



GRAZIELA HERMINIA ANDRADE MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DÉRMICA DO
ACETILCARVACROL EM RATOS WISTAR POR MEIO DE
ANÁLISES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
HISTOLÓGICAS**

**LAVRAS-MG
2022**

GRAZIELA HERMÍNIA ANDRADE MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DÉRMICA DO ACETILCARVACROL EM RATOS
WISTAR POR MEIO DE ANÁLISES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
HISTOLÓGICAS**

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

Dr. Rafael Neodini Remedio
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

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

Mendonça, Graziela Hermínia Andrade.

Avaliação da toxicidade dérmica do acetilcarvacrol em ratos
Wistar por meio de análises hematológicas, bioquímicas e
histológicas / Graziela Hermínia Andrade Mendonça. - 2022.
103 p. : il.

Orientador(a): Rafael Neodini Remedio.

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

Bibliografia.

1. Acaricida. 2. Carvacrol. 3. Toxicologia. I. Remedio, Rafael
Neodini. II. Título.

GRAZIELA HERMÍNIA ANDRADE MENDONÇA

**AValiação DA TOXICIDADE DÉRMICA DO ACETILCARVACROL EM RATOS
WISTAR POR MEIO DE ANÁLISES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
HISTOLÓGICAS**

**ASSESSMENT OF THE DERMAL TOXICITY OF ACETYLCARVACROL IN
WISTAR RATS THROUGH HEMATOLOGIC, BIOCHEMICAL AND
HISTOLOGICAL ANALYSIS**

Dissertação apresentada à 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 19 de dezembro de 2022.

Dr. Rafael Neodini Remedio UFLA

Dra. Camila Souza de Oliveira Guimarães UFLA

Dra. Patrícia Rosa de Oliveira UFBA

Dr. Rafael Neodini Remedio
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

AGRADECIMENTOS

Obrigada, Deus, pelas aptidões que me tornam capaz de adquirir e desenvolver o conhecimento.

Ao concluir o mestrado não poderia deixar de agradecer às pessoas que contribuíram para o bom êxito deste trabalho.

Ao meu orientador, Rafael, agradeço o empenho e a dedicação em compartilhar seus conhecimentos e conduzir com maestria todo o experimento.

À Aline, por estar sempre disposta a me auxiliar.

Ao Isaac, pelos ensinamentos no laboratório.

À Samantha, responsável pelo biotério, pelas instruções.

Aos professores José Ribamar, Rodrigo, Camila e Patrícia, que fizeram parte das bancas de qualificação e de defesa, pelas relevantes contribuições.

Aos meus filhos, por compreenderem e relevarem os momentos de impaciência.

Ao Henrique, por me apoiar, incentivar e permanecer sempre ao meu lado.

Agradeço também à Universidade Federal de Lavras por ter me proporcionado os recursos necessários para a obtenção deste título.

Don't ya think that you need somebody?

Don't ya think that you need someone?

Everybody needs somebody

You're not the only one

(November Rain, Gun's Roses)

RESUMO

Os carrapatos são ectoparasitos de grande importância médico-veterinária, principalmente devido ao fato de transmitirem grande variedade de microrganismos patogênicos. Atualmente, o controle destes parasitos é realizado, em sua maior parte, pela aplicação de acaricidas sintéticos. No entanto, o uso prolongado e indiscriminado dessas substâncias tem resultado na seleção de cepas de carrapatos resistentes. Por esta razão, nos últimos anos, investigações sobre produtos de origem vegetal com atividade carrapaticida, como os óleos essenciais e seus princípios ativos, têm se intensificado. O carvacrol, um monoterpene fenólico encontrado em óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae, apresenta reconhecidos efeitos inseticidas, acaricidas e repelentes. Sua acetilação pode ser realizada na tentativa de se obter um composto derivado com melhor perfil farmacológico e menor toxicidade aos organismos não-alvo. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade dérmica com doses repetidas do acetilcarvacrol em ratos Wistar a fim de se investigar os potenciais riscos da sua utilização em mamíferos. Foram utilizados 20 ratos divididos em quatro grupos (n=5). Para isto, 2,5 mL do produto foram aplicados diariamente, pela via cutânea, em área dorsal previamente tricotomizada, em diferentes concentrações (26, 52 e 104µL/mL) durante 21 dias. O grupo controle foi tratado apenas com o veículo (DMSO a 5%). Ao final do período de tratamento, os animais foram anestesiados e eutanasiados por punção cardíaca e, em seguida, dissecados para a coleta de amostras de fígado e da porção da pele onde a substância foi aplicada. Os ratos desenvolveram dermatite irritante de contato cumulativa no local de aplicação do produto e alterações microscópicas significativas nessa região da pele. Também foi detectada elevação dos níveis séricos de ureia e da transaminase hepática ALT. As alterações histológicas observadas no fígado dos animais corroboram com a elevação dos níveis séricos da enzima ALT, que indica danos hepáticos leves e reversíveis. Os resultados sinalizam que a aplicação dérmica do acetilcarvacrol nas condições experimentais aqui descritas provocaram sinais de toxicidade local e sistêmica.

Palavras-chave: Acaricida. Acetilação. Carvacrol. Morfologia. Toxicologia.

ABSTRACT

Ticks are ectoparasites of great medical and veterinary importance, mainly due to the fact that they transmit a variety of pathogenic microorganisms. Currently, the control of these parasites is carried out, for the most part, through the application of synthetic acaricides. However, the prolonged and indiscriminate use of these substances has resulted in the selection of resistant tick strains. For this reason, in recent years, investigations into products of plant origin, such as essential oils and their active ingredients with acaricidal activity, have intensified. Carvacrol, a phenolic monoterpene found in essential oils of plants of the Lamiaceae family, has recognized insecticidal, acaricidal and repellent effects. Its acetylation is performed as an attempt to obtain a derivative compound with a better pharmacological profile and less toxicity to non-target organisms. Thus, the aim of this study was to evaluate the dermal toxicity with repeated doses of acetylcarvacrol in Wistar rats in order to investigate the potential risks of its use in mammals. For this, 2,5 mL of the product were applied daily through the skin, in a previously shaved dorsal area, at different concentrations (26, 52 and 104 μ L/mL) for 21 days. The control group was treated with vehicle alone (5% DMSO). At the end of the treatment period, the animals were anesthetized and euthanized by cardiac puncture and then dissected to collect samples of the liver and the portion of the skin where the substance was applied. The rats developed cumulative irritant contact dermatitis at the site of product application and significant microscopic changes in this region of the skin. Elevated serum levels of urea and hepatic ALT transaminase were also detected. The histological changes observed in the liver of the animals corroborate the elevation of the serum levels of the ALT enzyme, which indicates mild and reversible liver damage. The results indicate that the dermal application of acetylcarvacrol in the experimental conditions described here provoked signs of local and systemic toxicity.

Keywords: Acaricide. Acetylation. Carvacrol. Morphology. Toxicology.

SUMÁRIO

PARTE I.....	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Carrapatos	12
2.2 <i>Rhipicephalus sanguineus sensu lato</i> (s.l.)	13
2.3 Resistência aos acaricidas	15
2.4 Acaricidas de origem vegetal.....	16
2.5 Carvacrol.....	18
2.6 Acetilcarvacrol.....	20
2.7 Toxicidade do Carvacrol e Acetilcarvacrol.....	23
2.8 Processos de desenvolvimento de um novo fármaco	25
2.9 Métodos de análise em toxicidade.....	27
2.10 O Fígado	29
2.11 A Pele	30
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
REFERÊNCIAS	35
PARTE II	
ALTERAÇÕES HEPÁTICAS E CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR EXPOSTOS AO ACETILCARVACROL EM TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA COM DOSE REPETIDA	52
1 INTRODUÇÃO	56
2 MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Acetilação do carvacrol.....	58
2.2 Animais.....	58
2.3 Delineamento experimental	58
2.3.1 Toxicidade dérmica com dose repetida	59
2.3.2 Pontos finais humanitários (“endpoints”).....	61
2.4 Material biológico.....	62
2.4.1 Análises hematológicas e bioquímicas	62
2.4.2 Avaliação morfológica e morfométrica	63
2.5 Análise dos resultados	63
3 RESULTADOS	68
3.1 Avaliação clínica e comportamental	68
3.2 Análises Hematológica e Bioquímica	70
3.3 Fígado	72
3.3.1 Avaliação Morfológica	72
3.3.2 Análise semiquantitativa.....	75
3.3.3 Avaliação Morfométrica	76
3.4 Pele	78
3.4.1 Avaliação Morfológica	79
3.4.2 Análise semiquantitativa.....	84
3.4.3 Avaliação morfométrica.....	87
4 DISCUSSÃO	89
REFERÊNCIAS	94

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos obrigatórios em pelo menos uma fase de sua vida e pertencem à Subclasse Acari, Superordem Parasitiformes e Ordem Ixodida (BARKER *et al.*, 2004). Em termos de transmissão de patógenos, esses animais são considerados o segundo maior vetor de doenças aos humanos, ficando atrás apenas dos mosquitos. As doenças por eles transmitidas têm impacto negativo na saúde humana e animal e na produção de alimentos em todo o mundo (PAROLA; RAOULT, 2001).

Neste sentido, é fundamental o controle desses parasitos, comumente realizado através da aplicação de acaricidas sintéticos. No entanto, estes produtos provocam danos generalizados ao atacar tanto organismos alvos quanto não alvos, causando efeitos tóxicos ou alérgicos nos vertebrados e podendo até mesmo levar à seleção de populações de carrapatos resistentes após utilização de longa duração, além de ocasionar bioacumulação em toda a cadeia alimentar (FURTADO *et al.*, 2013).

Com um pensamento mais ecológico e sustentável, iniciou-se a busca por produtos não convencionais para controlar infestações de carrapatos. Como o Brasil possui uma grande diversidade de plantas, os seus derivados vêm ganhando espaço no controle populacional destes animais (ALVES *et al.*, 2012). Óleos essenciais e extratos vegetais se ofertam como possibilidade esperançosa no controle desses parasitos devido à ampla variedade de espécies de plantas com propriedade antiparasitária, grande abundância e baixo custo (BENELLI *et al.*, 2016). A utilização de óleos essenciais, isolados ou em combinação com outros métodos, pode ter um importante papel no controle de patógenos, contribuindo para a redução do uso de pesticidas e, conseqüentemente, para um menor impacto ao meio ambiente (PEREIRA, 2014).

O carvacrol, um dos principais constituintes presente nos óleos essenciais de plantas como *Origanum* sp. e *Thymus* sp., tem sido usado em baixas concentrações como aromatizante e conservante de alimentos, bem como fragrância em formulações cosméticas (SUNTRES, 2015) Além disso, o carvacrol também demonstrou atividade acaricida significativa, podendo ser considerado uma opção promissora para o controle dos carrapatos (COSKUN *et al.*, 2008; KOC *et al.*, 2013; LAGE *et al.*, 2013; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2019).

Estudos demonstraram que a acetilação do carvacrol aumenta sua atividade biológica (RAMIREZ *et al.*, 2016), enquanto diminui sua toxicidade para mamíferos (ANDRE *et al.*, 2016). O acetilcarvacrol apresentou efeito ansiolítico em ratos (PIRES *et al.*, 2013), atividade bactericida (CACCIATORE *et al.*, 2015), ação anti-inflamatória (DAMASCENO *et al.*, 2014), atividade anti-helmíntica (MORAES *et al.*, 2013), dentre outros. Além disso, prejudicou o

desempenho reprodutivo de carrapatos *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), provavelmente contribuindo para seu controle em longo prazo (KONIG *et al.*, 2019, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020b).

Embora alguns estudos tenham demonstrado os efeitos tóxicos do acetilcarvacrol em vertebrados, nenhum dos experimentos utilizou concentrações reconhecidamente eficazes do produto contra carrapatos. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar e determinar a toxicidade dérmica desse composto por meio de aplicação tópica com doses repetidas em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), empregando-se concentrações de acetilcarvacrol baseadas nos valores de concentração letal previamente definidos *in vitro* para carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (KONIG *et al.*, 2020).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Carrapatos

Pertencentes ao Reino Animalia, Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida, Superfamília Ixodoidea, são divididos em três famílias: Ixodidae (carrapatos duros), Argasidae (carrapatos moles) e Nuttalliellidae (GUGLIELMONE *et al.*, 2014). Aproximadamente 900 espécies de carrapatos foram descritas e alguns gêneros incluem várias espécies transmissoras de agentes importantes de doenças (PFÄFFLE *et al.*, 2013).

As espécies de maior interesse veterinário estão incluídas no grupo dos ixodídeos ou carrapatos duros, assim denominados por possuírem um escudo quitinoso que cobre a parte dorsal do seu corpo integralmente, no caso dos machos, ou parcialmente, no caso das fêmeas, larvas e ninfas, permitindo assim a dilatação do abdômen após a alimentação (TAYLOR *et al.*, 2017). O ciclo de vida de todos os carrapatos duros engloba quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adulto. Cada estágio ativo se alimenta apenas uma vez na vida e, após atingir uma massa crítica, as fêmeas adultas ingurgitadas se desprendem do hospedeiro e podem realizar a oviposição (SZABO, BECHARA, 1999).

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas hematófagos obrigatórios em pelo menos um estágio de vida (SONENSHINE; ROE, 2014). O processo espoliativo ocasionado pela alimentação destes animais interfere no ganho de peso durante a vida do animal vertebrado, podendo causar anemia (NOGUEIRA *et al.*, 2020). Além disso, a inoculação de toxinas na corrente sanguínea do hospedeiro pode interferir na síntese proteica, resultando em uma desproporção proteína-gordura, com prevalência desta última (GOMES, 1998). Neurotoxinas presentes na saliva de várias espécies de carrapatos e inoculadas na corrente sanguínea do hospedeiro durante o repasto sanguíneo bloqueiam a condução neuromuscular, induzindo uma paralisia flácida de caráter ascendente que se instala rapidamente (de horas a dias), podendo ocasionar insuficiência cardíaca e até mesmo levar ao óbito (EDLOW; MCGILLICUDDY, 2008). Outro dano direto ocasionado pelo processo alimentar dos carrapatos ocorre no couro do animal vertebrado pois, ao se fixar, o parasito introduz um órgão quitinoso e serrilhado, denominado hipostômio, que lesiona a pele, favorecendo o aparecimento de enfermidades secundárias como as miíases cutâneas e podendo gerar prejuízos no mercado do couro (GONZALES; SERRA-FREIRE, 1992).

Além das ações hematófaga e tóxica, os carrapatos são capazes de transmitir uma maior variedade de microrganismos patogênicos, como protozoários, rickettsias, espiroquetas e vírus, quando comparados a qualquer outro grupo de artrópodes hematófagos em todo o mundo (DANTAS-TORRES, 2010). Por isso, estão entre os vetores mais importantes de doenças que afetam o gado, animais domésticos e seres humanos (JONGEJAN; UILENBERG, 1994). As principais doenças transmitidas aos seres humanos pelos carrapatos são a Febre Maculosa, a babesiose, a erliquiose e a borreliose (MASSARD & FONSECA, 2004).

Esta extraordinária capacidade de agirem como vetores de doenças se deve às seguintes características biológicas: hematofagia em todas as fases do ciclo de vida; fixação profunda nos hospedeiros, dificultando sua remoção; ingurgitamento lento, permitindo o tempo suficiente para adquirir e inocular patógenos; adaptação a diferentes hospedeiros, possibilitando veiculação de patógenos entre diferentes espécies; longevidade dos estágios no ambiente, proporcionando tempo para multiplicação de patógenos; transmissão transovariana, gerando proles com potencial de transmitir e funcionar como eficientes reservatórios de patógenos; poucos inimigos naturais; grande esclerotização, propiciando resistência às adversidades climáticas; e grande potencial biótico, que possibilita a perpetuação da espécie (HARWOOD & JAMES, 1979). As picadas de carrapatos também podem provocar uma resposta imune grave, pois sua saliva carrega uma ampla variedade de moléculas farmacologicamente ativas direcionadas para inibir as defesas do hospedeiro (ALARCON-CHAIDEZ *et al.*, 2006; NICHOLSON *et al.*, 2019).

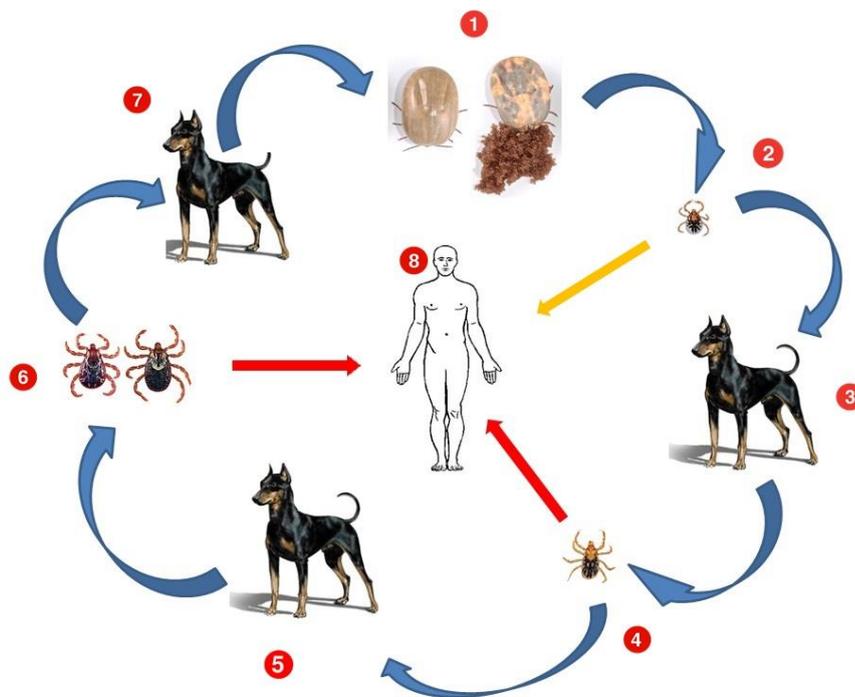
2.2 *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.)

Originário da África, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.) (Acari: Ixodidae), também conhecido como carrapato-marrom-do-cão, é uma espécie com ampla distribuição geográfica que encontrou no Brasil temperatura e umidade ideais para seu desenvolvimento, podendo ser encontrado em ambientes rurais e urbanos (LABRUNA, 2004). É um carrapato heteroxeno que pode parasitar diversos hospedeiros domésticos e silvestres, inclusive o homem, embora tenha o cão como hospedeiro preferencial (FERNANDES *et al.*, 2010). É transmissor de vários patógenos aos seus hospedeiros, além de ocasionar desconforto, dor, incômodo e prurido pela sua picada (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015). É considerado um dos carrapatos de maior importância médico-veterinária do mundo (PAZ *et al.*, 2008).

Estes carrapatos são caracterizados por possuírem um ciclo de vida trioxeno (FIGURA 1), ou seja, necessitam de três hospedeiros para completar seu processo de alimentação e

reprodução (PEGRAM *et al.*, 1987). As larvas caem do hospedeiro após a alimentação e mudam para o estágio de ninfa; as ninfas não alimentadas buscam um novo hospedeiro e podem se ligar ao mesmo ou a um vertebrado diferente, alimentando-se nele e abandonando-o com o objetivo de fazer a muda para o estágio adulto no ambiente. Os adultos encontram novamente o hospedeiro, alimentam-se e acasalam-se. As fêmeas, após estarem completamente ingurgitadas, desprendem-se do seu local de fixação no hospedeiro e se deslocam para o ambiente, onde realizam a postura de todos os seus ovos continuamente durante um período de vários dias, morrendo em seguida (OLIVER, 1982).

Figura 1 - Ciclo de vida do carrapato *R. sanguineus* s.l. e as vias de transmissão de patógenos.



1- Fêmeas adultas deixam o hospedeiro após o ingurgitamento completo para a realização da oviposição. **2-** Larvas eclodem dos ovos. **3-** As larvas se alimentam no primeiro hospedeiro do ciclo trioxeno. **4-** As larvas fazem a muda para o estágio de ninfa no ambiente, logo após deixarem o primeiro hospedeiro. **5-** As ninfas infestam o segundo hospedeiro. **6-** As ninfas descem para o ambiente realizarem a muda para o estágio adulto. **7-** Os adultos buscam o terceiro hospedeiro para alimentação e acasalamento. **8-** O ser humano pode adquirir patógenos em qualquer fase do ciclo de vida do carrapato.

Fonte: Oliveira *et al.* (2020b).

Uma única fêmea de *R. sanguineus* s.l. pode fazer a postura de 4 mil ovos, em média, podendo ultrapassar 7 mil ovos dependendo da temperatura, período de alimentação e tempo

de oviposição (KOCH, 1982). A fêmea coloca os ovos, preferencialmente, ao abrigo da luz, em locais como buracos na parede, frestas e regiões de difícil acesso. Esse acaba sendo um dos fatores que dificulta a exterminação deste parasito de uma propriedade. A temperatura ótima pode variar de 20 a 30°C, porém são animais que se adaptam facilmente a outras temperaturas (DANTAS-TORRES, 2008). Tanto a larva como a ninfa podem sobreviver no ambiente sem se alimentar por um longo período (DANTAS-TORRES *et al.*, 2010). Em suas fases de larva e ninfa, esta espécie é capaz de se alimentar com frequência em humanos (HARRISON *et al.*, 1997; MANFREDI *et al.*, 1999). Os carrapatos *R. sanguineus* s.l. podem causar diversos problemas nos hospedeiros de forma direta, bem como transmitir uma grande variedade de microrganismos causadores de diversas doenças (GROVES *et al.*, 1975), como *Rickettsia conorii*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia canis* (OLIVEIRA *et al.*, 2020b; OTRANTO *et al.*, 2005) e *Borrelia* sp. (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006; DANTAS-TORRES *et al.*, 2008), além de estarem possivelmente envolvidos na transmissão de *Leishmania* sp. (COUTINHO *et al.*, 2005) e de *R. rickettsii* (BARBOSA-SILVA *et al.*, 2017; DURÃES *et al.*, 2021; MOERBECK *et al.*, 2016).

Devido à importância de se controlar a infestação por esses parasitos, nos últimos anos houve um avanço no desenvolvimento de novos compostos acaricidas para serem aplicados em cães e gatos. Dentre os grupamentos químicos sintéticos mais empregados no controle de carrapatos em pequenos animais encontram-se os carbamatos, os organofosforados, os piretróides, as amidinas, as lactonas macrocíclicas e os fenilpirazóis, com modos de ação e eficácia distintos (FERNANDES *et al.*, 2010). Contudo, o uso indiscriminado desses compostos, que tem levado ao surgimento de populações de carrapatos resistentes, associado à contaminação do meio ambiente e seu potencial de intoxicação para a saúde de animais e humanos, fez com que se despertasse o interesse de pesquisadores para o desenvolvimento de formas de controle distintas (ZAIM; GUILLET, 2002).

2.3 Resistência aos acaricidas

A maneira mais tradicional de controle de carrapatos é o uso de acaricidas sintéticos (DE MENEGHI, 2016; HIGA, *et al.*, 2019), embora também existam outros métodos, como a vacinação, o controle biológico, a rotação de pastagens e o uso de produtos de origem vegetal, por exemplo (RODRIGUEZ-VIVAZ *et al.*, 2014; WASSERMANN *et al.*, 2016; CONTRERAS *et al.*, 2017).

Desde que realizada corretamente, a forma de controle de ectoparasitas mais eficaz ainda é obtida pela utilização de produtos químicos, tanto em animais para a agropecuária quanto em animais domésticos (GOMES *et al.*, 2011). Quando utilizados incorretamente e de forma indiscriminada, no entanto, estes produtos podem intensificar a seleção de populações de carrapatos resistentes aos diferentes tipos de defensivos agrícolas (FREITAS, *et al.*, 2005), levando à necessidade de maiores doses em intervalos cada vez menores (KLAFKE *et al.*, 2017), o que pode gerar efeitos tóxicos nos animais, plantas e seres humanos, além de contaminar o meio-ambiente (TSABOULA *et al.*, 2016).

A grande maioria dos acaricidas apresentam ação neurotóxica, e os carrapatos, por sua vez, podem apresentar alguns mecanismos para burlar/sobreviver à ação do tratamento químico, uma vez que a resistência é um fenômeno evolutivo. Sendo assim, o surgimento da resistência pode ocorrer por três mecanismos principais: detoxificação celular/resistência metabólica, insensibilidade no sítio de ação e diminuição da penetração cuticular da droga (HEMINGWAY *et al.*, 1998; OAKESHOTT *et al.*, 2003; FRENCH-CONSTANT *et al.*, 2004).

As mutações genéticas ocorrem naturalmente na população. Quando uma classe de drogas é introduzida pela primeira vez para o tratamento de parasitos, alelos resistentes serão raros; no entanto, à medida que a frequência dos tratamentos aumenta, a pressão de seleção nos alelos resistentes aumenta, resultando em um aumento nos indivíduos resistentes. Devido ao curto ciclo de vida dos carrapatos e à sua alta fecundidade, a resistência pode se espalhar rapidamente através da população (WOLSTENHOLME *et al.*, 2004).

2.4 Acaricidas de origem vegetal

Devido à resistência desenvolvida pelos carrapatos ao longo de décadas de uso dos acaricidas sintéticos, juntamente com as importantes preocupações ambientais, pesquisas com foco em acaricidas de origem vegetal são cada vez mais promissoras e precisam ser encorajadas, a fim de desenvolver novas substâncias mais seguras e ambientalmente sustentáveis para o controle destes parasitos (BENELLI *et al.*, 2016). Assim, o uso de produtos de origem vegetal contendo compostos acaricidas tem sido proposto para reduzir o impacto ambiental e econômico dos compostos sintéticos (CRUZ *et al.*, 2013; BENELLI, 2015; BENELLI *et al.*, 2016; HABEEB, 2010).

Dentro deste contexto, os óleos essenciais aparecem como uma alternativa atraente. Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente

odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, o fato de serem geralmente líquidos de aparência oleosa a temperatura ambiente e possuírem aroma agradável e intenso (BRUNETON, 1995; SIMÕES; SPITZER, 1999). São considerados misturas complexas e simples ao mesmo tempo: complexas porque podem conter dezenas ou até mesmo centenas de compostos diferentes, sendo que o composto majoritário presente dependerá da espécie ou variedade, e simples porque predominam os compostos terpênicos e/ou fenilpropanóides, com estruturas químicas inter-relacionadas (TAPPIN *et al.*, 2004).

Os óleos essenciais são líquidos oleosos provenientes das flores, brotos, sementes, cascas, folhas, ervas, madeiras, frutas e raízes de origem botânica. Nos vegetais, eles promovem a atração dos insetos polinizadores, aumentando a efetividade da reprodução, possuem função repelente contra insetos que sejam seus inimigos naturais, protegem o tecido vegetal no ataque de fungos e bactérias que possam os danificar e inibem a germinação de sementes de plantas parasitas (competidoras) ao seu redor (PINHEIRO, 2003).

São industrialmente extraídos por destilação com vapor de água, mas o método mais utilizado nos últimos anos é a extração supercrítica com dióxido de carbono, operando a baixas temperaturas, garantindo a preservação dos compostos essenciais presentes, sendo os mesmos armazenados em recipientes escuros e herméticos para evitar mudanças na sua composição (BURT, 2004; GAÑÁN; BRIGNOLE, 2011).

Benelli e Pavela (2018), em seu trabalho de revisão sistemática, observaram que todos os óleos testados nos estudos revisados demonstraram ação repelente, independente da espécie e estágio de desenvolvimento dos carrapatos; constataram ainda que testes de curto prazo avaliando o efeito repelente indicaram que os óleos em concentrações acima de 1% já causavam mais de 70% de repelência e que concentrações superiores a 10% no geral levavam à repelência total.

Nessa perspectiva, bioativos presentes nos óleos essenciais de várias plantas têm sido cogitados para uso no controle de carrapatos, por provocarem modificações em diversos órgãos internos desses ectoparasitos, prejudicando sua fisiologia, sua alimentação e reprodução (ANHOLETO *et al.*, 2020; LIMA DE SOUZA *et al.*, 2019; REMEDIO *et al.*, 2015). Plantas das famílias Lamiaceae e Verbenaceae, de acordo com estudos desenvolvidos em laboratório, apresentam grande potencial para fornecerem princípios ativos com ação acaricida. Exemplos de ambas as Famílias podem apresentar o monoterpene carvacrol como composto majoritário em seus óleos essenciais, que apresenta diversas propriedades comprovadas, dentre elas a

acaricida (KOC *et al.*, 2013). Bressanin *et al.* (2020) revisaram o conhecimento atual disponível sobre compostos puros extraídos de óleos essenciais testados no Brasil com potencial atividade acaricida. Neste estudo, os componentes majoritários mais evidenciados foram o timol e o carvacrol.

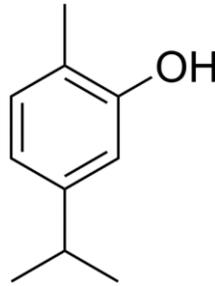
Entretanto, alguns problemas específicos precisam ser resolvidos, como a alta volatilidade, baixa solubilidade em água e instabilidade química dos produtos extraídos de plantas (GAÑÁN; BRIGNOLE, 2011). Além disso, vários fatores podem influenciar a composição, qualidade e quantidade dos óleos essenciais produzidos pelas plantas, como o clima, composição do solo, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, ataque de patógenos, idade da planta e órgão utilizado para extração (BAKKALI *et al.*, 2008; SIMÕES *et al.*, 2003).

2.5 Carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) é um monoterpene fenólico com fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$, encontrado principalmente em óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae. É um dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de plantas *Origanum* sp. e *Thymus* sp., assim como seu isômero, o timol (SANTORO *et al.*, 2007). Apresenta-se na forma líquida em temperatura ambiente, coloração amarelo claro com densidade igual a 0,975 g/mL, odor aromático semelhante ao orégano com coeficiente de partição n-octanol/água de 3,52. Seu ponto de fusão é de 2°C e seu ponto de ebulição varia de 234-236°C (NEVES, 2009). O carvacrol é lipofílico, apresenta baixa solubilidade em água e característica pungente (BASER, 2008).

Os monoterpenos pertencem a um grupo grande e diverso de compostos químicos chamados de terpenos e são representantes de uma classe de compostos orgânicos de ocorrência natural cuja estrutura química (FIGURA 2) consiste em dois isoprenos ligados. Cada isopreno é formado por cinco átomos de carbono ligados a oito átomos de hidrogênio (C_5H_8) (BAKKALI *et al.*, 2008).

Figura 2 - Estrutura química do carvacrol.



Fonte: Peixoto-Neves *et al.* (2010).

O carvacrol, bem com o seu isômero, timol, possuem bons perfis toxicológicos, causam baixa irritação cutânea quando utilizados em baixas concentrações. Diante disto, tem-se aumentado o interesse pela aplicação destes compostos como promotores de permeação cutânea para facilitar a veiculação de fármacos pela via tópica (CHANTARSAT, 2009).

A literatura mostra que este monoterpene é excretado após 24 horas em grandes quantidades ou inalterado na urina (SCHELIN, 1991). Foi aprovado pela FDA (Estados Unidos) para utilização em alimentos e o seu uso foi incluído, pelo Conselho da Europa, na lista de aromas químicos que podem ser adicionados aos alimentos em nível de 2ppm em bebidas, 5ppm em comidas e 25ppm em doces (DE VINCENZI *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, pesquisas significativas demonstraram que o carvacrol possui uma variedade de propriedades, incluindo antioxidante (JAYAKUMAR, *et al.*, 2012; ARISTATILE *et al.*, 2011; SLAMENOVA *et al.*, 2011), antibacteriana (PEREZ-CONESA *et al.*, 2011; RIVAS *et al.*, 2010), antifúngica (AHMAD *et al.*, 2011; DALLEAU *et al.*, 2008), antitumoral (ARUNASREE, 2010), hepatoprotetora (CANBEK, *et al.*, 2008), espasmolítica (BOSKABADY *et al.*, 2011), vasodilatadora (PEIXOTO-NEVES, 2010), anti-inflamatória (HOTTA *et al.*, 2010), antinociceptiva (GUIMARÃES *et al.*, 2010) e acaricida (COSKUN *et al.*, 2008; KOC *et al.*, 2013; LAGE *et al.*, 2013; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2019; LIMA DE SOUZA *et al.*, 2019).

O carvacrol demonstrou ação antiviral contra Herpes Simplex tipo I, com efeito inibitório, possivelmente devido a uma interação direta entre o composto e a cápsula proteica do vírus (LAI *et al.*, 2012). O composto também apresentou ação antibacteriana, relacionada à sua estrutura fenólica, possivelmente interferindo na atividade de enzimas da parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus*, causando diminuição do potencial de membrana e desestabilização das porções lipídicas das membranas plasmáticas bacterianas (NOSTRO, 2007), devido ao seu acúmulo na membrana citoplasmática e fuga dos íons potássio, que teria

como consequência uma diminuição do pH intracelular e inibição da síntese de ATP, inibindo o crescimento bacteriano (POL *et al.*, 2002). Quando testado contra patógenos orais, demonstrou forte atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos, sendo a maior efetividade observada contra *C. albicans* e *Streptococcus mutans* (BOTELHO *et al.*, 2007).

Em estudo realizado com diferentes cepas de *Candida albicans*, causadoras da candidíase, o carvacrol exibiu atividade fungicida devido à sua capacidade de inibir a biossíntese do ergosterol e tornar porosa a membrana plasmática do fungo (AHMAD *et al.*, 2011).

Um estudo feito por Canbeck *et al.* (2008) sugeriu que o carvacrol apresenta efeito hepatoprotetor em ratos submetidos a isquemia a reperfusão. Alguns estudos demonstraram ainda que este monoterpene possui ações ansiolíticas (MELO *et al.*, 2010) e antidepressivas (MELO *et al.*, 2011) possivelmente através da ativação das vias GABAérgicas e dopaminérgicas, respectivamente. O carvacrol e o timol são considerados potenciais fármacos para a doença de Alzheimer, devido ao seu efeito inibitório sobre a acetilcolinesterase (AChE) (JUKIC *et al.*, 2007; ORHAN *et al.*, 2008).

O carvacrol demonstrou ação em todos os estágios de desenvolvimento de carrapatos quando aplicado isoladamente e/ou em associação com outros componentes (PANELLA *et al.*, 2005). Quando diluído em etanol, apresentou um bom desempenho no controle reprodutivo de *R. microplus*. Na dosagem de 100% da Concentração Letal média - CL₅₀ (20,11 mg/mL), o produto manifestou capacidade de diminuir expressivamente a porcentagem de oviposição (61,59% de redução na massa de ovos), gerando 61,1% de eficácia. Desta forma, pode afetar diretamente no ciclo de vida do carrapato-do-boi, reduzindo o número de indivíduos das gerações futuras (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2019). Já em larvas não ingurgitadas de *R. microplus*, as CL₅₀ e CL₉₀ do carvacrol foram, respectivamente, 0,83 mg/mL e 2,02 mg/mL e a mortalidade de 100% dos animais foi obtida na concentração de 2,5 mg/mL (NOVATO *et al.*, 2018). Além disso, Lima de Souza *et al.* (2019) demonstraram que a concentração letal média deste composto foi de 62,48 µL/mL (CL₅₀) para fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. semi-ingurgitadas.

2.6 Acetilcarvacrol

O carvacrol, assim como outros fenóis, é mais tóxico do que muitos ésteres, e sua acetilação pode ser realizada para a obtenção de um composto derivado com melhor perfil farmacológico e menor toxicidade aos organismos não-alvo. Assim, sugere-se que este processo

acetilado diluído em uma mistura de tricloroetileno e azeite de oliva (RAMÍREZ *et al.*, 2013). Todavia, Novato *et al.* (2018) demonstraram que o carvacrol apresentou efeito acaricida superior ao seu derivado acetilado em teste realizado empregando etanol absoluto como solvente. Vale ressaltar ainda que, não surpreendentemente, a utilização de solventes diferentes pode ocasionar resultados diversos dos trivialmente esperados (KARAASLAN *et al.*, 2018).

Um estudo realizado para avaliar o potencial acaricida do acetilcarvacrol e determinar a eficácia de doses subletais no controle de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. em jejum, por meio do Teste de Imersão de Adultos (AIT), estabeleceu que as concentrações necessárias para produzir a morte de 50 e 90% (CL₅₀ e CL₉₀) dos animais expostos foram de 2,8 e 7,2 µL/mL, respectivamente. Além disso, o composto provocou alterações morfológicas consideráveis no tegumento dos carrapatos, observadas tanto na cutícula quanto no epitélio (OLIVEIRA *et al.*, 2020b). No entanto, König *et al.* (2020), ao determinarem a CL₅₀ e CL₉₀ para fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l. expostas ao acetilcarvacrol pelo mesmo método de imersão, encontraram os valores de 17,8 e 26,2 µL/mL, respectivamente. Isso indica que são necessárias quantidades mais elevadas dos produtos para que ocorra a morte dos carrapatos após a ingestão de sangue, quando comparados aos carrapatos em jejum. Além disso, o acetilcarvacrol demonstrou capacidade de alterar morfológicamente os órgãos do sistema reprodutor de fêmeas de *R. microplus*, ocasionando danos aos ovócitos e, assim, inibindo a geração de uma nova prole. Estas alterações foram dose-dependentes, com os melhores resultados evidenciados no grupo que foi exposto à maior concentração da droga (4,5µL/mL) (KONIG *et al.*, 2019). Em comparação ao seu composto de origem, o carvacrol, resultados semelhantes foram apenas encontrados em células germinativas de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. semi-ingurgitadas expostas a 50µL/mL (LIMA DE SOUZA *et al.*, 2019).

A ação repelente do carvacrol e do acetilcarvacrol contra fêmeas de *R. sanguineus* s.l., não diferiu estatisticamente quando avaliada em diferentes concentrações dos compostos. Em relação ao controle, contudo, o acetilcarvacrol demonstrou maior efeito repelente com o aumento da concentração. Além disso, as glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. em jejum apresentaram alterações dose-dependentes no tamanho e forma dos ácinos, bem como vacuolização citoplasmática. Essas alterações morfológicas podem interferir no processo de alimentação dos carrapatos, o que pode contribuir para o controle desses parasitos (KONIG *et al.*, 2021).

Quatro espécies diferentes de bactérias (*Bacillus polymyxa*, *Bacillus megatium*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus subtilis*) foram expostas ao acetilcarvacrol na concentração de 20,00 mg/mL diluído em acetona, que demonstrou eficácia biológica

antibacteriana, com bioatividade superior à do seu precursor carvacrol (NIKUMBH *et al.*, 2003). Quando dissolvido em dimetilsulfoxido (DMSO) a 0,05%, mostrou com pioneirismo ação anti-helmíntica, interferindo na atividade motora e causando mortalidade de 100% em indivíduos adultos da espécie *Schistosoma mansoni*, a partir da concentração 10,00µg/mL. Além disso, demonstrou efeito inibitório na produção diária de ovos, com resultado significativo a partir da concentração de 3,125 µg/mL em todo tempo de observação (MORAES *et al.*, 2013). O acetilcarvacrol, diluído em Tween 80, mostrou atividade biológica antinematódeos gastrointestinais de ovelhas (*Haemonchus contortus*). Apesar de terem sido utilizadas concentrações maiores que as do carvacrol, foi verificada a inibição na conversão larval, bem como maior mortalidade para larvas à medida que a concentração foi elevada. Além disso, o acetilcarvacrol mostrou ser menos tóxico em camundongos no mesmo experimento, quando comparado com o carvacrol (ANDRE *et al.*, 2016).

Pirez *et al.* (2013) sugeriram que o acetilcarvacrol apresenta um grande potencial para ser estudado como uma droga alternativa para o tratamento de transtornos de ansiedade, sem interferir na atividade psicomotora nas doses utilizadas em ratos. As evidências indicam que provavelmente ele atua no sistema GABAérgico, mas não nos receptores 5-HT1A. Além disso, sugere-se que doses mais baixas de acetilcarvacrol, em relação ao seu precursor, o carvacrol, são necessárias para atingir o efeito do tipo ansiolítico, aumentando a segurança no uso desse medicamento (MELO *et al.*, 2010).

O cérebro tem uma estrutura rica em lipídeos e é mais vulnerável a produtos de peroxidação lipídica do que qualquer outro órgão (COSTA *et al.*, 2012). O acetilcarvacrol em sua estrutura química apresenta três hidrogênios benzílicos e três hidrogênios- α que podem se ligar a radicais livres (FIGURA 4) que conferem a esse composto a propriedade de penetrar na barreira hematoencefálica e exercer efeitos antioxidantes no hipocampo (PIRES *et al.*, 2014). Todas essas descobertas sugerem que o acetilcarvacrol tem potencial para prevenir e tratar doenças neurodegenerativas, que têm em suas hipóteses fisiopatológicas uma superprodução de radicais livres e deficiência em enzimas do estresse oxidativo (PIRES *et al.*, 2014). O acetilcarvacrol também apresentou efeitos anti-inflamatórios pela inibição de histamina, serotonina e prostaglandina, mediadores inflamatórios e diminuição da degranulação de mastócitos, citocinas pró-inflamatórias e migração de neutrófilos, além de efeitos antinociceptivos por meio do envolvimento das vias de capsaicina e glutamato (DAMASCENO *et al.*, 2014).

2.7 Toxicidade do Carvacrol e Acetilcarvacrol

Ainda que um grande número de estudos tenha comprovado a atividade acaricida de alguns extratos de plantas em laboratório, muitos estudos são ainda necessários para permitir o seu uso nos hospedeiros vertebrados, validando-os como uma estratégia de controle (ARAÚJO *et al.*, 2016). Ao contrário da crença popular, o uso de plantas medicinais não é isento de risco, tendo em vista que além do princípio ativo terapêutico, a mesma planta pode conter outras substâncias tóxicas (GOODMAN, 2006).

O óleo essencial do *Origanum vulgare*, que tem o carvacrol como um dos seus componentes majoritários, quando administrado por via oral e intra-vaginal em ratas Wistar pelo período de 30 dias, não causou efeitos tóxicos, levando em conta a ausência de alterações na massa de órgãos, da massa corporal e da ausência de alterações de hemograma (CLEFF *et al.*, 2008). Ribeiro *et al.* (2019) através da administração oral do complexo carvacrol/ β -ciclodextrina em ratos Wistar, não observaram alterações no hemograma e concluíram que o produto não causa toxicidade no fígado quando comparado ao grupo controle, uma vez que não foram encontradas alterações nas atividades séricas de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase). A complexação com β -ciclodextrina aumentou a estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade dos monoterpenos.

Nenhuma alteração histopatológica ou efeitos genotóxicos no estômago e fígado de ratos foram observados em estudo realizado com o carvacrol após três doses de 810 mg/Kg de peso corporal (0, 24, 45 h) administradas por gavagem oral (LLANA-RUIZ-CABELLO *et al.*, 2016). Contudo, a exposição ao carvacrol provocou graves irritações na pele de coelhos após aplicação dérmica na dose de 2.700mg/Kg, permanecendo em contato com a pele durante 24 horas, sendo que nas primeiras 6 horas foi mantido no local com o auxílio de gaze (MCOMIE *et al.*, 1949). A dose letal média (DL₅₀) estimada de carvacrol administrada por via intravenosa e intraperitoneal em camundongos foi de 80 e 73,3 mg/Kg de peso corporal, respectivamente (ANDERSEN, 2006).

Quando comparado com o carvacrol, contudo, o acetilcarvacrol demonstrou menor toxicidade aguda em camundongos. Após administração em dose única por gavagem esofágica em ratos, a DL₁₀ e a DL₅₀ do acetilcarvacrol foram calculadas em 566,7 e 1.544,5 mg/Kg, respectivamente, e para o carvacrol foram DL₁₀ = 546,8 e DL₅₀ = 919 mg/Kg (ANDRE *et al.*, 2016).

Resultados obtidos por Oliveira *et al.* (2020a) mostraram que doses de até 2.000mg/Kg de acetilcarvacrol administradas por via oral, dose única, em camundongos não provocaram mortalidade ou sinais de toxicidade. Apesar disso, mortalidade, hipoatividade e astenia foram observados em camundongos que receberam o acetilcarvacrol na dose de 2.000 mg/Kg (LD₅₀ =

2.287 mg/Kg, i.p.) pela administração intraperitoneal. A LD₅₀ oral, portanto, é superior a 2.000 mg/Kg, o que permite sua inserção na categoria 5 de substâncias com toxicidade aguda relativamente baixa no Globally Harmonized System (GHS, 2007). Nesse mesmo estudo, após a administração de diferentes doses de acetilcarvacrol, não foram observadas mudanças nos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos. Variações nos indicadores de alteração hepática (ALT e AST) e função renal (ureia e creatinina), bem como indicadores metabólicos (glicose, triglicérides e colesterol total) não indicaram toxicidade em relação ao grupo controle, sugerindo ausência de efeitos adversos como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (OLIVEIRA *et al.*, 2020a).

No teste de toxicidade subcrônica em ratos submetidos ao tratamento com acetilcarvacrol (250mg/kg administrados diariamente por gavagem durante 28 dias), os resultados das análises bioquímicas e hematológicas demonstraram que os parâmetros não diferiram significativamente em relação ao grupo controle. Entretanto, foram observadas alterações hepáticas (edema nos hepatócitos, hiperplasia das células de Kupffer e congestão das veias porta e centrolobular), renais (edema moderado e vacuolização isomérica do epitélio tubular e cilindros hialinos) e no baço (ectasia e pigmentos sugestivos de lipofuscina e hemossiderina), além de resposta inflamatória nestes três órgãos. Todas estas alterações entretanto, foram consideradas reversíveis (ANDRÉ *et al.*, 2020).

Estes estudos demonstram que as aplicações a longo prazo tendem a gerar maior toxicidade mesmo em menores concentrações de acetilcarvacrol, mas torna indispensável a realização de estudos com o uso de doses comprovadamente eficazes contra carrapatos. A dificuldade em se encontrar dados na literatura para avaliar e discutir sobre a toxicidade do acetilcarvacrol reforça a necessidade desse tipo de estudo para fornecer suporte para ensaios não clínicos a fim de garantir o uso seguro desse composto em humanos e animais (OLIVEIRA *et al.*, 2020a).

2.8 Processos de desenvolvimento de um novo fármaco

A trajetória desde a descoberta de uma molécula promissora até a sua aplicação como produto farmacêutico é longa, onerosa e bastante complexa, principalmente na fase da pesquisa básica (escolha da molécula-alvo) e na pré-clínica (testes em animais para verificação da eficácia e segurança/toxicidade da molécula) (KNOP; MARIA, 2016). O processo de desenvolvimento de um novo fármaco começa pela descoberta ou síntese de uma nova molécula, muitas vezes impulsionada pelo conhecimento empírico das propriedades

terapêuticas de produtos de origem natural provenientes de plantas, insetos, fungos e bactérias, que possuem as propriedades terapêuticas pretendidas (TRIST, 2011).

Em seguida, procede-se ao planejamento da molécula, ou seja, a estrutura da molécula é delineada em função dos receptores dos locais alvos onde se deseja que ela atue. Após a identificação do composto protótipo, efetua-se a otimização das moléculas candidatas de modo a potencializar a sua eficácia, atendendo aos parâmetros farmacocinéticos observados (ELEBRING, 2012).

Antes de se iniciar os ensaios toxicológicos pré-clínicos é realizada uma série de testes em células, órgãos, tecidos e animais e a respectiva caracterização dos dados obtidos com a finalidade de selecionar a molécula que melhor se adapta ao objetivo terapêutico para o qual foi desenhada levando-se em consideração o seu mecanismo de ação e sua seletividade para os receptores alvo (NASCIUTTI, 2012).

Posteriormente, o composto candidato é submetido à uma bateria de ensaios toxicológicos pré-clínicos a fim de se identificar os perigos e avaliar os riscos. A identificação dos perigos abarca o grau de severidade do novo composto no organismo bem como o potencial de reversibilidade e irreversibilidade, ou seja, determina o tipo e o grau de toxicidade, estabelece a relação dose-resposta, fornece informação sobre a função da nova entidade química (NCE) no órgão alvo e, na maioria das vezes, o modo de toxicidade. Finalizada a identificação dos perigos e avaliação dos riscos, inicia-se a extrapolação dos dados para os animais a que se direciona para a realização dos ensaios clínicos (DENNY; STEWART, 2013).

As pesquisas e testes realizados em animais devem obter o máximo de informações possíveis utilizando o mínimo de animais. Esta iniciativa levou ao desenvolvimento do conceito dos 3 R's (PEREIRA et al., 1998): “replacement” (substituição), que prevê a utilização de qualquer método científico alternativo à utilização de vertebrados vivos conscientes; “reduction” (redução), em que se procura reduzir, substancialmente, a quantidade de animais a ser usada, quando não se pode eliminar completamente sua utilização em experimentos; e “refinement” (refinamento), quando são utilizadas de medidas que possam melhorar o bem estar do animal e minimizar o sofrimento a que estão sujeitos durante os experimentos.

Apesar do grande investimento feito pela indústria farmacêutica no desenvolvimento de fármacos, a taxa de lançamento de novos produtos não se verifica na mesma proporção uma vez que 99,9% dos compostos estudados revelam-se obsoletos antes de se iniciar os ensaios clínicos, quer seja por exibirem toxicidade ou por falta de eficácia (DORATO; VODICNIK, 2001).

2.9 Métodos de análise em toxicidade

O estudo toxicológico é uma avaliação estimada e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância teste com a finalidade de fornecer informações acerca dos riscos para a saúde dos usuários. Neste tipo de estudo é comum a utilização de cobaias, sendo os ratos, camundongos e coelhos as espécies mais utilizadas devido ao seu pequeno porte, sensibilidade, menores quantidades da substância a serem administradas, linhagens isogênicas definidas e características fisiológicas bem conhecidas (VRBANAC *et al.*, 2013). A avaliação do potencial tóxico deve ser realizada por meio de exames clínicos, laboratoriais e histopatológicos de animais após exposição a princípios ativos, em diferentes intervalos de tempo. A análise toxicológica antecipa o risco e reduz a probabilidade de os compostos promissores falharem em fases avançadas do processo de pesquisa e desenvolvimento do novo fármaco, evitando-se assim a perda de recursos materiais e econômicos (ROZZA; PELLIZZON, 2013).

Os ensaios toxicológicos pré-clínicos constituem um excelente meio para avaliar os possíveis efeitos tóxicos dos compostos, uma vez que são conduzidos sob um elevado grau de controle no que se refere às condições de exposição, à população exposta e à detecção dos efeitos decorrentes da exposição. Por meio deles, é possível dispor de modelos animais manipulados sob condições previamente determinadas, coletar informações sobre os mecanismos de ação do fármaco, medir os tipos de respostas e reconhecer os seus efeitos sobre o hospedeiro. No entanto, estes ensaios apresentam limitações como a incerteza associada à extrapolação dos dados obtidos em modelos animais para os indivíduos alvos que vivem em condições ambientais e estilo de vida não controláveis, além de haver diferenças entre as doses administradas e a janela terapêutica (BECK *et al.*, 2001).

O hemograma constitui o meio mais direto e prático de se estudar os elementos figurados do sangue periférico. Estes elementos celulares sofrem alterações no decurso de, praticamente, todas as enfermidades (SANDERSON; PHILIPS, 1981). Efetivamente, estas alterações são inespecíficas, comuns a um grande número de patologias, mas fornecem informações diagnósticas valiosas sobre o sistema hematológico e outros sistemas orgânicos, prognóstico, resposta ao tratamento e recuperação (DUNCAN; PRASSE, 1982). A maioria dos distúrbios hematológicos podem ser identificados por anormalidades específicas desses resultados, sendo que na identificação de estados patológicos, o sangue muitas vezes pode fornecer informações diagnósticas valiosas (GUIMARÃES, 1990).

O dano ao fígado, como consequência de uma desintoxicação incessante, é muitas vezes refletido por um surto de enzimas hepáticas (GIANNINI *et al.*, 2005). Muitos processos

patológicos que afetam o fígado, muitas vezes induzidos por agentes exógenos químicos, incluindo fármacos, podem causar elevações proporcionalmente distintas nas enzimas hepáticas, uma vez que há variação na distribuição de cada enzima específica nos lóbulos (SHARON; CENTER, 1995). As transaminases são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas (AL-HABORI *et al.*, 2002) e estão amplamente distribuídas nos tecidos: a aspartato aminotransferase (AST), enzima encontrada nas mitocôndrias das células do fígado, está presente também em outros tecidos como o coração, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas e, portanto, é muito menos específica de lesão hepática do que a alanina aminotransferase (ALT), que existe primariamente no fígado. A ALT é encontrada no citoplasma dos hepatócitos e, juntamente com a AST, são consideradas marcadores bioquímicos de disfunção hepática, podendo fornecer uma avaliação quantitativa do grau de danos sofridos pelos hepatócitos. Isso porque há liberação de ambas as enzimas para o plasma em uma lesão hepática, o que eleva seus níveis séricos (MILLER; GONÇALVES, 1999). Um aumento muito evidente nos níveis de ALT, por exemplo, sugere uma hepatite aguda, enquanto aumentos mais brandos podem sugerir doença hepatocelular crônica, cirrose, neoplasia ou hepatopatia por parasitas (TENNANT, 1997).

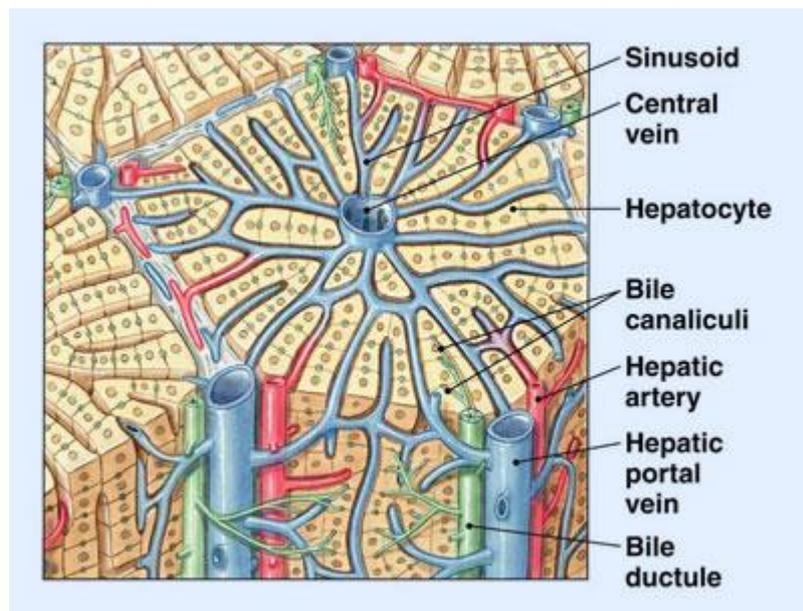
O sistema renal é o principal sistema de excreção das drogas, sendo o rim o órgão mais importante. A excreção renal de uma substância depende da sua lipossolubilidade, taxa de infiltração glomerular, pH do filtrado, secreção tubular ativa e reabsorção tubular ativa. Altas concentrações de um determinado composto na luz dos túbulos renais podem desencadear respostas inflamatórias e comprometer a função de filtração glomerular (POTTER; PERRY, 2005). A ureia, o produto final do metabolismo proteico, é excretada pelos rins. Os níveis sanguíneos dessa substância constituem uma indicação da função renal e podem servir como índice da taxa de filtração glomerular (SCHOSSLER *et al.*, 2001). A quantidade de creatinina presente nos rins é mais constante, sendo, teoricamente, a mais indicada para verificar a função renal, embora não seja reabsorvida nos túbulos renais como a ureia (STEVEN; SCOTT, 2002). Ambas as substâncias são produzidas constantemente pelo organismo e são eliminadas pelos rins. Deste modo, a sua concentração mantém-se sempre estável; se os rins passam a não funcionar bem, elas começam a acumular no sangue (DELANAYE *et al.*, 2014). A elevação nos níveis plasmáticos de ureia e creatinina fornece indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo proteico (ADEBAYO *et al.*, 2003), enquanto a redução desses níveis fornecem indícios de uma diminuição do catabolismo proteico ou uma melhora da função renal (DANTAS *et al.*, 2006).

2.10 O Fígado

O fígado é um órgão do corpo humano que possui um peso médio de 1500g, representando 2,5 a 4,5% da massa corporal total. É um órgão muito complexo que realiza várias funções vitais (TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2013). Em mamíferos, constitui uma preocupação excepcional para o estudo sobre a toxicidade de compostos administrados em vários modelos experimentais (AHN; BAKER, 2015). Este órgão encontra-se em uma posição estratégica para metabolizar, acumular e neutralizar as substâncias absorvidas pelo intestino, recebendo um suprimento sanguíneo duplo: cerca de 20% do seu fluxo é rico em O₂ e provém da artéria hepática, enquanto o restante é rico em nutrientes e provém da veia porta (TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2013). Nos sinusoides dos lóbulos hepáticos, o sangue que chega pelos ramos da veia porta e o que flui por dentro da artéria hepática se misturam. Esse sangue, agora misturado nos sinusoides, segue para a veia central do lóbulo hepático, e, de onde segue pelas veias coletoras e pelas veias hepáticas até a veia cava inferior (FIGURA 5) (ROSS; PAWLINA, 2012).

Os hepatócitos são células epiteliais e as mais importantes do fígado, constituindo cerca de 2/3 da sua massa. Entre os cordões dos hepatócitos estão os sinusoides vasculares revestidos por células endoteliais fenestradas e descontínuas que demarcam o espaço de Disse, no interior do qual existem outros tipos de células, como as células de Kupffer e células de Ito, além de várias estruturas de suporte (CRAWFORD, 2000).

Figura 5 – Representação esquemática da histologia hepática.

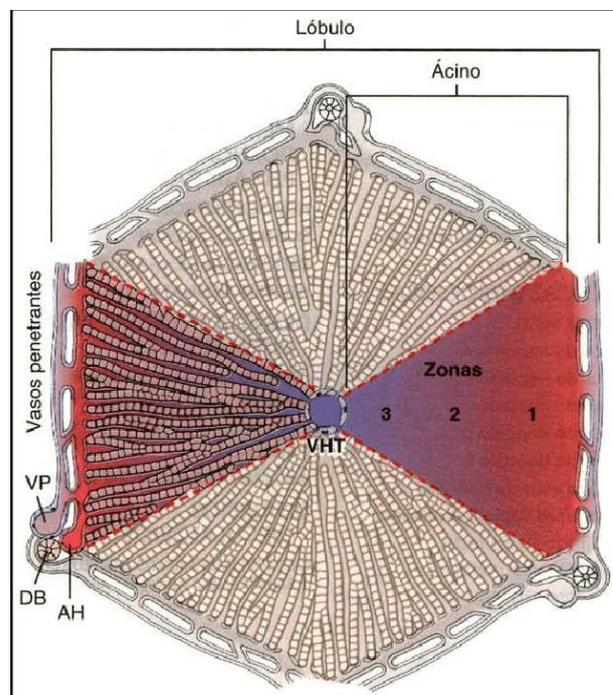


Fonte: <http://www.hepcentro.com.br/cbp.htm>

Os hepatócitos têm forma poliédrica, com um ou dois núcleos centrais, nucléolos evidentes e têm a função de armazenar glicose, principalmente na forma de glicogênio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), além de realizarem a captação, processamento e secreção de diversas substâncias, são responsáveis pela síntese da maior parte das proteínas presentes no plasma sanguíneo (albumina, fibrinogênio, protrombina e as globulinas), pela formação e excreção de bile, pela conversão de importantes hormônios e vitaminas em formas mais ativas, pela regulação do metabolismo de nutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos), pelo armazenamento de vitaminas e ferro e pela degradação de medicamentos, toxinas e de proteínas estranhas ao corpo (ROSS; PAWLINA, 2012).

Histologicamente, o fígado está organizado em lóbulos (FIGURA 6) com as áreas portais na periferia e as veias centrolobulares no centro de cada lóbulo. Neles os hepatócitos se anastomosam e delimitam os capilares sinusoides. Uma veia centrolobular ou vênula hepática terminal, como seu próprio nome indica, localizada no centro do lóbulo, coleta o sangue misturado dos sinusoides. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 6 – Arquitetura hepática microscópica evidenciando a zonas metabólicas hepáticas (1,2 e 3). VHT: vênula hepática terminal, AH: artéria hepática, DB: ducto biliar, VP: veia porta.



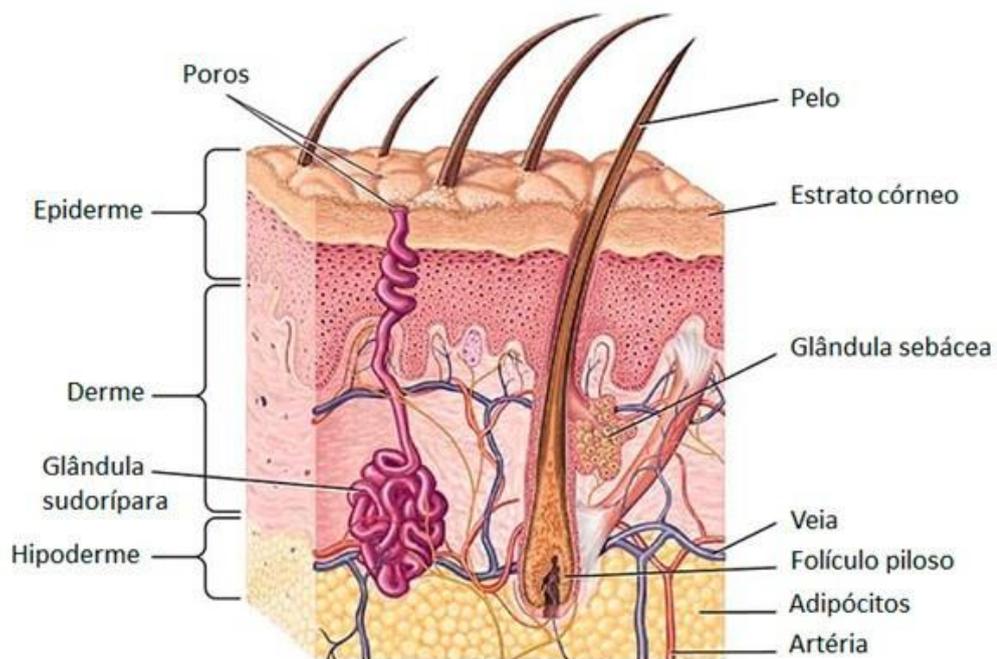
Fonte: Cotran *et al.* (2000).

2.11 A Pele

A pele recobre toda a superfície do corpo, constituindo-se como o seu maior órgão, tanto em peso (aproximadamente 16% do peso corporal) quanto em área. Apresenta inúmeras funções: protege o organismo contra perda de água e atrito; recebe informações do meio ambiente e as envia para o sistema nervoso central através de suas terminações nervosas sensitivas; colabora no controle da temperatura corporal por meio dos vasos sanguíneos, glândulas e tecido adiposo; participa da excreção de várias substâncias e da termorregulação, pela ação das glândulas sudoríparas; protege contra os raios ultravioleta; sintetizam a vitamina D; e impedem a invasão de microrganismos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; YOUNG *et al.*, 2007).

A pele, ou *cútis*, é a base estrutural do sistema tegumentar e a sua constituição fundamental tecidual em mamíferos tetrápodes é similar à da *cútis* humana. Apesar de ambas serem estruturadas pela epiderme e derme repousando sobre a tela subcutânea (hipoderme), existem diferenças entre os homens e os animais, entre indivíduos da mesma espécie e entre as diferentes regiões do corpo (MEYER *et al.*, 1978). Nos animais ocorre maior abundância de pelos, formando uma pelagem comum e uniforme, sendo que a epiderme dos mamíferos peludos é mais fina do que a de humanos (AFFOLTER; MORE, 1994).

Figura 7 - Estrutura da pele.



Fonte: Williams *et al.* (2000).

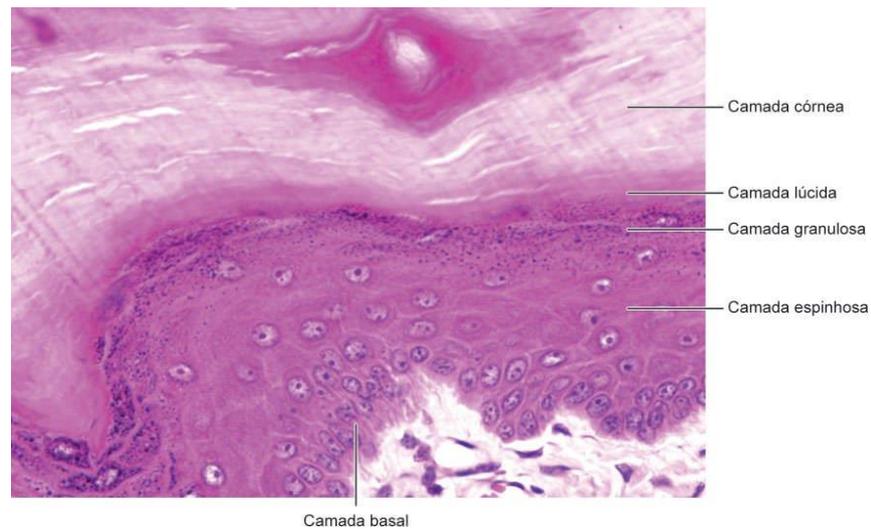
É dividida em duas camadas, a epiderme e a derme (FIGURA 7), ambas firmemente unidas entre si. A epiderme é a camada mais externa da pele, e é composta por quatro linhagens

de células: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel (MOORE; PERSAUD, 2000; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A epiderme organiza-se em cinco camadas (FIGURA 8) e, à medida que as mais superficiais são eliminadas, as mais profundas são restauradas pelo processo de mitose. A camada germinativa (estrato basal) é a mais profunda e repousa sobre a membrana basal, sendo considerada o ponto de separação dermo-epidérmico; nela, as células estão dispostas em uma única fileira e possuem forma cúbica ou cilíndrica (BAL, 1996). Por haver intensa proliferação celular no estrato basal, ele é rico em células tronco e é normal que sejam observadas células em mitose e células em apoptose (SCOTT *et al.* 2001). Células em apoptose são vistas na microscopia de luz como células isoladas com citoplasma eosinofílico e brilhante e com núcleo fragmentado ou picnótico (URMACHER, 1997). A camada espinhosa apresenta filamentos de queratina e desmossomos, que apresentam papel importante na manutenção da coesão entre as células da epiderme e na resistência ao atrito, sendo formadas por células cubóides ou ligeiramente achatadas, ligadas entre si por pontes intracelulares. Nesse estrato estão localizadas as células de Langerhans que funcionam como apresentadoras de antígeno na pele (HARGIS; GINN, 2007). A camada granulosa é formada por uma ou várias camadas de células rombóides ou pavimentosas que estão carregadas de grânulos de querato-hialina; o material lipídico produzido por estas células contribui para formar uma barreira contra a penetração de substâncias e impermeável a água, impedindo a desidratação do organismo. O estrato granuloso não está presente em todos os cortes histológicos da pele com pelos (GRAU; WALTER, 1975). Na camada lúcida, composta por uma delgada camada de células achatadas, os núcleos e as organelas das células foram digeridos por enzimas dos lisossomos. Por fim, a camada córnea apresenta espessura variável e é constituída por células mortas, queratinizadas e anucleadas - os corneócitos. O citoplasma dessas células apresenta-se repleto de queratina (BANKS, 1992; FRANDSON, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O estrato córneo corresponde à principal barreira física da pele e, por isso, para que uma substância permeie a pele, a difusão através deste estrato é um passo limitante. Inversamente, este mesmo estrato córneo é também a principal barreira para a difusão da água para fora do corpo (PROW *et al.*, 2011).

Figura 8 - Estrutura da epiderme.



Fonte: Junqueira; Carneiro (2017).

A derme é uma camada espessa de tecido conjuntivo de origem mesodérmica, que se estende da epiderme até o tecido subcutâneo e está separada da epiderme pela membrana basal. Apresenta função protetora e de sustentação, sendo o local onde se formam as glândulas sebáceas e folículos pilosos. A derme é dividida em duas camadas, a papilar (ou superficial) e a reticular (ou profunda). A camada papilar é constituída principalmente de tecido conjuntivo frouxo que forma as papilas dérmicas. A camada reticular é mais espessa e constituída por tecido conjuntivo denso. A células predominantes na derme são os fibroblastos, macrófagos, mastócitos. Outras células esparsamente presentes incluem linfócitos e plasmócitos que, junto com as células de Langerhans, formam o tecido linfoide associado à pele (HARGIS; GINN, 2007). Fornece também uma base firme para a epiderme e para os anexos cutâneos. Possui fibras colágenas que proporcionam resistência a tensão e fibras elásticas que lhe conferem flexibilidade. Nesta camada localizam-se os anexos da pele, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (BANKS, 1992; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade dérmica do acetilcarvacrol em ratos da linhagem Wistar, após aplicação tópica do produto em doses repetidas, por meio de análises hematológicas, bioquímicas e histopatológicas.

3.2 Objetivos específicos

- a) Realizar análise dos valores de contagem de glóbulos brancos e glóbulos vermelhos), hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração média de hemoglobina corpuscular, hemoglobina corpuscular média, e contagem de plaquetas, a fim de verificar variações dos índices de referência desses elementos celulares;
- b) Investigar os seguintes parâmetros bioquímicos: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina e ureia, verificando assim ocorrência de variações em relação aos índices de referência;
- c) Avaliar a morfologia do fígado e da porção da pele em que foi aplicado o produto, por meio de análises morfométricas e semiquantitativas, a fim de identificar possíveis prejuízos a esses órgãos.

REFERÊNCIAS

- ADEBAYO, J.O.; YAKUBU, M.T.; EGWIM, E.C.; OWOYELE, V.B.; ENAIBE, B.U. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. **J Ethnopharmacol.** v. 88, n. 1, p. 69-72, 2003.
- AFFOLTER, V.K.; MOORE, K. Histologic features of normal canine and feline skin. **Clin. Dermatol.** v. 12, p. 491-497, 1994.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 30, p. 41–50, 2011.
- AHN, B.E.; BAKER, T.A. Oxidization without substrate unfolding triggers proteolysis of the peroxide-sensor, **PerR**. **PNAS. U. S. A.** v. 113, p. E23–E31, 2016.
- ALARCON-CHAIDEZ F., RYAN R., WIKEL S., DARDICK K., LAWLER C., FOPPA I. M., *et al.* Confirmation of tick bite by detection of antibody to *Ixodes calreticulin* salivary protein. **Clin. Vacc. Immunol.**, v. 13, 2006.
- AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **J Ethnopharmacol.** v. 83, n. 3, p. 209-17, 2002.
- ALVARENGA, E. M.; SOUSA, N. A.; DE ARAÚJO, S.; JÚNIOR, J. L. P.; ARAÚJO, A. R.; ILES, B. *et al.* Carvacryl acetate, a novel semisynthetic monoterpene ester, binds to the TRPA1 receptor and is effective in attenuating irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1773–1785, 2017.
- ALVES, W.V.; LORENZETTI, E.R.; GONÇALVES, F.C. Utilização de acaricidas a base de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: uma contribuição para a produção e desenvolvimento sustentável. **Rev. Bras. De Agropecuária Sustentável**, v.2, n.2, 2012.
- ANDERSEN, A. Final report on the safety assessment of sodium p-chlorom- cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. **Int. J. Toxicol.** v. 25 (Suppl 1) p. 29–127, 2006.
- ANDRE, W.P.P.; PAIVA JUNIOR, J.R.; CAVALCANTE, G.S.; RIBEIRO, W.L.S.; ARAÚJO FILHO, J.V.; *et al.* Anthelmintic activity of nanoencapsulated carvacryl acetate against gastrointestinal nematodes of sheep and its toxicity in rodents. **Braz J Vet Parasitol.** v. 29, n. 1, 2020.
- ANDRE, W.P.P.; RIBEIRO, W.L.C.; CAVALCANTE, G.S.; SANTOS, J.M.L.; MACEDO, I.T.F.; PAULA, H.C.B.; *et al.* Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Vet Parasitol.** v. 218, p. 52-58, 2016.

ANHOLETO, L.A.; OLIVEIRA, P.R.; RODRIGUES, R.A.F.; CASTRO, K.N.C.; CAMARGO MATHIAS, M.I. Ação do extrato etanólico bruto de *Acmella oleracea* em carrapatos *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): avaliação ultraestrutural do sistema reprodutor masculino. In: In: SILVEIRA, M.; SILVA, E. da; LIMA, R. A. (Org.). **Biodiversidade e Biotecnologia no Brasil 1**. Rio Branco, AC: Strictu Sensu, 2020.

ANTHONY, K. P. *et al.* C: Food Chemistry Comprehensive Assessment of Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Food Science**, USA, v. 77, n. 8, p. 839-843, 2012.

ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L.; ZERINGOTA, V.; *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**, v. 30, n. 4, p. 377–382, 2016.

ARISTATILE, B.; AL-NUMAIR, K. S.; AL-ASSAF, A. H.; PUGALENDI, K. V. Pharmacological effect of carvacrol on D: -galactosamine-induced mitochondrial enzymes and DNA damage by single-cell gel electrophoresis. **J. Nat. Med.** v. 65, p. 568–577, 2011.

ARNOSTI, A.; BRIENZA, P. D.; FURQUIM, K. C. S.; CHIERICE, G. O.; BECHARA, G. H.; BRAGGIÃO, I. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 575–580, 2011.

ARUNASREE, K. M. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. **Phytomedicine**, v. 17, p. 581–588, 2010.

BAL, H.S. 1996. Pele, p.560-570. In: Swenson M.J. & Reece W.O. (Ed.), **Dukes' Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 856p.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2ª ed. São Paulo: Manole, p. 391-424, 1992.

BAKKALI, F.; AVERBECK, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BAKIR, M.; GEYIKOGLU, F.; COLAK, S.; TURKEZ, H.; BAKIR, T.O.; HOSSEINIGOUZDAGANI, M. The carvacrol ameliorates acute pancreatitis-induced liver injury via antioxidant response. **Cytotechnology**, 2015.

BARBOSA-SILVA, A.; DUARTE, M. M.; CAVALCANTE, R. C.; OLIVEIRA, S. V.; VIZZONI, V. F.; DURÉ, A. I. L.; IANI, F. C. M.; MACHADO-FERREIRA, E.; GAZÊTA, G. S. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica, Basel**, v. 173, n. May, p. 30–33, 2017.

BARKER, S.C. A. Murrell, Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, v. 129, p. S15–S36, 2004.

BASER, K.H.C. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Curr. Pharm, Design.**, v. 14, p. 3106-3120, 2008.

BECK, B. D. et al. Use of Toxicology in the Regulatory Process. In Hayes, A. W. **Principles and Methods of Toxicology**. 4 ed. Estados Unidos da América: Taylor & Francis, p. 24-35, 2001.

BENELLI, G. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. **Parasitol. Res.** v. 114, p. 2801–2805, 2015.

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

BENELLI, G.; PAVELA, R. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks -A systematic review. **ActaTropica**, v. 179, p. 47 - 54, 2018.

BLAGBURN, B.L.; DRYDEN, M.W. Biology, treatment, and control of flea and tick infestations. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v.39, n. 6, p. 1173-200, 2009.

BOSKABADY, M. H.; JAFARI, Z.; POURABOLI, I. The effect of carvacrol on muscarinic receptors of guinea-pig tracheal chains. **Phyther. Res.**, v. 25, p. 530–535, 2011.

BRESSANIM, G.G.N.; MELO, A.L.T.; PERINOTTO, W.M.S. Essential oils with acaricida activity to control *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Brazil. **Ensaio e Ciências**, v. 24, n. 5, p. 480-488, 2020.

BRUNETON, J. Pharmacognosy phytochemistry medicinal. In: BRUNETON, J. **Terpenoids and steroids essential oils**. 2 ed. Landon: Lavoisier, 1995, p. 405-426.

BRUNER, J.H. Pathological processes of skin damage related to toxicant exposure. In: **Dermal and Ocular Toxicology: Fundamentals and Methods**. CRC Press, Boston, p. 80-85, 1991.

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

CACCIATORE, I.; DI GIULIO, M.; FORNASARI, E.; DI STEFANO, A.; CERASA, L.S.; MARINELLI, L.; TURKEZ, H.; DI CAMPLIE, E.; DI BARTOLOMEO, S.; ROBUFFO, I.; CELLINI, L. Carvacrol Codrugs: A New Approach in the Antimicrobial Plan. **PloS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.

CANBEK, M.; UYANOGLU, M.; BAYRAMOGLU, G.; SENTURK, H.; ERKASAP, N.; KOKEN, T.; USLU, S.; DEMIRUSTU, C.; ARAL, E.; HUSNU CAN BASER, K. Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. **Phytomedicine**, v. 15, p. 447–452, 2008.

CASTREJON, F.M. Repellence of *Boophilus microplus* larvae in *Stylosanthes humilis* and *Stylosanthes hamata* plants. **Parasitol. Latinoamer.** v. 58, n. 2–3, p. 118 –121, 2003.

CHANTASART, D.; PONGJANYAKUL, T.; HIGUCHI, W.; KEVIN, S. Effects of oxygen-containing terpenes as skin permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 10, 2009.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; SALLIS, E.S.; ANTUNES, T.A. MATTEI, A. *et al.* Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 704-9, 2008.

CONTRERAS, M. *et al.* Vaccinomics approach to the identification of candidate protective antigens for the control of tick vector infestations and *Anaplasma phagocytophilum* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–15, 2017.

COSKUN, S. *et al.* Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). **Parasitol**, Turkey, n. 103, p. 259-261, 2008.

COSTA, D.M.; OLIVEIRA, G.A.L.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do composto ciano-carvona. **J Basic Appl Pharm Sci.**, v. 33, p. 567–575, 2012.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400p.

COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.T.; BOTELHO, J.R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.

CRAWFORD, J.M. O Fígado e o Trato Biliar. In: Cotran RS, Kumar, Collins, editors. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**, ed 6, tradução Guanabara Koogan, 2000.

CRUZ, E.M.O., LIVIO, M.C.J., JESSIKA, A.O.P., DARLISSON, A.S., SANDRA, A.A., MARIA, F.A.B., LEANDRO, B., PERICLES, B.A., SOCRATES, C.H.C., ARIE, F.B.; LINO JUNIOR, R.S. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Vet. Parasitol.** v. 195, p. 198–202, 2013.

CUNHA, L.C.; AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, M.C.; FREITAS, H.O.G.; SENA, A.A.S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 19, v. 2^a, p. 403-411, 2009.

CUNHA, E.L.R.; MATOS, R.S.; PEREIRA, N.R.C.; OLIVEIRA, P.R.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal of Histology and Histopathology**, v.4, p.1-8, 2017.

DALLEAU, S.; CATEAU, E.; BERGES, T.; BERJEAUD, J. M.; IMBERT, C. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 31, p. 572–576, 2008.

DAMASCENO, S. R. B.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; CARVALHO, N. S.; *et al.* Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Sciences**, v. 94, n. 1, p. 58–66, 2014.

- DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI, A.; CIOMAR, A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci Health Sci**. v. 28, n. 2, p. 165-70, 2006.
- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L.A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.1, p. 64–67, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.173-185, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 26, 2010.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Vet. Parasitol.** v. 208 ,p. 9–13, 2015.
- DELANAYE, P.; CAVALIER, E.; CRISTOL, J.P.; DELANGHE, J.R. Calibration and precision of serum creatinine and plasma cystatin C measurement: impact on the estimation of glomerular filtration rate. **J Nephrology**. v. 27, n.5 p. 467-75, 2014.
- DE MENEGHI, D.; DE MENEGHI, D.; STACHURSKI, F.; ADAKA, H. 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. 239, p. 1-11, 2016.
- DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGOMATHIAS, M. I. *Azadirachta indica* A. juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks females. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 126, p. 462-470, 2010.
- DENNY, K.H.; STEWART, C.W. Acute, sub-acute, sub-chronic and chronic general toxicity testing for preclinical drug development. In: FAQI, S.A. **A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development**, 1 ed., USA: Elsevier, p. 87-104, 2013.
- DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801-804, 2004.
- DIAS, A; AIRES, C; SILVA, M; CATARINO, R. Teste de toxicidade em *Artemia salina*: contaminantes (K₂CrO₇) e efluentes químicos (tratados e não tratados). Universidade do Algarve, 2002.
- DORATO, M. A; VODICNIK, M. J. The Toxicological Assessment of Pharmaceutical and Biotechnology Products. In: Hayes, A. W. **Principles and Methods and Toxicology**. 4 ed., New York: Taylor & Francis, pp.137-150, 2001.
- DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W. **Patologia Clínica Veterinária**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1982.

DURÃES, L.S.; BITENCOURTH, K.; RAMALHO, F.R.; NOGUEIRA, M.C.; NUNES, E.C.; GAZETA, G.S. Biodiversity of potential vectors of Rickettsiae and epidemiological mosaic of spotted fever in the state of Paraná, **Brazil**. **Front Public Health**, 12 mar 2021.

EDLOW, J.A.; MCGILLICUDDY, D.C. Tick Paralysis. **Infect Dis Clin N Am.**, v.22, p. 397-413, 2008.

ELEBRING, T.; GILL, A.; PLOWRIGHT, A.T. What is the most important approach in current drug discovery: doing the right things or doing things right? **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 21/22, p. 1166-9, 2012.

ENGELMAN, M.F.B.; GUIDUGLI NETO, J.; ANDRADE, C.H.V.; HERNANDEZ, R.; GOULART, L.B.N.T. Estudo morfométrico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológicas de tiroxina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 45, n. 2, 2001.

FERNANDES, J. I.; CORREIA, T. R.; RIBEIRO, F. A.; CID, Y. P.; TAVARES, P. V.; SCOTT, F. B. Eficácia in vitro do nim (*Azadirachta indica*) no controle de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32, n. (Supl. 1), p. 64-68, 2010.

FFRENCH-CONSTANT, R.H.; DABORN, P.J.; LE GOFF, G. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends in Genetics**, v. 20, P. 163-170, 2004.

FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAIL, A. D. Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 454p, 2005.

FREITAS, D.R.J.; POHL, P.C.; ITABAJARA, S.F. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. **ACTA Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 2, p. 109-117, fev. 2005.

FURTADO, F. N. *et al.* Avaliação in vitro do potencial acaricida do óleo essencial de *Tagetes minuta* frente à *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Biociências**, v. 19, n. 1, p. 104-110, 2013.

GAÑÁN, N.; BRIGNOLE, E.A. Fractionation of essential oils with biocidal activity using supercritical CO₂ - experiments and model. **Journal of Supercritical Fluids**, v.58, p.58-67, 2011.

GHS. Globally Harmonized System for the classification and labelling of chemicals, 2007.

GIACCO, F.; BROWNLE, E.M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, p. 1058–1070, 2010.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **CMAJ**, v. 73, n. 3, p. 367-79, 2005.

GOMES, A. O carrapato do boi *Boophilus microplus*: ciclo, epidemiologia, patogenia e controle. In: KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 157p., 1998.

- GOMES, A. *et al.* Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1447-1452, ago. 2011.
- GONZÁLES, J. C.; SERRA-FREIRE, N. M. O couro dos bovinos no Rio Grande do Sul: riqueza há muito maltratada. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v. 12, n. 1, p. 14-16, 1992.
- GOODMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11a ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.
- GRAU, H.; WALTER, P. **Histología y Anatomía Microscópica Comparada de los Mamíferos Domésticos**. Labor, Barcelona. 210p, 1975.
- GROVES, M.G. *et al.* Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **Am. J. Vet. Res.** 36, 937–940, 1975.
- GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012.
- GUGLIELMONE, A.A.; ROBBINS, R.G.; APANASKEVICH, D.A.; PETNEY, T.N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.G. **Hard ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) of the world**. Springer, Heidelberg, 2014.
- GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S. *et al.* Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Bas Clin Pharmacol Toxicol.**, v. 107, p. 949-957, 2010.
- GUIMARÃES, R.X. **Clínica e Laboratório**: Interpretação Clínica das provas laboratoriais, Ed. Sarvier: São Paulo, 1990.
- GUPTA-ELERA, G.; GARRETT, A.R.; ROBISON, R.A.; O'NEILL, K.L. The role of oxidative stress in prostate cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 21, p. 155–162, 2012.
- HABEEB, S.M. Ethno-Veterinary and Medical Knowledge of crude plant extracts and its methods of application (traditional and modern) for tick control. **Word. Appl. Sci. J.**, v. 11, n. 9, p. 1047-1054, 2010.
- HARGIS, A.M.; GINN, P.E. The integument, p.1107-1261. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Ed.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis. 1476p, 2007.
- HARRISON, B.A., ENGBER, B.R., APPERSON, C.S. Ticks (Acari: Ixodidae) uncommonly found biting humans in North Carolina. **J. Vector. Ecol.**, v.22, p.6-12, 1997.
- HARWOOD, R. F.; JAMES, M. T. **Entomology in human and animal health**. Washington, 1979. No.7th edition pp.vii 548pp.

- HEMINGWAY, J.; HAWKES, N.; PRAPANTHADARA, L.; JAYAWARDENAL, K. G. I.; RANSON, H. The role of gene slicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 353, P. 1695-1699, 1998.
- HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 20 ed. São Paulo: Manole, 2008.
- HIGA, L.O.S.; GARCIA, M.V.; BARROS, J.C.; BONATTE JUNIOR, P. Controle do carrapato-do-boi por meio de acaricidas. In. ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. (Ed.). **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 240 p.
- HOTTA, M.; NAKATA, R.; KATSUKAWA, M.; HORI, K.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression. **J. Lipid. Res.**, v. 51 p. 132–139, 2010.
- HWANG, H.S.; WINKLER-MOSER, J.K.; LIU, S.X. Structural effect of lignans and sesamol on polymerization of soybean oil at frying temperature. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 1067–1076, 2012.
- JAYAKUMAR, S.; MADANKUMAR, A.; ASOKKUMAR, S.; RAGHUNAN DHAKUMAR, S.; GOKULA DHAS, K.; KAMARAJ, S.; JOSEPHINE DIVYA, M. G.; DEVAKI, T. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. **Mol. Cell. Biochem.** v. 360, p. 51–60, 2012.
- JONGEJON, F.; UIELENBERG, G. Tick and control methods. **Rev.Sci.Tech.Off.Epiz.**, v. 13, n. 4, p. 1201-1226, 1994.
- JUKIC, M. POLITEO, O.; MAKSIMOVIC, M.; MILOS, M. Properties of Thymol, Carvacrol and their derivatives Thymiquinone and Thymohydroquinone. **Phytoter Res.**, v. 21, p. 259-261, 2007.
- JUNQUEIRA, L.C. **Basic Techniques of Cytology and Histology**. Livraria Editora Santos; Bookstore Santos, São Paulo, 1983.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12th ed. São Paulo: Editora Guanabara Koogan 2013.
- JUNQUEIRA, Luiz Carlos U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. Disponível em: Minha Biblioteca, (13th edição). Grupo GEN, 2017.
- KARAASLAN, N. M.; KARAASLAN, M. G.; ATES, B. Effects of Some Extraction Solvents on the Antioxidant Properties of Strawberry Fruit. **International Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 4, n. 2, p. 102–109, 2018.
- KARTHEEK, R.M.; DAVID, M. Assessment of fipronil toxicity on wistar rats: A hepatotoxic perspective. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 448–456, 2018.
- KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; DALL AGNOL, B.; *et al.* Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 73–80, 2017.

- KNOP, L. B.; MARIA, D. A. Métodos substitutivos e a experimentação animal: um enfoque inovador. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 4, n. 2, p. 101-114, 2016.
- KOC, S. *et al.* Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Antalya, Turkey, v. 193, p. 316–319, jan. 2013.
- KOCH, H. G. Oviposition of the Brown Dog Tick (Acari: Ixodidae) in the Laboratory. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 75, n. 5, p. 583–586, set 1982.
- KONIG, I.F.M.; GONÇALVES, R.R.P.; OLIVEIRA, M.V.S.; SILVA, C.M.; THOMASI, S.S.; PECONICK, A.P.; REMEDIO, R.N. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick-Borne Dis.** v. 10, p. 766–774, 2019.
- KONIG, I.F.M.; OLIVEIRA, M.V.S.; GONÇALVES, R.R.P.; PECONICK, A.P.; THOMASI, S.S.; ANHOLETO, L.A.; LIMA-DE-SOUZA, J.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; REMEDIO, R.N. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae), **Micron**, v. 129, 2020.
- KONIG, I.F.M.; REIS, A.C.; GONÇALVES, R.R.P.; OLIVEIRA, M.V.S.; SILVA, C.M.; MELO, D.S.; PECONICK, A.P.; THOMASI, S.S.; REMEDIO, R.N. Repellent activity of acetylcarvacrol and its effects on salivary gland morphology in unfed *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Dis.**, v.12, n.4, 2021.
- LABRUNA, M.B. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p.123-124, 2004.
- LAGE, T.C.A. *et al.* Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 863-869, 2013.
- LAI, W. *et al.* Inhibition of herpes simplex virus type 1 by thymol-related monoterpenoids. **Planta Med**, TAIWAN, v. 78, p. 1636-1638, jul. 2012.
- LEGHAIT, J.; GAYRARD, V.; PICARD-HAGEN, N.; CAMP, M.; PERDU, E.; TOUTAIN, P.L.; VIGUIE, C. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**. v. 255, p. 38-44, 2009.
- LIMA DE SOUZA, J.R.; OLIVEIRA, P.R.; ANHOLETO, L.A.; ARNOSTI, A.; DAEMON, E.; REMEDIO, R.N.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Effects do carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, p. 66-72, 2019.
- LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; MAISANABA, S.; PUERTO, M.; PRIETO, A.I.; PICHARDO, S.; MOYANO, R.; GONZALEZ-PEREZ, J.A.; CAMEAN, A.M. Genotoxicity evaluation of carvacrol in rats using a combined micronucleus and comet assay. **Food and Chemical Toxicology**. v. 98, p. 240-250, 2016.

MABEKU, L. B. K.; BENG, V. P.; KOUAM, J.; ESSAME, O.; ETOA, F. X. Toxicological evaluation of ethyl acetate extract of *Cylicodiscus gabunensis* stem bark (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 598-606, 2007.

MANFREDI, M.T.; DINI, V.; PIACENZA, S.; GENCHI, C. Tick species parasitizing people in an area endemic for tick-borne diseases in North-Western Italy. **Parasitologia**, v.41, n.4, p.555-560, 1999.

MARTINS, A.L.C.F.; FERNÁNDEZ, F.R.C.; CORRÊA, M.S.N.P.; GUERRERA, A.C. A Cárie dentária. In: CORRÊA, M.S.N.P. **Odontopediatria na primeira infância**. São Paulo: Santos, cap. 17, p. 195-207, 1998.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, 2002.

MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns aos homens e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

MATOS, R. S.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; FURQUIM, K. C. S.; SAMPIERI, B. R.; REMEDIO, R. N.; ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, Berlin, v. 113, p. 4555-4565, 2014.

MCOMIE, W. A.; ANDERSON, H. H.; ESTESS, F. M. Comparative toxicity of certain t-butyl substituted cresols and xylenols. **J. Am. Pharm. Assoc.** v.38, p. 366–369, 1949.

MELO, F.H.C. *et al.* Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 24, p. 437-443, 2010.

MELO, F.H.C. *et al.* Antidepressant-like effect of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 3, p. 362-367, 2011.

MEYER, W.; NEURAND, K. A comparative scanning electron micro-scopic view of the integument of domestic mammals. **Scanning Microsc.** v. 1, p. 169-180, 1987.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. **Laboratório para o clínico**. 8. ed. São Paulo: Editora Arheneu; 607 p, 1999.

MOERBECK, L.; VIZZONI, V. F.; MACHADO-FERREIRA, E.; CAVALCANTE, R. C.; OLIVEIRA, S. V.; SOARES, C. A. G.; AMORIM, M.; GAZÊTA, G. S. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) vector biodiversity in high altitude atlantic forest fragments within a semiarid climate: a new endemic area of spotted-fever in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2016.

MOHSENI, R.; KARIMI, J.; TAVILANI, H.; KHODADADI, I.; HASHEMNIA, M. Carvacrol ameliorates the progression of liver fibrosis through targeting of Hippo and TGF- β signaling pathways in carbon tetrachloride (CCl₄)- induced liver fibrosis in rats. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 2019.

- MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Básica**. 5ª ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.406-409, 2000.
- MORAES, J. D. *et al.* Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitol**, Brazil, v. 112, p. 603-610, out. 2013.
- MOSSA, A.T.H.; MOHAFRASH, S.M.; CHANDRASEKARAN, N. Safety of Natural Insecticides: Toxic effects on experimental animals. **BioMed Research International**, 2018.
- NAGHDIBADI, H.; ABDOLLAHI, M.; MEHRAFARIN, A.; GHORBANPOUR, M.; TOLYAT, M.; QADERI, A.; GHIACI YEKTA, M. An overview on two valuable natural and bioactive compounds, thymol and carvacrol, in medicinal plant. **Journal Med. Plants**, v. 16, n. 63, p. 1-32, 2017.
- NASCIUTTI, P. R. Processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. **Desenvolvimento de novos fármacos**. p. 17, 2012.
- NEVES, J. Antifungal activity of a gel containing *Thymus vulgaris* essential oil against *Candida* species commonly involved in vulvovaginal candidosis. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 151-153, 2009.
- NICHOLSON, W.L.; SONENSHINE, D.E.; NODEN, B.H.; BROWN, R.N. "Ticks (Ixodida)", in medical and veterinary entomology, **Editors GR Mullen and LA Durden** (San Diego, CA: Academic Press, an impression by Elsevier), p. 603-672, 2019.
- NIKUMBH, V. P. *et al.* Eco-friendly pest management using monoterpenoids – III: antibacterial efficacy of carvacrol derivatives. **Journal of Scientific & Industrial Research**, Maharashtra, v. 62, p. 1086-1089, set. 2003.
- NOGUEIRA, J. A. P. *et al.* Repellency effect of *Pilocarpus spicatus* A. St.-Hil essential oil and nanoemulsion against *Rhipicephalus microplus* larvae. **Experimental Parasitology**, New York, v. 215, 2020.
- NOSTRO, A.; ROCCARO, A.S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A.; PIZZIMENTI, F.C.; *et al.* Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J Med Microbiol**. v. 56, p. 519–523, 2007.
- NOVATO, T. *et al.* In vitro assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Brazil, v. 260, p. 1-4, jul. 2018.
- OAKESHOTT, J. G.; HOME, I.; SUTHERLAND, T. D.; RUSSELL, R. J. The genomics of insecticide resistance. **Genome Biology**, v.4, Issue1. Article 202, p. 1-4, Jan. 2003.
- OKELLO-ONEN, J. *et al.* Tick situation and control strategies in Uganda. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 13, n. 04, p. 657–660, 1992.
- OLIVEIRA, F.R.A.M.; OLIVEIRA, G.A.L.; OLIVEIRA, G.L.S.; FREITAS, R.M. Prospecção tecnológica do acetato de carvacrila e aplicações no setor industrial farmacêutico: ênfase em doenças negligenciadas. **Revista Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, p. 103–110, 2013.

OLIVEIRA, G.L.S.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; SOUZA, A.A.C.; MOURA, A.K.S.; LIMA, S.G.; FREIRE, J.A.P.; CITÓ, A.M.G.L. Carvacryl Acetate: Synthesis and Toxicological and Pharmacological Activities. **Rev. Virtual Quim.**, v. 12, n. 3, 2020a.

OLIVEIRA, M.V.S.; KONIG, I.F.M.; REIS, A.C; SILVA, L.; PECONICK, A.P.; THOMASI, S.S.; LIMA-DE-SOUZA, J.R; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; REMEDIO, R.N. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol affect reproduction and integument morphology in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, 2020b.

OLIVER, JOHN HENRIS. **Ticks reproduction**: Sperm development and cytogenetics. 1 ed. Obenchain, F.D. & Galun: Oxford, 1982. 275p.

ORHAN, I.; KARTAL, M.; KAN, Y.; SENER, B. Activity of essential oils and individual Components against *Acetyl and Butyrylcholinesterase*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, p. 547-553, 2008.

OTRANTO, D.; LIA, R.P.; CANTACESSI, C.; GALI, G.; PARADIES, P.; MALLIA, E.; CAPELLI, G. Efficacy of a combination of imidacloprid 10%/ permethrin 50% versus fipronil 10% (S)-methoprene 12%, against ticks in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, n. 130, p. 293-304, 2005.

PANELLA, N. A.; DOLAN, M. C.; KARCHESY, J. J.; XIONG, Y.; PERALTACRUZ, J.; KHASAWNEH, M.; MONTENIERI, J. A.; MAUPIN, G. O. Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from Heartwood of Alaska Yellow Cedar. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 352-358, 2005.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe, **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 7, 2001.

PAVELA, R. *et al.* Application of ethnobotanical repellents and acaricides in prevention, control and management of livestock ticks: a review. **Research in Veterinary Science**, v. 109, p. 1-9, 2016.

PAZ, G. F.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. de. Controle de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) no canil da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, n. 1, p. 41-44, 2008.

PEGRAM, R.G. *et al.* Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. **Systematic Parasitology**. Uxbridge, England, v. 10, p. 27-44, aug 1987.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K. S.; GOMES, M. D.; LIMA, F. C.; LAHLOU, S.; MAGALHAES, P. J.; CECCATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v.24, p. 341-350, 2010.

PEREIRA, A.I.S.; PEREIRA, A.G.S.; SOBRINHO, O.P.L.; CANTANHEDE, E.K.P.; SIQUEIRA, L.F.S. Antimicrobial activity in fighting mosquito larvae *Aedes aegypti*: Homogenization of essential oils of linalool and eugenol. **Educación Química**, v.25, n. 4, p. 446-449, 2014.

PEREIRA, A.M.S.P.; COSTA, N.M.C.; COELHO, P.M.R.A. A utilização de órgãos isolados como método alternativo à experimentação animal em toxicologia – **Métodos alternativos à experimentação animal em toxicologia**. P. 1-13, 1998.

PEREIRA JÚNIOR, 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**, Lavras, Brasil, v. 1, p. 1-4, 2019.

PEREZ-CONESA, D.; CAO, J.; CHEN, L.; MCLANDSBOROUGH, L.; WEISS, J. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. **J. Food Prot.** v. 74, P. 55–62, 2011.

PFÄFFLE, M.; LITWIN, N.; MUDERS, S.V.; PETNEY, T.N. The ecology of tickborne diseases. **Int J Parasitol**, v. 43, p. 1059–1077, 2013.

PINHEIRO, A.L. “**Produção de Óleos Essenciais**”, Ed. CPT, Viçosa, Minas Gerais, 2003.

PIRES, L. F.; COSTA, L. M.; SILVA, O. A.; *et al.* Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 112, p. 42–48, 2013.

PIRES, L.F.; COSTA, L.M.; ALMEIDA, A.A.C.; SILVA, O.A.; CERQUEIRA, G.S.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Is there a correlation between in vitro antioxidant potential and in vivo effect of carvacryl acetate against oxidative stress in mice hippocampus? **Neurochem Res.**, v. 39, p. 758-769, 2014.

POL, I.E.; KROMMER, J.; SMID, E.D. Bioenergetic consequences of nisin combined with carvacrol towards *Bacillus cereus*. **Innovative Food Sci. Emerg. Technol.**, v. 3, p. 55-61, 2002.

POTTER, P.A.; PERRY, A.G. **Fundamentos de enfermagem: conceitos, processo e prática**. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

RAMÍREZ, C.; FROYLÁN, I. V.; HERMINIA I, P. M.; *et al.* In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 61, n. 2, p. 251–257, 2013.

RAMÍREZ, C.; IBARRA, F.; PÉREZ, H. I.; *et al.* Assessment and determination of LC50 of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 1, n. 2, p. 72–33, 2016.

REMEDIO, R.N.; NUNES, P.H.; ANHOLETO, L.A.; OLIVEIRA, P.R.; SÁ, I.C.G.; CAMARGO-MATHIAS, I.M. Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlim, v. 114, p. 431-444, 2015.

RIBEIRO, C.T.; GASPAROTTO, J.; PETIZ, L. L.; BRUM, P. O.; PEIXOTO, D. O. *et al.* Oral administration of carvacrol/ β -cyclodextrin complex protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic denervation. **Neurochemistry International**, v. 126, p. 27-35, 2019.

RIVAS, L.; MCDONNELL, M.J.; BURGESS, C. M.; O'BRIEN, M.; NAVARRO-VILLA, A.; FANNING, S.; DUFFY, G. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. **Int. J. Food Microbiol.** v. 139, p. 70–78, 2010.

RITTIÉ, L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. **Methods in Molecular Biology**, 395–407, 2017.

RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; ROSADO-AGUILAR, J.A.; OJEDA-CHI, M.M.; PÉREZ-COGOLLO, L.C.; TRINIDAD-MARTÍNEZ, I.; BOLIO-GONZÁLEZ, M.E. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. **Ecos Rec Agrop**, v. 1, n. 3, p. 295–308, 2014.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia - Texto e Atlas**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

ROZZA, A.L.; PELLIZZON, C.H. Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 51–63, 2013.

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.

SAMPIERI, B. R.; ARNOSTI, A.; FURQUIM, K. C. S.; CHEIRICE, G. O.; BECHARA, G. H.; CARVALHO, P. L. P. F.; NUNES, P. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effect of ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*) on the oocyte yolk components of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari : Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 191, n. 3–4, p. 315–322, 2013.

SANDERSON, J.H.; PHILIPS, C.I. **An Atlas of Laboratory Animal Haematology**. Clarendon Press, Oxford, 1981.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; *et al.* Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, v. 100, n. 4, p. 783–790, 2007.

SCHELIN, R.R. **Handbook of Mammalian Metabolism of Plant Compounds**. Editora: CRC Press; 1 ed., 1991.

SCHOSSLER, D.; ALIEVI, M.M.; EMANUELLI, M.P.; SCHOSSLER, J.P. Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de flunixin meglumine e Ketoprofeno durante e trans e pós-operatório. **Acta Cir Bras.**, v. 16, n. 1, p. 46-51, 2001.

SCOTT, D.W.; MILLER, D.H.; GRIFFIN, C.E. **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**. 6th ed. Saunders, Philadelphia. 1528p, 2001.

- SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; ZERINGÓTA, V.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; MATOS, R. S.; MELO, D.; GOMES, G. A.; CARVALHO, G. A.; DAEMON, E. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlim, v. 112, p. 3471–3476, 2013.
- SHARON, A.; CENTER, D.M.V. Avaliação fitoquímica da função hepática no cão e gato. **Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais**. p. 1166-83, 1995.
- SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p. 618-626, 2008.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFRGS: Porto Alegre, p. 1102, 2003.
- SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1999.
- SLAMENOVA, D.; HORVATHOVA, E.; CHALUPA, I.; WSOLOVA, L.; NAVAROVA, J. Ex vivo assessment of protective effects of carvacrol against DNA lesions induced in primary rat cells by visible light excited methylene blue (VL+MB). **Neoplasma** v. 58, p. 14–19, 2011.
- SODELLI, L.F.; CALLIGARIS, I.B.; LIMA DE SOUZA, J.R.; SILVA, O.; ARAÚJO, B.J.N.; RODRIGUES, M.L. Clinical and morphophysiological hepatic alterations caused by the ingestion of food with added ricinoleic acid esters a bioactive with acaricidal potential. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 8, p. 58599-58612, 2022.
- SOLOMONS, T.W.G., FRYHLE, C.B., SNYDER, S.A. **Organic Chemistry**, 12ª edição, John Wiley, Hoboken NJ, 2016.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, 2014.
- SOUZA, J. R.; OLIVEIRA, P. R.; ANHOLETO, L. A.; *et al.* Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, n. September 2018, p. 66–72, 2019.
- STEVEN, L.S.; SCOTT, M.S. Urinary sistem. In: **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. Iowa: Iowa State, p. 277-336, 2002.
- STOHS, S.J. The role of free radicals in toxicity and disease. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 6, p. 205–228, 2011.
- SUNTRES, Z.E.; COCCIMIGLIO, J. & ALIPOUR, M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol, Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 304-318, 2015.
- SZABO, M. P. J.; BECHARA, G. H. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. **Experimental and Applied Acarology**, Jaboticabal, Brasil, v. 23, p. 915–928, jul. 1999.

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.

TAPPIN, M.R.R.; PEREIRA, J.F.G.; LIMA, L.A.; SIANI, A.C.; MAZZEI, J.L.; RAMOS, M.F. Análise química, quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L., & WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. Guanabara Koogan, 2017.

TEIXIERA, I.A.C.; TEIXEIRA, V.W. Glândulas anexas ao sistema digestório. In: GLEREAN, I.; SIMÕES, M.J. **Fundamentos de histologia para estudantes da área da saúde**. São Paulo: Santos, 2013.

TENNANT, B.C. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. London: Academic Press, p.327-352, 1997.

TRIST, D.G. Scientific process, pharmacology and drug discovery. Current Opinion in Pharmacology. **Curr Opin Pharmacol**, v. 11, n.5, p.528-33, 2011.

TSABOULA, A.; PAPADAKIS, E. N.; VRYZAS, Z.; *et al.* Environmental and human risk hierarchy of pesticides: A prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. **Environment International**, v. 91, p. 78–93, 2016.

URMACHER, C.D. Normal skin, p.25-45. In: Sternberg S.S. (Ed.), **Histology for Pathologist**. 2nd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1200p, 1997.

VAIRAMUTHU, S. *et al.* A six year (2006–2011) retrospective study of hemoprotozoan parasites affecting dogs in Chennai, Tamil Nadu, India. **J Parasit Dis**, India, v. 38, p. 193–195, dez. 2012.

VASCONCELOS, T.H.C.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M.F.F.M.; SANTOS, H.B.; AGUIAR, F.B.; MOREIRA, P.V.L. Acute pre-clinical toxicological study with the hydroalcoholic extract of the leaves of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 4, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C; MACIEL, M.A.M. Medicinal plants: safe cure? **Quim. Nova**, v. 28, p. 519-28, 2005.

VENDRAMINI, M. C. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FARIA, A. U.; FURQUIM, K. C. S.; SOUZA, L. P.; BECHARA, G. H.; ROMA, G. C. Action of Andiroba Oil (*Carapa guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae) Semi-engorged Females : Morphophysiological Evaluation of Reproductive System. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 75, p. 1745– 1754, 2012.

VERÍSSIMO, C.J.; BRITES-NETO, J.; PEREZ, C.A.; MONTEIRO, C.M.O. *et al.* **Controle de carrapatos nas pastagens**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2ed., 106p., 2015.

VRBANAC, J; SLAUTER, R. ADME in Drug Discovery. In Faqi, A. S. **A Comprehensive Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development**. 1ª Edição, Editora Elsevir, 2013,

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.

WOLSTENHOLME, A.J. *et al.* Resistência a medicamentos em helmintos veterinários. **Trends Parasitol**, v. 20, p. 469 – 476, 2004.

YOUNG, B; LOUISE, J.S.; STEVENS, A.; HETH, J.W. **Wheater – Histologia Funcional**. Rio de Janeiro: ed. Elsevier Churchill Livinstone, 5^a ed., 2007.

ZAIM, M.; GUILLET, P. Alternative insecticides: an urgent need. **Trends in Parasitology**, n. 18, v.4, p.161-163, 2002.

PARTE II

**ALTERAÇÕES HEPÁTICAS E CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR EXPOSTOS AO
ACETILCARVACROL EM TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA COM DOSE
REPETIDA**

**ALTERAÇÕES HEPÁTICAS E CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR EXPOSTOS AO
ACETILCARVACROL EM TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA COM DOSE
REPETIDA**

Graziela Hermínia Andrade Mendonça¹, Aline Chaves Reis¹,

Isaac Filipe Moreira Konig², Gabriela Pereira Brito³

Rafael Neodini Remédio^{1*}

1Departamento de Medicina – Universidade Federal de Lavras (UFLA)

2Departamento de Química – Universidade Federal de Lavras (UFLA)

3Departamento de Biologia – Universidade Federal de Lavras (UFLA)

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

E-mail: rafaেল.remedio@ufla.br

RESUMO

O carvacrol é um monoterpeneo fenólico encontrado em óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae e que desponta como uma alternativa de acaricida de origem vegetal. Sua acetilação foi proposta a fim de se obter um composto derivado com melhor perfil farmacológico e menor toxicidade aos organismos não-alvo. O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito do acetilcarvacrol na pele e no fígado de ratos Wistar após exposição dérmica com doses repetidas durante 21 dias. Foram utilizados 20 ratos distribuídos em 4 grupos com 5 animais cada. Três grupos receberam o tratamento com diferentes concentrações da substância (26, 52 e 104 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e um grupo (controle) recebeu apenas o veículo de diluição (DMSO a 5%). O composto foi aplicado, diariamente, em área da pele tricotomizada e mantido no local por meio de uma gaze fixada com atadura de crepom e esparadrapo. Os ratos desenvolveram dermatite irritante de contato cumulativa no local de aplicação do produto e alterações microscópicas significativas nessa região da pele. Também foi detectada elevação dos níveis séricos de ureia e da transaminase hepática ALT. As alterações histológicas observadas no fígado dos animais corroboram com a elevação dos níveis séricos da enzima ALT, que indica danos hepáticos leves e reversíveis. Os resultados sinalizam que a aplicação dérmica do acetilcarvacrol nas condições experimentais aqui descritas provocaram sinais de toxicidade local e sistêmica.

Palavras-chave: Acaricida. Acetilação. Carvacrol. Morfologia. Toxicologia.

ABSTRACT

Carvacrol is a phenolic monoterpene found in essential oils of plants of the Lamiaceae family and which emerges as an alternative acaricide of plant origin. Its acetylation was proposed in order to obtain a derivative compound with a better pharmacological profile and less toxicity to non-target organisms. The present study aimed to verify the effect of acetylcarvacrol in Wistar rats after dermal exposure with repeated doses for 21 days. Twenty rats were divided into 4 groups with 5 animals each. Three groups received treatment with different concentrations of the substance (26, 52, 104 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and one group (control) received only the dilution vehicle (5% DMSO). The substance was applied daily through the skin, in a previously shaved dorsal area and kept in place by the use of a gauze fixed with a crepe bandage and tape. The rats developed cumulative irritant contact dermatitis at the site of product application and significant microscopic changes in this region of the skin. Elevated serum levels of urea and hepatic ALT transaminase were also detected. The histological changes observed in the liver of the animals corroborate the elevation of the serum levels of the ALT enzyme, which indicates mild and reversible liver damage. The results indicate that the dermal application of acetylcarvacrol in the experimental conditions described here provoked signs of local and systemic toxicity.

Keywords: Acaricide. Acetylation. Carvacrol. Morphology. Toxicology.

1 INTRODUÇÃO

De origem africana, o *Rhipicephalus sanguineus* é popularmente conhecido como carrapato-do-cão, tendo sido introduzido no continente americano juntamente com os cães domésticos oriundos da colonização europeia (GUGLIELMONE *et al.*, 2003). Durante o processo de alimentação, além da espoliação e injúria causadas nos hospedeiros, os carrapatos são ainda potenciais transmissores de patógenos como protozoários, vírus e bactérias, causando várias doenças (KAUFMAN *et al.*, 2010; CONTRERAS *et al.*, 2016; BARBOSA-SILVA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2017).

Devido à importância de se controlar a infestação por esses parasitos, nos últimos anos houve um avanço no desenvolvimento de novos compostos acaricidas para serem aplicados em cães e gatos. Dentre os grupamentos químicos sintéticos mais empregados no controle de carrapatos em pequenos animais encontram-se os carbamatos, os organofosforados, os piretróides, as amidinas, as lactonas macrocíclicas e os fenilpirazóis, com modos de ação e eficácia distintos (FERNANDES *et al.*, 2010). Contudo, o uso indiscriminado desses compostos, que tem levado ao surgimento de populações de carrapatos resistentes, associado à contaminação do meio ambiente e seu potencial de intoxicação para a saúde de animais e humanos, fez com que se despertasse o interesse de pesquisadores para o desenvolvimento de formas de controle distintas (ZAIM; GUILLET, 2002).

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) é um monoterpene fenólico com fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$, encontrado principalmente em óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae (SANTORO *et al.*, 2007). É um dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de plantas *Origanum* sp. e *Thymus* sp. e tem sido usado em baixas concentrações como aromatizante e conservante de alimentos, bem como fragrância em formulações cosméticas (SUNTRES, 2015). Além disso, o carvacrol também demonstrou atividade acaricida significativa, podendo ser considerado uma opção promissora para o controle dos carrapatos (COSKUN *et al.*, 2008; KOC *et al.*, 2013; LAGE *et al.*, 2013; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2019). A acetilação do carvacrol foi realizada na tentativa de se obter um composto derivado com melhor perfil farmacológico e menor toxicidade aos organismos não-alvo. Sugere-se que este processo possa proporcionar características de segurança, bem como aumentar sua eficácia, conferindo maior estabilidade ao composto pela conversão da hidroxila fenólica, mais susceptível à oxidação, em um grupamento éster (DAMASCENO *et al.*, 2014). Em carrapatos, por exemplo, o uso de acetilcarvacrol já demonstrou elevada eficácia, além de afetar

diretamente os órgãos internos de carrapatos *R. sanguineus* e *Rhipicephalus microplus* (GONÇALVES *et al.*, 2019, 2021; KONIG *et al.*, 2019, 2020, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2020)

Ainda que um grande número de estudos tenha comprovado a atividade acaricida de alguns extratos e derivados de plantas em laboratório, muitos estudos são ainda necessários para permitir o seu uso nos hospedeiros vertebrados, validando-os como uma estratégia de controle (ARAÚJO *et al.*, 2016). Ao contrário da crença popular, o uso de plantas medicinais não é isento de risco, tendo em vista que além do princípio ativo terapêutico, a mesma planta pode conter outras substâncias tóxicas (GOODMAN, 2006). A exposição ao carvacrol provocou graves irritações na pele de coelhos após aplicação dérmica na dose de 2.700mg/Kg (MCOMIE *et al.*, 1949). Quando comparado com o carvacrol, o acetilcarvacrol demonstrou menor toxicidade aguda em camundongos. Após administração em dose única por gavagem esofágica em ratos, a DL₁₀ e a DL₅₀ do acetilcarvacrol foram calculadas em 566,7 e 1.544,5 mg/Kg, respectivamente, e para o carvacrol foram DL₁₀ = 546,8 e DL₅₀ = 919 mg/Kg (ANDRE *et al.*, 2016). A dificuldade em se encontrar dados na literatura para avaliar e discutir sobre a toxicidade do acetilcarvacrol reforça a necessidade desse tipo de estudo para fornecer suporte para ensaios não clínicos, a fim de garantir o uso seguro desse composto em humanos e animais (OLIVEIRA *et al.*, 2020a).

Diante desse cenário e sob a perspectiva de num futuro próximo o acetilcarvacrol poder ser utilizado como uma estratégia eficiente, segura e ambientalmente sustentável no controle de carrapatos, o presente estudo teve como objetivo avaliar e determinar a toxicidade dérmica com dose repetida desse composto em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), empregando-se concentrações de acetilcarvacrol baseadas nos valores de concentração letal previamente definidos *in vitro* para carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (KONIG *et al.*, 2020) por meio de análise semiquantitativa e morfométrica utilizando-se técnicas histológicas e histoquímicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Acetilação do carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol, fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$) foi adquirido da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha) com 99% de pureza e acetilado de acordo com metodologia proposta por König *et al.* (2019). Para isso, em um balão volumétrico contendo 25mL de solução de hidróxido de sódio a 10% foram adicionados 5mL de carvacrol, em temperatura ambiente. Posteriormente, 5,5mL de anidrido acético foram acrescentados ao frasco sob refrigeração. Após agitação por 15 minutos, o óleo obtido foi separado da solução e caracterizado por espectroscopia de infravermelho e de acordo com seu ponto de fusão (SOLOMONS *et al.*, 2016; KONIG *et al.*, 2019), em espectrômetro IR affinity-1 Shimadzu, funcionando em faixa espectral de 4000-400 cm^{-1} . A ausência de fenol residual do reagente foi determinada pela ausência de banda larga intensa entre 3000 a 4000 cm^{-1} . Além disso, a confirmação da estrutura do éster carbonílico foi realizada a partir da detecção de uma banda intensa a 1753 cm^{-1} .

2.2 Animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (Protocolo 002/2021 de 26/04/2021).

Foram utilizadas 20 ratas adultas, da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus* albinos), com aproximadamente 9 semanas de idade e pesando entre 160–230 g, procedentes do Biotério Central da UFLA. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno medindo 40x34x17cm, mantidas em estante ventilada, sob temperatura de $22 \pm 3^{\circ}C$, umidade relativa 50-60%, em sala contendo exaustor, com luz artificial e fotoperíodo de 12/12h (claro/escuro), recebendo água e ração *ad libitum*. Os ratos foram identificados através de marcação na cauda e mantidos nas gaiolas por 15 dias antes do início dos tratamentos, para permitir sua aclimatação às condições laboratoriais (OCDE, 1981, 1995).

2.3 Delineamento experimental

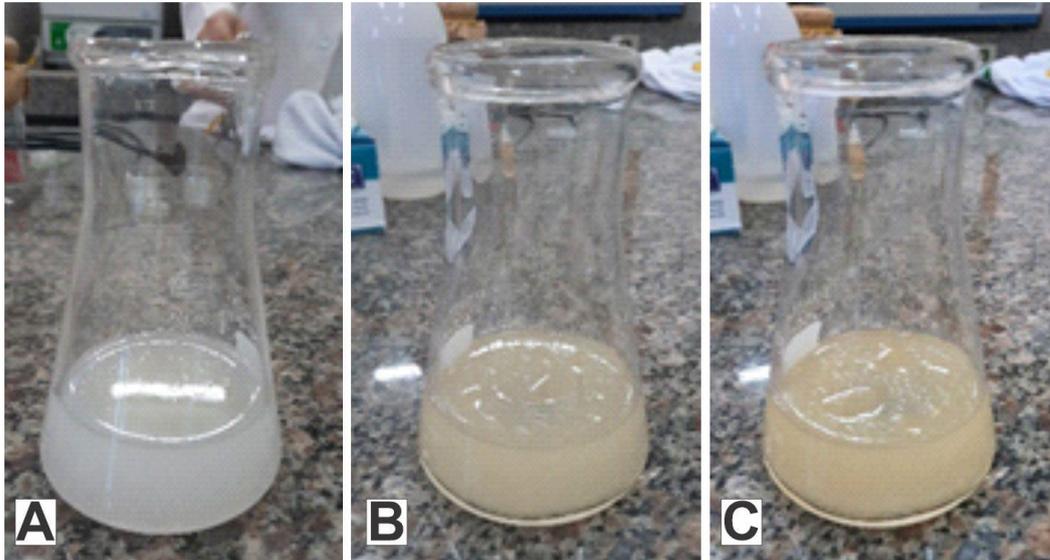
2.3.1 Toxicidade dérmica com dose repetida

Os estudos de toxicidade de doses repetidas têm como objetivo caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração contínua por um período específico. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos na fisiologia do animal, alterações hematológicas, bioquímicas, anátomo e histopatológicas, além de informações sobre a indicação do NOEL (Nível sem efeito observado) e NOAEL (Nível sem efeitos adversos observados).

Os procedimentos para determinação da toxicidade dérmica do acetilcarvacrol em ratos foram baseados no Guideline 410 da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) (OCDE, 1981) e no experimento desenvolvido por Cunha *et al.* (2017).

Um dia antes do início dos procedimentos experimentais, os ratos foram submetidos à tricotomia de 10-20% do dorso utilizando-se tosador elétrico. Os animais foram pesados e divididos, aleatoriamente, em 4 grupos ($n = 5$ animais por grupo). As soluções de acetilcarvacrol foram diluídas em DMSO a 5% (veículo) e foi aplicado em cada animal, diariamente, o volume de 2,5mL em três diferentes concentrações (26, 52 e 104 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Essas concentrações foram baseadas no trabalho de König *et al.* (2020) em que carrapatos *R. sanguineus* s.l. foram imersos em soluções contendo acetilcarvacrol e determinou-se, estatisticamente, que a concentração de 26 $\mu\text{L}/\text{mL}$ é suficiente para gerar a mortalidade em 90% desses parasitos (CL_{90}). As aplicações se seguiram da seguinte forma: grupo Tratamento 1 recebeu a concentração de 26 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (1 x CL_{90}); o grupo Tratamento 2 foi tratado com solução a 52 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (2 x CL_{90}); e o grupo Tratamento 3 foi exposto a 104 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (4 x CL_{90}). O grupo Controle recebeu apenas aplicação do veículo (2,5mL de DMSO a 5%/dia).

Figura 1 - Soluções com diferentes concentrações de acetilcarvacrol diluído em DMSO a 5%.



Legendas: (A) 26 μ L/mL; (B) 52 μ L/mL; (C) 104 μ L/mL.
Fonte: Do autor (2021).

Cada grupo de animais, no momento de receber o tratamento, era deslocado para a sala de procedimentos para a execução do protocolo experimental.

Os tratamentos foram realizados por meio de aplicação do acetilcarvacrol e do veículo de diluição (DMSO) sobre a área tricotomizada, com o auxílio de pipeta volumétrica descartável. Em seguida, a região foi coberta com gaze e protegida usando atadura de crepom fixada por esparadrapo impermeável. Os produtos foram administrados uma vez ao dia e sempre no mesmo horário, durante 21 dias.

Figura 2 - Animal após aplicação do produto; o local da aplicação foi envolvido com gaze e esparadrapo, para evitar o acesso do animal à pele tratada.



Fonte: Do autor (2021).

Após o tratamento os animais foram observados, sempre no mesmo horário, para detecção de sinais de irritação, toxicidade sistêmica, morbidade e mortalidade. A pesagem dos animais foi realizada semanalmente.

Ao final dos 21 dias de tratamento, os animais foram novamente pesados e mantidos em jejum de 12h. Após este período, foram anestesiados com solução de xilazina (10mg/kg) e cetamina (90mg/kg) diluídas em solução de cloreto de sódio 0,9%, aplicada por via intraperitoneal para que fosse realizada a eutanásia por exsanguinação por punção cardíaca e coletadas as amostras de sangue. Todos os animais foram dissecados para coleta dos órgãos. Os órgãos foram examinados macroscopicamente em busca de alterações e em seguida foi realizada a ressecção.

A carcaça e demais resíduos biológicos oriundos deste processo foram acondicionados em saco plástico branco e descartados conforme o Plano de Gestão de Resíduos da UFLA.

2.3.2 Pontos finais humanitários (“endpoints”)

Logo após a aplicação das doses, os animais foram observados individualmente pelo menos uma vez durante os primeiros trinta minutos, com atenção especial às primeiras quatro horas pós-tratamento. Estas observações permitem a documentação de quaisquer condições anormais, incluindo dados como início da ocorrência, duração e severidade, servindo como

indicativo de necessidade de eutanásia, de acordo com a severidade da condição, a identificação de dor e distresse, o prognóstico e a perda potencial de dados importantes (OCDE, 2000).

Os pontos finais humanitários (“endpoints”), que indicam a necessidade de finalização do experimento antes do previsto, de forma a minimizar ou evitar dor e distresse, seguiram as orientações fornecidas pela OCDE (2000) e por Stokes (2002). Os seguintes sinais clínicos foram utilizados como indicativos de condição moribunda ou morte iminente: deambulação prejudicada, dificuldade de se alimentar ou beber água, anorexia prolongada, perda de peso excessiva, desidratação severa, perda de sangue significativa, ausência de respostas voluntárias a estímulos externos, dificuldade de respiração, incapacidade de permanecer em pé, convulsões, automutilação, diarreia prolongada, alterações significativas na temperatura corporal, tumores e evidências que sugiram falência de algum órgão específico (OCDE, 2000; STOKES, 2002). A necessidade de eutanásia antes do final do experimento foi avaliada de acordo com os seguintes sinais clínicos: anormalidades na vocalização, agressividade, alterações posturais, reação à manipulação, traumas autoinduzidos, ulcerações ou feridas abertas, dificuldades respiratórias, fraturas, relutância em se mover, aparência externa anormal, rápida perda de peso e sangramentos significativos (OCDE, 2000; STOKES, 2002).

2.4 Material biológico

2.4.1 Análises hematológicas e bioquímicas

As amostras de sangue foram coletadas em tubos com e sem anticoagulante, mantidas sob refrigeração em uma faixa de temperatura de 2 a 6°C e processadas em, no máximo, 2 horas.

O sangue coletado para a realização do hemograma foi acondicionado em tubos com EDTA (anticoagulante) K3EDTA (Vacuette®) respeitando o volume de sangue descrito no tubo (4mL). O sangue foi homogeneizado cuidadosamente com o anticoagulante através de leve agitação do tubo. Os hemogramas foram realizados obtendo-se os valores de WBC (contagem de glóbulos brancos), RBC (contagem de glóbulos vermelhos), HCB (hemoglobina), HCT (hematócrito), VCM (volume corpuscular médio), CHCM (concentração média de hemoglobina corpuscular), HCM (hemoglobina corpuscular média), PLT (contagem de plaquetas) através do analisador automático de células hematológicas Siemens Healthcare Diagnostics/Bayer.

As amostras utilizadas para a determinação dos parâmetros bioquímicos (aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina e ureia) foram

armazenadas em tubos CAT Serum Sep Clot Activador (Vacuette®) sem anticoagulante, que foram centrifugados a 3500rpm por 15 minutos para a separação do soro e do coágulo. As quantificações foram realizadas através de kits colorimétricos da Bioclin® (teste cinético colorimétrico para a determinação da creatinina, metodologia cinética para as transaminases e reagente enzimático para ureia).

2.4.2 Avaliação morfológica e morfométrica

Para avaliação histopatológica, os materiais coletados foram seccionados e imediatamente imersos em solução fixadora de formaldeído a 4% por 72h. As amostras foram, então, transferidas para solução de tampão fosfato de sódio (pH 7,2) por 24h e, em seguida, desidratadas em série gradativa de álcool etílico (70, 80, 90 e 95%, por 20 minutos cada), embebidas e incluídas em parafina. Os blocos foram seccionados em micrótomo Lupetec MRP09 para a obtenção de cortes com espessura de 3µm e distribuídos em lâminas de vidro. As secções de fígado e de pele foram, então, submetidas à técnica de hematoxilina-eosina (H-E), para a observação das características gerais do tecido (JUNQUEIRA, 1983). As lâminas de pele foram também submetidas à coloração de Picrosírius, para a observação das fibras colágenas presentes no tecido, em vermelho (JUNQUEIRA, 1983).

2.5 Análise dos resultados

As lâminas foram examinadas e fotografadas por meio de sistema de captura e análise de imagens, composto por microscópio de luz trinocular *Leica* DM500 equipado com câmera ICC50W.

A partir das fotomicrografias obtidas, realizou-se a análise semiquantitativa das alterações morfológicas observadas no fígado e na pele, permitindo a comparação das alterações morfológicas observadas nos diferentes indivíduos por meio de análise estatística. Para isso, foi estabelecido um protocolo de avaliação baseado no trabalho conduzido por Bernet *et al.*, 1999 e modificado por Marinho *et al.* (2014). Este sistema de análise poderá servir como referência para futuras análises morfológicas desses órgãos de ratos expostos a produtos potencialmente tóxicos, podendo ser readequado para outros órgãos, outras metodologias e inclusive outras espécies de vertebrados.

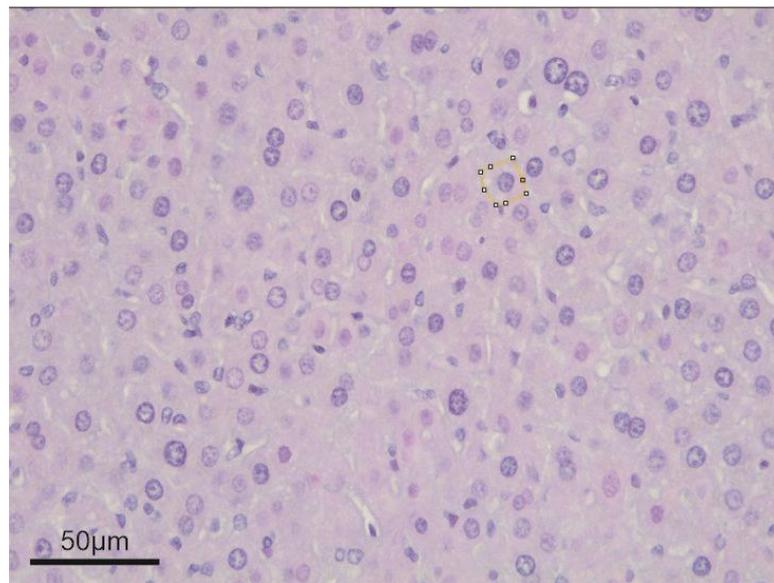
As principais modificações estruturais que podem ser observadas no fígado e na pele de ratos expostos a produtos tóxicos foram sumarizadas em tabela, a partir das informações

disponíveis na literatura. Cada alteração recebeu um fator de importância (w), variando de 1 a 3, definido previamente pelos pesquisadores participantes do projeto, de acordo com sua relevância no desenvolvimento e sobrevivência das células e tecidos em questão: (1) importância mínima, quando a lesão é facilmente reversível após a interrupção da exposição ao agente químico; (2) importância moderada, quando na maioria dos casos a lesão pode ser reversível, após a neutralização do agente agressor; (3) importância elevada, quando a lesão é irreversível, levando à perda parcial ou total da função da célula ou do tecido. As alterações morfológicas foram, então, classificadas em escores (a), que podem variar de 0 a 5, dependendo do grau de extensão da alteração no tecido, sendo (0) nenhuma ocorrência e (5) ocorrência muito frequente. Multiplicando-se o fator de importância pelo escore, obteve-se o índice de cada alteração ($INDEX_{alt} = w \times a$). O índice total de cada indivíduo foi calculado pela soma dos índices de cada alteração observada, de acordo com a seguinte fórmula: $INDEX_{ind} = \Sigma (w \times a)$.

A análise morfométrica foi realizada em software Image J (NIH). Regiões com possíveis lesões em que foram observados núcleos sobrepostos ou células degeneradas foram desconsideradas. Nas lâminas do fígado, as seguintes medidas foram avaliadas: área e o perímetro do núcleo e dos hepatócitos, densidade de hepatócitos no tecido, porcentagem de núcleos dos hepatócitos alterados no tecido e a porcentagem do tecido ocupada por sinusóides hepáticos. Núcleos apresentando forma irregular e mais fortemente corados com hematoxilina foram considerados alterados. Para as medidas de área e perímetro, 50 núcleos e 50 hepatócitos foram avaliados de forma randomizada em imagens em aumento de 400x para cada indivíduo, em todos os grupos (Figura 3). Apenas células com núcleo e limite celular visíveis foram consideradas. A razão entre a área do núcleo e a área do hepatócito ($R = \text{área do núcleo} / \text{área do hepatócito}$) também foi calculada para cada indivíduo, em 50 células. A densidade de hepatócitos no tecido foi calculada a partir da contagem do número de hepatócitos em 20 regiões de área conhecida ($6000\mu^2$), para cada indivíduo em todos os grupos, possibilitando a obtenção do valor do número de hepatócitos por μm^2 (Figura 4). A porcentagem de núcleos alterados no tecido foi mensurada em 5 imagens no aumento de 400x, por indivíduo por grupo. Foi contabilizado o número de núcleos alterados (irregulares, hipercoreados ou picnóticos) e o número de total de núcleos da imagem, para a obtenção dos valores de porcentagem, de acordo com a seguinte fórmula: $\%N_{alt} = (N_{alterados} / N_{total}) \times 100$. A porcentagem do tecido ocupada por capilares sinusoides foi mensurada em 5 imagens no aumento de 400x para cada indivíduo, em todos os grupos. Em cada imagem, foi estabelecido um *grid* de 713 pontos, e os pontos de intersecção que se localizavam sobre os sinusoides foram contabilizados. A porcentagem foi

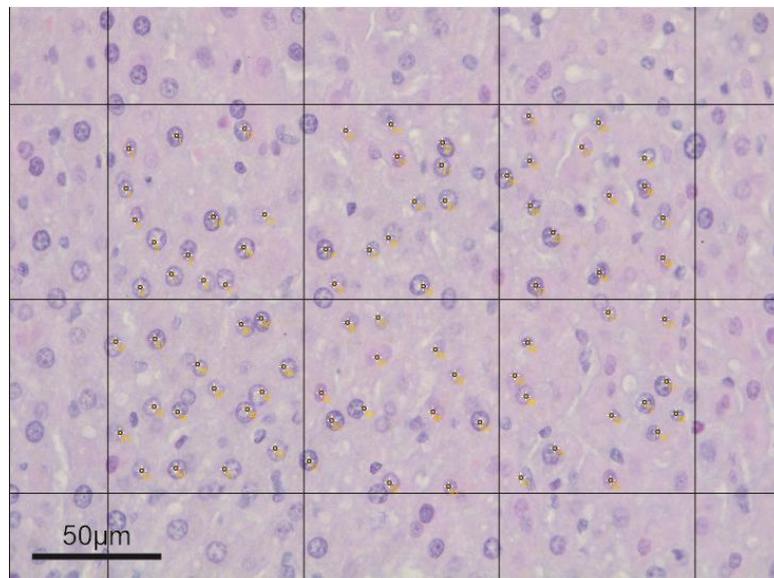
obtida a partir do número de pontos sobre os sinusoides (P_{sin}) e o número total de pontos de cada imagem (P_{total}), conforme a seguinte fórmula: $\%sin = (P_{sin}/P_{total}) \times 100$. Nesta análise, foram desconsideradas imagens em que foram observados vasos de calibre maior ou artefatos de técnica. A partir dos índices individuais, foram obtidos os valores de média e desvio padrão para cada grupo.

Figura 3 - Lâmina de fígado de rato Wistar (aumento: 400x) pertencente ao Grupo Controle e corada com H-E, após ser submetida à ferramenta “Polygon selections” do software Image J, para a obtenção da medida da área do hepatócito.



Fonte: Do autor (2022).

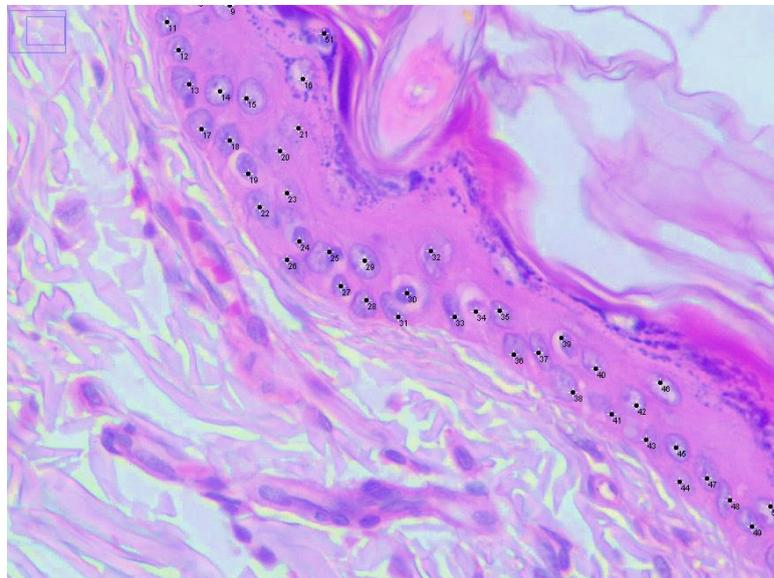
Figura 4 - Lâmina de fígado de rato Wistar (aumento: 400x) pertencente ao Grupo Controle e corada com H-E, após ser submetida à ferramenta “Grid Type” e “Cell Counter” do software Image J, para a obtenção da densidade de hepatócitos no tecido.



Fonte: Do autor (2022).

Em relação à morfometria da pele, foram mensurados os seguintes parâmetros: a densidade de células epiteliais na epiderme e de células do tecido conjuntivo na derme, a espessura da epiderme e a porcentagem de fibras colágenas presentes na derme. Para a medida da densidade de células epidérmicas, a área ocupada pela epiderme foi determinada em 10 imagens no aumento de 400x por indivíduo, em cada grupo. O número de células epiteliais foi contabilizado, de forma a se obter o número de células por μm^2 (Figura 5). Na derme, o mesmo procedimento foi adotado para a contagem de células do tecido conjuntivo. A espessura da epiderme foi mensurada, para cada indivíduo, em 10 imagens no aumento de 400x e foi definida como a distância entre a membrana basal e a superfície apical da camada córnea. Foram realizadas 3 medidas para cada imagem, no centro e próximo às extremidades direita e esquerda da epiderme na fotomicrografia. O valor de espessura para cada imagem correspondeu à média entre as três regiões mensuradas.

Figura 5 - Lâmina da pele de rato Wistar (aumento: 400x) pertencente ao Grupo Controle e corada com H-E, após ser submetida à ferramenta “Cell Counter” do software Image J para a obtenção dos valores de densidade de células na epiderme.

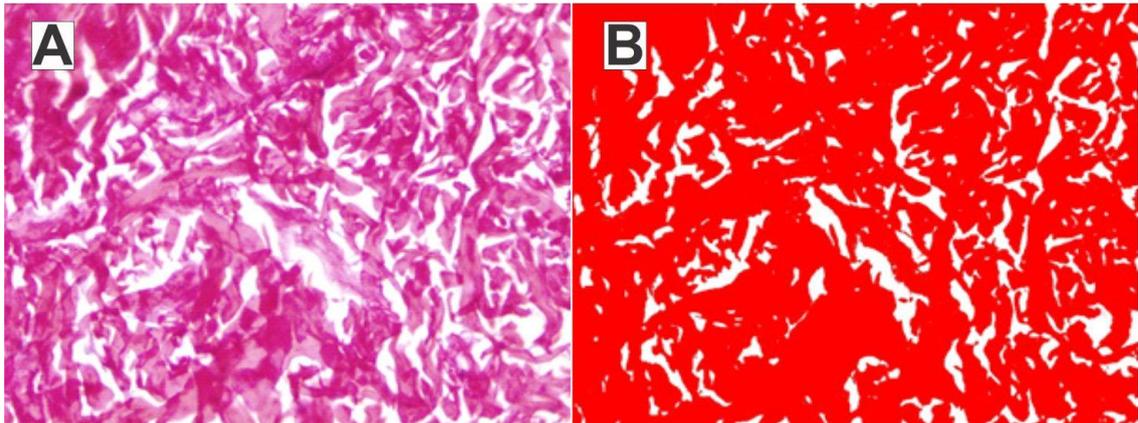


Fonte: Do autor (2022).

A porcentagem de fibras colágenas no tecido foi realizada nas lâminas submetidas à coloração de Picosírius, avaliadas no Image J a partir da ferramenta Threshold. As áreas selecionadas para essa mensuração corresponderam apenas à derme papilar, não apresentando nenhuma outra porção da pele, como epiderme e hipoderme e sem a presença de folículos

pilosos, conforme demonstrado na Figura 6. Foram avaliadas 10 imagens por indivíduo, para cada grupo.

Figura 6 - Lâmina da pele de rato Wistar (400x) pertencente ao Grupo T3 corada com Picrosírius (A) e após ser submetida à ferramenta Threshold do Image J (B), para a análise da porcentagem de fibras colágenas presentes na derme.



Fonte: Do autor (2022).

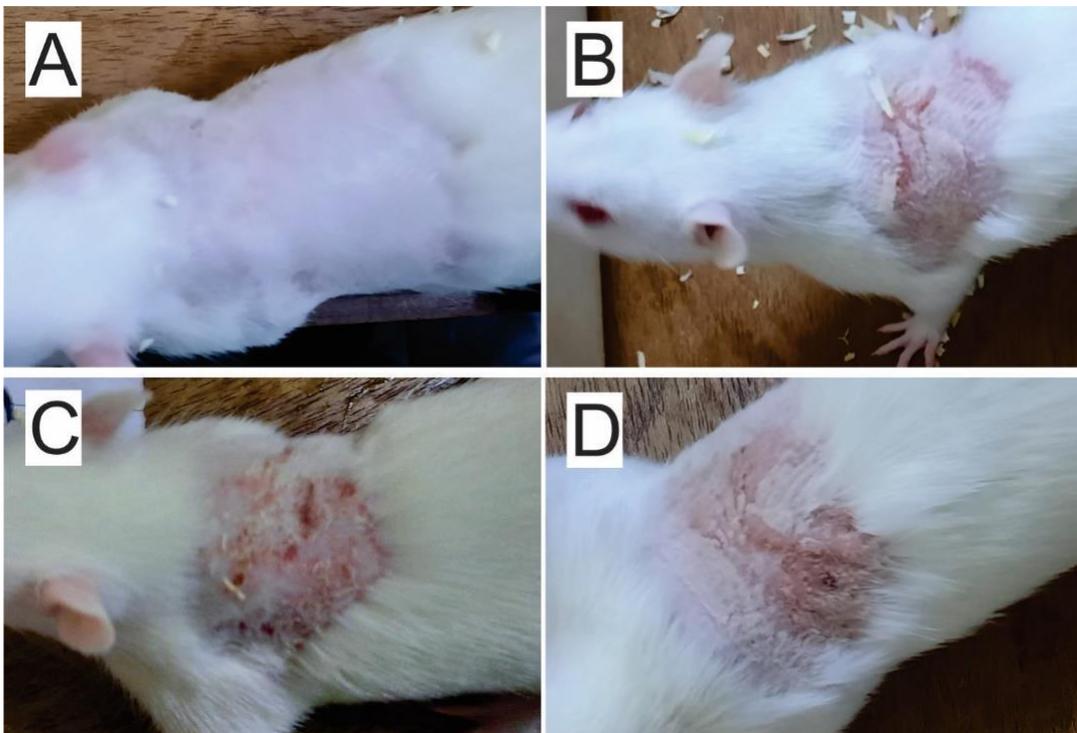
Os dados hematológicos, bioquímicos, morfológicos e morfométricos foram avaliados estatisticamente por meio do teste de ANOVA *one way* seguido de teste *post hoc* de Tukey ($\alpha = 0,05$; GraphPad Prism v.7.00).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação clínica e comportamental

A aplicação dérmica com dose repetida de acetilcarvacrol em ratos por 21 dias em diferentes concentrações não provocou mortalidade. No entanto, os animais dos grupos de tratamento manifestaram sinais clínicos evidentes de toxicidade na pele, como irritação dérmica local, dor ao toque e dermatite. As lesões na pele foram evidenciadas a partir do terceiro dia de aplicação e se seguiu por formação de crostas amarelas. A aplicação diária provocava a descamação da pele e formação de novas feridas e, posteriormente, novas crostas (Figura 7). Ocorreram escoriações e exsudação associadas à lesão de pele que era intensificada pelo traumatismo autoinfligido em decorrência do intenso prurido que, em alguns casos, resultava na remoção da gaze protetora.

Figura 7 - Aspecto da pele dos animais no 5º dia após o início do tratamento. (A) Grupo Controle (DMSO 5%); (B) Grupo T1; (C) Grupo T2; (D) Grupo T3.

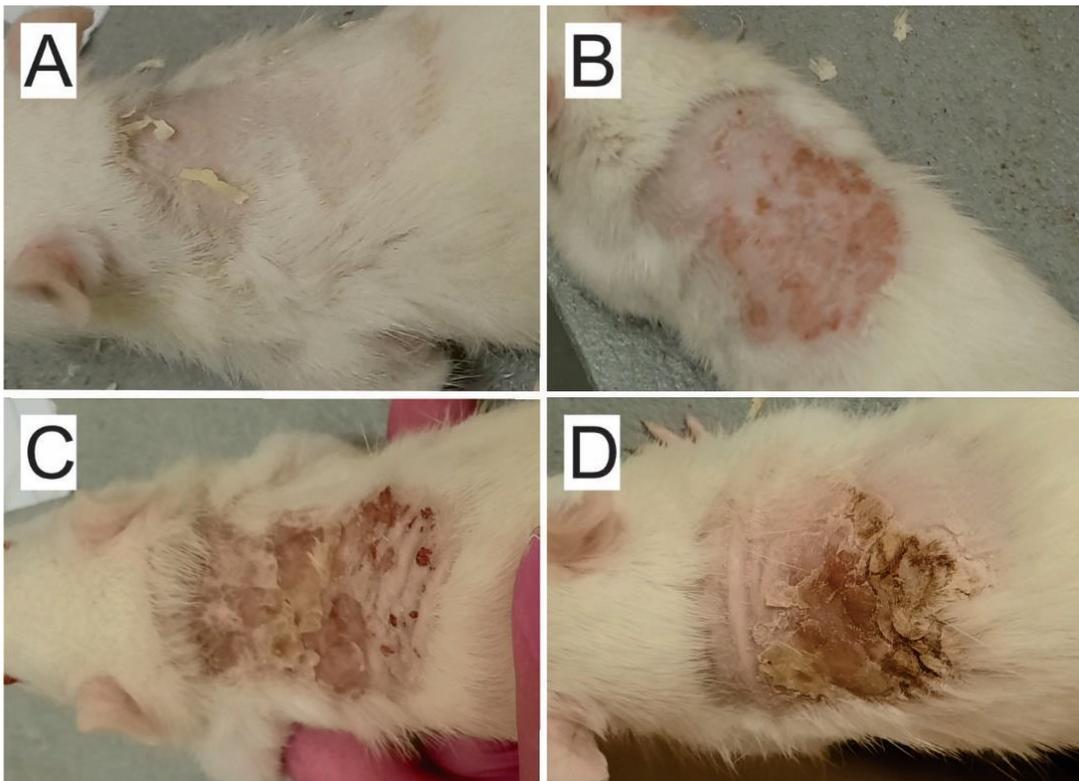


Fonte: Do autor (2021).

Verificou-se a inibição do crescimento de pelo no local de aplicação do produto (alopecia) e alteração de seu aspecto nas regiões adjacentes à área tricotomizada, em virtude do

escorrimento do produto. O grau de irritação foi dose-dependente, e embora todos os indivíduos pertencentes aos grupos de tratamento tenham exibido sinais de irritação grave pela manifestação de eritema, edema e lesão na pele, os grupos tratados com as maiores concentrações (T2 e T3) demonstraram um aspecto de maior severidade (Figura 8).

Figura 8 - Aspecto da pele dos animais ao final do experimento. (A) Grupo Controle (DMSO 5%); (B) Grupo T1; (C) Grupo T2; (D) Grupo T3.



Fonte: Do autor (2021).

Mudanças no padrão de comportamento dos animais foram observadas diariamente. O estresse e a dor aguda fizeram com que os animais que receberam o tratamento vocalizassem com guinchos agudos e ficassem mais agitados, inquietos e agressivos imediatamente após a aplicação da substância. Apresentaram intenso prurido, tentando rasgar a gaze e o esparadrapo com as unhas e com os dentes, o que não foi observado nos animais do grupo controle.

O peso corporal médio dos ratos está discriminado na Tabela 1 e as variações semanais no peso corporal médio está representado no Gráfico 1. Não foram observadas diferenças na alteração do peso corporal médio dos animais pertencentes aos grupos controle e de tratamento ($p < 0,05$).

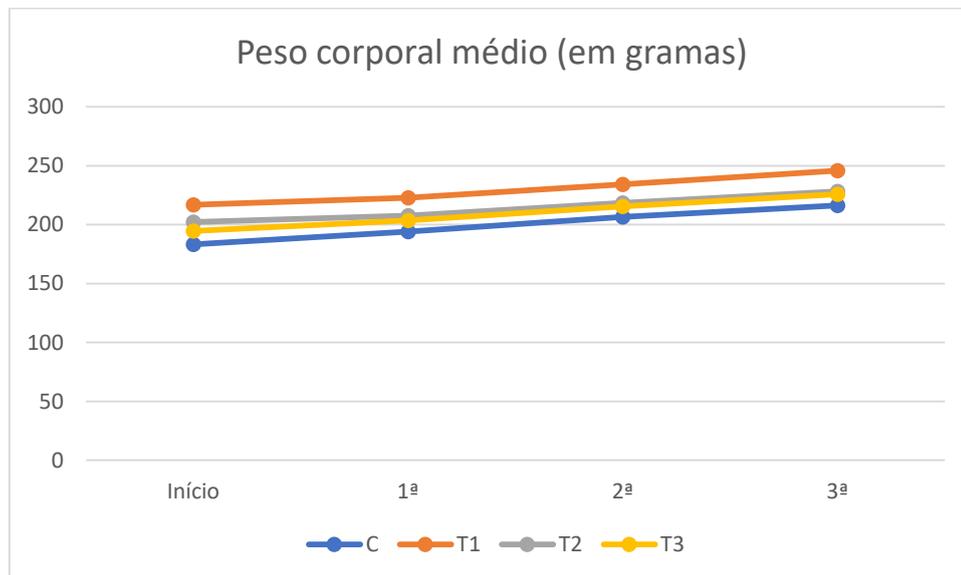
Tabela 1 - Média \pm desvio padrão do peso corporal (g) de ratos Wistar ao longo dos 21 dias de experimento.

Grupo	Experimento			
	Início	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana
C (DMSO 5%)	183,20 \pm 13,27 ^a	194,20 \pm 13,91 ^a	206,60 \pm 15,72 ^a	216,40 \pm 14,67 ^a
T1 (26 μ L/mL)	217,00 \pm 9,05 ^a	222,80 \pm 12,23 ^a	234,20 \pm 7,59 ^a	245,80 \pm 15,84 ^a
T2 (52 μ L/mL)	202,20 \pm 9,62 ^a	207,80 \pm 9,36 ^a	218,40 \pm 10,78 ^a	228,40 \pm 9,39 ^a
T3 (104 μ L/mL)	194,80 \pm 6,83 ^a	203,60 \pm 9,55 ^a	215,60 \pm 11,03 ^a	225,80 \pm 13,59 ^a

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si (ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey; $\alpha = 0,05$). Legendas: (C) Grupo Controle; (T1) Grupo Tratamento 1; (T2) Grupo Tratamento 2; (T3) Grupo Tratamento 3.

Fonte: Do autor (2022).

Gráfico 1 - Variação do peso corporal médio (g) de ratos Wistar ao longo do tratamento.



Legendas: (C) Grupo Controle; (T1) Grupo Tratamento 1; (T2) Grupo Tratamento 2; (T3) Grupo Tratamento 3.

Fonte: Do autor (2022).

3.2 Análises Hematológica e Bioquímica

Após 21 dias de aplicação dérmica diária do acetilcarvacrol, não houve diferença estatística nos parâmetros hematológicos (eritrograma e leucograma) entre os grupos, conforme dados listados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Eritrograma de ratos Wistar albinos após 21 dias de exposição tópica ao acetilcarvacrol em diferentes concentrações.

Eritrograma	Grupos				p-valor
	Controle	T1 (26µL/mL)	T2 (52µL/mL)	T3 (104µL/mL)	
Hemácias (milhões/mm ³)	7,29 ± 0,94 ^a	7,86 ± 0,21 ^a	7,16 ± 0,34 ^a	7,82 ± 0,22 ^a	0.249
Hemoglobina (g/dL)	13,82 ± 1,82 ^a	15,60 ± 0,40 ^a	14,44 ± 0,37 ^a	15,43 ± 0,51 ^a	0.123
Hematócrito (%)	38,70 ± 4,50 ^a	42,53 ± 0,85 ^a	40,02 ± 0,97 ^a	42,96 ± 1,24 ^a	0.132
VCM (fL)	53,17 ± 0,78 ^a	54,10 ± 0,40 ^a	55,90 ± 1,86 ^a	51,43 ± 6,09 ^a	0.236
HCM (pg)	18,97 ± 0,09 ^a	19,83 ± 0,05 ^a	20,26 ± 0,72 ^a	19,73 ± 0,11 ^a	0.197
CHCM (%)	35,70 ± 0,62 ^a	36,70 ± 0,20 ^a	36,20 ± 0,18 ^a	35,90 ± 0,36 ^a	0.132
RDW (%)	12,10 ± 1,54 ^a	12,90 ± 0,70 ^a	12,60 ± 0,85 ^a	11,90 ± 0,52 ^a	0.599
Eritroblastos (%)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	-

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey; $\alpha = 0,05$). (VCM) Volume corpuscular médio; (HCM) Hemoglobina corpuscular média; (CHCM) Concentração de hemoglobina corpuscular média; (RDW) Amplitude de distribuição de glóbulos vermelhos; (g/dL) Grama por decilitro; (fL) Fitolitro; (pg) Picograma.

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 3 - Leucograma de ratos Wistar albinos após 21 dias de exposição tópica ao acetilcarvacrol em diferentes concentrações.

Leucograma	Grupos				p-valor
	Controle	T1 (26µL/mL)	T2 (52µL/mL)	T3 (104µL/mL)	
Leucócitos (mil/mm ³)	3,52 ± 0,50 ^a	4,23 ± 0,15 ^a	3,66 ± 0,90 ^a	4,63 ± 1,75 ^a	0.431
Bastonetes (%)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	
Segmentados (%)	15,50 ± 8,90 ^a	19,00 ± 4,35 ^a	16,80 ± 7,15 ^a	24,00 ± 13,74 ^a	0.627
Linfócitos (%)	82,25 ± 9,70 ^a	79,33 ± 3,21 ^a	81,60 ± 7,63 ^a	72,33 ± 14,84 ^a	0.532
Linfócitos atípicos (%)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	
Monócitos (%)	1,75 ± 1,50 ^a	1,66 ± 1,15 ^a	1,20 ± 0,44 ^a	2,33 ± 1,15 ^a	0.572
Eosinófilos (%)	0,50 ± 1,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,40 ± 0,50 ^a	1,33 ± 1,15 ^a	0.261
Basófilos (%)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey; $\alpha = 0,05$).

Fonte: Do autor (2022).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, após a análise estatística, foi verificada elevação nos níveis plasmáticos de ureia e da enzima hepática alanina aminotransferase (ALT) nos animais do grupo tratado com a maior concentração (T3), em relação aos animais do grupo controle. Os demais índices analisados apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade ($p < 0,05$), conforme listado na Tabela 4.

Tabela 4 - Quantidade de plaquetas (mil/mm³), ureia (mg/dL), creatinina (mg/dL), AST (U/L) e ALT (U/L) em ratos Wistar albinos após 21 dias de experimento.

Exames bioquímicos	Grupos				P-valor
	Controle	T1 (26µL/mL)	T2 (52µL/mL)	T3 (104µL/mL)	
Plaquetas (mil/mm ³)	923,50 ± 93,20 ^a	1049,00 ± 121,20 ^a	977,20 ± 177,90 ^a	972,30 ± 46,70 ^a	0.669
Ureia (mg/dL)	49,40 ± 5,32 ^a	55,80 ± 4,08 ^{a,b}	58,40 ± 7,20 ^{a,b}	59,80 ± 4,20 ^b	0.033
Creatinina (mg/dL)	0,30 ± 0,07 ^a	0,30 ± 0,00 ^a	0,30 ± 0,00 ^a	0,28 ± 0,04 ^a	0.835
AST (U/L)	150,40 ± 22,30 ^a	167,60 ± 32,00 ^a	168,40 ± 5,10 ^a	168,40 ± 5,10 ^a	0.205
ALT (U/L)	57,80 ± 10,30 ^a	56,40 ± 4,50 ^a	62,60 ± 16,20 ^{a,b}	83,20 ± 17,20 ^b	0.018

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey; $\alpha = 0,05$). (AST) Aspartato aminotransferase; (ALT) Alanina aminotransferase; (U/L) Unidade por litro.

Fonte: Do autor (2022).

3.3 Fígado

3.3.1 Avaliação Morfológica

- Grupo Controle (DMSO 5%)

No grupo controle, os resultados obtidos demonstraram que as características histológicas do órgão mantiveram-se preservadas (Figura 9A-B), uma vez que os hepatócitos apresentaram-se distribuídos em cordões regulares e com morfologia íntegra, ou seja, formato cúbico e citoplasma corado em rosa pela eosina, contendo um ou dois núcleos arredondados com cromatina dispersa e nucléolos íntegros, ambos corados em roxo pela hematoxilina. Em todos os indivíduos desse grupo foi possível notar uma pequena parcela de hepatócitos com núcleo irregular. O fígado está organizado em lóbulos com as áreas portais na periferia e veia central, contendo hepatócitos anastomosados que delimitam os capilares sinusoides. Foram observadas células de Kupffer entre os cordões hepáticos, com núcleo alongado com aspecto íntegro. Os espaços sinusoidais, artérias e veias hepáticas apresentaram aspecto normal e todos os indivíduos demonstraram pequeno grau de congestionamento dos vasos sanguíneos.

- Grupo Tratamento 1 (26 μ L/mL)

As amostras de fígado de ratos tratados com 26 μ L/mL de acetilcarvacrol mostraram algumas alterações em relação ao grupo controle (Figura 9C-D). Houve leve aumento no grau de congestionamento dos vasos sanguíneos em parte do tecido analisado de todos os indivíduos. Também foi observada leve dilatação do lúmen dos sinusoides em dois indivíduos. Em todos os indivíduos foi possível notar hepatócitos com núcleos irregulares em quantidades similares às aquelas observadas no grupo controle.

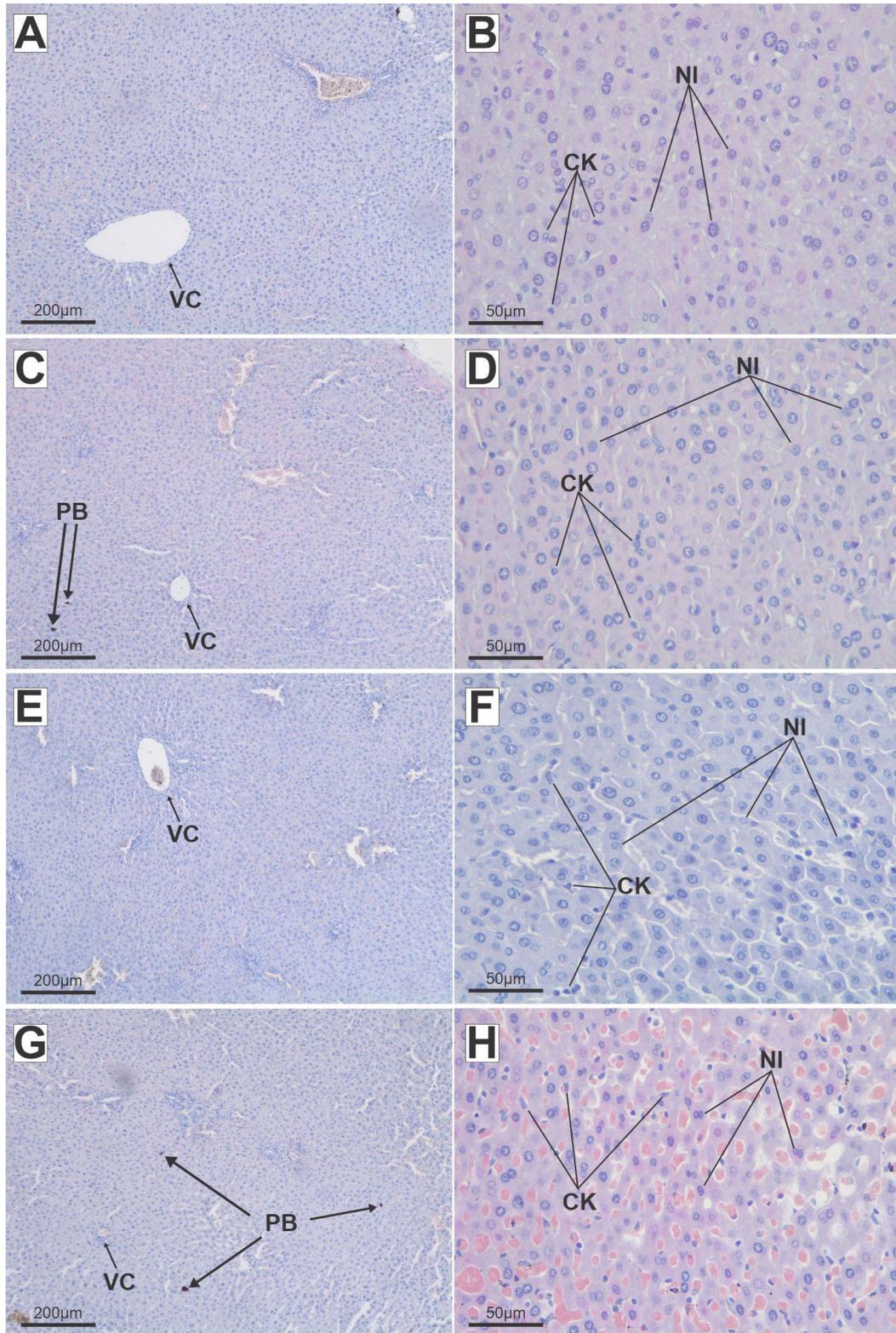
- Grupo Tratamento 2 (52 μ L/mL)

Nesse tratamento (Figura 9E-F), em uma pequena parte do tecido analisado foi observada dilatação dos sinusoides em quatro dos cinco animais tratados. Vasos sanguíneos congestionados em amostras correspondentes a todos os animais também foram visualizados em maior frequência quando comparados ao grupo controle; entretanto, não houve diferença em relação ao grupo T1. Foi notado leve aumento do espaço intersticial entre os hepatócitos em dois indivíduos desse grupo. Um indivíduo demonstrou aumento no número de células de Kupffer, o que ainda não havia sido observado no grupo controle e no grupo T1. Também foram observados hepatócitos com núcleos irregulares em todos os indivíduos, sem diferenças em relação ao grupo controle; no entanto, um indivíduo desse grupo demonstrou maior frequência dessa irregularidade.

- Grupo Tratamento 3 (104 μ L/mL)

Em todos os indivíduos, houve dilatação dos sinusoides em uma pequena parte do tecido analisado em comparação ao grupo controle (Figura 9G-H). Um indivíduo apresentou maior grau de dilatação dos sinusoides, correspondendo à metade do tecido analisado. O grau de congestionamento dos vasos sanguíneos apresentou-se de forma semelhante ao observado no grupo T2 e mais evidente do que aquele observado nos grupos controle e T1. Notou-se, em três indivíduos desse grupo, leve aumento do espaço intersticial entre os hepatócitos, sendo que em um deles esse aumento foi mais frequente (20% a 40%). Além disso, o aumento na quantidade de células de Kupffer foi notado em três indivíduos, sendo que em um deles esse aumento foi mais evidente. Assim como nos demais grupos, todos os indivíduos apresentaram núcleos dos hepatócitos irregulares.

Figura 9 - Fotomicrografias do fígado de ratos Wistar tratados com acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade dérmica com dose repetida, durante 21 dias, coradas com hematoxilina-eosina.



Legendas: (A-B) Grupo Controle; (C-D) Grupo Tratamento 1; (E-F) Grupo Tratamento 2; (G-H) Grupo Tratamento 3; (VC) Veia centrolobular; (PB) Pigmento biliar; (CK) Célula de Kupffer; (NI) Núcleo irregular.

Fonte: Do autor (2021).

3.3.2 Análise semiquantitativa

A partir das informações disponíveis na literatura, as principais alterações verificadas no fígado de ratos expostos a substâncias químicas e seus respectivos fatores de importância foram listadas na Tabela 5. As médias dos índices de cada alteração observada nos grupos dos ratos submetidos ao acetilcarvacrol (INDEXalt), bem como a média dos índices individuais (INDEXind) e seus respectivos desvios padrão estão apresentados na Tabela 6. A comparação estatística evidenciou diferença significativa entre o INDEXind do grupo controle e do grupo tratado com a maior concentração de acetilcarvacrol ($F_{(3,16)} = 4$; $p=0.019$). Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos com relação às alterações observadas (INDEXalt).

Tabela 5 - Principais alterações encontradas no fígado de ratos expostos a substâncias químicas e seus respectivos fatores de importância (w). (continua)

Alterações morfológicas	Fator de importância (w)	Referências
Desorganização dos cordões hepáticos	2	(SUNTRES <i>et al.</i> , 2015; BAKIR <i>et al.</i> , 2015; CUNHA <i>et al.</i> , 2017)
Aumento do espaço intersticial	2	CUNHA <i>et al.</i> , 2009; CUNHA <i>et al.</i> , 2017)
Núcleos dos hepatócitos irregulares	2	(BAKIR <i>et al.</i> , 2015; CUNHA <i>et al.</i> , 2017; HASSAN <i>et al.</i> , 2021)
Núcleos dos hepatócitos picnóticos	3	(BAKIR <i>et al.</i> , 2015; CUNHA <i>et al.</i> , 2017; HASSAN <i>et al.</i> , 2021)
Núcleos dos hepatócitos com marginação da cromatina	3	(CUNHA <i>et al.</i> , 2017)
Vacuolização citoplasmática nos hepatócitos	2	(BAKIR <i>et al.</i> , 2015; CUNHA <i>et al.</i> , 2017; KARTHEEK; DAVID, 2018; HASSAN <i>et al.</i> , 2021)
Granulação citoplasmática nos hepatócitos	1	(CUNHA <i>et al.</i> , 2017)
Necrose dos hepatócitos	3	(CUNHA <i>et al.</i> , 2009; BAKIR <i>et al.</i> , 2015; KARTHEEK; DAVID, 2018; MOHSENI <i>et al.</i> , 2019)
Apoptose dos hepatócitos	3	(CUNHA <i>et al.</i> , 2017)
Hipertrofia dos hepatócitos	1	(ENGELMAN <i>et al.</i> , 2001; CUNHA <i>et al.</i> , 2017; KARTHEEK; DAVID, 2018)
Hiperplasia dos hepatócitos	2	(BAKIR <i>et al.</i> , 2015; CUNHA <i>et al.</i> , 2017; MOHSENI <i>et al.</i> , 2019; ANDRE <i>et al.</i> , 2020)
Aumento do número de células de Kupffer	1	(BAKIR <i>et al.</i> , 2015; CUNHA <i>et al.</i> , 2017; MOHSENI <i>et al.</i> , 2019; ANDRE <i>et al.</i> , 2020)

Vasos sanguíneos congestionados	1	(CUNHA <i>et al.</i> , 2017; KARTHEEK; DAVID, 2018; MOHSENI <i>et al.</i> , 2019; ANDRE <i>et al.</i> , 2020)
Fibrose nas veias portais	3	(CUNHA <i>et al.</i> , 2009; BAKIR <i>et al.</i> , 2015; MOHSENI <i>et al.</i> , 2019)
Células apresentando mitose atípica	3	(LLANA-RUIZ-CABELLO <i>et al.</i> , 2016)
Dilatação dos sinusóides	2	(CUNHA <i>et al.</i> , 2009; BAKIR <i>et al.</i> , 2015; KARTHEEK; DAVID, 2018; MOHSENI <i>et al.</i> , 2019)

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 6 - Média \pm desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) e dos índices individuais (INDEXind) observados no fígado de ratos submetidos ao teste de toxicidade dérmica do acetilcarvacrol com dose repetida. (continua)

Alteração morfológica	(w)	Controle	T1 (26 μ L/mL)	T2 (52 μ L/mL)	T3 (104 μ L/mL)
Aumento do espaço intersticial	2	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,80 \pm 1,09 ^a	1,60 \pm 1,67 ^a
Núcleos dos hepatócitos irregulares	2	2,00 \pm 0,00 ^a	2,00 \pm 0,00 ^a	2,40 \pm 0,89 ^a	2,80 \pm 1,09 ^a
Aumento do número de células de Kupffer	1	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,20 \pm 0,54 ^a	0,80 \pm 0,83 ^a
Vasos sanguíneos congestionados	1	1,40 \pm 0,54 ^a	2,40 \pm 0,54 ^a	2,00 \pm 0,70 ^a	1,80 \pm 0,83 ^a
Dilatação dos sinusóides	2	0,00 \pm 0,00 ^a	0,80 \pm 1,09 ^a	1,60 \pm 0,89 ^a	2,40 \pm 2,19 ^a
INDEXind		3,40 \pm 0,54 ^a	5,20 \pm 1,30 ^{a,b}	7,00 \pm 1,41 ^{a,b}	9,80 \pm 5,44 ^{b,c}

Fonte: Do autor (2022).

3.3.3 Avaliação Morfométrica

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação aos seguintes parâmetros: área do núcleo ($F_{(3,16)} = 1,100$; $p = 0,378$) e do hepatócito ($F_{(3,16)} = 0,519$; $p = 0,675$), razão área do núcleo/área do hepatócito ($F_{(3,16)} = 0,006$; $p = 0,999$), densidade de hepatócitos no tecido ($F_{(3,16)} = 0,285$; $p = 0,836$), e porcentagem do tecido ocupada por sinusoides hepáticos ($F_{(3,16)} = 0,341$; $p = 0,796$), conforme dados discriminados na Tabela 7 e observados no Gráfico 2. Entretanto, houve aumento significativo na porcentagem de núcleos alterados de hepatócitos, entre os grupos T1 e T3 ($F_{(3,16)} = 6,033$; $p = 0,019$) e T2 e T3 ($F_{(3,16)} = 6,033$; $p = 0,006$).

Tabela 7 - Medidas da área do núcleo (μm^2) e do hepatócito (μm^2), razão entre as áreas do núcleo e do hepatócito, porcentagem de núcleos de hepatócitos alterados (%), porcentagem de sinusoides presentes no tecido (%) e densidade de hepatócitos ($\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2$) em ratos submetidos ao teste de toxicidade dérmica com dose repetida de acetilcarvacrol.

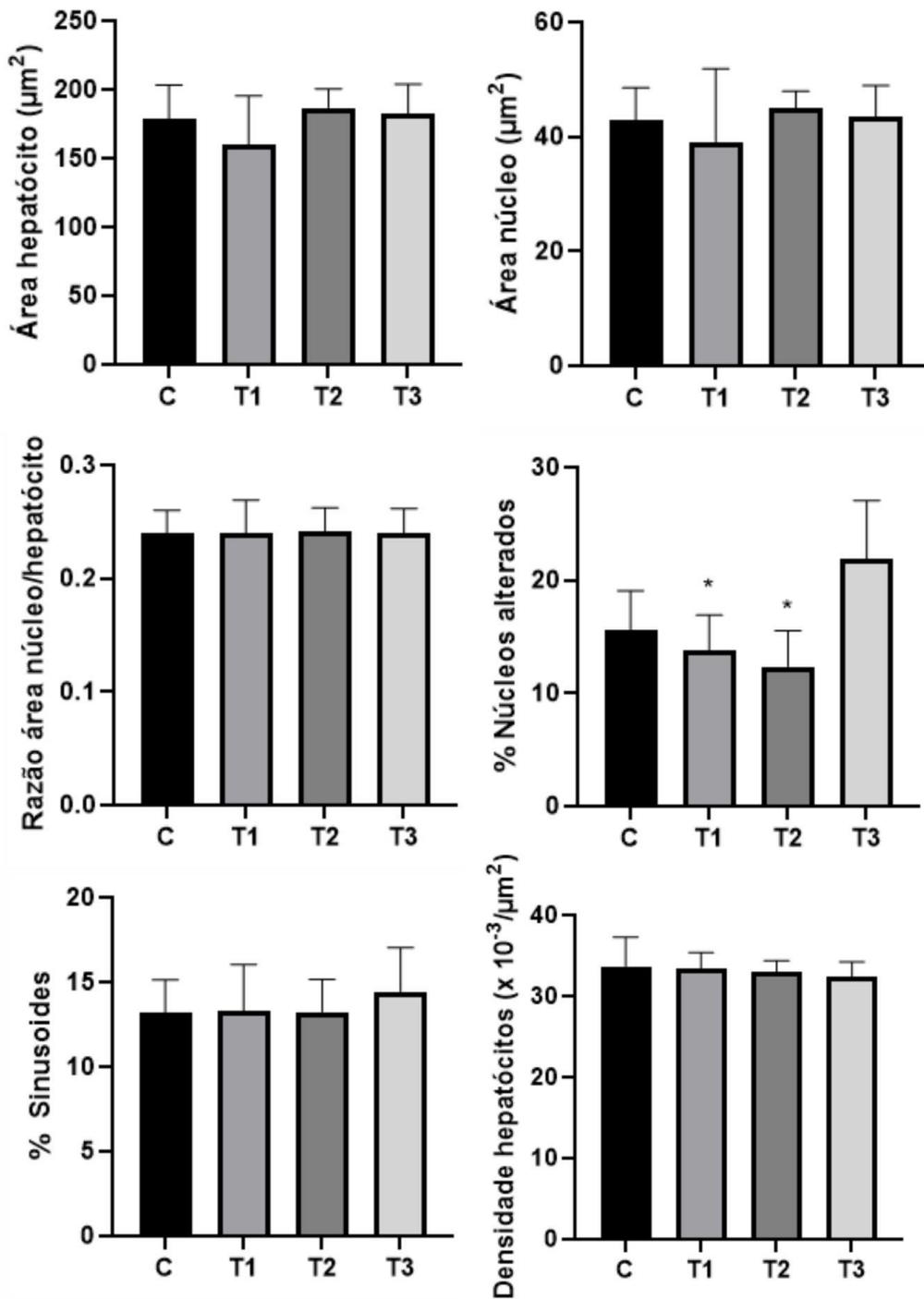
Parâmetro	Grupo			
	Controle	T1	T2	T3
Área do núcleo	42.76 \pm 5.77 ^a	39.14 \pm 12.75 ^a	44.91 \pm 3.00 ^a	43.54 \pm 5.37 ^a
Área do hepatócito	179.04 \pm 24.23 ^a	159.94 \pm 35.33 ^a	186.68 \pm 13.82 ^a	181.97 \pm 21.91 ^a
Razão núcleo/hepatócito	0.24 \pm 0.02 ^a	0.24 \pm 0.03 ^a	0.24 \pm 0.02 ^a	0.24 \pm 0.02 ^a
% Núcleos alterados	15.64 \pm 3.43 ^{a,b}	13.80 \pm 3.12 ^a	12.36 \pm 3.17 ^a	21.88 \pm 5.18 ^b
% Sinusoides	13.16 \pm 1.96 ^a	13.26 \pm 2.78 ^a	13.24 \pm 1.93 ^a	14.44 \pm 2.58 ^a
Densidade hepatócitos	33.67 \pm 3.61 ^a	33.33 \pm 2.04 ^a	33.00 \pm 1.39 ^a	32.33 \pm 1.90 ^a

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (ANOVA one-way seguida de teste *post-hoc* de Tukey; $\alpha = 0,05$).

Fonte: Do autor (2022).

Gráfico 2 - Área do núcleo e do hepatócito (μm^2), razão entre as áreas do núcleo e do hepatócito, porcentagem de núcleos alterados e de sinusoides no tecido (%) e densidade de hepatócitos (\times

$10^{-3}/\mu\text{m}^2$) em ratos submetidos ao teste de toxicidade dérmica com dose repetida de acetilcarvacrol.



Legenda: (*) estatisticamente diferente em relação ao grupo T3.

Fonte: Do autor (2022).

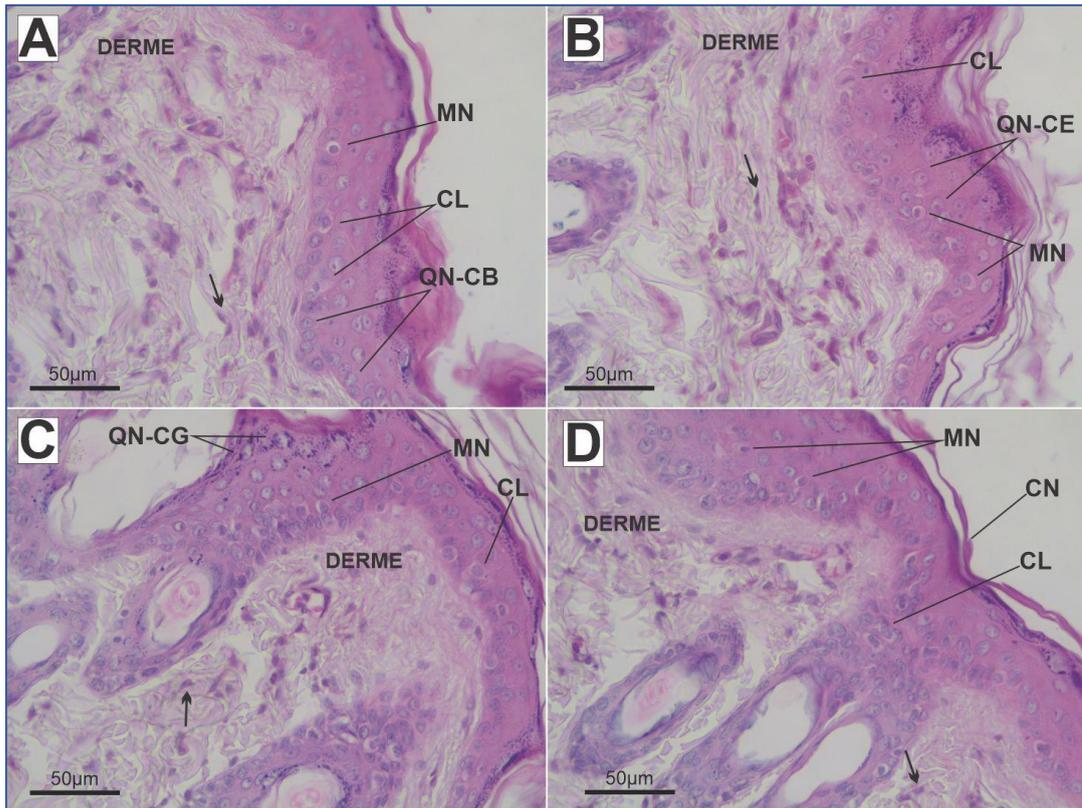
3.4 Pele

3.4.1 Avaliação Morfológica

- Grupo Controle (DMSO 5%)

No grupo controle (Figura 10A-D), os animais apresentaram pele com aspecto normal, dividida em duas camadas, a epiderme e a derme. Na epiderme, a camada mais externa da pele, foram observados: os queratinócitos, com diferentes características morfológicas conforme a camada; os melanócitos, que apresentaram citoplasma claro, núcleo pequeno e arredondado, fortemente corado com hematoxilina; e as células de Langerhans, com citoplasma claro e núcleo azul-arroxeadado com contorno irregular. Nela foram identificadas quatro camadas: a camada germinativa (estrato basal), mais profunda, repousa sobre a membrana basal, sendo considerada o ponto de separação dermo-epidérmico em que são observados queratinócitos dispostos em uma única fileira, com forma cúbica ou cilíndrica e núcleo grande e oval; a camada espinhosa apresentou queratinócitos cuboides ou ligeiramente achatados, ligados entre si por pontes intracelulares; na camada granulosa foram observadas uma a várias camadas de queratinócitos achatados, com núcleo central e carregados de grânulos basófilos de querato-hialina; e por fim, a camada córnea demonstrou espessura variável, sendo constituída por células mortas, queratinizadas e anucleadas - os corneócitos, com citoplasma repleto de queratina e fortemente corado com a hematoxilina. A derme subjacente, constituída principalmente de tecido conjuntivo colagenoso em meio a uma substância fundamental amorfa, apresentou superfície irregular com saliências que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme (papilas dérmicas), podendo ser dividida em derme papilar (mais externa, adjacente à epiderme) e reticular (mais interna). A derme papilar, mais delgada, apresentou evidente vascularização, sendo formada por feixes delicados de fibras colágenas e elásticas. A derme reticular, por sua vez, mostrou-se constituída de fibras colágenas entrelaçadas. Foram observadas na derme vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos (células grandes, com muitos prolongamentos, contendo um núcleo oval hiperconrado com hematoxilina e citoplasma fracamente corado em rosa), alguns folículos pilosos em seção transversal, além de glândulas sebáceas e sudoríparas (Figura 14-A).

Figura 10 - Fotomicrografias da pele de ratos Wistar tratados com acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade dérmica com dose repetida, durante 21 dias, coradas com hematoxilina-eosina (Grupo Controle).



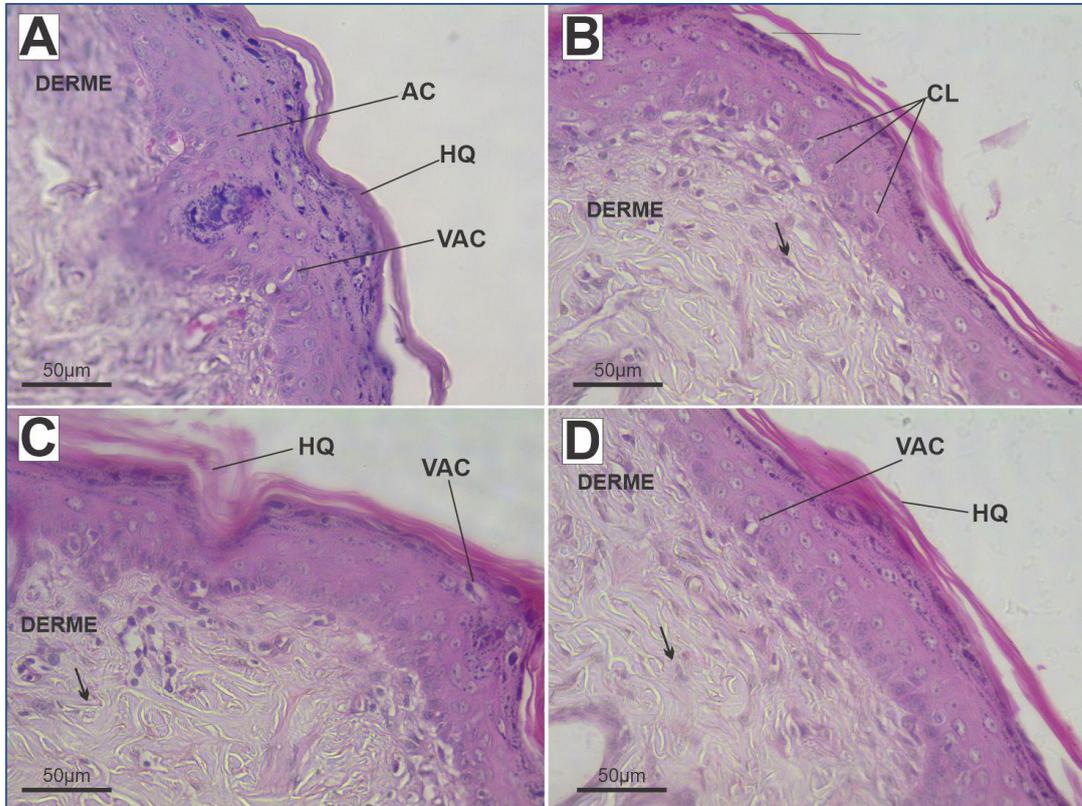
Legendas: (QN-CB) Queratinócitos da camada Basal; (CL) Células de Langerhans; (MN) Melanócitos; (QN-CE) Queratinócitos camada Espinhosa; (QN-CG) Queratinócitos camada Granulosa; (CN) Corneócitos; (Setas) Fibroblastos.

Fonte: Do autor (2021).

- Grupo Tratamento 1 (26µL/mL)

Nas amostras pertencentes aos animais deste grupo (Figura 11A-D), as alterações observadas foram: vacuolização citoplasmática nos queratinócitos nas camadas basal e espinhosa, observada pela presença de área clara no citoplasma dessas células; espessamento da epiderme por aumento das células da camada espinhosa (acantose); espessamento da camada granulosa, com aumento da quantidade de células com grânulos de queratohialina, observados pela coloração roxa mais intensa nos citoplasmas dos queratinócitos (hiperqueratose); e provável aumento na quantidade de células de Langerhans e da espessura do estrato córneo em parte do tecido analisado de todos os indivíduos pertencentes a este grupo. Leve infiltrado inflamatório crônico próximo a vasos e anexos na derme e hipertrofia das glândulas sebáceas também foram observados. Sugere-se aumento na quantidade de folículos pilosos transversais visualizados em três animais (Figura 14-B). Em dois animais observou-se a diminuição dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas.

Figura 11 - Fotomicrografias da pele de ratos Wistar tratados com solução de 26 μ L/mL de acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade dérmica com dose repetida, durante 21 dias, coradas com hematoxilina-eosina (Grupo Tratamento 1).



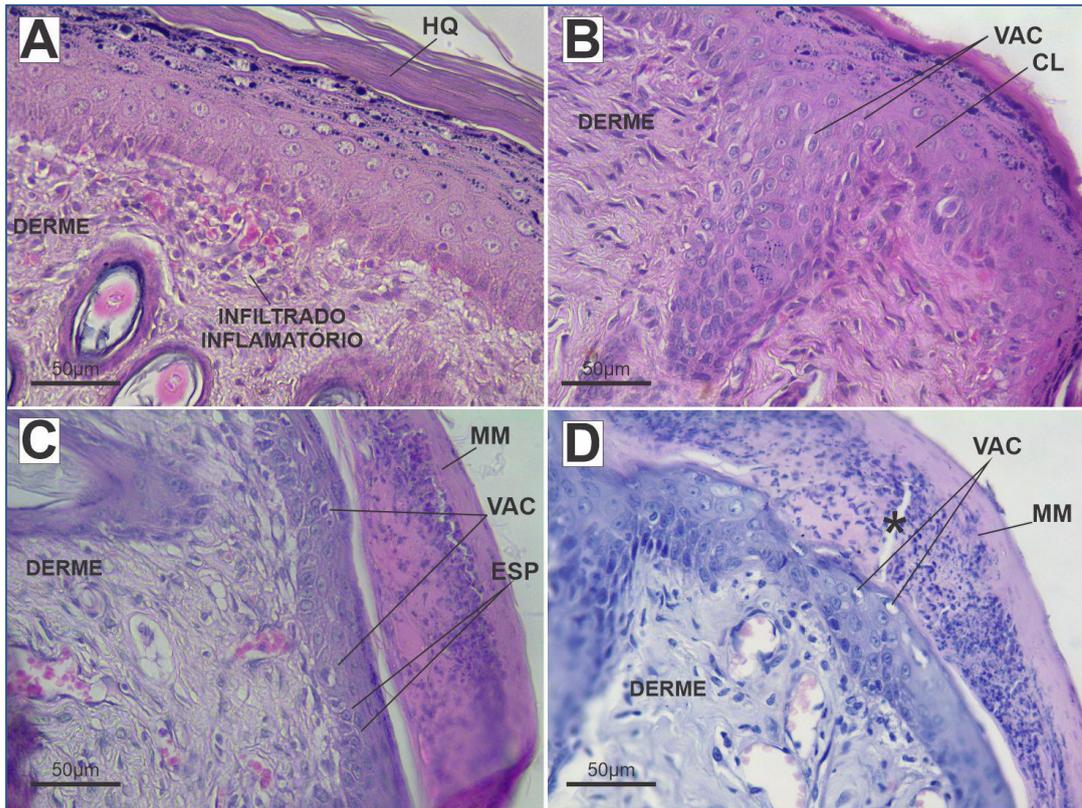
Legendas: (AC) Acanthose; (HQ) Hiperqueratose; (VAC) Vacuolização citoplasmática em queratinócitos; (CL) Células de Langerhans; (Setas) Fibroblastos.

Fonte: Do autor (2021).

- Grupo Tratamento 2 (52 μ L/mL)

Neste tratamento (Figura 12A-D), além das alterações observadas nas amostras do grupo T1, constatou-se hiperplasia da epiderme mais evidente, alargamento acentuado da camada córnea, que apresentou acúmulos de neutrófilos degenerados (microabscessos de Munro), visualizados como pontos azul-arroxeados no estrato córneo. Também foi detectada, em todos os animais deste grupo, a ocorrência de espongiose na camada espinhosa, notada como fendas claras entre os queratinócitos. Na derme, próximo à camada basal da epiderme, nota-se infiltrado inflamatório crônico. Também foi observada a proliferação de vasos sanguíneos na derme, especialmente nas regiões em que foi observada inflamação.

Figura 12 - Fotomicrografias da pele de ratos Wistar tratados com solução de 52 μ L/mL de acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade dérmica com dose repetida, durante 21 dias, coradas com hematoxilina-eosina (Grupo Tratamento 2).



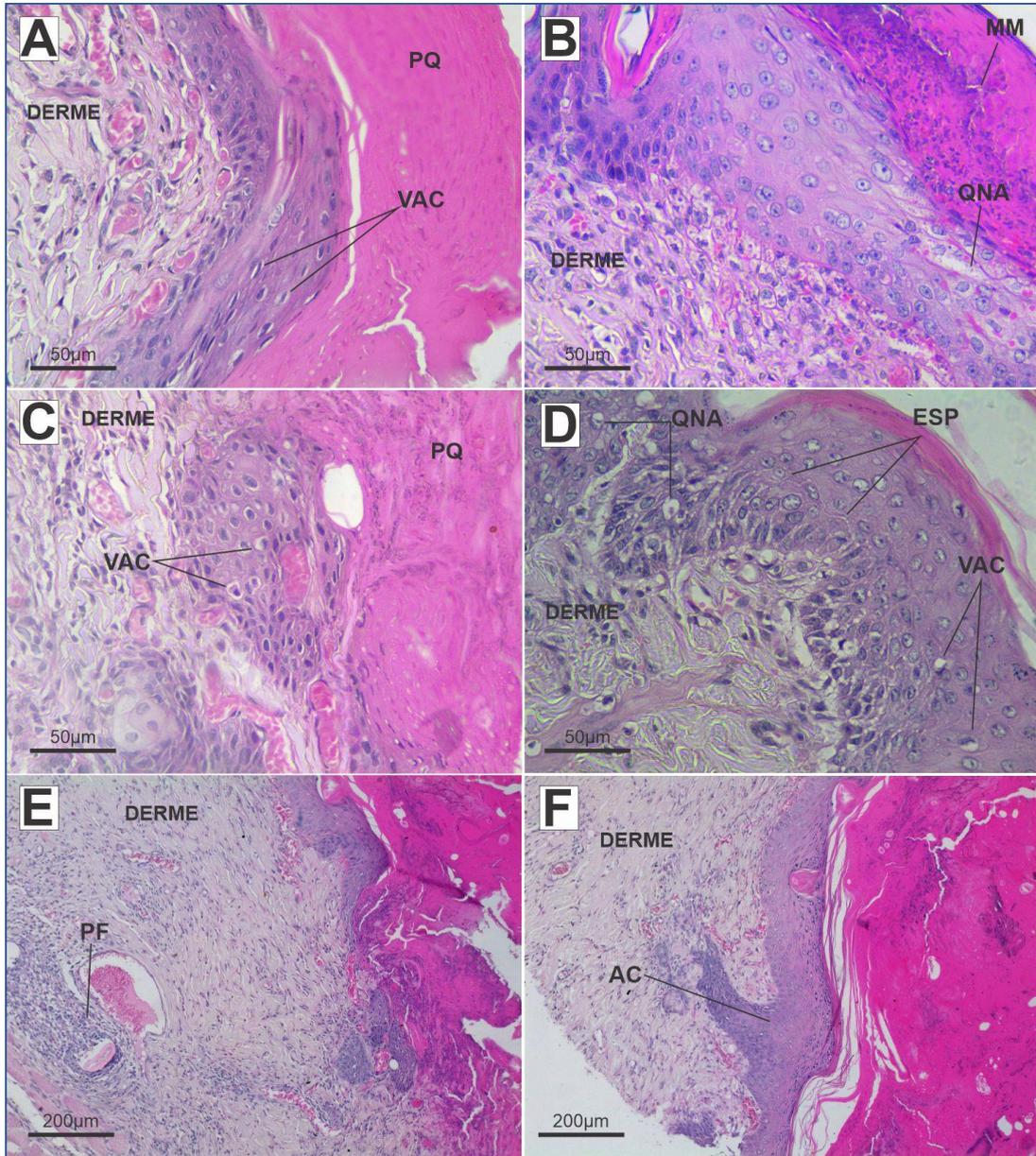
Legendas: (HQ) Hiperqueratose; (VAC) Vacuolização citoplasmática em queratinócitos; (CL) Células de Langerhans; (MM) Microabscessos de Munro; (ESP) Espongiose; (*) Artefato.

Fonte: Do autor (2021).

- Grupo Tratamento 3 (104 µL/mL)

Foram constatadas todas as alterações observadas nos grupos T1 e T2 de forma mais evidente e em todos os animais pertencentes a este grupo (Figura 13A-F). Além disso, foram identificadas áreas de paraqueratose, ou seja, alteração do processo de queratinização normal com a presença de núcleos na camada córnea e diminuição ou desaparecimento da camada granulosa em três animais. Nesses mesmos animais, observou-se o obscurecimento da junção derme-epiderme pelo acentuado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e vacuolização citoplasmática dos queratinócitos do estrato basal, causando a desorganização dessa camada. Notou-se úlcera epidérmica em pequena extensão e em apenas dois animais deste grupo. Houve a intensificação da resposta inflamatória na derme, que apresentou infiltrado inflamatório circundando folículos pilosos (perifoliculite) em três animais. Verificou-se diminuição de folículos pilosos e das glândulas sebáceas em um animal deste grupo.

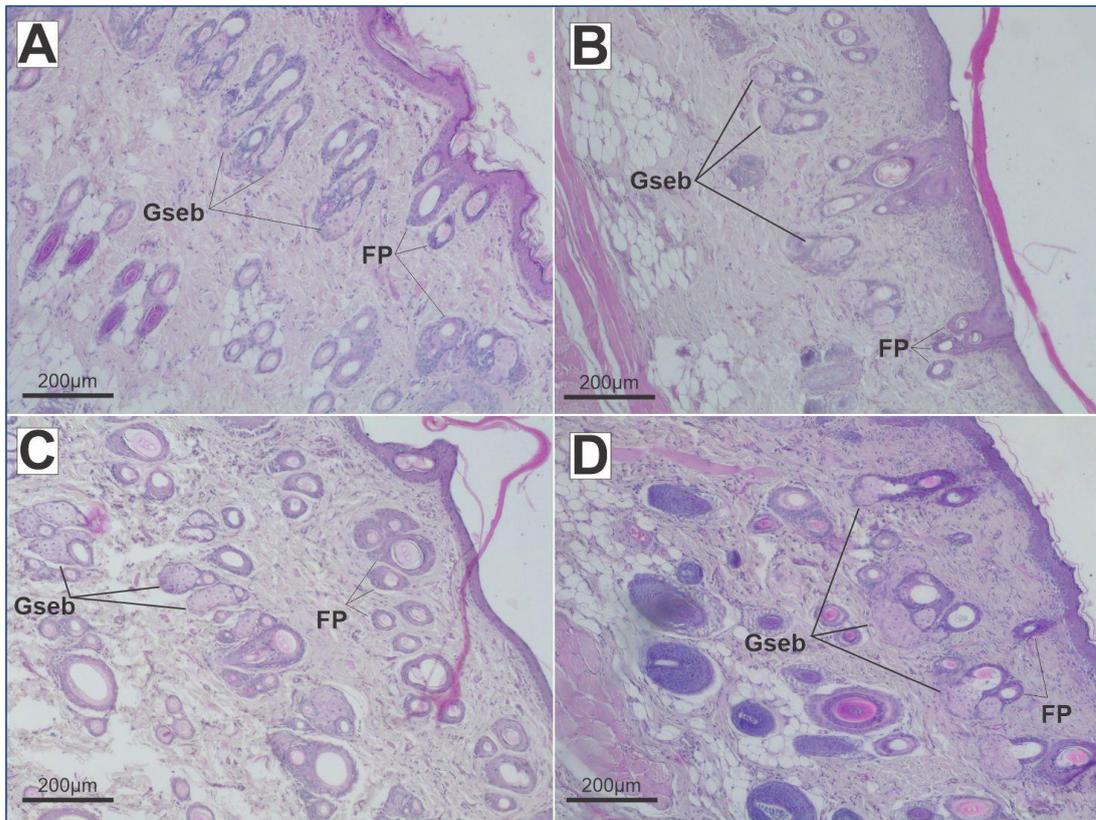
Figura 13 - Fotomicrografias da pele de ratos Wistar tratados com solução de 104 μ L/mL de acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade dérmica com dose repetida, durante 21 dias, coradas com hematoxilina-eosina (Grupo Tratamento 3).



Legendas: (PQ) Paraqueratose; (MM) Microabscessos de Munro; (QNA) Queratinócitos acantolíticos (VAC) Vacuolização citoplasmática em queratinócitos; (ESP) Espongiose; (PF) Perifoliculite; (AC) Acantose.

Fonte: Do autor (2021).

Figura 14 - Fotomicrografias da pele de ratos Wistar tratados com acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade dérmica com dose repetida, durante 21 dias, coradas com hematoxilina-eosina.



Legendas: (A) Grupo Controle; (B) Grupo Tratamento 1; (C) Grupo Tratamento 2; (D) Grupo Tratamento 3; (Gseb) Glândulas Sebáceas; (FP) Folículo Piloso.

Fonte: Do autor (2021).

3.4.2 Análise semiquantitativa

As principais alterações observadas na pele de ratos expostos a substâncias químicas por via tópica e seus respectivos fatores de importância estão listados na Tabela 8. Os índices de cada alteração observada nos ratos submetidos ao acetilcarvacrol (INDEXalt), bem como as médias dos índices individuais (INDEXind) e seus respectivos desvio padrão para cada grupo estão apresentados na Tabela 9. A análise estatística demonstrou diferença entre os grupos controle e todos os grupos de tratamento em relação ao INDEXind ($F_{(3,16)} = 26,80$; $p < 0,0001$). As alterações foram mais evidentes nos grupos T2 e T3, que demonstraram os maiores índices. A gravidade das lesões foi mais significativa e em maior extensão no grupo que recebeu a maior concentração da substância (T3). Todos os animais do grupo controle apresentaram o tecido íntegro, dentro dos padrões de normalidade. Hiperplasia epidérmica ($F_{(3,16)} = 104,3$; $p < 0,0001$), vacuolização citoplasmática ($F_{(3,16)} = 10,82$; $p = 0,0004$), hiperqueratose ($F_{(3,16)} = 26,67$;

$p < 0,0001$), hiperplasia das glândulas sebáceas ($F_{(3,16)} = 8,182$; $p = 0,0016$), maior número no perfil de folículos pilosos transversais ($F_{(3,16)} = 4,288$; $p = 0,0212$) e infiltrado de células inflamatórias na derme ($F_{(3,16)} = 1,867$; $p = 0,1759$) foram observados em todos os animais pertencentes aos grupos de tratamento (T1, T2 e T3). Microabscessos de Munro ($F_{(3,16)} = 77,87$; $p < 0,0001$), espongiose ($F_{(3,16)} = 75,11$; $p < 0,0001$), inflamação crônica na epiderme ($F_{(3,16)} = 2,462$; $p = 0,1000$) e degradação da camada epidérmica ($F_{(3,16)} = 1,467$; $p = 0,2611$) foram constatados em animais pertencentes aos grupos T2 e T3. Diminuição no número de folículos pilosos e glândulas sebáceas ($F_{(3,16)} = 0,9231$; $p = 0,4521$) foi notada em uma pequena extensão nos grupos T1 e T3. Nos animais tratados com a maior concentração da substância (T3), foram observadas úlceras epidérmicas ($F_{(3,16)} = 2,667$; $p = 0,0829$), paraqueratose ($F_{(3,16)} = 6,000$; $p = 0,0061$), perifoliculite ($F_{(3,16)} = 6,000$; $p = 0,0061$) e dermatite ulcerativa ($F_{(3,16)} = 1,000$; $p = 0,4182$).

Tabela 8 - Principais alterações encontradas na pele de ratos submetidos à exposição tópica de substâncias químicas e seus respectivos fatores de importância (w). (continua)

Alterações morfológicas	Fator de importância (w)	Referências
Hiperplasia epidérmica	2	(CHHABRA <i>et al.</i> , 1990; SHARMA; LOCKE, 2010; SURH <i>et al.</i> , 2012, BEHL <i>et al.</i> , 2012; CATLIN <i>et al.</i> , 2016)
Vacuolização citoplasmática nas células epidérmicas	2	(PAPPINEN <i>et al.</i> , 2005; WINNICKA <i>et al.</i> , 2015)
Úlceras epidérmicas	3	(CHHABRA <i>et al.</i> , 1990; CATLIN <i>et al.</i> , 2016)
Inflamação crônica na epiderme (neutrófilos e macrófagos)	2	(SURH <i>et al.</i> , 2012; CATLIN <i>et al.</i> , 2016)
Hiperqueratose	2	(CHHABRA <i>et al.</i> , 1990; BEHL <i>et al.</i> , 2012, CHANDRA <i>et al.</i> , 2013; RYU <i>et al.</i> , 2014; CATLIN <i>et al.</i> , 2016)
Queratinócitos degenerados e necróticos	3	(WINNICKA <i>et al.</i> , 2015; HAN <i>et al.</i> , 2019)
Degradação da camada epidérmica	2	(PAPPINEN <i>et al.</i> , 2005; SHARMA; LOCKE, 2010; SURH <i>et al.</i> , 2012; HAN <i>et al.</i> , 2019)
Hiperplasia dos folículos pilosos – espessamento do epitélio folicular	2	(SURH <i>et al.</i> , 2012; CATLIN <i>et al.</i> , 2016)
Hiperplasia das glândulas sebáceas	2	(CHHABRA <i>et al.</i> , 1990, SURH <i>et al.</i> , 2012; CATLIN <i>et al.</i> , 2016)

Fibrose Dérmica - aumento da quantidade de tecido conjuntivo colagenoso ou fibroso na derme	2	(WINNICKA <i>et al.</i> , 2015; CATLIN <i>et al.</i> , 2016)
Diminuição no número de folículos pilosos e glândulas sebáceas	2	(CHANDRA <i>et al.</i> , 2013)
Maior número de perfis de folículos pilosos transversais	1	(CATLIN <i>et al.</i> , 2016)
Infiltrado de células inflamatórias na derme	2	(CHANDRA <i>et al.</i> , 2013; TEWARI-SINGH <i>et al.</i> , 2014; WINNICKA <i>et al.</i> , 2015; CATLIN <i>et al.</i> , 2016)
Fibroblastos degenerativos e necróticos na derme	3	(HAN <i>et al.</i> , 2019)
Dermatite ulcerativa	3	(TEWARI-SINGH <i>et al.</i> , 2014; HAN <i>et al.</i> , 2019)
Microabscesso de Munro	2	(KARAMANI <i>et al.</i> , 2021)
Paraqueratose	3	(CHHABRA <i>et al.</i> , 1990; ADASHI <i>et al.</i> , 2013; TEWARI-SINGH <i>et al.</i> , 2014; TETZLAFF <i>et al.</i> , 2017; KARAMANI <i>et al.</i> , 2021)
Espongiose	2	(ADASHI <i>et al.</i> , 2013; TETZLAFF <i>et al.</i> , 2017)
Perifoliculite	3	(ADASHI <i>et al.</i> , 2013)

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 9 - Média \pm desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) e dos índices individuais (INDEXind) observados na pele de ratos submetidos ao teste de toxicidade dérmica do acetilcarvacrol com dose repetida. (continua)

Alteração morfológica	(w)	Controle	T1	T2	T3
Hiperplasia epidérmica	2	0,00 \pm 0,00 ^a	6,00 \pm 0,00 ^b	8,00 \pm 1,41 ^{b,c}	9,20 \pm 1,09 ^c
Vacuolização citoplasmática nas células epidérmicas	2	0,00 \pm 0,00 ^a	3,20 \pm 1,09 ^b	3,20 \pm 1,09 ^b	3,60 \pm 1,67 ^b
Úlceras epidérmicas	3	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	2,40 \pm 3,28 ^a
Inflamação crônica na epiderme	2	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	2,40 \pm 2,19 ^a	2,40 \pm 3,28 ^a
Hiperqueratose	2	0,00 \pm 0,00 ^a	1,60 \pm 2,19 ^a	4,40 \pm 0,89 ^b	6,80 \pm 1,09 ^c
Degradação da camada epidérmica	2	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,80 \pm 1,78 ^a	1,60 \pm 2,19 ^a
Hiperplasia das glândulas sebáceas	2	0,00 \pm 0,00 ^a	6,00 \pm 0,00 ^b	6,00 \pm 0,00 ^b	6,00 \pm 0,00 ^b

Diminuição no número de folículos pilosos e glândulas sebáceas	2	0,00 ± 0,00 ^a	1,20 ± 1,78 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	1,20 ± 2,68 ^a
Maior número de perfis de folículos pilosos transversais	1	0 ± 0,00 ^a	1,20 ± 1,30 ^{a,b}	2,20 ± 1,30 ^b	2,20 ± 1,30 ^b
Infiltrado de células inflamatórias na derme	2	0,00 ± 0,00 ^a	1,20 ± 1,78 ^a	2,00 ± 2,00 ^a	2,40 ± 2,19 ^a
Dermatite ulcerativa	3	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	1,20 ± 2,68 ^a
Microabscesso de Munro	2	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	5,20 ± 1,09 ^b	4,40 ± 0,89 ^b
Paraqueratose	3	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	5,40 ± 4,92 ^b
Espongiose	2	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	5,20 ± 1,09 ^b	5,20 ± 1,09 ^b
Perifoliculite	3	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	3,60 ± 3,28 ^b
Índice individual		0,00 ± 0,00 ^a	20,40 ± 4,39 ^b	39,40 ± 6,50 ^{b,c}	57,20 ± 20,41 ^c

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (ANOVA one-way seguida de teste *post-hoc* de Tukey; $\alpha = 0,05$).

Fonte: Do autor (2022).

3.4.3 Avaliação morfométrica

A análise morfométrica não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nas medidas referentes à porcentagem de fibras colágenas na derme ($F_{(3,16)} = 0.381$; $p = 0.768$). As análises demonstraram aumento da espessura da epiderme nos animais tratados em comparação aos animais do grupo controle ($F_{(3,16)} = 15.49$), sendo esse aumento mais evidente nos grupos T2 ($p = 0,014$) e T3 ($p = 0,011$). Em relação à densidade de células epidérmicas foi observado aumento significativo nos animais pertencentes aos grupos T2 ($F_{(3,16)} = 5,472$; $p = 0,045$) e T3 ($F_{(3,16)} = 5,472$; $p = 0.008$), em relação ao controle. Também houve aumento significativo no número de células da derme papilar nos animais tratados com as concentrações mais elevadas de acetilcarvacrol, T2 ($F_{(3,16)} = 8,011$; $p = 0,003$) e T3 ($F_{(3,16)} = 8,011$; $p = 0,003$). Os dados estatísticos podem ser observados na Tabela 10 e no Gráfico 3.

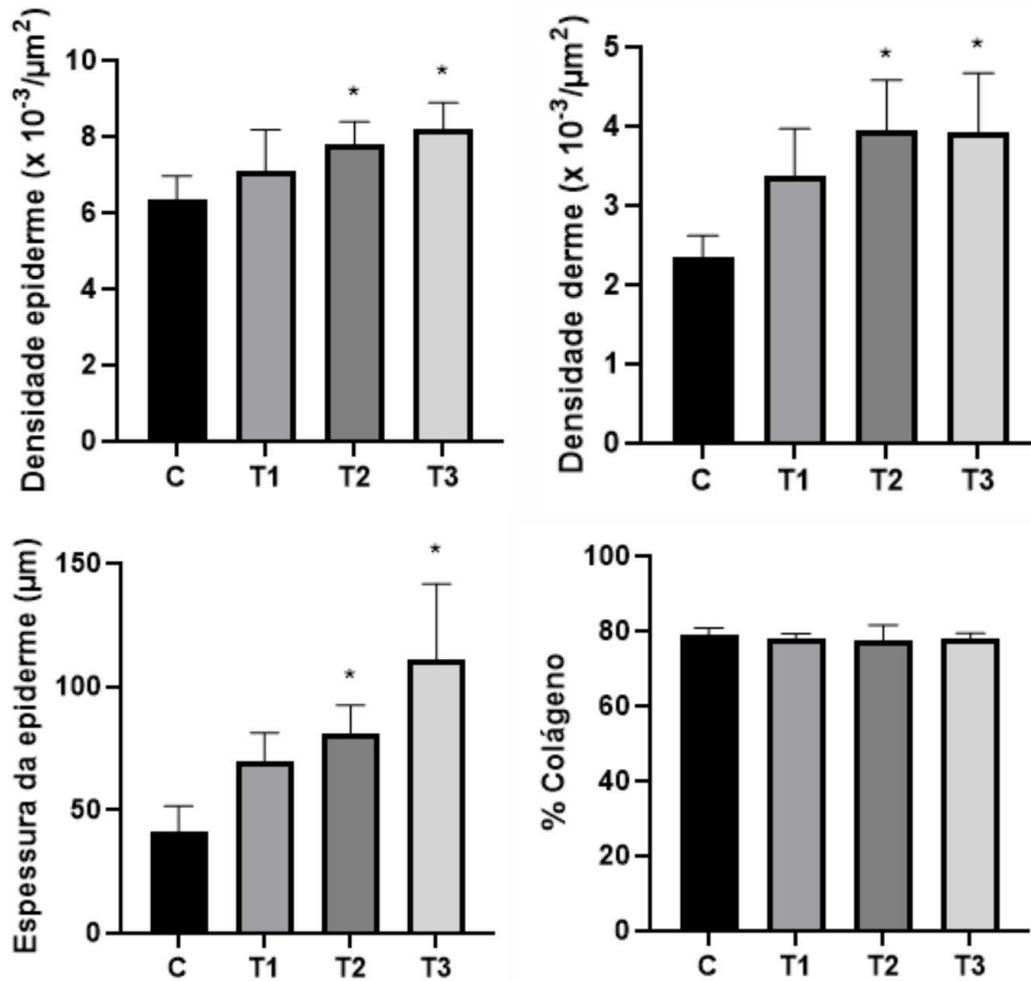
Tabela 10 - Medidas da densidade de células epiteliais ($\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2$) e dérmicas ($\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2$), espessura da epiderme (μm) e porcentagem de colágeno na derme (%) em ratos submetidos ao teste e toxicidade dérmica com dose repetida de acetilcarvacrol.

Parâmetro	Grupo			
	Controle	T1	T2	T3
Densidade (células epidérmicas)	6.35 ± 0.61 ^a	7.10 ± 1.08 ^{a,b}	7.78 ± 0.61 ^b	8.20 ± 0.69 ^b
Densidade (células dérmicas)	2.36 ± 0.26 ^a	3.38 ± 0.59 ^{a,b}	3.95 ± 0.63 ^b	3.92 ± 0.75 ^b
Espessura da epiderme	41.09 ± 10.41 ^a	69.99 ± 11.33 ^{a,b}	81.20 ± 11.27 ^{b,c}	111.18 ± 30.57 ^c
% Colágeno (derme)	79.10 ± 1.73 ^a	78.00 ± 1.31 ^a	77.60 ± 3.93 ^a	77.94 ± 1.44 ^a

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si (ANOVA one-way seguida de teste *post-hoc* de Tukey; $\alpha = 0,05$).

Fonte: Do autor (2022).

Gráfico 3 - Densidade de células epidérmicas ($\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2$) e dérmicas ($\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2$), espessura da epiderme (μm) e porcentagem de colágeno na derme (%) em ratos submetidos ao teste de toxicidade dérmica com dose repetida de acetilcarvacrol.



Legenda: (*) estatisticamente diferente em relação ao grupo controle.

Fonte: Do autor (2022).

4 DISCUSSÃO

Embora a ação acaricida e os efeitos morfológicos provocados pelo acetilcarvacrol, composto derivado do carvacrol, já tenham sido demonstrados em diferentes órgãos de carrapatos (RAMÍREZ *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2020b; KONIG *et al.*, 2019b; KONIG *et al.*, 2020), ainda existem lacunas relativas às respostas dos hospedeiros e de organismos não alvos quando expostos a este produto, de forma a se conhecer suas possíveis vias de administração e mecanismos de ação. Estas informações são imprescindíveis para se confirmar se esse composto pode ser indicado e utilizado no controle destes ectoparasitos.

Os resultados aqui obtidos revelaram que a aplicação dérmica com dose repetida de acetilcarvacrol em ratos por 21 dias em diferentes concentrações não provocou mortalidade. No entanto, todos os animais dos grupos de tratamento manifestaram sinais clínicos evidentes de dermatite de contato irritativa cumulativa, ou seja, prurido, irritação dérmica local, dor ao toque, eritema e edema, embora não tenham sido observados indícios de perda de peso e desidratação. Dermatites provocadas pelo contato com cosméticos que apresentam extratos de plantas ou substâncias isoladas de fonte vegetal na sua formulação são muito comuns (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2005). Estudos recentes demonstraram que a aplicação tópica do carvacrol induz coceira, hiperplasia e inflamação na pele, assemelhando-se às manifestações clínicas da dermatite atópica (QU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2021). No presente estudo, a acetilação do carvacrol foi proposta na tentativa de se obter um produto com maior estabilidade e menor toxicidade.

Agentes tóxicos podem afetar órgãos como o fígado, rim, coração, entre outros, prejudicando suas funções fisiológicas. Os efeitos dos danos celulares ocorridos nos órgãos podem ser detectados antes mesmo da ocorrência de danos estruturais, por meio de exames bioquímicos (TESHOME *et al.*, 2008). Neste estudo, verificou-se elevação estatisticamente significativa nos níveis plasmáticos de ureia nos animais do grupo tratado com a maior concentração de acetilcarvacrol. A ureia é utilizada como um dos indicadores de problemas renais por ser mais sensível às alterações primárias nos rins (RAMOS; MARINI, 2014). A elevação desse biomarcador indica a ocorrência de possível comprometimento da função renal e da filtração glomerular (SCHOSSLER *et al.*, 2001; POTTER; PERRY, 2005; MELLO *et al.*, 2021).

Também foi detectado, no presente estudo, o aumento dos níveis da enzima hepática alanina aminotransferase (ALT) nos grupos tratados com a maior concentração do produto. O fígado é considerado um dos órgãos primordiais nos processos de desintoxicação dos

vertebrados, sendo sensível a qualquer alteração no organismo destes animais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). A ALT, enzima encontrada no citosol dos hepatócitos que catalisa a transferência do grupo amino da alanina, permanecendo o ácido pirúvico, é considerada um marcador sensível de dano hepatocelular, podendo inclusive fornecer uma avaliação do grau do dano sofrido pelo fígado (MABEKU *et al.*, 2007; MOSSA *et al.*, 2018). A elevação dos níveis plasmáticos dessa enzima é consequência do seu extravasamento mediante danos na membrana celular (HENRY, 2008; TANG *et al.*, 2017), e pode indicar a ocorrência de danos hepatocelulares leves; já em caso de lesões hepatocelulares graves, ocorre a liberação da aspartato aminotransferase (AST) (MOTTA, 2003; OZER *et al.*, 2008). O acetilcarvacrol, no presente estudo, não causou alterações estatisticamente significativas nos níveis plasmáticos de AST, o que pode indicar dano hepático leve ocasionado pela absorção do produto pela pele. A exposição subcrônica de ratos ao tratamento de acetilcarvacrol (250mg/kg), administrado diariamente por gavagem durante 28 dias, no entanto, não revelou diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em relação ao grupo controle (ANDRÉ *et al.*, 2020). Oliveira *et al.* (2020a) também não observaram alterações nos níveis séricos das transaminases hepáticas, bem como de ureia e creatina, após administração de acetilcarvacrol por via oral (2000 mg/Kg) e intraperitoneal (1000 mg/Kg) em camundongos. Estas observações podem indicar possíveis diferenças no metabolismo desta substância em vias de administração distintas, bem como em diferentes espécies.

A absorção percutânea é definida como o movimento de uma substância química aplicada à superfície da pele para o sistema circulatório. Assim, a absorção percutânea via trans-epidérmica envolve a difusão através do estrato córneo, das células viáveis da epiderme e, finalmente, das camadas superiores da derme até a microcirculação (MARTINS; VEIGA, 2002). O estrato córneo corresponde à principal barreira física da pele e, por isso, para que uma substância permeie a pele, a difusão através deste estrato é um passo limitante. Inversamente, esta mesma região é também a principal barreira para a difusão da água para fora do corpo (PROW *et al.*, 2011). O dimetil sulfoxido (DMSO), utilizado neste estudo como veículo, é comumente empregado como intensificador da penetração cutânea de moléculas por alterar a organização dos lipídeos da camada córnea (CHEN *et al.*, 2014; LUNDBORG *et al.*, 2018; ISIK *et al.*, 2021). O carvacrol, por sua vez, apresenta baixa polaridade (coeficiente de partição n-octanol/água de 3,64) o que facilita a passagem pela bicamada lipídica da pele (ULTEE *et al.*, 2002). Sugere-se que a adição de um radical acetil na estrutura química do carvacrol potencialize sua ação lipofílica, melhorando sua permeabilidade celular (MORAES *et al.*, 2013). Assim, o uso de DMSO como solvente, que favorece a permeação cutânea, somado às

propriedades químicas do acetilcarvacrol pode ter contribuído para uma maior absorção deste produto pelos animais, o que ocasionou os efeitos sistêmicos observados no presente estudo.

Em geral, especialmente no grupo submetido ao tratamento com a maior concentração de acetilcarvacrol, foi observada a dilatação dos sinusoides, congestão dos vasos sanguíneos, aumento do espaço intersticial entre os hepatócitos, leve desorganização dos cordões de hepatócitos e possível aumento da quantidade de células de Kupffer. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados na análise semiquantitativa. Em relação à avaliação morfométrica, a porcentagem de núcleos dos hepatócitos alterados demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos T1 e T3. Vale ressaltar, contudo, que a somatória das alterações observadas no grupo tratado com a maior concentração resultou em uma média de INDEXind estatisticamente maior em relação ao grupo controle, o que sugere relativa toxicidade hepática. Essas observações corroboram com a elevação dos níveis séricos da enzima ALT (alanina aminotransferase), que indica danos hepáticos leves. A liberação da ALT é impulsionada por danos não necróticos nos hepatócitos e potencialmente reversíveis (SMITH *et al.*, 2020). André *et al.* (2020), embora não tenham identificado alterações hematológicas e bioquímicas em ratos tratados com acetilcarvacrol, também observaram alterações hepáticas, como a ocorrência de edema, hiperplasia das células de Kupffer e congestão das veias porta e centrolobular. Outro estudo, realizado com camundongos fêmeas da espécie *Mus musculus* expostas ao timol (2 mg/mL), isômero do carvacrol, por meio de banhos de aspersão, também demonstrou importantes alterações histológicas no fígado, como vacuolização, presença de núcleos irregulares e granulação citoplasmática dos hepatócitos, além de necrose (CUNHA *et al.*, 2017). As alterações hepáticas aqui verificadas, no entanto, podem ser consideradas reversíveis, uma vez que as células sofreram alterações funcionais e morfológicas, porém mantiveram-se vivas, podendo se recuperar assim que o estímulo nocivo for suspenso (JUNG; YIM, 2017).

Alterações microscópicas significativas foram verificadas na pele dos animais que foram tratados topicamente com o acetilcarvacrol em todas as avaliações realizadas. Assim como a irritação dérmica, essas alterações foram dose-dependentes, pois apresentaram-se de forma mais acentuada nos indivíduos pertencentes aos grupos que receberam as maiores concentrações do produto. Principalmente nestes grupos, alterações como vacuolização citoplasmática, acantose, espongiose, hiperqueratose, aumento da espessura do estrato córneo, microabscessos de Munro e paraqueratose foram observadas na epiderme. Estas características, somadas às modificações estruturais observadas na derme, foram responsáveis pelas diferenças estatísticas observadas no INDEXind de todos os tratamentos, em relação ao grupo controle.

Além disso, a avaliação morfométrica detectou o aumento da espessura da epiderme e maior densidade de células epidérmicas nos animais pertencentes aos grupos tratados com as maiores concentrações do produto. Na derme, por sua vez, a aplicação tópica de acetilcarvacrol ocasionou aumento na quantidade de vasos sanguíneos e presença de infiltrados inflamatórios inespecíficos ao seu redor, bem como hipertrofia das glândulas sebáceas, aumento da quantidade de folículos pilosos transversais e perifoliculite. Também foi observada maior densidade de células dérmicas nos indivíduos tratados com as maiores concentrações do produto.

QU *et al.* (2019) aplicaram carvacrol 3%, diluído em solução salina contendo 50% de etanol, diretamente na orelha de camundongos, duas vezes ao dia, por cinco dias consecutivos, provocando lesões cutâneas inflamatórias. A aplicação tópica de solução de carvacrol 1%, diluído em solução de etanol 10%, no dorso de camundongos por 10 minutos, duas vezes ao dia, durante quatro dias consecutivos, induziu hiperplasia epidérmica e proliferação de queratinócitos (WANG *et al.*, 2020). Wang *et al.* (2021), por sua vez, aplicaram carvacrol (100µl dissolvidos em solução de etanol 30%) na pele tricotomizada de camundongos, o que resultou em sinais clínicos semelhantes à dermatite atópica, como prurido intenso, lesões na pele e hiperplasia epidérmica. Mesmo apresentando melhores efeitos contra carrapatos (GONÇALVES *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2020), aparentemente a acetilação do carvacrol não permitiu a obtenção de um produto com efeitos reduzidos na pele, o que sugere cautela na sua utilização.

A resposta inflamatória na pele está associada a um aumento na espessura epidérmica (TEWARI-SINGH *et al.*, 2014). Hiperplasia epidérmica, hiperqueratose e ulcerações são indicativas de uma reação hiperproliferativa que é consistente com dermatite de contato irritativa (BRUNER, 1991). A hiperplasia epidérmica na dermatite de contato irritativa pode ser observada na fase inicial de recuperação ou na fase crônica da doença (ADACHI *et al.*, 2013). A espongiose, por sua vez, ocorre devido à lesão dos desmossomos e consequente perda da adesividade das células epidérmicas (TETZLAFF *et al.*, 2017). Os microabscessos de Munro se caracterizam pela presença de neutrófilos degenerados na camada córnea. A fase inicial da lesão é caracterizada pela espongiose e exocitose de neutrófilos entre as células epiteliais que migram para o estrato córneo culminando na formação do microabscesso (MURPHY *et al.*, 2007; KARAMANI *et al.*, 2021). A paraqueratose, ou seja, persistência de núcleos na camada córnea e ausência da camada granulosa, ocorre porque a maturação das células epidérmicas está acelerada não havendo tempo hábil para a formação da camada granulosa e corneificação dos queratinócitos (TETZLAFF *et al.*, 2017; KARAMANI *et al.*, 2021). Além disso, a ocorrência de

vacuolização citoplasmática pode indicar que a célula esteja desenvolvendo estratégias para remover o produto tóxico, eliminando algumas regiões do citoplasma e organelas. Essas estruturas eliminadas seriam cobertas por membranas, formando vacúolos autofágicos, que seriam digeridos pelos lisossomos ou liberados para o exterior (SURH *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2017).

Substâncias obtidas a partir de plantas medicinais são agentes xenobióticos, ou seja, compostos estranhos ao organismo que resultam em produtos de biotransformação potencialmente tóxicos, podendo levar a um quadro clínico severo e por vezes fatal em longo prazo (SILVEIRA *et al.*, 2008). Neste estudo, todas as concentrações utilizadas resultaram em efeitos tóxicos nos órgãos avaliados, não sendo possível determinar o NOAEL (nível sem efeitos adversos observáveis).

A aplicação dérmica com doses repetidas do acetilcarvacrol por 21 dias resultou em lesões cutâneas e alterações hepáticas em todos os grupos de tratamento. As características químicas do produto e as lesões provocadas pela dermatite de contato irritativa favoreceram a absorção da substância ao longo dos dias, levando a uma resposta inflamatória sistêmica, leve e potencialmente reversível. Neste estudo, o acetilcarvacrol apresentou boa permeabilidade cutânea, provavelmente potencializada pelo uso do DMSO como solvente. Esses resultados indicam que o uso de acetilcarvacrol como acaricida deve ser avaliado com cautela. Considerando seu potencial no controle de carrapatos, sugere-se que a aplicação de concentrações reduzidas de acetilcarvacrol, em associação a outros produtos químicos menos tóxicos e que atuem de forma sinérgica, possa potencializar seus resultados e reduzir seus efeitos tóxicos no organismo dos hospedeiros.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, K.; YAMADA, N.; YOSHIDA, Y.; YAMAMOTO, O. Subchronic exposure of titanium dioxide nanoparticles to hairless rat skin. **Experimental Dermatology**, v. 22, p. 278–283, 2013.
- ANDRE, W.P.P.; PAIVA JUNIOR, J.R.; CAVALCANTE, G.S.; RIBEIRO, W.L.S.; ARAÚJO FILHO, J.V.; *et al.* Anthelmintic activity of nanoencapsulated carvacryl acetate against gastrointestinal nematodes of sheep and its toxicity in rodents. **Braz J Vet Parasitol**. v. 29, n. 1, 2020.
- ANDRE, W.P.P.; RIBEIRO, W.L.C.; CAVALCANTE, G.S.; SANTOS, J.M.L.; MACEDO, I.T.F.; PAULA, H.C.B.; *et al.* Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Vet Parasitol**. v. 218, p. 52-58, 2016.
- ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L.; ZERINGOTA, V.; *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**, v. 30, n. 4, p. 377–382, 2016.
- ARNOSTI, A.; BRIENZA, P. D.; FURQUIM, K. C. S.; CHIERICE, G. O.; BECHARA, G. H.; BRAGGIÃO, I. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 575–580, 2011.
- BAKIR, M.; GEYIKOGLU, F.; COLAK, S.; TURKEZ, H.; BAKIR, T.O.; HOSSEINIGOUZDAGANI, M. The carvacrol ameliorates acute pancreatitis-induced liver injury via antioxidant response, **Cytotechnology**, 2015.
- BARBOSA-SILVA, A.; DUARTE, M. M.; CAVALCANTE, R. C.; OLIVEIRA, S. V.; VIZZONI, V. F.; DURÉ, A. I. L.; IANI, F. C. M.; MACHADO-FERREIRA, E.; GAZÊTA, G. S. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica, Basel**, v. 173, n. May, p. 30–33, 2017.
- BASER, K.H.C. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Curr. Pharm. Design.**, v. 14, p. 3106-3120, 2008.
- BEHL, M.; KADIISKA, M.B.; HEJTMANCIK, M.R.; VASCONCELOS, D.; CHHABRA, R.S. Subacute oral and dermal toxicity of tert-butyl hydroperoxide in Fischer F344/N rats and B6C3F1 mice. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 204–213, 2012.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P. & WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal Fish Disease**, v. 22, p. 25-34, 1999.
- BOUWSTRA, J. A.; PESCHIER, L. J. C.; BRUSSEE, J.; BODDE, H. E. Effect of N-alkylazocycloheptan-2-ones including Azone on the behaviour of stratum corneum. **Int. J. Pharm.**, v.52, p. 47-54, 1989.

BRAS, C.; GUMILAR, F.; GANDINI, N.; MINETTI, A.; FERRERO, A. Evaluation of the acute dermal exposure of the ethanolic and hexanic extracts from leaves of *Schinus molle* var. *areira* L. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1450–1456, 2011.

BRUNER, J.H. Pathological processes of skin damage related to toxicant exposure. In: **Dermal and Ocular Toxicology: Fundamentals and Methods**. CRC Press, Boston, p. 80-85, 1991.

CATLIN, N.R.; HERBERT, R.; JANARDHAN, K.; HEJTMANCIK, M.R.; FOMBOY, L.M.; VALLANT, M.; KISSLING, G.E.; DEVITO, M.J. Dose-response assessment of the dermal toxicity of Virginia cedarwood oil in F344/N rats and B6C3F1/N mice. **Food and Chemical Toxicology**, 2016.

CHANDRA, S.A.; PETERSON, R.A.; MELICH, D.; MERRILL, C.M.; BAILEY, D.; MELLON-KUSIBAB, K.; ADLER, R. Dermal irritation of petrolatum in rabbits but not in mice, rats or minipigs. **Journal Applied Toxicology**, v. 34, p. 857-861, 2014.

CHEN, B.; LIU, D.L.; PAN, W.I.; YANG, X.H.; SHOU, J.B.; WU, J.H.; MAO, Q.L.; WANG, J. Use of lipolanthionine peptide, a toll-like receptor 2 inhibitor, enhances transdermal delivery efficiency. **Molecular Medicine Reports**, V. 10, p. 593-598, 2014

CHHABRA, R.S.; ELWELL, M.R.; PETERS, A. Toxicity of 4-Vinyl-1-cyclohexene diepoxide after 13 weeks of dermal or oral exposure in rats and mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 14, p. 745-751, 1990.

CONTRERAS, M. *et al.* Vaccinomics approach to the identification of candidate protective antigens for the control of tick vector infestations and *Anaplasma phagocytophilum* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–15, 2017.

COSKUN, S. *et al.* Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). **Parasitol**, Turkey, n. 103, p. 259-261, abr. 2008.

COSTA, D.M.; OLIVEIRA, G.A.L.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do composto ciano-carvona. **J Basic Appl Pharm Sci.**, v. 33, p. 567–575, 2012.

CUNHA, L.C.; AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, M.C.; FREITAS, H.O.G.; SENA, A.A.S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 19, v. 2^a, p. 403-411, 2009.

CUNHA, E.L.R.; MATOS, R.S.; PEREIRA, N.R.C.; OLIVEIRA, P.R.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal of Histology and Histopathology**, v.4, p.1-8, 2017.

DALLEAU, S.; CATEAU, E.; BERGES, T.; BERJEAUD, J. M.; IMBERT, C. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 31, p. 572–576, 2008.

DAMASCENO, S. R. B.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; CARVALHO, N. S.; *et al.* Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Sciences**, v. 94, n. 1, p. 58–66, 2014.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 26, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Vet. Parasitol.** v. 208 ,p. 9–13, 2015. .

ENGELMAN, M.F.B.; GUIDUGLI NETO, J.; ANDRADE, C.H.V.; HERNANDEZ, R.; GOULART, L.B.N.T. Estudo morfométrico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológicas de tiroxina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 45, n. 2, 2001.

FERNANDES, J. I.; CORREIA, T. R.; RIBEIRO, F. A.; CID, Y. P.; TAVARES, P. V.; SCOTT, F. B. Eficácia in vitro do nim (*Azadirachta indica*) no controle de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32, n. (Supl. 1), p. 64-68, 2010.

GONCALVES, R. R. P.; PECONICK, A. P.; THOMASI, S. S.; KONIG, I. F. M.; GOMES, S. L.; REMEDIO, R. N. Acaricidal activity and effects of acetylcarvacrol on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) engorged female ticks (Acari: Ixodidae).. **International Journal of Acarology**, v. 45, p. 404-408, 2019.

GONCALVES, R. R. P.; PECONICK, A. P.; KONIG, I. F. M.; LUNGUINHO, A. S.; RIBEIRO, J. C. S.; GOMES, S. L.; SILVA, L.; THOMASI, S. S.; REMEDIO, R. N. Acetylation of carvacrol raises its efficacy against engorged cattle ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Natural Product Research**, v. 35, p. 5475-5479, 2021.

GOODMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11a ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.

GUGLIELMONE, A.A.; ROBBINS, R.G.; APANASKEVICH, D.A.; PETNEY, T.N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.G. **Hard ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) of the world**. Springer, Heidelberg, 2014.

HADGRAFT, J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v.184, p. 1-6, 1999.

HAN, J.S.; JANG, S.; SON, H.Y., KIM. Y.M.; KIM, Y.; NOH, J.H.; KIM, M.J.; LEE, B.S. Subacute dermal toxicity of perfluoroalkyl carboxylic acids: comparison with different carbon-chain lengths in human skin equivalents and systemic effects of perfluoroheptanoic acid in Sprague Dawley rats. **Archives of Toxicology**, 2019.

HASSAN, M.E.; HASSAN, R.R.; DIAB, K.A.; EL-NEKEETY, A.A.; HASSAN, N.S.; ABDEL-WAHHAB, M.A. Nanoencapsulation of thyme essential oil: a new avenue to enhance its protective role against oxidative stress and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, 2021.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 20 ed. São Paulo: Manole, 2008.

ISIK, D.; JOSHI, A.A.; GUO, X.; RANCAN, F.; KLOSSEK, A.; VOGT, A.; RÜHL, E.; HEDTRICH, S.; KLINGER, D. Sulfoxide-functionalized nanogels inspired by the skin penetration properties of DMSO. **Biomaterials Science**, v. 9, p. 712-725, 2021.

JAIN, A.K.; TEWARI-SINGH, N.; INTURI, S.; KUMAR, D.; ORLICKY, D.J.; AGARWAL, C.; WHITE, C.W.; AGARWAL, R. Flavanone silibinin treatment attenuates nitrogen mustard-induced toxic effects in mouse skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 285, p. 71–78, 2015.

JAYAKUMAR, S.; MADANKUMAR, A.; ASOKKUMAR, S.; RAGHUNAN DHAKUMAR, S.; GOKULA DHAS, K.; KAMARAJ, S.; JOSEPHINE DIVYA, M. G.; DEVAKI, T. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. **Mol. Cell. Biochem.** v. 360, p. 51–60, 2012.

JUNQUEIRA, L.C. **Basic Techniques of Cytology and Histology**. Livraria Editora Santos; Bookstore Santos, São Paulo, 1983.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12th ed. São Paulo: Editora Guanabara Koogan 2013.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** - Texto e Atlas. Disponível em: Minha Biblioteca, (13th edição). Grupo GEN, 2017.

KARAMANI, C.; ANTONIADOU, I.T.; DIMOU, A.; ANDREOU, E.; KOSTAKIS, G.; SIDERI, A.; VITSOS, A.; GKAVANOZI, A.; SFINIADAKIS, I.; SKAL TSA, H.; PAPAIOANNOU, G.T.; RALLIS, M.C.; MAIBACH, H. Optimization of psoriasis mouse models. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 108, 2021.

KARTHEEK, R.M.; DAVID, M. Assessment of fipronil toxicity on wistar rats: A hepatotoxic perspective. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 448–456, 2018.

KAUFMAN, W.R. Ticks: physiological aspects with implications for pathogen transmission. **Ticks Tick Borne Disease**, v. 1, n. 1, p. 11-22, 2010.

KOC, S. *et al.* Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Antalya, Turkey, v. 193, p. 316–319, jan. 2013.

KONIG, I.F.M.; GONÇALVES, R.R.P.; OLIVEIRA, M.V.S.; SILVA, C.M.; THOMASI, S.S.; PECONICK, A.P.; REMEDIO, R.N. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick-Borne Dis.** v. 10, p. 766–774, 2019.

KONIG, I.F.M.; OLIVEIRA, M.V.S.; GONÇALVES, R.R.P.; PECONICK, A.P.; THOMASI, S.S.; ANHOLETO, L.A.; LIMA-DE-SOUZA, J.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; REMEDIO, R.N. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae), **Micron**, v. 129, 2020.

KONIG, I.F.M.; REIS, A.C.; GONÇALVES, R.R.P.; OLIVEIRA, M.V.S.; SILVA, C.M.; MELO, D.S.; PECONICK, A.P.; THOMASI, S.S.; REMEDIO, R.N. Repellent activity of acetylcarvacrol and its effects on salivary gland morphology in unfed *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Dis.**, v.12, n.4, 2021.

JUMG, Y.K.; YIM, H.J. Reversal of liver cirrhosis: current evidence and expectations. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 32, n. 2, 2017.

LAGE, T.C.A. *et al.* Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 863-869, 2013.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; MAISANABA, S.; PUERTO, M.; PRIETO, A.I.; PICHARDO, S.; MOYANO, R.; GONZALEZ-PEREZ, J.A.; CAMEAN, A.M. Genotoxicity evaluation of carvacrol in rats using a combined micronucleus and comet assay. **Food and Chemical Toxicology**. v. 98, p. 240-250, 2016.

LUNDBORG, M.; WENNBERG, C.L.; NARANGIFARD, A.; LINDAHL, E.; NORLÉN, L. Predicting drug permeability through skin using molecular dynamics simulation. **Journal of Controlled Release**, 2018.

MABEKU, L. B. K.; BENG, V. P.; KOUAM, J.; ESSAME, O.; ETOA, F. X. Toxicological evaluation of ethyl acetate extract of *Cylicodiscus gabunensis* stem bark (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 598-606, 2007.

MARINHO, J.F.U. *et al.* Sugar cane vinasse in water bodies: impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.110, p.239-245, 2014.

MARTINS, A.L.C.F.; FERNÁNDEZ, F.R.C.; CORRÊA, M.S.N.P.; GUERRERA, A.C. A Cárie dentária. In: CORRÊA, M.S.N.P. **Odontopediatria na primeira infância**. São Paulo: Santos, cap. 17, p. 195-207, 1998.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, 2002.

MCOMIE, W. A.; ANDERSON, H. H.; ESTESS, F. M. Comparative toxicity of certain t-butyl substituted cresols and xylenols. **J. Am. Pharm. Assoc.** v.38, p. 366–369, 1949.

MELLO, P.A.; ROCHA, B.G.; OLIVEIRA, W.N.; MENDONÇA, T.S.; DOMINGUETI, C.P. Nephrotoxicity and alterations of laboratory tests by drugs: literature review. **Revista de Medicina**, v. 100, n. 2, p. 152-61, 2021.

MOHSENI, R.; KARIMI, J.; TAVILANI, H.; KHODADADI, I.; HASHEMNIA, M. Carvacrol ameliorates the progression of liver fibrosis through targeting of Hippo and TGF- β signaling pathways in carbon tetrachloride (CCl₄)- induced liver fibrosis in rats. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/iipi20>, 2019.

- MORAES, J.; CARVALHO, A.A.L.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A.A.C.; MARQUES, T.H.C.; ANDRADE, L.N.; FREITAS, M.R.; SOUSA, D.P. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 603–610, 2013.
- MOSSA, A.T.H.; MOHAFRASH, S.M.; CHANDRASEKARAN, N. Safety of Natural Insecticides: Toxic Effects on Experimental Animals. **BioMed Research International**, 2018.
- MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório**: princípios e interpretações. 4ed. São Paulo: Robe, 2003.
- MURPHY, M.; KERR, P.; GRANT-KELS, J. M. The histopathologic spectrum of psoriasis. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 6, p. 524-8, 2007.
- OCDE. Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. In: CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Paris: Head of Publications Service, 1995.
- OCDE. Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. In: CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). Guideline 410: Repeated Dose Dermal Toxicity. Paris: Head of Publications Service, 1981.
- OCDE. Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Paris: Head of Publications Service, 2000.
- OLIVEIRA, F.R.A.M.; OLIVEIRA, G.A.L.; OLIVEIRA, G.L.S.; FREITAS, R.M. Prospecção tecnológica do acetato de carvacrila e aplicações no setor industrial farmacêutico: ênfase em doenças negligenciadas. **Revista Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, p. 103–110, 2013.
- OLIVEIRA, G.L.S.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; SOUZA, A.A.C.; MOURA, A.K.S.; LIMA, S.G.; FREIRE, J.A.P.; CITÓ, A.M.G.L. Carvacryl Acetate: synthesis and toxicological and pharmacological activities. **Rev. Virtual Química**, v. 12, n. 3, 2020a.
- OLIVEIRA, M.V.S.; KONIG, I.F.M.; REIS, A.C; SILVA, L.; PECONICK, A.P.; THOMASI, S.S.; LIMA-DE-SOUZA, J.R; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; REMEDIO, R.N. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol affect reproduction and integument morphology in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, 2020b.
- OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, p. 194–205, 2008.
- PAPPINEN, S.; PASONEN-SEPPANEN, S.; SUHONEN, M.; TAMMI, R.; URTTI, A. Rat epidermal keratinocyte organotypic culture (ROC) as a model for chemically induced skin irritation testing. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 208, p. 233 – 241, 2005.
- PEREIRA, A.I.S.; PEREIRA, A.G.S.; SOBRINHO, O.P.L.; CANTANHEDE, E.K.P.; SIQUEIRA, L.F.S. Antimicrobial activity in fighting mosquito larvae *Aedes aegypti*: Homogenization of essential oils of linalool and eugenol. **Educación Química**, v.25, n. 4, p. 446-449, 2014.

PEREIRA, A.M.S.P.; COSTA, N.M.C.; COELHO, P.M.R.A. A utilização de órgãos isolados como método alternativo à experimentação animal em toxicologia – **Métodos alternativos à experimentação animal em toxicologia**. p. 1-13, 1998.

PEREIRA JÚNIOR, 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**, Lavras, Brasil, v. 1, p. 1-4, fev. 2019.

POTTER, P.A.; PERRY, A.G. **Fundamentos de enfermagem: conceitos, processo e prática**. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

PROW, T.W.; GRICE, J.E.; LIN, L.L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E.M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T.A.; SOYER, H.P.; ROBERTS, M.S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 470-491, 2011.

RAMÍREZ, C.; FROYLÁN, I. V.; HERMINIA I, P. M.; *et al.* In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 61, n. 2, p. 251–257, 2013.

RAMÍREZ, C.; IBARRA, F.; PÉREZ, H. I.; *et al.* Assessment and determination of LC50 of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 1, n. 2, p. 72–33, 2016.

RAMOS, G.; MARINI, D.C. Exames bioquímicos relacionados a alterações renais. **Foco: caderno de estudos e pesquisas**, n. 4, 2014.

RITTIÉ, L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. **Methods in Molecular Biology**, 395–407, 2017.

RYU, H.J.; SEO, M.Y.; JUNG, S.K.; MAENG, E.H.; LEE, S.Y.; JANG, D.H. *et al.* Zinc oxide nanoparticles: a 90-day repeated-dose dermal toxicity study in rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, Suppl 2, p. 137–144, 2014.

SAMPIERI, B. R.; ARNOSTI, A.; FURQUIM, K. C. S.; CHEIRICE, G. O.; BECHARA, G. H.; CARVALHO, P. L. P. F.; NUNES, P. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effect of ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*) on the oocyte yolk components of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari : Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 191, n. 3–4, p. 315–322, 2013.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; *et al.* Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, v. 100, n. 4, p. 783–790, 2007.

SCHOSSLER, D.; ALIEVI, M.M.; EMANUELLI, M.P.; SCHOSSLER, J.P. Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de flunixin meglumine e Ketoprofeno durante e trans e pós-operatório. **Acta Cir Bras.**, v. 16, n. 1, p. 46-51, 2001.

SHARMA, R.; LOCKE, B.R. Jet fuel toxicity: skin damage measured by 900-MHz MRI skinmicroscopy and visualization by 3D MR image processing. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 28, p. 1030–1048, 2010.

SMITH, A.K.; ROPELLA, G.E.P.; MCGILL, M.R.; KRISHNAN, P.; DUTTA, L.; KENNEDY, R.C.; JAESCHKE, H.; HUNT, C.A. Contrasting model mechanisms of alanine aminotransferase (ALT) release from damaged and necrotic hepatocytes as an example of general biomarker mechanisms. **PLOS Computational Biology**, v. 16, n. 6, 2020.

SODELLI, L.F.; CALLIGARIS, I.B.; LIMA DE SOUZA, J.R.; SILVA, O.; ARAÚJO, B.J.N.; RODRIGUES, M.L. Clinical and morphophysiological hepatic alterations caused by the ingestion of food with added ricinoleic acid esters a bioactive with acaricidal potential. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 8, p. 58599-58612, 2022.

SOLOMONS, T.W.G., FRYHLE, C.B., SNYDER, S.A. **Organic Chemistry**, 12^a edição, John Wiley, Hoboken NJ, 2016.

STEVEN, L.S.; SCOTT, M.S. Urinary sistem. In: **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. Iowa: Iowa State, p. 277-336, 2002.

STOKES, W.S. Humane Endpoints for Laboratory Animals Used in Regulatory Testing. **ILAR Journal**, v. 43, Suplemento, p. S31-S38, 2002.

SUNTRES, Z.E.; COCCIMIGLIO, J. & ALIPOUR, M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol, Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 304-318, 2015.

SURH, I.; BEHL, M.; ELMORE, S.A.; CHHABRA, R.S. Comparative dermal toxicity of dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in rodents. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 177–187, 2012.

TANG, J; HU, P; LI, Y.; WIN-SHWE, T-T.; LI, C. Ion imbalance is involved in the mechanisms of liver oxidative damage in rats exposed to glyphosate. **Front. Physiol**, v. 8, n. 1083, 2017.

TESHOME, K.; GEBRE-MARIAM, T.; ASRES, K.; PERRY, F.; ENGIDAWORK, E. Toxicity studies on dermal application of plant extract of *Plumbago zeylanica* used in Ethiopian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 236–248, 2008.

TETZLAFF, M.T.; NAGARAJAN, P.; CHON, S.; HUEN, A; DIAB, A; OMAR, P.; AUNG, P.P.; TORRES-CABALA, C.A.; MAYS, S.R.; PRIETO, V.G.; CURRY, J.L. Lichenoid Dermatologic toxicity from immune checkpoint blockade therapy: A detailed examination of the clinicopathologic features. **Dermatopathol**, v. 39, n. 2, 2017.

TEWARI-SINGH, N.; JAIN, A.K.; ORLICKY, D.J.; WHITE, C.W.; AGARWAL, R. Cutaneous injury-related structural changes and their progression following topical Nitrogen Mustard exposure in hairless and haired mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

ULTEE, A.; BENNIK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen bacillus cereus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C; MACIEL, M.A.M. Medicinal plants: safe cure? **Quim. Nova**, v. 28, p. 519-28, 2005.

WINNICKA, K.; WROBLEWSKA, M.; SOSNOWSKA, K.; CAR, H.; KASACKA, I. Evaluation of cationic polyamidoamine dendrimers' dermal toxicity in the rat skin model. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 1367–1377, 2015.

ZAIM, M.; GUILLET, P. Alternative insecticides: an urgent need. **Trends in Parasitology**, n. 18, v.4, p.161-163, 2002.