, $p > 0.05$). SD = standard deviation.

3.3. Histological and Histochemical analysis

No significant differences were observed between the ovaries of individuals belonging to the control groups I and II. For this reason, a summary of the main morphological characteristics present in the ovaries of these groups were described together (Fig. 1A-B; Fig. 2A-B; Fig. 3A-B).

3.3.1. Control Groups I (H₂O) and II (DMSO 10%)

Oocyte I

Oocytes I are the smallest cells in the germline. These cells had their shape ranging from rounded to elliptical and homogeneously basophilic cytoplasm, without granulations. Nucleus was observed occupying about half of the cell and was centrally located. Nucleus and cytoplasm stained equally in purple and the nucleolus was rarely visualized. In bromophenol blue staining, a homogeneous distribution of proteins was observed in the cytoplasm of oocytes as well as for the pedicel cells and oviduct. Oocyte nucleus and nucleolus were weakly stained. In the PAS technique, oocytes I, pedicel and oviduct cells were difficult to visualize, indicating low concentrations of carbohydrates.

Oocyte II

These cells were larger than oocytes I. They exhibited cytoplasm with fine and slightly eosinophilic granulations. The nucleus was weakly stained by hematoxylin, with evident nucleolus. In bromophenol blue, the nucleus was weakly stained, whereas the nucleolus was easily visible. In addition, fine protein granulations were observed in the cytoplasm. For the presence of carbohydrates, these oocytes exhibited a pinkish colour in light tones evenly distributed throughout the cells.

Oocyte III

At this stage, chorion deposition begins as a thin, weakly basophilic layer. This oocyte was larger in size compared to the previous stages. About 10 to 20% of oocytes III contained regions that were not reactive to dyes in the basal portion of the cell. Larger and non-uniform yolk granules were observed; the smaller ones being located in the central part of the cell. Nucleus and nucleolus

showed similar staining pattern compared to oocyte II. However, the nucleus was located closer to the basal pole of oocytes III. For bromophenol blue and PAS technique, the larger granules showed more intense staining, indicating greater presence of proteins and carbohydrates, respectively.

Oocyte IV

Oocytes IV exhibited strongly eosinophilic cytoplasm, in addition to thicker chorion than in stage III. The yolk granules were larger. However, it was still possible to observe some smaller granules in the cytoplasm. For the presence of proteins, yolk granules presented more intense and homogeneous staining pattern compared to the previous stage. However, about 10% of all animals had small, unstained regions close to the chorion. Regarding the presence of carbohydrates, the same homogeneous staining pattern was evidenced by the PAS technique.

Oocyte V

These are the biggest cells of the germline. Oocytes V exhibited larger yolk granules, homogeneous in size and strongly eosinophilic. The chorion was completely deposited at this stage. In about 10% of the oocytes of two individuals, the chorion was slightly thicker than the others. Nucleus and nucleolus were not observed. Regarding the presence of proteins, very reactive and homogeneously stained yolk granules were observed. However, some yolk granules in the center of the cells showed slightly less intense staining. For the PAS technique, homogeneous distribution of carbohydrates was observed in the yolk granules, evidenced by intense and uniform pinkish colour.

3.3.2. Treatment Group I (3,0 µL/mL)

Ticks exposed to 3,0 µL/mL of the essential oil of *S. montana* L. showed several morphological changes in their ovaries when compared to individuals in the control groups (Fig. 1C-D). In all animals in this group, the epithelial cells of the oviduct as well as the pedicel were presented as a multiple and disorganized layer of cells. In these regions, which occupied between 40% and 60% of the analyzed samples, oocytes I were rarely observed. When present, they exhibited irregular shape. In addition, many cells of the epithelium in the oviduct were extensively vacuolated, with their nuclei having varied shape. Cytoplasmic vacuolation was present mainly in

oocytes III. These cells exhibited vacuoles occupying up to 40% of the cytoplasmic content. Four ticks presented fusion of about 20% of yolk granules. In addition, thicker and detached chorion was seen in approximately 20% of oocytes V of four ticks. Finally, vacuolated nucleolus was observed in oocytes I and II in about 20% of the ovary of 3 animals in this group. Regarding the protein and carbohydrate content, all animals showed non-uniform staining regions, especially in oocytes IV and V (Fig. 2C-D and Fig. 3C-D).

3.3.3. Treatment Group II (4,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$)

Ticks exposed to 4,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of the essential oil of *S. montana* L. showed morphological changes similar to those described in the previous group (Fig. 1E-F). Changes in oviduct morphology and cytoplasmic vacuolation were the most evident alterations. In addition, oocytes V with thicker chorion exhibited slightly smaller cytoplasmic vacuolation, demonstrating an inverse relationship between vacuolation and chorion thickening. Finally, the protein and carbohydrate contents were more affected, as evidenced by the increase in the heterogeneity of staining in the yolk granules (Fig. 2E-F and Fig. 3E-F).

3.3.4. Treatment Group III (5,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$)

The group exposed to the highest concentration of *S. montana* L. essential oil (5,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$) exhibited slightly more damaged ovarian morphology than the other groups (Fig. 1G-H). Cytoplasmic vacuolation was more intense and present in all individuals, occupying a greater extent of all oocytes. In all animals in this group, there were also cellular changes in the oviduct and pedicel, presenting as hyperplastic layers, disorganized and without a defined shape. Also, the oviduct had cells with extensive vacuolation. Oocytes III exhibited vacuolation in up to 60% of the cytoplasmic content. In addition, it was possible to observe oocytes V with extensive irregularity in shape, containing fused yolk granules, with a non-rounded shape. Moreover, in the oocytes V, detached and irregular chorion was observed. In this treatment, nucleolar vacuolation was also more intense, being present in up to 40% of oocytes I and II of 4 individuals in this group. Changes in protein and carbohydrate contents were also more intense (Fig. 2G-H and Fig. 3G-H). Oocytes

IV and V showed a non-homogeneous staining pattern of the yolk granules in both histochemical techniques.

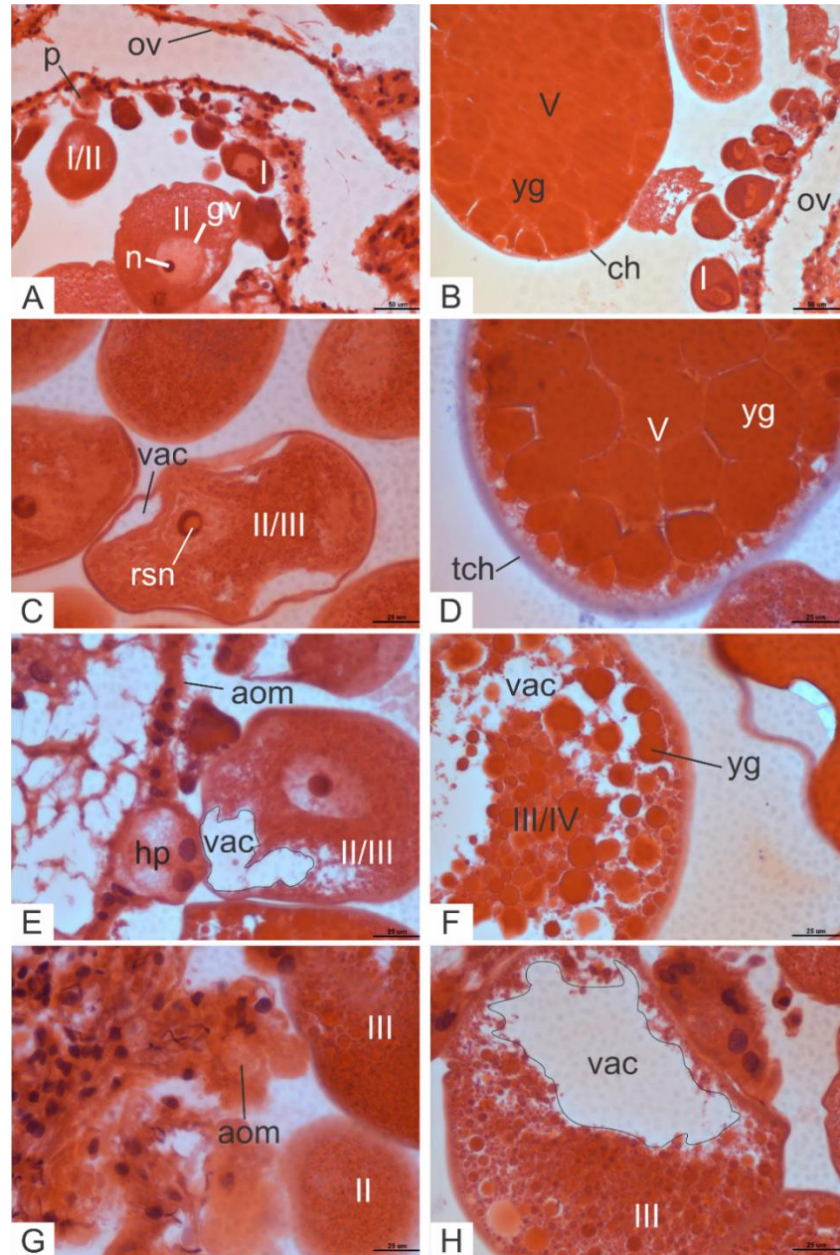


Fig. 1. Histological sections of ovaries of engorged *Rhipicephalus microplus* ticks exposed to essential oil of *Satureja montana* L., stained with hematoxylin and eosin. (A) Control group I (distilled water), (B) Control group II (10% DMSO), (C-D) – Treatment group I (3,0 µL/mL), (E-F) - Treatment group II (4,0 µL/mL), (G-H) - Treatment group III (5,0 µL/mL). Legends: (I-V) stages of oocyte development, (aom) abnormal ovary epithelium, (Ch) chorion, (gv) germinal vesicle (nucleus), (hp) hyperplasia of the pedicel cells, (n) nucleolus, (ov) oviduct, (p) pedicel, (tch) thicker chorion, (rsn) ring-shaped nucleolus, (vac) cytoplasmic vacuolization, (yg) yolk granules. Bars: (A-B) 50 µm; (C-H) 25 µm.

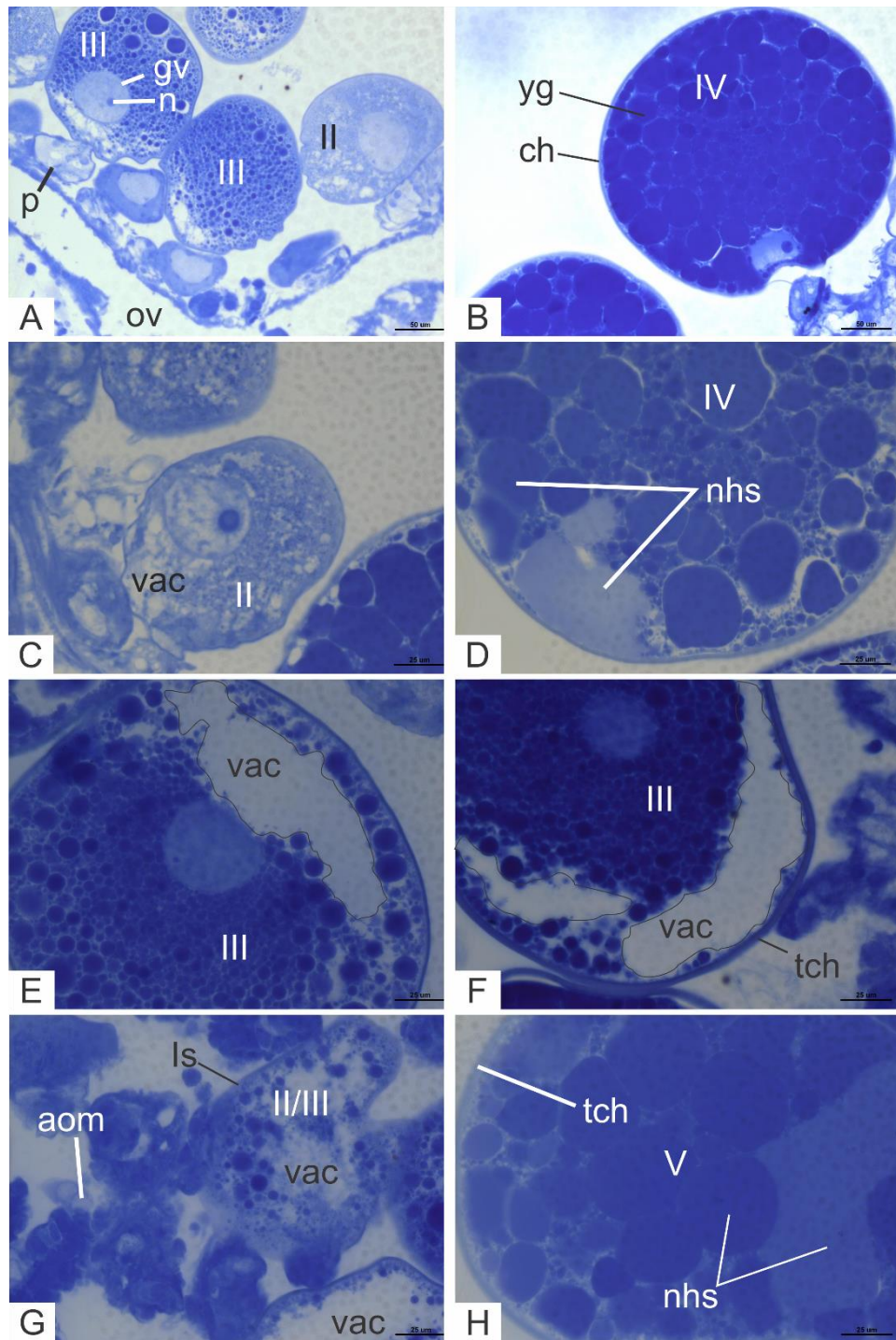


Fig. 2. Histological sections of ovaries of engorged *Rhipicephalus microplus* ticks exposed to essential oil of *Satureja montana* L., stained with bromophenol blue. (A) Control group I (distilled water), (B) Control group II (10% DMSO), (C-D) – Treatment group I (3,0 µL/mL), (E-F) - Treatment group II (4,0 µL/mL), (G-H) - Treatment group III (5,0 µL/mL). Legends: (II-V) stages of oocyte development, (aom) abnormal ovary epithelium, (Ch) chorion, (gv) germinal vesicle (nucleus), (ls) irregular oocyte shape, (n) nucleolus, (nhs) non-homogeneous staining, (ov) oviduct, (p) pedicel, (tch) thicker chorion, (vac) cytoplasmic vacuolization, (yg) yolk granules. Bars: (A-B) 50 µm; (C-H) 25 µm.

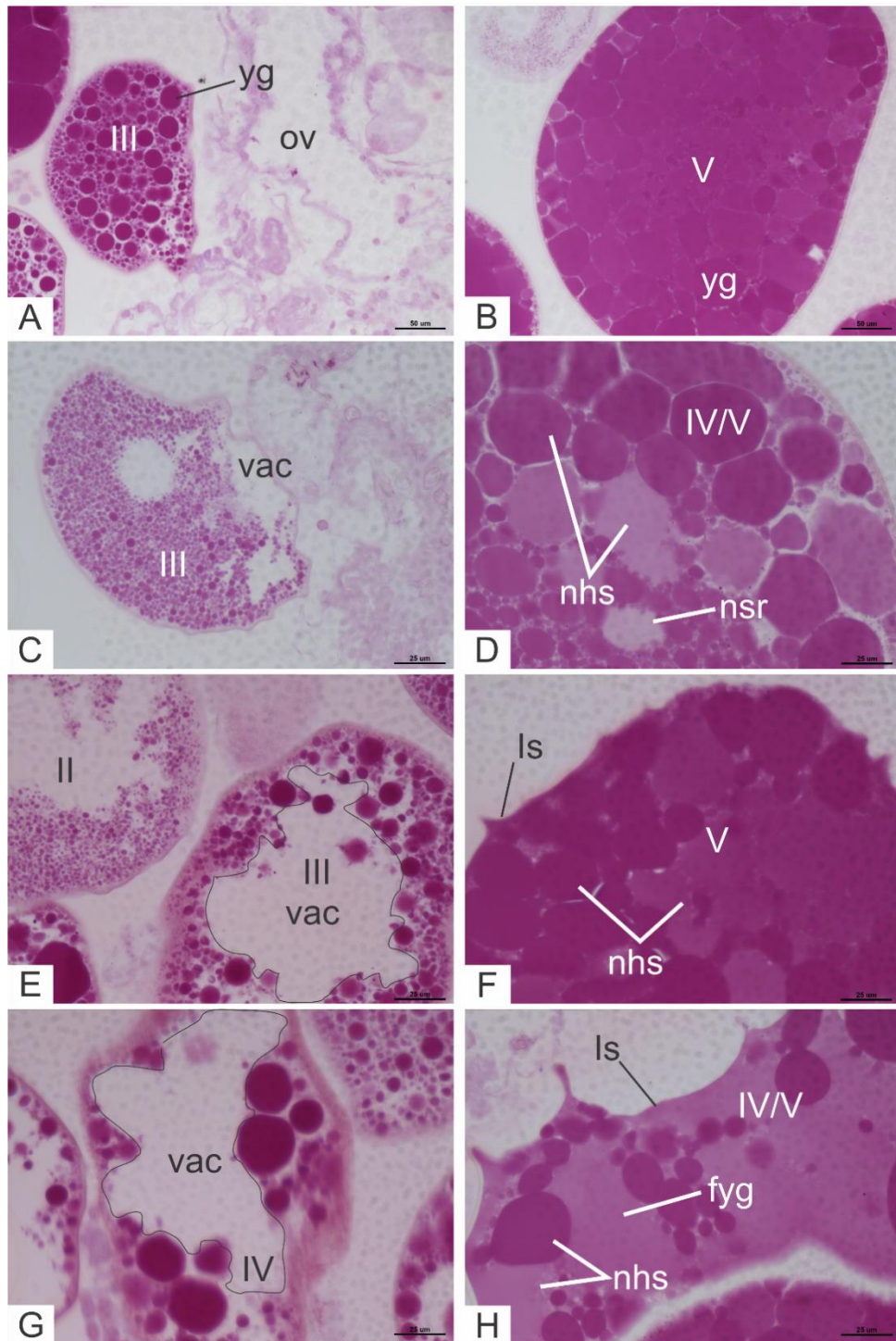


Fig. 3. Histological sections of ovaries of engorged *Rhipicephalus microplus* ticks exposed to essential oil of *Satureja montana* L., stained by Periodic acid–Schiff (PAS) technique. (A) Control group I (distilled water), (B) Control group II (10% DMSO), (C-D) – Treatment group I (3,0 µL/mL), (E-F) - Treatment group II (4,0 µL/mL), (G-H) - Treatment group III (5,0 µL/mL). Legends: (II-V) stages of oocyte development, (fyg) fragmented yolk granules, (Is) irregular oocyte shape, (nhs) non-homogeneous staining, (nsr) non stained region, (ov) oviduct, (vac) cytoplasmic vacuolization, (yg) yolk granules. Bars: (A-B) 50 µm; (C-H) 25 µm.

3.4. Semiquantitative analysis

The indices of each morphological alteration ($\text{Index}_{\text{alt}}$) observed in the ovaries of *R. microplus* engorged females exposed to the essential oil of *S. montana* L. are listed in Table 4. Cytoplasmic vacuolation and abnormal oviduct morphology were the most frequently found morphological alterations in the treatment groups.

The individual index ($\text{Index}_{\text{ind}}$), obtained by the sum of each $\text{Index}_{\text{alt}}$, is shown in Table 5. Control groups I and II did not differ statistically. The group exposed to 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of the essential oil of *S. montana* L. (TIII) showed $\text{Index}_{\text{ind}}$ significantly greater than the control groups. There was no difference in the $\text{Index}_{\text{ind}}$ among treatments I, II and III.

Table 4. Mean \pm standard deviation (SD) of the alteration indices (Index_{alt}) observed in oocytes of *Rhipicephalus microplus* engorged females exposed to the essential oil of *Satureja montana* L. in different concentrations.

Morphological alterations	Importance factor (w)*	Index _{alt}				
		CI (H ₂ O)	CII (DMSO)	TI (3,0 μ L/mL)	TII (4,0 μ L/mL)	TIII (5,0 μ L/mL)
Thicker chorion	1	0.6 \pm 0.55	0.4 \pm 0.55	1.0 \pm 0.71	0.8 \pm 0.45	0.8 \pm 0.45
Irregular chorion	1	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	0.8 \pm 0.45	1.2 \pm 0.45	1.0 \pm 0.00
Changes in protein contente	1	1.0 \pm 0.00	1.0 \pm 0.00	1.2 \pm 0.45	1.6 \pm 0.55	2.2 \pm 0.84
Changes in carbohydrate contente	1	1.0 \pm 0.00	1.0 \pm 0.00	1.0 \pm 0.00	2.0 \pm 0.00	1.8 \pm 0.84
Cytoplasmic vacuolation	2	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	2.8 \pm 1.10	2.4 \pm 0.89	4.0 \pm 1.41
Irregular oocyte shape	2	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	2.0 \pm 0.00	1.6 \pm 0.89	1.2 \pm 1.79
Fusion of yolk granules	2	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	1.6 \pm 0.89	1.6 \pm 0.89	2.4 \pm 2.61
Abnormal oviduct morphology	3	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	6.6 \pm 1.34	5.4 \pm 2.51	6.6 \pm 2.51
Vacuolated nucleolus	3	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	1.8 \pm 1.64	0.6 \pm 1.34	3.0 \pm 2.12

*According to Konig et al. (2019, 2020).

Table 5. Mean \pm standard deviation (SD) of the individual index (Index_{ind}) calculated for *Rhipicephalus microplus* engorged females exposed to different concentrations of the essential oil of *Satureja montana* L.

Individual	Index _{ind}				
	CI (H ₂ O)	CII (DMSO)	TI (3,0 μ L/mL)	TII (4,0 μ L/mL)	TIII (5,0 μ L/mL)
I	3	3	24	22	20
II	3	2	20	18	17
III	3	3	17	20	27
IV	2	2	16	14	22
V	2	2	17	12	29
Mean \pm SD	2.6 \pm 0.55 ^a	2.4 \pm 0.55 ^a	18.8 \pm 3.27 ^{a,b}	17,2 \pm 4.14 ^{a,b}	23.0 \pm 4.95 ^b

Means followed by different letters in rows differ statistically (Kruskal-Wallis; p<0.05).

3.5. Morphometric analysis

Control groups I and II did not differ in the oocytes cytoplasmic area (Table 6). Oocyte III of treatment groups had significantly smaller cytoplasmic area when compared to the control groups. For this stage of development, there was no difference among treatments I, II and III. For the other stages, oocytes cytoplasmic area was statistically equal.

Table 6. Mean \pm standard deviation of oocytes cytoplasm area (μm^2) of *Rhipicephalus microplus* ticks exposed to different concentrations of the essential oil of *Satureja montana* L.

Oocytes	CI (H ₂ O)	CII (DMSO)	TI (3,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	TII (4,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	TIII (5,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$)
I	986.71 \pm 315.97 ^a	825.40 \pm 257.80 ^a	856.59 \pm 261.69 ^a	999.18 \pm 257.35 ^a	960.70 \pm 286.94 ^a
II	3187.77 \pm 1052.47 ^a	2878.76 \pm 929.93 ^a	3214.25 \pm 696.81 ^a	3058.87 \pm 721.83 ^a	2794.01 \pm 787.15 ^a
III	8027.66 \pm 2203.45 ^a	7149.38 \pm 1607.80 ^a	5990.12 \pm 1962.20 ^b	6160.38 \pm 1539.24 ^b	6753.78 \pm 1405.24 ^b
IV	12501.15 \pm 3808.01 ^a	11649.39 \pm 3834.40 ^a	11250.66 \pm 3019.55 ^a	11477.09 \pm 3008.60 ^a	12448.70 \pm 2889.81 ^a
V	23225.06 \pm 4124.78 ^a	23777.34 \pm 2481.78 ^a	23164.95 \pm 3682.87 ^a	23986.87 \pm 2711.51 ^a	24310.08 \pm 2998.11 ^a

Means followed by different lowercase letters in rows differ significantly (one-way ANOVA; $p < 0.05$).

4. DISCUSSION

The chemical composition of the essential oil of *S. montana* L. found in the present study is in accordance with the results obtained by Stoilova et al. (2008) using gas chromatography with a flame ionization detector. These authors identified the presence of carvacrol (41.5%), *p*-cymene (11.0%), thymol (8.6%), γ -terpinene (6.2%) and β -karyophyllene (4.1%) as its major constituents. Carvacrol and *p*-cymene were also the major constituents of the present study, but they were found in different proportions.

The main morphological effects caused by the essential oil of *S. montana* L. on the oocytes of *R. microplus* engorged females were: irregularity and thickening of the chorion, cytoplasmic vacuolation, irregular shape of the oocytes, fusion of the yolk granules, abnormal oviduct morphology and presence of vacuolated nucleolus in oocytes. Changes in the content of proteins and carbohydrates were also identified by histochemical techniques. These alterations were more evident in individuals treated with 5,0 μ L/mL of *S. montana* L. essential oil. Similar results were obtained in a study that evaluated the effects of isolated carvacrol on oocytes of semi-engorged *R. sanguineus* s.l. female ticks, but the concentration employed was ten times greater (LIMA DE SOUZA et al., 2019). It is indeed speculated that *R. sanguineus* s.l. may be less susceptible to acaricidal treatment due to the lower cuticle permeability of this tick species. This is probably an adaptation to xeric conditions, as this species is originated from the African continent (DANTAS-TORRES, 2008). However, the difference in susceptibility of both species would seem to be much smaller than ten times fold, as suggested by Araújo et al. (2016). Thus, it demonstrates that the use of an essential oil can be more effective than an isolated active component, possibly due to a synergistic effect. Indeed, a number of studies have already demonstrated that natural compounds can act synergistically (NOVATO et al., 2015, 2019).

Individuals of the control groups exhibited morphological features consistent with the information described for the species (SAITO et al., 2005). The absence of evident changes in control group II suggests that 10% DMSO solution can be considered an adequate solvent. Indeed, Sharma et al. (2012) evaluated the effects of different solvents on mortality and reproductive parameters of engorged females of *R. microplus* and demonstrated that 10% DMSO solution did not cause any mortality or alteration on reproductive parameters when compared to the controls. Therefore, all morphological changes found in the treated groups can be exclusively attributed to the essential oil of *S. montana* L.

Oocytes at different stages of development are attached to the oviduct through the pedicel (SAITO et al., 2005), one of the main entrance routes for chemicals to tick oocytes (SAMPIERI et al., 2012). According to Balashov (1983), the pedicel helps in the incorporation of proteins and lipids by oocytes. In the present study, the alterations observed in the oviduct and pedicel may have affected the development of germ cells. Indeed, changes in the protein and carbohydrate content found in oocytes of the present study were possibly due to reduced intake of nutrients through the pedicel.

In all three treatments, the pedicel and oviduct showed hyperplasia with cellular disorganization and loss of shape, in addition to vacuolations in about 40% of the oviduct epithelial cells in treatment III. These data are similar to the results obtained by Oliveira et al. (2016) in engorged *R. microplus* females exposed to the extract of *Acmella oleraceae*. König et al. (2020) also obtained similar findings in the ovary of engorged *R. sanguineus* s.l. treated with 20,0 µL/mL of acetylcarvacrol, and suggested that these alterations can lead to severe damage to oocytes. These authors stated that by damaging oocytes in the early developmental stages, the amount of viable eggs deposited by females in the environment can certainly be reduced (KONIG et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2016). In fact, our results showed that oocytes were affected differently, as oocytes at early developmental stages showed the most remarkable alterations. The impact occurred in both morphology and vitellogenesis, as evidenced by the damage caused in the synthesis of nutrients in the yolk granules. Thus, we believe that the treatment of *R. microplus* ticks with the essential oil of *S. montana* L. may cause the production of eggs containing less nutrients or even unviable, impairing the development of larvae.

As the oocyte increases in size and completes its development, it becomes surrounded by the chorion (SAITO et al., 2005). The chorion is responsible for protection against mechanical stimuli, desiccation and predation, in addition to allowing gas exchange (HINTON, 1981). In the present study, the essential oil caused irregular shape, thickening and detachment of the chorion from the cytoplasmic membrane in all three treatments. Barbosa et al. (2016) and Sampieri et al. (2012) suggested that chorion thickening occurs as a protective response in an attempt to prevent the entrance of toxic chemical compounds. However, chorion thickening would also impair embryos gas exchange, prejudicing their survival, as reported by König et al. (2019). Moreover, the absence of chorion in younger cells (oocytes I and II), in turn, increases their vulnerability to the intake of toxic compounds (REMEDIO et al., 2014). This greater vulnerability can lead to absorption of the essential oil components causing, therefore, the alterations observed in the present study.

Cytoplasmic vacuolation was the most frequently found morphological alteration in this study, observed mainly in oocytes II and III. According to some studies, cytoplasmic vacuolation indicates an autophagic process in an attempt to degrade or even recycle damaged components of the cytoplasm (MATOS et al., 2014; ROMA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010). In addition, as suggested by König et al. (2019), vacuolation may occur due to the loss of cytoplasmic content, caused possibly by increased permeability of the oocyte membrane. Thus, we believe that some components of the essential oil of *S. montana* L. were able to get inside the oocytes. The intake of chemicals would be greater in cells with thinner chorion. Indeed, our results demonstrate an inverse relationship between chorion thickness and vacuolated regions in the cytoplasm. In fact, the presence of toxic compounds in the hemolymph can damage the oocytes, especially the younger ones or those with less thickened chorion, since hemolymph is another possible entrance route of chemicals into tick internal organs (OLIVEIRA et al. 2019). Thus, oocytes with extensive vacuolations may have less nutrient storage, which can impair the offspring's survival, as suggested by Denardi et al. (2011).

Nucleoli vacuolation, visualized as ring-shaped nucleoli, was also observed in all treatments of this study. Vacuolated regions of nucleoli exhibited more intense staining with a central vacuole, displaying a ring-like shape. Similar data was also reported by König et al. (2019, 2020) in engorged *R. microplus* and *R. sanguineus* s.l. exposed to acetylcarvacrol and Vendramini et al. (2012) in semi-engorged *R. sanguineus* ticks exposed to andiroba oil (*Carapa guianensis*). According to these authors, this alteration can lead to cell death, since it is indicative of degradation of the genetic material. Additionally, nucleolus is the site of ribosome biogenesis, playing a central role in protein synthesis (SCHEER; HOCK, 1999). This alteration may explain the reduction in protein content and non-homogeneous staining pattern observed in treated groups of the present study.

Yolk granules fragmentation was present mainly in oocytes with irregular and thinner chorion. We suggest that the essential oil components of *S. montana* L. may have directly affected the yolk granules, making them agglomerated and without defined limits. The constituents of the essential oil may have entered the cell at more immature stages, when the chorion is thinner or nonexistent and, therefore, oocyte is more permeable to the entrance of chemicals. In fact, Matos et al. (2014) observed similar results when evaluating the effects of thymol in semi-engorged females of *R. sanguineus*. As the yolk granules are the storage of nutrients of eggs, these authors stated that damage to these constituents would certainly affect the survival of the progeny (MATOS et al., 2014).

Individuals of treatment III (5,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$) showed individual indices statistically greater when compared to the control groups. König et al. (2019) also observed significant difference in the individual indices of engorged *R. microplus* treated with 4,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of acetylcarvacrol. However, less morphological changes were found in the oocytes exposed to acetylcarvacrol compared to the present study, in which morphological changes in the oviduct and pedicel cells were observed in greater extent. Indeed, individuals of TIII of the present study presented an individual index considerably higher ($\text{Index}_{\text{ind}} = 23.0 \pm 4.95$) when compared to exposure to a similar concentration of acetylcarvacrol (4,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) ($\text{Index}_{\text{ind}} = 15.20 \pm 4.21$). Thus, we suggest that the use of the essential oil of *S. montana* L. contributes to reduce ticks offspring production, favoring a long-term control of this species.

In conclusion, *S. montana* L. essential oil severely damaged oocytes of engorged females of *R. microplus* ticks. The morphological changes observed can lead to a decrease in the number of descendants or generate descendants with difficulties to survive due to the deficit of proteins and carbohydrates, which are essential for germ cells. Finally, further studies are needed to demonstrate the toxicity of *S. montana* L. essential oil on mammals and non-target organisms to validate its use as a safe phytopesticide.

Acknowledgments

The authors would like to thank for the financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, Grant number 430327/2018-8).

REFERENCES

- ABBAS, R. Z. et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**. 203, 6–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>. 2014.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allure, 804 p. 2017.
- ADENUBI, O. T. et al. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis. **Industrial Crops & Products**. 123, 779–806. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.075>. 2018.
- ARAÚJO, L. X. et al. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**. 30, 377–382. <https://doi.org/10.1111/mve.12181>. 2016.
- BALASHOV, Y. S. Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure. **Entomological Society of Amer.** 239p. 1983.
- BARBOSA, C. S. et al. In vitro activity of 3 β -O-tigloylmelianol from *Guarea kunthiana* A. Juss (Meliaceae) on oogenesis and ecdysis of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**. 164, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.015>. 2016.
- BENELLI, G. et al. Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: Synergistic and antagonistic effects. **Parasitology International**. 66, 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.01.012>. 2017.
- BORGES, L. M. F. et al. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. 20, 89–96. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000200001>. 2011.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. Editora Unesp, São Paulo. 2018.
- CETIN, H. et al. Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and γ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae).

- Veterinary Parasitology**.170, 287–290. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.031>. 2010.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**. 152, 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>. 2008.
- DE CLERCQ, E. M. et al. Geographic distribution of the invasive cattle tick *Rhipicephalus microplus*, a country-wide survey in Benin. **Experimental and Applied Acarology**, 58(4), 441–452. doi:10.1007/s10493-012-9587-0. 2012.
- DENARDI, S. E. et al. Inhibitory action of neem aqueous extract (*Azadirachta indica* A. Juss) on the Vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. **Microscopy Research and Technique**. 74, 889–899. <https://doi.org/10.1002/jemt.20973>. 2011.
- DRUMMOND, R. O. et al. Tests of acaricides for control of *Boophilus annulatus* and *B. microplus*. **Journal of economic entomology**. 69, 37–40. <https://doi.org/10.1093/jee/69.1.37>. 1973.
- DUNKIČ, V. et al. Chemotaxonomic and micromorphological traits of *Satureja montana* L. and *S. subspicata* Vis. (Lamiaceae). **Chemistry & Biodiversity**. 9, 2825–2842. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100376>. 2012.
- GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. 23, 150–156. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014042>. 2014.
- GUERRERO, F. D. et al. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. 21, 1–6. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612012000100002>. 2012.
- HEYDARZADE, A.; MORAVVEJ, G. Contact toxicity and persistence of essential oils from *Foeniculum vulgare*, *Teucrium polium* and *Satureja hortensis* against *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) adults. **Türkiye Entomoloji Dergisi**. 36, 507–518. <https://doi.org/10.16970/ted.56583>. 2012.
- HIGA, L. O. S. et al. Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview. **Medicinal chemistry**. doi: 10.4172/2161-0444.1000281. 2015.

HINTON, H. E. *Biology of Insect Eggs*. Pergamon Press. Oxford. 1981.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**. 137, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.010>. 2006.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos. 123 p. 1983.

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**. 10, 766–774. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.010>. 2019.

KONIG, I. F. M. et al. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**. 129, 102780. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.102780>. 2020.

LIMA DE SOUZA, J. R. et al. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**. v 116, p. 66–72. 2019.

MAEDEH, M. et al. Bioactivity of essential oil from *Satureja hortensis* (Lamiaceae) against three stored-product insect species. **African Biotechnology Journal**. 10, 6620–6627. <https://doi.org/10.5897/AJB11.469>. 2011.

MATOS, R. et al. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**. 113, 4555–4565. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4145-9>. 2014.

MICHAELAKIS, A. et al. Essential oils of *Satureja* species: Insecticidal effect on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). **Molecules** 12, 2567–2578. <https://doi.org/10.3390/12122567>. 2007.

NOVATO, T. L. P. al. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**. 212, 331-335. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.021>. 2015.

NOVATO, T. L. P. et al. Evaluation of synergism and development of a formulation with thymol, carvacrol and eugenol for *Rhipicephalus microplus* control. **Experimental Parasitology**. 207, 107774. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107774>. 2019.

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**. 46, 2459–2465. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.034>. 2008.

OLIVEIRA, P. R., et al. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy Research and Technique**. 79, 744–753. <https://doi.org/10.1002/jemt.22693>. 2016.

OLIVEIRA, P. R., et al. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleracea* in the ovaries and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) female ticks. **Journal of Microscopy and Ultrastructure** 7, 28. https://doi.org/10.4103/jmau.jmau_16_18. 2019.

OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**. 144, 546–555. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.022>. 2011.

OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **LWT Food Science and Technology**. 45, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.006>. 2012.

PAVELA, R. et al. Application of ethnobotanical repellents and acaricides in prevention, control and management of livestock ticks: A review. **Research in Veterinary Science**, 109, 1–9. doi:10.1016/j.rvsc.2016.09.001. 2016.

PEARSE, A. **Histochemistry Theoretical and Applied**. Edinburgh: ChurchillLivingstone. 1985.

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**. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1569657>. 2019.

- PICCAGLIA, R. et al. Characterization of essential oil from a *Satureja montana* L. Chemotype grown in Northern Italy. **Journal of Essential Oil Research**. 3, 147–152. <https://doi.org/10.1080/10412905.1991.9700494>. 1991.
- 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** 114, 431–444. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4200-6>. 2014.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I. et al. Evolution of acaricide resistance: Phenotypic and genotypic changes in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to pyrethroid selection pressure. **International Journal for Parasitology**, 41(8), 895–903. doi:10.1016/j.ijpara.2011.03.012. 2011.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I. et al. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, 117 (1), 3–29. doi:10.1007/s00436-017-5677-6. 2017.
- ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Permethrin-induced ultrastructural changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 1, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.05.004>. 2010.
- ROSADO-AGUILAR, J. A. et al. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**. 168, 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.022>. 2010.
- 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**. 129, 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.020>. 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**, v. 75, n. 5, p.683–690, 2012.
- SCHEER, U.; HOCK, R. Structure and function of the nucleolus. **Current Opinion in Cell Biology**. 11, 385–390. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80054-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80054-4). 1999.
- SERRANO, C. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts.

Journal of the Science of Food and Agriculture 91, 1554–1560.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.4347>. 2011.

SHARMA, A. K. et al. Comparative acaricidal properties of different solvents and surfactants on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Indian journal of animal sciences**. 82, 154–158. 2012.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. Oxford University Press, New York. 2014.

STOILOVA, I. et al. Chemical Composition, Olfactory Evaluation and Antioxidant Effects of the Essential Oil of *Satureja montana* L. **Natural Product Communications** v. 1, n. 4, p. 9–12. 2008.

ŠUĆUR, J., et al. Allelopathic effects and insecticidal activity of aqueous extracts of *Satureja montana* L. **Journal of the Serbian Chemical Society**. 80, 475–484.
<https://doi.org/10.2298/JSC020714106S>. 2015.

TABAN, A., et al. Insecticidal and repellent activity of three *Satureja* species against adult red flour beetles, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Acta Ecologica Sinica**. 37, 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.01.001>. 2017.

TAK, J. H.; ISMAN, M. B. Acaricidal and repellent activity of plant essential oil-derived terpenes and the effect of binary mixtures against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**. 108, 786–792.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.003>. 2017.

TOZLU, E. et al. Chemical compositions and insecticidal effects of essential oils isolated from *Achillea gypsicola*, *Satureja hortensis*, *Origanum acutidens* and *Hypericum scabrum* against broadbean weevil (*Bruchus dentipes*). **Scientia Horticulturae** (Amsterdam). 130, 9–17.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.019>. 2011.

TROUGHTON, D. R.; LEVIN, M. L., Life Cycles of Seven Ixodid Tick Species (Acari: Ixodidae) Under Standardized Laboratory Conditions. **Journal of Medical Entomology**. 44, 732–740. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.5.732>. 2007.

TSABOULA, A. et al. Environmental and human risk hierarchy of pesticides: A prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. **Environment International**. 91, 78–93. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.008>. 2016.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**. 11:463-471.1963.

VENDRAMINI, M. C. R., et al. 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**. 75, 1745–1754. <https://doi.org/10.1002/jemt.22126>. 2012.

YAZDANI, E. et al. Effect of *Satureja hortensis* L. essential oil on feeding efficiency and biochemical properties of *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Phytopathology and Plant Protecti.** 46, 328–339. <https://doi.org/10.1080/03235408.2012.740980>. 2013.

Parte III

Efeito tóxico do óleo essencial de *Callistemon viminalis* no ovário de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

Efeito tóxico do óleo essencial de *Callistemon viminalis* no ovário de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

Aline Chaves Reis¹, Isaac Filipe Moreira Konig², Graziela Herminia Andrade Mendonça¹,
Allan da Silva Lunguinho², Maria das Graças Cardoso², Rafael Neodini Remedio^{1*}.

¹Departamento de Medicina, Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil.

²Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil.

*Autor para correspondência: Dr. Rafael Neodini Remedio, Departamento de Medicina,
Universidade Federal de Lavras, Lavras, 37200-900, Brasil.

E-mail: rafael.remedio@ufla.br

RESUMO

Rhipicephalus microplus é o principal ectoparasito de bovinos e seu parasitismo pode reduzir o ganho de peso de seus hospedeiros vertebrados, além de causar anemia, aumentar o risco de miíases e também resultar na transmissão de *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*, entre outros patógenos. Neste sentido, a utilização de produtos químicos sintéticos desempenha um papel importante no controle desses carrapatos. Porém, seu uso frequente e em larga escala tem contribuído para a seleção de cepas resistentes, resultando em um maior interesse na busca por produtos de origem natural. A espécie *Callistemon viminalis* já tem comprovada atividade antibacteriana, acaricida, repelente e antifúngica, porém não existem relatos na literatura sobre seus efeitos na morfologia interna de carrapatos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação de diferentes concentrações do óleo essencial de *C. viminalis* na morfologia do ovário de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* por meio de análises histológicas, histoquímicas e morfométricas. A exposição ao óleo essencial causou alterações morfológicas dose-dependentes, como alterações celulares na parede epitelial do oviduto e pedicelo, irregularidade do córion e do formato dos ovócitos, alterações no conteúdo de proteínas e carboidratos e diminuição do tamanho dos ovócitos, bem como redução do tamanho do núcleo, vacuolização citoplasmática e nucleolar. Desta forma, o óleo essencial de *C. viminalis* demonstrou ação tóxica sobre o sistema reprodutivo de *R. microplus*, resultando em prejuízos reprodutivos para a espécie. Assim, *C. viminalis* se destaca como uma potencial alternativa natural para o controle de carrapatos em longo prazo.

Palavras-chave: Acaricida. Controle de carrapatos. Morfologia. Morfometria.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus is the main ectoparasite of cattle and its parasitism can reduce weight gain of hosts, in addition to causing anemia, increasing the risk of myiasis and also resulting in the transmission of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale*, among other pathogens. In this sense, the use of synthetic chemicals plays an important role in controlling these ticks. However, its frequent and large-scale use has contributed to the selection of resistant strains, resulting in a greater interest in the search for products of natural origin. The species *Callistemon viminalis* has already proven to have antibacterial, acaricidal, repellent and antifungal activities, but there are no reports in literature about its effects on the internal morphology of ticks. Thus, the aim of this study was to evaluate the action of different concentrations of *C. viminalis* essential oil on the ovary morphology of engorged *R. microplus* females through histological, histochemical and morphometric analysis. Exposure to *C. viminalis* caused dose-dependent morphological changes, such as cellular alterations in the epithelial wall in the oviduct and pedicel, irregularity of the chorion and oocyte shape, changes in protein and carbohydrate content, and a decrease in oocyte size, as well as a reduction in the size of the nucleus, cytoplasmic and nucleolar vacuolization. Thus, the *C. viminalis* essential oil demonstrated to have a toxic action on the reproductive system of *R. microplus*, resulting in reproductive damage to this tick species. Thus, *C. viminalis* stands out as a promising natural alternative for long-term tick control.

Keywords: Acaricide. Tick control. Morphology. Morphometry.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária é uma das atividades do agronegócio mais importantes e lucrativas em todo o mundo, com uma população global de aproximadamente 1.49 bilhão de cabeças de gado (PÉREZ DE LEÓN; MITCHELL; WATSON, 2020). O segundo maior rebanho bovino do mundo encontra-se no Brasil, com aproximadamente 213,8 milhões de cabeças (DE SOUZA et al., 2019). *Rhipicephalus microplus*, popularmente conhecido como carrapato-do-boi, é o carrapato mais importante da pecuária, sendo responsável por grandes prejuízos na bovinocultura (RODRIGUES; LEITE, 2013). Além de ocasionar perda de sangue e transmissão de doenças como babesiose e anaplasmose, a infestação por esses ectoparasitos causa danos ao couro e desconforto aos animais.

O uso de acaricidas sintéticos tem sido a principal forma de controle de ectoparasitos por mais de um século, porém, quando realizado de forma indiscriminada, pode resultar na seleção de indivíduos resistentes (EISEN; DOLAN, 2016; FURLONG, 1993; TAYLOR, 2001). Ademais, os resíduos desses pesticidas podem contaminar a carne, leite e derivados bem como o meio ambiente (DE MENEGHI, 2016; RAHEEM; NIAMAH, 2021). Além disso, um fator preocupante é a rapidez na seleção de indivíduos resistentes aos produtos químicos utilizados para seu controle (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2017). Esses fatores apontam para a necessidade de identificar métodos alternativos que sejam seguros e eficazes no controle de ectoparasitos que possam ser utilizados de forma integrada (NWANADE et al., 2020; WILLADSEN, 2006).

Desde a antiguidade, as plantas aromáticas são comumente utilizadas por suas propriedades medicinais. Contudo, a comercialização de pesticidas à base de plantas vem sendo realizada somente a partir do final da década de 1990 (ISMAN, 2016). Dentre as diversas espécies vegetais, *Callistemon viminalis* se destaca por sua constituição química variada e ampla atividade biológica (LUNGUINHO et al., 2021). De fato, diversas propriedades já foram relatadas para essa espécie, tais como atividade antioxidante (SALEM et al., 2013), moluscicida (GOHAR et al., 2014), antibacteriana (OYEDEJI et al., 2009), antifúngica (SALES et al., 2017), alelopática (OLIVEIRA et al., 2014), antiagregação plaquetária (BABALOLA et al., 2013), anti-helmíntica (GARG; KASERA, 1982; VEERAKUMARI, 2015), inseticida contra *Myzus persicae* (SALES et al., 2017), *Acanthoscelides obtectus* e *Callosobruchus maculatus* (NDOMO et al., 2009, 2010), *Tetranychus urticae* (ROH; LEE; PARK, 2013) entre outros. Ainda, em concentrações reduzidas, essa espécie de planta possui atividade repelente contra

Rhipicephalus sanguineus s.l. e acaricida contra fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* (LUNGUINHO et al., 2021).

Além da atividade acaricida, diversos estudos têm demonstrado que concentrações subletais de compostos de origem natural são capazes de alterar a morfofisiologia de órgãos particularmente importantes para a sobrevivência dos carrapatos (AGWUNOBI et al., 2020; KONIG et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020). Dentre esses órgãos, o ovário se destaca por representar cerca de um quarto da massa total de uma fêmea ingurgitada (KONIG et al., 2020). De fato, uma única fêmea é capaz de fazer a postura de 2.000 a 3.000 mil ovos (FURLONG, 1993). Nesse sentido, compostos capazes de diminuir o sucesso reprodutivo desses ectoparasitos podem ser considerados alternativas promissoras para o controle da espécie. Contudo, embora a atividade acaricida do óleo essencial de *C. viminalis* já tenha sido comprovada, seus efeitos no ovário de *R. microplus* ainda não foram investigados.

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as alterações morfológicas provocadas pelo óleo essencial de *C. viminalis* no ovário de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus*. O material foi analisado em microscópio de luz de campo claro utilizando-se técnicas histológicas e histoquímicas, e avaliado por meio de análises semiquantitativa e morfométrica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do óleo essencial

A extração do óleo essencial de *Callistemon viminalis* foi realizada com um aparelho de Clevenger modificado no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), utilizando o processo de hidrodestilação. Para isso, 370g de folhas de *C. viminalis* foram colocadas em um balão de fundo redondo com capacidade de 5 L, ao qual foi acrescentada água até completar 2,5 L. Um condensador foi conectado e a mistura foi levada a ferver por um período de 2 horas. Decorrido esse tempo, o sistema permaneceu em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos. A torneira foi aberta e o excesso de água retirado até que a camada de óleo se aproximasse da abertura da torneira. O hidrolato foi coletado e centrifugado a 965 G por um período de 15 minutos. Posteriormente, o óleo essencial foi separado e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (ANVISA, 2010). A extração foi realizada em triplicata.

2.2. Carrapatos *Rhipicephalus microplus*

Em um rebanho naturalmente infestado no município de Lavras, Minas Gerais, foram coletadas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. O rebanho não havia recebido tratamento acaricida nos últimos três meses. Após a coleta, os ectoparasitos foram lavados em água corrente e secos em papel absorvente macio para, posteriormente, serem submetidos ao Teste de Imersão de Adultos (TIA) (DRUMMOND et al., 1973).

2.3. Teste de Imersão de Adultos

O TIA foi realizado no Laboratório de Biologia Parasitária (BIOPAR) do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA de acordo com o protocolo descrito por Drummond et al. (1973). Inicialmente, os animais foram pesados e divididos em grupos com pesos homogêneos ($p > 0,05$), contendo 20 carrapatos cada. Foram utilizados dois grupos para controle: um tratado com água destilada (CI) e outro tratado com o solvente dimetilsulfóxido (DMSO a 10% - CII). Os demais grupos receberam tratamento com o óleo essencial de *C. viminalis* diluído em DMSO a 10%, nas concentrações de 6,0 (TI); 8,0 (TII) e 10,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (TIII). Essas concentrações foram estabelecidas com base em testes previamente realizados (LUNGUINHO et al., 2021). Os

animais foram imersos em béqueres contendo as diferentes soluções durante 5 minutos. Posteriormente, os carrapatos foram secos em papel absorvente, colocados em placas de Petri sob condições ambientes e observados por um período de sete dias (OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008). Os carrapatos considerados mortos foram os que não apresentaram motilidade após estímulo com dióxido de carbono (CO₂), além de cutícula enrijecida e com coloração enegrecida.

2.4. Análises histológicas e histoquímicas

Em cada grupo, cinco carrapatos sobreviventes foram aleatoriamente selecionados e dissecados em placas de Petri contendo solução salina tamponada (NaCl 0,13M, Na₂HPO₄ 0,017M, KH₂PO₄ 0,02M, pH 7,2), sob estereomicroscópio (Opticam OPZTS), para a coleta dos ovários. Em seguida, as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 72h e transferidas para solução de etanol a 70%. Os ovários foram então desidratados em séries gradativas de álcool etílico (70, 80, 90 e 95%), com duração de 20 minutos cada etapa. Posteriormente o material foi embebido em historesina *Leica* por 24 horas e transferido para histomoldes para inclusão.

Após esses procedimentos, as amostras foram seccionadas em micrótomo (Lupec MRP09) na espessura de 4 µm e submetidas às técnicas de hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) (duas lâminas com 6 cortes cada grupo) para a análise histológica, e ácido periódico-Schiff (PAS) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) (uma lâmina com 6 cortes) e azul de bromofenol (PEARSE, 1985) (uma lâmina com 6 cortes) para as análises histoquímicas. Após as colorações, as lâminas foram secas e cobertas com Entellan® e lamínula. Em seguida, os cortes histológicos foram examinados e fotografados em microscópio *Leica* DM500 equipado com uma câmera ICC50W.

2.5. Análises morfológica e semiquantitativa

A análise morfológica foi realizada no software Image J, para medição do tamanho dos ovócitos, do núcleo e da área vacuolizada (região não corada). Para essas análises, foram utilizadas lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Primeiramente os ovócitos foram classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento (I-V), conforme descrito por Saito

et al. (2005). Para cada animal, foram analisados 10 ovócitos em cada estágio de desenvolvimento. Os ovócitos em estágios mais imaturos (I, II e III) foram selecionados entre aqueles em que era possível observar a presença do núcleo. Para os estágios IV e V, os ovócitos foram selecionados aleatoriamente para as medições, uma vez que nesses estágios o núcleo raramente é observado. Por esse mesmo motivo, estas células não tiveram seus núcleos mensurados (BARBOSA et al., 2016). Para a análise da área vacuolizada, foram dimensionadas as regiões que não coraram quando submetidas à coloração com hematoxilina e eosina.

A análise semiquantitativa foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Konig et al. (2019) e adaptada por Konig et al. (2020), que definiram um fator de importância (w), variando de um a três, para cada alteração observada, de acordo com a sua relevância para o desenvolvimento e sobrevivência das células dos ovários: (1) importância mínima, quando a lesão afeta minimamente a fisiologia da célula avaliada; (2) importância moderada, quando a alteração provoca perda parcial da função do ovócito e (3) importância elevada, quando o ovócito afetado possivelmente apresentará função totalmente comprometida. No presente estudo, um escore (α), variando de zero a cinco, foi atribuído com base na extensão da alteração no tecido analisado. Zero representa características semelhantes aos grupos controle e cinco significa que as alterações morfológicas estão presentes em mais de 80% das estruturas avaliadas. A multiplicação do fator de importância de uma alteração por seu escore permitiu a obtenção do índice de cada alteração ($INDEX_{alt} = w \times \alpha$). O índice individual ($INDEX_{ind}$) foi calculado pela soma dos índices de cada alteração, sendo: $INDEX_{ind} = \Sigma (INDEX_{alt})$. Esses valores foram utilizados na comparação estatística entre os grupos.

2.6. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à verificação de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste *post-hoc* de Tukey ($\alpha < 0.05$), e os dados não paramétricos foram analisados por Kruskal-Wallis, seguido de teste *post-hoc* de Dunn (GraphPad Prism v.7.00).

3. RESULTADOS

3.1. Mortalidade de *Rhipicephalus microplus*

As massas dos carrapatos submetidos ao Teste de Imersão de Adultos (TIA) não diferiram estatisticamente. Não houve mortalidade nos grupos controle água (CI) e DMSO 10% (CII). Já nos grupos de tratamento, uma relação dose-dependente foi observada para a mortalidade (Tabela 1).

Tabela 1: Média \pm desvio padrão da massa corporal das fêmeas de *Rhipicephalus microplus* ingurgitadas e percentual de carrapatos vivos e mortos sete dias após o Teste de Imersão de Adultos.

Grupos	Carrapatos			
	Total	Massa (mg)*	Mortos (%)	Vivos (%)
H₂O	20	237 \pm 0,02	0	100
DMSO	20	239 \pm 0,03	0	100
6,0 μL/mL	20	238 \pm 0,02	5	95
8,0 μL/mL	20	230 \pm 0,02	40	60
10,0 μL/mL	20	233 \pm 0,04	70	30

*Médias de massa corporal não diferiram estatisticamente entre si (ANOVA *one way*; $p > 0,05$).

3.2. Análise histopatológica

As características morfológicas dos grupos CI e CII foram descritas conjuntamente, já que não foram observadas diferenças relevantes entre os grupos (Figs. 1-A e 1-B).

3.2.1. Grupos Controle (CI e CII)

Na parede epitelial do oviduto foi observado epitélio de revestimento simples cúbico formado por células com citoplasma eosinofílico e núcleo localizado na região central, corado pela hematoxilina. As células do pedicelo exibiram características morfológicas semelhantes às da parede do oviduto, porém com formato alongado. Os ovócitos I apresentaram formato variando de oval a elíptico, com núcleo localizado na região central, fracamente corado em roxo, nucléolo bem evidente e citoplasma homogeneamente eosinofílico e agranular. Os ovócitos II (Figura 1-A) demonstraram características semelhantes ao estágio anterior, mas finas granulações foram observadas no citoplasma. O núcleo dos ovócitos III foi visualizado em posição basal, com nucléolo evidente. Foram observadas granulações citoplasmáticas eosinofílicas de tamanho heterogêneo nesse estágio. Os grânulos maiores encontravam-se localizados na periferia das células, enquanto os menores foram observados no centro. Em 4 animais (2 do grupo CI e 2 do grupo CII), foram observadas pequenas regiões sem afinidade à eosina no polo basal dos ovócitos III, presentes em cerca de 20% dos ovócitos. Nesse estágio também foi possível observar o início da deposição do córion ao redor da célula. Nos ovócitos IV, o núcleo e nucléolo foram dificilmente observados, em virtude do grande tamanho dos grânulos de vitelo. Esses se demonstraram mais homogêneos e foi possível observar o córion mais espesso que nos ovócitos III. Os ovócitos V foram as maiores células observadas, quando comparados aos estágios anteriores. Nesse estágio, o córion foi mais evidente e foram visualizados grânulos de vitelo totalmente homogêneos e fortemente corados pela eosina (Figura 1-B). Em 1 animal do grupo CI, foi possível verificar a fusão dos grânulos de vitelo em cerca de 10% desses ovócitos.

Em relação ao conteúdo proteico (Figs. 2-A e 2-B), tanto as células da parede epitelial do oviduto quanto os ovócitos demonstraram reatividade ao corante. Contudo, as células epiteliais do oviduto e os ovócitos I e II mostraram-se ligeiramente menos corados (Figura 2-A). Já, os ovócitos III, IV e V, apresentaram coloração azul mais intensa uniformemente distribuída nas células (Figura 2-B), ou seja, não foi observada diferença de tonalidade em um

mesmo ovócito. Todavia, nos ovócitos V de 1 animal do grupo CII, pequenas variações de tonalidade nos grânulos de vitelo de cerca de 10% dos ovócitos mais maduros foram visualizadas.

No que se refere ao conteúdo de carboidratos (Figs. 3-A e 3-B), tanto as células da parede epitelial do oviduto quanto os ovócitos I praticamente não apresentaram reatividade à técnica (Figura 3-A). Já os ovócitos II exibiram coloração rosa muito fraca. Os ovócitos III, IV e V demonstraram coloração rósea intensa, com tonalidade uniforme dentro de uma mesma célula (Figura 3-B). No entanto, 1 animal do grupo CI e 1 animal do grupo CII apresentaram pequenas variações de tonalidade em cerca de 10% dos ovócitos V.

3.2.2. Grupo Tratamento I

A parede epitelial do oviduto de todos os carrapatos tratados com 6,0 µL/mL de óleo essencial de *C. viminalis* apresentou alterações morfológicas em cerca de 20% da extensão analisada, principalmente representadas pela presença de aglomerados amorfos de células epiteliais (Figura 1-C). Nessas regiões, os ovócitos I e II demonstraram severas alterações de formato. Além disso, foi observada vacuolização citoplasmática em cerca de 40% dos ovócitos III de todos os indivíduos pertencentes a esse grupo (Figura 1-C). Nucléolo vacuolizado também foi observado em cerca de 20% dos ovócitos mais jovens (I-II) de todos os indivíduos. Os ovócitos IV e V apresentaram pequenas alterações de formato e vacuolização (Figura 1-D). Quanto ao conteúdo proteico, cerca de 30% a 40% dos ovócitos IV e V de todos os animais exibiram coloração azul não uniforme (Figs. 2-C e 2-D). Isso também foi observado para a técnica de PAS (Figs. 3-C e 3-D).

3.2.3. Grupo Tratamento II

Nos animais expostos a 8,0 µL/mL de óleo essencial de *C. viminalis* foram visualizadas alterações morfológicas mais extensas em comparação ao grupo anterior. A parede epitelial do oviduto e o pedicelo mostraram-se consideravelmente mais alterados, sendo observados como camadas celulares múltiplas sem organização morfológica definida (Figs. 1-E e 1-F). A vacuolização citoplasmática estava presente em todos os indivíduos do grupo, mostrando-se mais evidente nos ovócitos III (Figura 1-F). Nos ovócitos I, II e III foram verificadas

vacuolizações nucleolares em todos os indivíduos em proporções variando de 10% a 60% dos ovócitos (Figs. 1-E e 1-F). No que diz respeito ao conteúdo de proteínas e carboidratos, foram observados grânulos de vitelo com coloração mais heterogênea, além de uma maior quantidade de regiões não coradas no citoplasma, em comparação ao grupo anterior (Figs. 2-E, 2-F, 3-E e 3-F).

3.2.4. Grupo Tratamento III

Esse grupo apresentou alterações morfológicas semelhantes aos do grupo TII. As mesmas alterações na parede epitelial do oviduto e pedicelo foram identificadas. A vacuolização citoplasmática foi observada em intensidade semelhante entre os grupos TII e TIII em todos os ovócitos nos estágios III e IV. Os ovócitos I não apresentaram vacuolização citoplasmática, enquanto os ovócitos nos estágios II e V demonstraram pequenas áreas não coradas em cerca de 30% desses ovócitos. A vacuolização nucleolar foi visualizada de forma mais frequente do que no grupo TII, estando presente em todos os indivíduos do grupo em proporções variando de 20% a 80% dos ovócitos I e II. Nos ovócitos IV e V, o córion apresentou formato irregular em todos os indivíduos, estando ligeiramente espessado (Figura 1-G) em 10% dos ovócitos de 2 animais. Além disso, cerca de metade dos ovócitos V analisados exibiram fusão dos grânulos de vitelo (Figura 1-H), não sendo mais possível visualizar sua delimitação. Essas regiões de fusão apresentaram menor reatividade frente as técnicas de PAS e coloração com azul de bromofenol (Figs. 2-G, 2-H, 3-G e 3-H) quando comparadas aos controles.

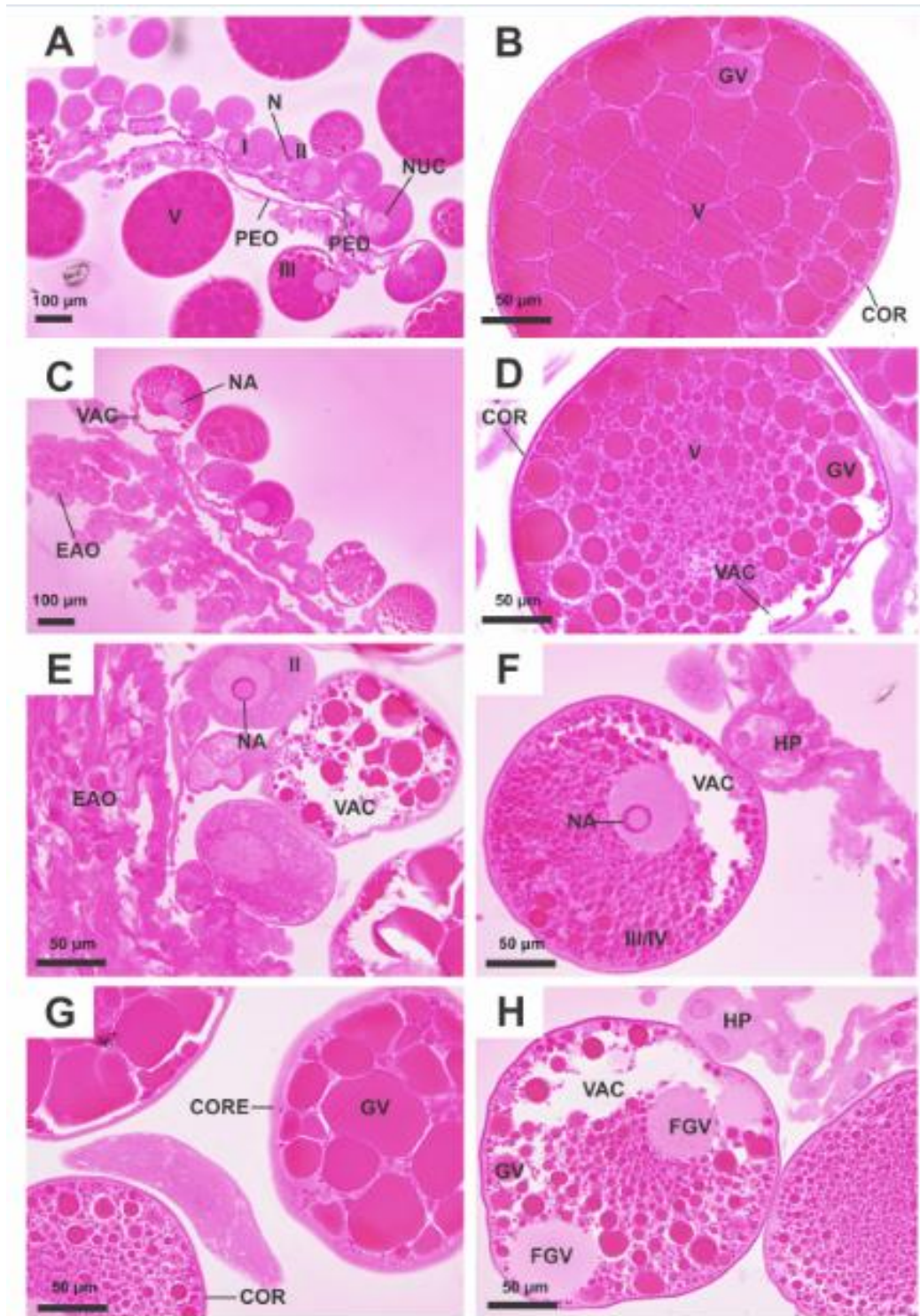


Figura 1. Seções histológicas de ovários de carrapatos *Rhipicephalus microplus* ingurgitados expostos ao óleo essencial de *Callistemon viminalis*, coradas com hematoxilina e eosina. (A) Grupo Controle Água (CI), (B) Grupo Controle DMSO a 10% (CII), (C-D) Grupo Tratamento I (6 µL/mL), (E-F) Grupo Tratamento II (8 µL/mL), (G-H) Grupo Tratamento III (10 µL/mL). Legendas: (I-V) estágios de desenvolvimento dos ovócitos, (N) núcleo, (NUC) nucléolo, (PEO) parede epitelial do oviduto, (PED) pedicelo, (GV) grânulos de vitelo, (VAC) vacuolização citoplasmática, (NA) nucléolo em anel, (EAO) epitélio anormal da parede do oviduto, (COR) córion, (CORE) córion espessado, (HP) hiperplasia do pedicelo, (FGV) fusão dos grânulos de vitelo. Barras: (A,C) 100 µm; (B, D-H) 50 µm.

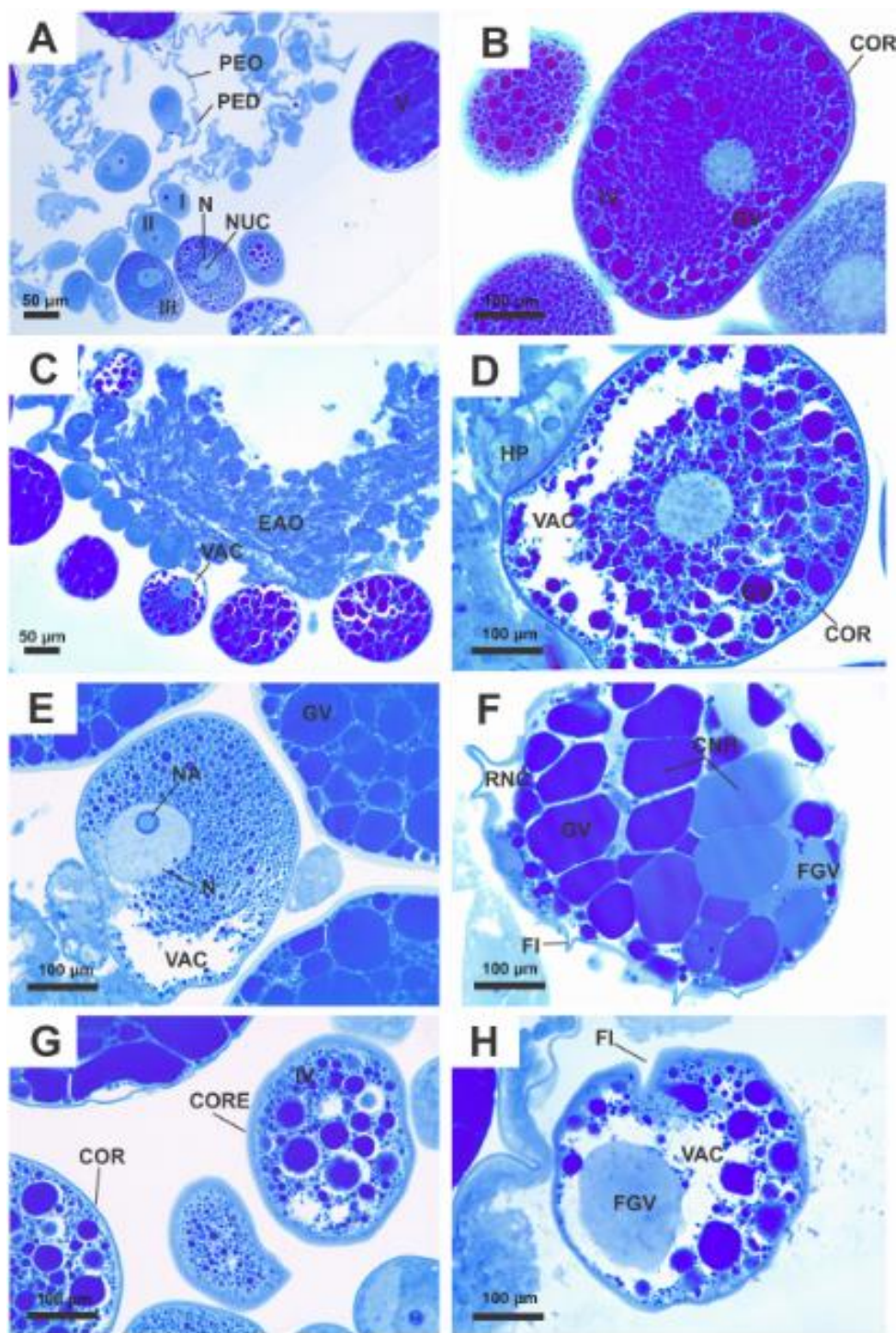


Figura 2. Seções histológicas de ovários de carrapatos *Rhipicephalus microplus* ingurgitados expostos ao óleo essencial de *Callistemon viminalis*, coradas com azul de bromofenol. (A) Grupo Controle Água (CI), (B) Grupo Controle DMSO a 10% (CII), (C-D) Grupo Tratamento I (6 $\mu\text{L}/\text{mL}$), (E-F) Grupo Tratamento II (8 $\mu\text{L}/\text{mL}$), (G-H) Grupo Tratamento III (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Legendas: (I-V) estágios de desenvolvimento dos ovócitos, (N) núcleo, (NUC) nucléolo, (PEO) parede epitelial do oviduto, (PED) pedicelo, (GV) grânulos de vitelo, (VAC) vacuolização citoplasmática, (NA) nucléolo em anel, (EAO) epitélio anormal da parede do oviduto, (COR) córion, (CORE) córion espessado, (HP) hiperplasia do pedicelo, (FGV) fusão dos grânulos de vitelo, (FI) formato irregular do ovócito, (RNC) região não corada, (CNH) coloração não homogênea. Barras: (A,C) 100 μm ; (B, D-H) 50 μm .

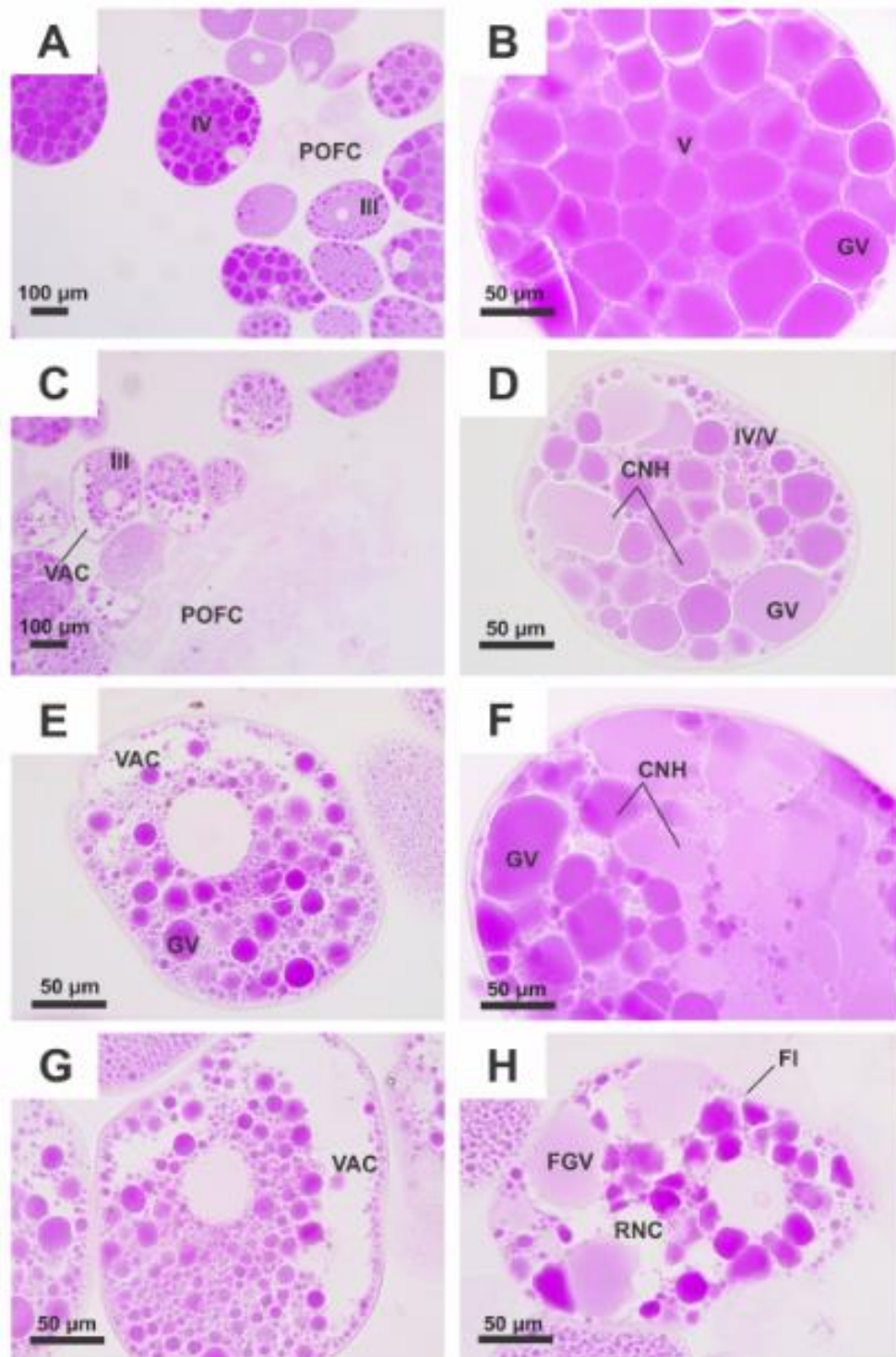


Figura 3. Seções histológicas de ovários de carrapatos *Rhipicephalus microplus* ingurgitados expostos ao óleo essencial de *Callistemon viminalis*, coradas pela técnica de ácido periódico-Schiff (PAS). (A) Grupo Controle Água (CI), (B) Grupo Controle DMSO a 10% (CII), (C-D) Grupo Tratamento I (6 µL/mL), (E-F) Grupo Tratamento II (8 µL/mL), (G-H) Grupo Tratamento III (10 µL/mL). Legendas: (I-V) estágios de desenvolvimento dos ovócitos, (GV) grânulos de vitelo, (VAC) vacuolização citoplasmática, (POFC) parede epitelial do oviduto fracamente corado, (CNH) coloração não homogênea, (FGV) fusão dos grânulos de vitelo, (FI) formato irregular do ovócito, (RNC) região não corada. Barras: (A,C) 100 µm; (B, D-H) 50 µm.

3.3. Análises semiquantitativa e morfométrica

As alterações observadas no ovário dos carrapatos expostos ao óleo essencial de *C. viminalis* foram listadas na Tabela 2. Excetuando-se o espessamento do córion, todas as outras alterações observadas no grupo TIII diferiram estatisticamente dos grupos CI e CII.

Tabela 2. Média \pm desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) observados em ovócitos de *Rhipicephalus microplus* expostos ao óleo essencial de *Callistemon viminalis* em diferentes concentrações.

Alterações morfológicas	Fator de Importância (w)*	INDEXalt				
		CI (H ₂ O)	CII (DMSO)	TI (6 μ L/mL)	TII (8 μ L/mL)	TIII (10 μ L/mL)
Córion espessado	1	0,0 \pm 0,00 ^a	0,0 \pm 0,00 ^a	0,0 \pm 0,00 ^a	0,6 \pm 0,90 ^a	0,6 \pm 0,55 ^a
Córion irregular	1	0,0 \pm 0,00 ^a	0,0 \pm 0,00 ^a	0,8 \pm 0,45 ^{a,b}	1,0 \pm 0,00 ^{a,b}	1,4 \pm 0,55 ^b
Alterações no conteúdo de proteínas	1	0,0 \pm 0,00 ^a	0,2 \pm 0,45 ^a	1,6 \pm 0,55 ^{a,b}	2,4 \pm 0,55 ^b	2,2 \pm 0,45 ^b
Alterações no conteúdo de carboidratos	1	0,2 \pm 0,45 ^a	0,2 \pm 0,45 ^a	1,6 \pm 0,55 ^{a,b}	2,4 \pm 0,55 ^b	2,2 \pm 0,45 ^b
Vacuolização citoplasmática	2	0,8 \pm 1,10 ^a	0,8 \pm 0,10 ^a	3,6 \pm 0,90 ^{a,b}	4,4 \pm 2,19 ^{a,b}	4,4 \pm 0,90 ^b
Formato irregular do ovócito	2	0,0 \pm 0,00 ^a	0,0 \pm 0,00 ^a	2,0 \pm 0,00 ^{a,b}	2,0 \pm 0,00 ^{a,b}	3,6 \pm 0,89 ^b
Rompimento/fusão dos grânulos de vitelo	2	0,4 \pm 0,90 ^{a,b}	0,0 \pm 0,00 ^a	2,4 \pm 0,89 ^{a,b}	3,2 \pm 1,10 ^b	3,2 \pm 1,10 ^b
Morfologia anormal da parede do oviduto	3	0,0 \pm 0,00 ^a	0,0 \pm 0,00 ^a	3,0 \pm 0,00 ^{a,b}	7,8 \pm 1,64 ^b	6,0 \pm 0,00 ^b
Nucléolo vacuolizado	3	0,0 \pm 0,00 ^a	0,0 \pm 0,00 ^a	3,6 \pm 1,34 ^{a,b}	6,0 \pm 2,12 ^{a,b}	9,6 \pm 2,51 ^b

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si (Kruskal-Wallis; $p > 0,05$).

*Segundo Konig et al. (2019, 2020).

Os índices individuais (INDEXind), obtidos pelo somatório de cada INDEXalt para um mesmo indivíduo, estão listados na Tabela 3. Os grupos CI e CII não diferiram estatisticamente entre si ($p>0,05$). Já os grupos expostos ao óleo essencial de *C. viminalis* (TI, TII e TIII) apresentaram média dos índices individuais significativamente maiores que os grupos controle ($p<0,05$). Também foi observada diferença estatística do INDEXind entre o grupo TI e os tratamentos TII e TIII ($p<0,05$). Esses dois últimos, contudo, não diferiram entre si ($p>0,05$).

Tabela 3. Média \pm desvio padrão dos Índices individuais (INDEXind) calculados para carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos ao óleo essencial de *Callistemon viminalis* em diferentes concentrações.

Indivíduo	INDEXind				
	H ₂ O	DMSO	TI (6 μ L/mL)	TII (8 μ L/mL)	TIII (10 μ L/mL)
I	3	2	19	30	34
II	2	2	14	33	37
III	2	0	19	29	30
IV	0	2	17	25	34
V	0	0	26	32	31
Média \pm DP	1,4 \pm 1,3 ^a	1,2 \pm 1,1 ^a	19,0 \pm 4,4 ^b	29,8 \pm 3,1 ^c	33,2 \pm 2,8 ^c

Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem estatisticamente entre si (ANOVA *one way*; $p>0,05$).

Não houve diferença estatística na área citoplasmática dos ovócitos dos grupos CI e CII ($p>0,05$) (Tabela 4). Também não foram observadas alterações estatisticamente significativas no grupo TI, em relação aos controles. Os ovócitos I e V dos grupos TII e TIII apresentaram área citoplasmática significativamente menor que ambos os grupos controle ($p<0,05$). No grupo TIII, os valores de área dos ovócitos II também foram estatisticamente menores que CI e CII ($p<0,05$). Para esses estágios de desenvolvimento, houve diferença entre os grupos tratados, tendo os grupos TII e TIII maior redução da área citoplasmática, exibindo efeito dose-dependente.

Tabela 4. Média \pm desvio padrão (μm^2) das áreas de citoplasma de ovócitos de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos a diferentes concentrações do óleo essencial de *Callistemon viminalis*.

Estágios dos ovócitos	H ₂ O	DMSO	TI (6 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	TII (8 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	TIII (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$)
I	2240,92 \pm 643,01 ^a	2349,15 \pm 819,18 ^a	2052,27 \pm 819,18 ^a	1639,59 \pm 427,44 ^b	1291,74 \pm 561,91 ^b
II	5698,28 \pm 1010,50 ^a	5725,60 \pm 1170,19 ^a	5558,85 \pm 1003,79 ^a	5130,47 \pm 833,25 ^{a,b}	4461,70 \pm 1007,63 ^b
III	8713,06 \pm 969,17 ^a	8881,54 \pm 1093,87 ^a	9017,10 \pm 1080,14 ^a	8938,70 \pm 1896,43 ^a	8182,05 \pm 1096,45 ^a
IV	17702,84 \pm 4135,50 ^a	17880,06 \pm 3882,25 ^a	18879,93 \pm 4559,10 ^a	17538,13 \pm 2992,72 ^a	17041,10 \pm 3105,39 ^a
V	44466,30 \pm 7761,302 ^a	43253,98 \pm 8261,89 ^a	43908,88 \pm 7366,27 ^a	38474,85 \pm 7718,36 ^b	36727,80 \pm 7150,95 ^b

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (ANOVA one-way; $p>0,05$).

Também não foi observada diferença significativa no tamanho médio do núcleo dos ovócitos dos grupos CI e CII (Tabela 5). Nos estágios de desenvolvimento I e II, os tratamentos causaram a redução do tamanho dos núcleos dos ovócitos ($p < 0,05$). Nos ovócitos III, contudo, apenas houve diferença no tratamento de maior concentração ($p < 0,05$), em relação aos controles.

Tabela 5. Média \pm desvio padrão (μm^2) do tamanho do núcleo de ovócitos de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos a diferentes concentrações do óleo essencial de *Callistemon viminalis*.

Estágios dos ovócitos	H ₂ O	DMSO	TI (6 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	TII (8 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	TIII (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$)
I	0,555 \pm 0,162 ^a	0,514 \pm 0,103 ^a	0,388 \pm 0,125 ^b	0,293 \pm 0,041 ^{b,c}	0,236 \pm 0,069 ^c
II	0,973 \pm 0,248 ^a	0,977 \pm 0,193 ^{a,b}	0,793 \pm 0,139 ^b	0,602 \pm 0,125 ^c	0,514 \pm 0,133 ^c
III	1,028 \pm 0,160 ^a	0,984 \pm 0,215 ^a	0,941 \pm 0,254 ^{a,b}	0,904 \pm 0,210 ^{a,b}	0,805 \pm 0,212 ^b

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (ANOVA one-way; $p > 0,05$).

Com relação a área vacuolizada (sem coloração), não foi observada diferença entre os ovócitos dos grupos controle I e II (Tabela 6). Nos estágios de desenvolvimento II e III, os tratamentos causaram o aumento da área sem coloração. Nesses estágios, também foi observada diferença entre os grupos TII e TIII em relação a TI.

Tabela 6. Média \pm desvio padrão (μm^2) da área vacuolizada de ovócitos de carrapatos *Rhipicephalus microplus* expostos a diferentes concentrações do óleo essencial de *Callistemon viminalis*.

Estágios dos ovócitos	H ₂ O	DMSO	TI (6 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	TII (8 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	TIII (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$)
I	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a
II	0,085 \pm 0,154 ^a	0,083 \pm 0,149 ^a	0,279 \pm 0,339 ^b	0,679 \pm 0,614 ^c	0,749 \pm 0,697 ^c
III	0,414 \pm 0,411 ^a	0,420 \pm 0,390 ^a	1,253 \pm 0,416 ^b	2,055 \pm 0,814 ^c	2,592 \pm 1,028 ^c
IV	0,185 \pm 0,281 ^a	0,187 \pm 0,313 ^a	0,343 \pm 0,404 ^a	0,444 \pm 0,538 ^a	0,526 \pm 0,778 ^a
V	0,171 \pm 0,239 ^a	0,178 \pm 0,267 ^a	0,204 \pm 0,354 ^a	0,275 \pm 0,423 ^a	0,481 \pm 0,687 ^a

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (Kruskal-Wallis; $p > 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Os componentes majoritários observados no óleo essencial de *Callistemon viminalis* utilizados no presente estudo foram 1,8-cineol (78,10%), α -pineno (12,48%), limoneno (3,36%) e α -terpineol (2,99%). A caracterização do óleo essencial foi realizada previamente e os dados foram publicados no trabalho de Lunguinho et al. (2021). Na literatura, diferentes experimentos já relataram a ação praguicida ou repelente ocasionada por esses compostos isoladamente, entretanto, esse é o primeiro trabalho demonstrando o efeito do óleo essencial de *C. viminalis* no aparelho reprodutor de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. O α -terpineol, por exemplo, demonstrou atividade repelente contra formigas (SHIM, 2001) e o limoneno apresentou atividade acaricida contra *Rhipicephalus microplus* (FERRARINI et al., 2008). Já no estudo de Martinez-Velazquez et al. (2011), foi avaliado o efeito acaricida do óleo essencial de alecrim, rico em α -pineno (31,07%) e 1,8-cineol (14,2%), contra *R. microplus*. Esse óleo foi responsável pela mortalidade de mais de 85% das larvas na concentração de 20% (MARTINEZ-VELAZQUEZ et al., 2011).

Alguns estudos envolvendo a utilização do óleo essencial de diferentes espécies do gênero *Callistemon* também relataram atividade inseticida contra duas pragas agrícolas (*Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*) causando 100% de mortalidade dos indivíduos de ambas as espécies na concentração de 1,5% v/v após 24h (SILVESTRE et al., 2021). No estudo de Kouam et al. (2017) foi verificada a mortalidade de 100% de carrapatos da espécie *Amblyomma variegatum* a partir do quarto dia de exposição ao óleo essencial de *Callistemon* sp. quando submetidos a concentração de 0,27 μ L/g. Dessa maneira foi demonstrado que tanto os seus constituintes individuais, quanto o óleo em si, contemplando várias substâncias ativas (que podem agir de forma sinérgica), são capazes de exercerem ação praguicida.

No presente trabalho, as principais alterações morfológicas observadas nos ovários de carrapatos *R. microplus* expostos ao óleo essencial de *C. viminalis* foram: vacuolização citoplasmática e nucleolar nos ovócitos; irregularidades e espessamento do córion; variações no formato e diminuição da área citoplasmática e nuclear nos ovócitos; modificação no conteúdo de proteínas e carboidratos e variações na morfologia da parede epitelial do oviduto e pedicelo.

Os resultados aqui obtidos demonstraram que todos os grupos tratados exibiram índices individuais estatisticamente diferentes dos grupos controle, na análise semiquantitativa. Além disso, os tratamentos de maior concentração (TII e TIII) foram estatisticamente diferentes do grupo TI, indicando um possível efeito dose-dependente. Um efeito dose-dependente semelhante também foi relatado contra o inseto *Xanthogaleruca luteola* tratado com o composto isolado 1,8-cineol, um dos componentes majoritários do óleo essencial de *C. viminalis* no presente estudo. Nesses insetos, foram relatadas alterações morfológicas e histológicas nos ovócitos tais como: redução no tamanho dessas células e presença de estágios indiferenciados, não sendo possível detectar ovócitos em desenvolvimento; esses achados indicaram a inibição do crescimento, com interferência direta na reprodução (ADIBMORADI et al., 2018). Utilizando a mesma metodologia, König et al. (2019, 2020) também observaram diferença nos índices individuais de carrapatos *R. microplus* e *R. sanguineus* s.l. ingurgitados expostos a diferentes concentrações de acetilcarvacrol, um derivado semissintético do carvacrol. Esses autores relataram índice individual médio de 15,20 e 23,40 para carrapatos *R. microplus* e *R. sanguineus*, expostos respectivamente a 4,5 e 20,0 µL/mL de acetilcarvacrol. No presente estudo, contudo, um índice individual médio de 33,2 foi determinado para *R. microplus* expostos a apenas 10 µL/mL do óleo essencial de *C. viminalis*. A ocorrência de alterações mais evidentes após exposição a baixas concentrações de óleos essenciais, em comparação aos compostos isolados, pode ser explicada pelo efeito sinérgico que acontece entre os constituintes dos óleos essenciais, visto que esses são formados por misturas complexas de ativos com diferentes mecanismos de ação, podendo resultar em aumento da atividade biológica (TAK; JOVEL; ISMAN, 2016).

Os indivíduos dos grupos controle CI e CII exibiram características morfológicas consistentes com as informações descritas para a espécie (SAITO et al., 2005). A ausência de alterações evidentes nos indivíduos expostos apenas ao DMSO a 10% (CII) sugere que essa solução pode ser considerada um solvente adequado para estudos de toxicidade de acaricidas, já que não provoca interferência na análise. Sharma et al. (2012) avaliaram os efeitos de diferentes solventes e verificaram que o DMSO a 10% não causou mortalidade e nem alterações nos parâmetros reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* em comparação ao controle, corroborando os dados obtidos na avaliação morfológica do presente estudo. Dessa forma, as alterações encontradas

nos grupos tratados com *C. viminalis* podem ser atribuídas à ação direta dos componentes presentes em seu óleo essencial.

Os ovócitos estão ligados ao oviduto pelo pedicelo (SAITO et al., 2005), uma das principais portas de entrada de proteínas e lipídeos (BALASHOV, 1983), além de compostos químicos (SAMPIERI et al., 2012). A membrana plasmática das células do pedicelo possui numerosas microvilosidades que se interdigitam com os microvilos localizados na superfície dos ovócitos. Caso essa estrutura tenha sua morfologia alterada, podem ocorrer prejuízos na entrada de nutrientes que auxiliam o crescimento dos ovócitos (OLIVEIRA et al., 2005). Nesse estudo, foram verificadas alterações morfológicas tanto na parede epitelial do oviduto quanto no pedicelo. Essas mudanças podem ter afetado diretamente o desenvolvimento dos ovócitos e, por esse motivo, os danos mais evidentes foram observados principalmente nas células mais jovens. Outra hipótese é a maior vulnerabilidade dessas células por apresentarem apenas uma fina membrana plasmática protetora, ainda sem a presença do córion (SAITO et al., 2005). Sendo a cavidade corporal dos carrapatos uma hemocele banhada pela hemolinfa (SONENSHINE, 1991), a absorção dos compostos presentes no óleo essencial poderia ocorrer por meio desse fluido, que está em contato direto com os ovócitos, sendo considerada outra via de entrada de produtos químicos além do pedicelo (OLIVEIRA et al., 2019).

O córion é uma camada protetora dos ovócitos, sendo sua deposição iniciada no estágio III e finalizada no estágio V de desenvolvimento (SAMPIERI et al., 2012). Nesse estudo, embora tenha sido observado um ligeiro espessamento do córion em alguns ovócitos, esta alteração não foi estatisticamente significativa, devido a baixa frequência em que ocorreu nos tecidos. Entretanto, a irregularidade nesse revestimento foi verificada em todos os tratamentos. Essa camada é constituída por microporos que permitem a oxigenação embrionária (SAMPIERI et al., 2012) e, sua ausência nas células mais jovens (ovócitos I e II) aumenta sua vulnerabilidade a entrada de compostos tóxicos (REMEDIO et al., 2014). Essa característica torna esses estágios imaturos mais vulneráveis a absorção dos compostos presentes no óleo essencial, causando as alterações encontradas nesse trabalho, como vacuolização nucleolar, alterações de formato e presença de regiões vacuolizadas no citoplasma.

Os resultados aqui obtidos mostraram ainda que os ovócitos nos estágios I, II e V diminuíram de tamanho em relação aos controles. O aumento de tamanho dos ovócitos ocorre

durante a vitelogênese, período no qual as substâncias necessárias como as proteínas e carboidratos se acumulam nos ovócitos (XAVIER et al., 2018). Dessa forma, é possível que o óleo essencial possa ter prejudicado a vitelogênese e promovido a formação de ovócitos com reserva nutricional reduzida, conforme observado nesse estudo pelas técnicas que evidenciaram carboidratos e proteínas.

A vacuolização nucleolar aqui observada, também foi relatada por outros autores (KONIG et al., 2020; REMEDIO et al., 2014; VENDRAMINI et al., 2012). Konig et al. (2019) sugeriram uma possível relação entre o conteúdo proteico nos ovários dos carrapatos e a vacuolização nucleolar, uma vez que o nucléolo é o local em que ocorre a biogênese dos ribossomos, que têm função na síntese proteica (SCHEER; HOCK, 1999). Já Pereira et al. (2011) também encontraram vacuolizações nucleolares nas glândulas salivares de *R. sanguineus* semi-ingurgitadas expostas ao fipronil e associaram essa alteração aos estágios finais do processo de morte celular, corroborando com Furquim et al. (2008).

A diminuição do tamanho do núcleo das células germinativas de *R. microplus* também ocorreu nos três diferentes tratamentos com *C. viminalis*. O estudo de Nodari et al., (2017), que avaliaram glândulas salivares de *R. sanguineus* s.l. submetidas a permetrina, demonstrou que esse produto afetou o núcleo causando aumento em seu tamanho. Tais alterações foram observadas principalmente quando ocorreram processos de morte apoptótica, juntamente com a fragmentação do material genético e a presença de figuras de mielina, que indicaram a ocorrência de degeneração precoce do tecido causada pela exposição ao produto. Entretanto, no estudo de Abreu et al. (2020) foi observado que as células epiteliais do integumento do carrapato *R. sanguineus* s.l. apresentaram núcleos menores e imersos em um citoplasma vacuolizado, após exposição a água ozonizada. Essas alterações foram atribuídas também ao processo de morte celular causada pela ação tóxica do produto. Oliveira et al. (2016) observaram a mesma alteração nos ovócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com extrato de *Acmella oleraceae* e inferiram que a degeneração do material genético foi causada pelo tratamento, levando a danos irreversíveis que prejudicam o desenvolvimento celular. Dessa forma, esse achado sugere uma provável degradação do material genético, o que possivelmente indica um processo apoptótico do tecido ovariano, embora estudos mais detalhados sejam necessários para a comprovação da morte celular nos ovócitos.

A vacuolização citoplasmática dos ovócitos foi a alteração morfológica mais notável. Essas regiões não coradas foram observadas em todos os grupos, porém de forma mais evidente nos tratamentos. Nos grupos controles CI e CII, áreas não coradas corresponderam a regiões reduzidas localizadas apenas no polo basal das células entre os estágios II e III, correspondendo a uma característica comum aos ovócitos nesses estágios e relatada anteriormente por König et al. (2019), que propuseram se tratar de um processo fisiológico diante da necessidade de expansão da célula após o estímulo de alimentação e acasalamento da fêmea. Já nos tratamentos, regiões não coradas foram visualizadas de forma mais extensa especialmente nos ovócitos II e III, em que essas áreas diferiram estatisticamente em relação aos grupos controle, em todas as concentrações testadas. A vacuolização citoplasmática em ovários de carrapatos expostos a produtos acaricidas também já foi relatada em diversos estudos (KONIG et al., 2019, 2020; MATOS et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2019; ROMA et al., 2011). Acredita-se que essa alteração seja um indicativo de autofagia como um processo de reciclagem dos componentes citoplasmáticos (MATOS et al., 2014; ROMA; BECHARA; CAMARGO MATHIAS, 2010). Além disso, outros autores argumentam que a vacuolização também possa ocorrer pelo aumento da permeabilidade da membrana, que permite a entrada do composto e degeneração dos constituintes citoplasmáticos, resultando no aparecimento de áreas não coradas (KONIG et al., 2019). Sugere-se que o óleo essencial de *C. viminalis* tenha adentrado pelo pedicelo, que é uma das vias de entrada de substâncias (SAMPIERI et al., 2012), uma vez que foi possível observar maiores regiões não coradas próximas a esse local. De fato, a permeabilidade dos estágios mais jovens (II e III) provavelmente se encontra aumentada, já que a entrada de macromoléculas se eleva nessa fase de desenvolvimento (SAITO et al., 2005).

Em conclusão, os resultados obtidos demonstraram os efeitos deletérios do óleo essencial de *C. viminalis* no sistema reprodutor de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Essas alterações podem resultar em um número reduzido de descendentes e, assim, afetar a sobrevivência da próxima geração e contribuir com o controle desses carrapatos. Todavia, estudos para a avaliação da toxicidade desse óleo para espécies não-alvo bem como sua estabilidade química nas aplicações em campo são necessários.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. R. et al. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari:Ixodidae) to Ozonated Water: Integument Response. **Ozone: Science and Engineering**, v. 42, n. 6, p. 507–516, 2020.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils componentes by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured Pubishing Corporation, Carol Stream, Illinois v. 4. ed. Car, p.809, 2007.
- ADIBMORADI, G. et al. Effect of 1,8-cineol on the biology and physiology of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Col.: Chrysomelidae). **Journal of Plant Protection Research**, v. 58, n. 4, p. 420–430, 2018.
- AGWUNOBI, D. O. et al. Expression profiles of glutathione S-transferases genes in semi-engorged *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) exposed to *Cymbopogon citratus* essential oil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 25, n. 5, p. 918–930, 2020.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia brasileira**, v. 5. ed. Brasília, 1, pp. 198-199, 2010.
- BABALOLA, I. et al. Platelet-Aggregation Inhibitory Activity of Oleanolic Acid, Ursolic Acid, Betulinic Acid, and Maslinic Acid. **J. Pharmacogn. Phytochem.** p. 54- 60, 2013.
- BALASHOV, Y. S. **Ixodid tick ultrastructure**. 1983.
- BARBOSA, C. S. et al. In vitro activity of 3 β -O-tigloylmelianol from *Guarea kunthiana* A. Juss (Meliaceae) on oogenesis and ecdysis of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, 164, pp. 5-11, 10.1016/j.exppara.2016.01.015, 2016.
- DE MENEGHI, D. F. S. Experiences in Tick Control by Acaricide in the Traditional Cattle Sector in Zambia and Burkina Faso: Possible Environmental and Public Health Implications. **Front Public Health**. v. 4, n. November, p. 1–11, 2016.
- DE SOUZA, N. R. D. et al. Sugarcane ethanol and beef cattle integration in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 448–457, 2019.

DRUMMOND; S. E. et al. *Boophilus anulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–133, 1973.

EISEN, L.; DOLAN, M. C. Evidence for personal protective measures to reduce human contact with blacklegged ticks and for environmentally based control methods to suppress host-seeking blacklegged ticks and reduce infection with Lyme disease spirochetes in tick vectors and rodent. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2016.

FERRARINI, S. R. et al. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and β -amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1–2, p. 149–153, 2008.

FURLONG, J. Controle dos carrapatos dos bovinos na região sudeste do Brasil. **Caderno da escola de veterinária UFMG**. Belo Horizonte, v. 8, p. 49–61, 1993.

FURQUIM, S. K. C.; et al. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 152–163, 2008.

GARG, S. C; KASERA H. L. Anthelmintic activity of the essential oil of *Callistemon viminalis*. **Fitoterapia**, v. 53 (5–6) p, 1982.

GOHAR, A. A. et al. Molluscicidal Activity of the Methanol Extract of *Callistemon viminalis* (Sol. ex Gaertner) G. Don ex Loudon Fruits, Bark and Leaves against *Biomphalaria alexandrina* Snails. **Iran Journal Pharmaceuticl Research**. v. 5, n. 1, p. 7–11, 2014.

ISMAN, M. B. Pesticides based on plant essential oils: Phytochemical and practical considerations. **ACS Symposium Series**, v. 1218, p. 13–26, 2016.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**, 1983.

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**, v. 10, n. 4, p. 766–774, 2019.

KONIG, I. F. M. et al. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 129, p. 102780, 2020.

KOUAM, M. K. et al. In vitro acaricidal activity of *Callistemon viminalis* and *Cupressus lusitanica* leaf essential oil against *Amblyomma variegatum* tick. **Bulletin de La Santé et de la production animales em Afrique**. v. 65, P. 509-519. 2017.

LUNGUINHO, A. S. et al. Acaricidal and repellent activity of the essential oils of *Backhousia citriodora*, *Callistemon viminalis* and *Cinnamodendron dinisii* against *Rhipicephalus* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 1, p. 1, 2021.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M. et al. Acaricidal effect of Essential Oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 4, p. 822–827, 2011.

MATOS, R. S. et al. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, v. 113, n. 12, p. 4555–4565, 2014.

NDOMO, A. et al. Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) contre les adultes d'*Aconthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera; Bruchidae). **Tropicultura**, v. 27, n. 3, p. 137–143, 2009.

NDOMO, A. F. et al. Insecticidal activities of essential oil of *Callistemon viminalis* applied as fumigant and powder against two bruchids. **Journal of Applied Entomology**, v. 134, n. 4, p. 333–341, 2010.

NODARI, E. F. et al. Morpho-ultrastructural alterations in the salivary glands of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* s.l. females subjected to permethrin. **Emergent Life Sciences Research**, v. 3, p. 18–31, 2017.

NWANADE, C. F. et al. **Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions**. v.81. Springer International Publishing, 2020.

OLIVEIRA, C. M. et al. Chemical Composition and Allelopathic Activity of the Essential Oil from *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) Blossoms on Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Seedlings. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3551–3557, 2014.

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**, v. 82, n. 2, p. 265–279, 2020.

OLIVEIRA, P. R. et al. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 2, p. 146–156, 2005.

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, n. 7, p. 2459–2465, 2008.

OLIVEIRA, P. R. et al. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy research and technique**, v. 79, n. 8, p. 744–753, 2016.

OLIVEIRA, P. R. et al. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleracea* in the ovaries and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) female ticks. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 7, n. 1, p. 28, 2019.

OYEDEJI, O. O. et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from South Africa. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 1990–1998, 2009.

PEARSE, A. **Histochemistry Theoretical and Applied**. 1985.

PEREIRA, C. P. M. et al. Fipronil-induced cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 481–489, 2011.

PÉREZ DE LEÓN, A. A.; MITCHELL, R. D.; WATSON, D. W. Ectoparasites of Cattle. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 173–185, 2020.

RAHEEM, W. S.; NIAMAH, A. Contamination methods of milk with pesticides residues and veterinary drugs. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 877, n. 1, p. 012003, 2021.

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**, v. 114, n. 2, p. 431–444, 2014.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1570–1572, 2013.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I. et al. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, 117(1), 3–29. doi:10.1007/s00436-017-5677-6. 2017.

ROH, H. S.; LEE, B. H.; PARK, C. G. Acaricidal and repellent effects of myrtacean essential oils and their major constituents against *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 16, n. 3, p. 245–249, 2013.

ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Permethrin-induced ultrastructural changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 3, p. 113–123, 2010.

ROMA, G. C. et al. 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? **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, n. 3, p. 287–299, 2011.

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**, v. 129, n. 3–4, p. 299–311, 2005.

SALEM, M. Z. M. et al. Evaluation of extracts and essential oil from *Callistemon viminalis* leaves: Antibacterial and antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 10, p. 785–791, 2013.

SALES, T. A. et al. Essential Oils from the Leaves and Flowers of *Callistemon viminalis*: Chemical Characterization and Evaluation of the Insecticide and Antifungal Activities. **American Journal of Plant Sciences**, v. 08, n. 10, p. 2516–2529, 2017.

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**, v. 75, n. 5, p. 683–690, 2012.

SCHEER, U.; HOCK, R. Structure and function of the nucleolus. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 385–390, 1999.

SHARMA, A. K. et al. Comparative acaricidal properties of different solvents and surfactants on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 82, n. 2, p. 154–158, 2012.

SHIM, J. H. et al. Determination of Ant Repellents Activity of Cineol, α -Terpineol, Linalool, and Piperitone. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. Vol. 44, 2001.

SILVESTRE, W. P. et al. Insecticidal activity of *Callistemon speciosus* essential oil on *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. **International Journal of Tropical Insect Science**, n. doi:10.1007/s42690-021-00648-8, 2021.

SONENSHINE, D. E., **Biology of Ticks** Vol. 1. 1991.

TAK, J. H.; ISMAN, M. B. Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 72, n. 3, p. 474–480, 2016.

TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasiticides. **Veterinary Journal**, v. 161, n. 3, p. 253–268, 2001.

VEERAKUMARI, L. Botanical anthelmintics. **Asian Journal Science & Technology**, p. 1881–1894, 2015.

VENDRAMINI, M. C. R. et al. 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**, v. 75, n. 12, p. 1745–1754, 2012.

XAVIER, M. A. et al. A proteomic insight into vitellogenesis during tick ovary maturation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

WILLADSEN, P. Tick control: Thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1–2, p. 161–168, 2006.

PARTE IV

1. DISCUSSÃO GERAL

Carrapaticidas sintéticos são comumente utilizados no controle de *Rhipicephalus microplus*; no entanto, vários casos de resistência já foram relatados (ABBAS et al., 2014; FERNÁNDEZ-SALAS; RODRIGUEZ-VIVAS; ALONSO-DÍAZ, 2012; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2017), reforçando a necessidade de desenvolvimento de novas alternativas de intervenção contra o carrapato-do-boi, como o uso dos óleos essenciais (PAZINATO et al., 2014). Sabe-se que os produtos vegetais possuem vários constituintes que podem agir de forma sinérgica e com diferentes modos de ação, dificultando a seleção de indivíduos resistentes (VARMA; DUBEY, 1999). As espécies de plantas *Satureja montana* L. e *Callistemon viminalis* produzem óleos essenciais ricos em constituintes com comprovada ação carrapaticida. Considerando-se que os carrapatos ixodídeos são capazes de fazer a postura de milhares de ovos (DANTAS-TORRES, 2010) é de extrema importância o estudo de métodos de controle baseados na reprodução, de forma a mitigar a infestação por esses ectoparasitos (CAMARGO-MATHIAS, 2018).

No presente trabalho, o óleo essencial de *S. montana* L. demonstrou ação significativa sobre a morfologia dos ovócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Além disso, também foi demonstrada a atividade tóxica do óleo essencial de *C. viminalis* sobre a mesma espécie de carrapato.

Os constituintes das duas espécies de plantas foram bem distintos, sendo os compostos majoritários presentes no óleo essencial da *S. montana* L.: borneol (36,18%), γ -terpineol (12,66%), carvacrol (11,07%) e p-cimeno (9,57%), e na espécie *C. viminalis*: 1,8-cineol (78,10%), α -pineno (12,48%), limoneno (3,36%) e α -terpineol (2,98%). A identificação de composições químicas distintas pode justificar as diferenças observadas nos resultados para cada um dos óleos essenciais avaliados. Ademais, óleos essenciais de uma mesma espécie ainda podem sofrer alterações nos seus constituintes dependendo do país de origem, época de colheita, temperatura, entre outros fatores (ISMAN, 2016).

Nosso estudo evidenciou que o óleo essencial da *S. montana* causou uma maior mortalidade dos carrapatos, uma vez que a concentração de 5 μ L/mL provocou a morte de 15% dos animais, enquanto o uso de concentração mais elevada do óleo essencial de *C. viminalis* (6 μ L/mL) resultou na mortalidade de apenas 5% dos ectoparasitos.

Em relação aos índices de alteração (INDEXalt), determinados pela análise semiquantitativa, ambos os óleos causaram modificações morfológicas semelhantes, porém em diferentes proporções. Esses resultados nos mostram que, embora as alterações observadas tenham sido parecidas, os efeitos ocorreram de formas distintas, provavelmente devido as diferenças na composição de cada óleo.

A análise dos índices individuais (INDEXind), por sua vez, demonstrou que a utilização da concentração de 6 µL/mL do óleo essencial de *C. viminalis* foi responsável por uma média ± desvio padrão correspondente a 19,0 ± 4,4; enquanto que se utilizando uma concentração de 5 µL/mL do óleo essencial de *S. montana*, o valor foi de 23,0 ± 4,95, demonstrando ter causado maiores prejuízos ao tecido ovariano.

Em relação a análise morfométrica, o óleo essencial de *S. montana* L. causou redução da área citoplasmática dos ovócitos III nos três tratamentos (3, 4 e 5 µL/mL). Já o óleo essencial de *C. viminalis* ocasionou a diminuição da área dos ovócitos nos estágios I, II e V nos tratamentos TII e TIII (8 e 10 µL/mL). Além disso, foi observada a redução do tamanho do núcleo dos ovócitos I, II e III bem como extensa área de vacuolização dos ovócitos II e III em todos os tratamentos com *C. viminalis*. Esses dados não foram obtidos para o óleo essencial de *S. montana*.

O processo de vacuolização citoplasmática foi o dano observado em maiores extensões em ambos os estudos. Essa alteração pode estar relacionada com a redução na quantidade de nutrientes dos ovócitos, maior entrada dos compostos no citoplasma dessas células devido a alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática ou mesmo uma maior vulnerabilidade das células mais jovens que ainda não apresentam o córion. Dessa forma, sugere-se que esses efeitos possam prejudicar a formação de indivíduos viáveis ou a sobrevivência dos descendentes, podendo resultar em um controle reprodutivo em longo prazo.

Por fim, cabe ressaltar que a busca por métodos alternativos ecologicamente apropriados é de extrema importância, visto que sua utilização comprovadamente exerce efeito carrapaticida, possuindo ainda relativo baixo custo, maior facilidade na aplicação, menor probabilidade em causar bioacumulação e toxicidade a humanos, animais e meio ambiente.

2. CONCLUSÃO GERAL

Baixas concentrações dos óleos essenciais foram capazes de alterar a morfologia dos ovócitos dos carrapatos *Rhipicephalus microplus*. As alterações morfológicas e histoquímicas comuns nas duas espécies foram irregularidade do córion, alteração no conteúdo de carboidratos e proteínas, vacuolização citoplasmática, formato irregular dos ovócitos, fusão dos grânulos de vitelo, morfologia anormal da parede epitelial do oviduto e pedicelo, além da vacuolização nucleolar. Alterações morfológicas nos ovários dos carrapatos podem diminuir a quantidade de ovos ou mesmo dificultar a sobrevivência desses ectoparasitos pela deficiência de nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento. Dessa forma, os óleos essenciais de *Satureja montana* L. e *Callistemon viminalis* podem ser considerados biopesticidas para o controle em longo prazo de *R. microplus*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, R. Z. et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 2014.

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

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, p. 1–11, 2010.

FERNÁNDEZ-SALAS, A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; ALONSO-DÍAZ, M. A. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3–4, p. 338–342, 2012.

ISMAN, M. B. Pesticides based on plant essential oils: Phytochemical and practical considerations. **ACS Symposium Series**, v. 1218, p. 13–26, 2016.

PAZINATO, R. et al. Influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 63, n. 1, p. 77–83, 2014.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I. et al. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, 117(1), 3–29. doi:10.1007/s00436-017-5677-6. 2017.

VARMA, J.; DUBEY, N. K. Prospectives of botanical and microbial products as pesticides of tomorrow. **Current Scien.** 1999.