



Marcos Vinicius Silva de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL DO
ACETILCARVACROL EM RATOS WISTAR.**

**Lavras - MG
2025**

Marcos Vinicius Silva de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL DO ACETILCARVACROL EM RATOS
WISTAR.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio
Orientador
Prof.^a Dr.^a Ana Paula Peconick
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2025**

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

Oliveira, Marcos Vinicius Silva de.

Avaliação Da Toxicidade Oral Do Acetilcarvacrol Em Ratos Wistar. / Marcos Vinicius Silva de Oliveira. - 2024.
126 p.: il.

Orientador(a): Rafael Neodini Remedio.

Coorientador(a): Ana Paula Peconick.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Toxicologia. 2. Acaricida. 3. Fitoterápico. I. Remedio, Rafael Neodini. II. Peconick, Ana Paula. III. Título.

Marcos Vinicius Silva de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL DO ACETILCARVACROL EM RATOS
WISTAR.**

ORAL TOXICITY ASSESSMENT OF ACETYLCARVACROL IN WISTAR RATS.

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para obtenção do título de Doutor.

APROVADO em 20 de dezembro de 2024

Dr. Rafael Neodini Remedio
Dr.^a Ana Paula Peconick
Dr. Sidney de Almeida Ferreira
Dr. Eric Francelino Andrade
Dr. Fernando Antônio Frieiro Costa

Prof. Dr. Rafael Neodini Remedio
Orientador
Prof.^a Dr.^a Ana Paula Peconick
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2025**

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa de doutorado, e à Universidade Federal de Lavras (UFLA), por prover os recursos estruturais necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

À minha esposa, **Vanessa Alvarenga Silva**, que tanto amo, pela paciência, ajuda e companhia nos laboratórios por inúmeros finais de semana durante toda a minha trajetória acadêmica de pós-graduação.

À Prof.^a Dr.^a **Ana Paula Peconick**, minha coorientadora, sempre prestativa e sorridente em todas as minhas solicitações. Durante todo o período de pós-graduação (mestrado e doutorado).

Ao Prof. Dr. **Fernando Antônio Frieiro Costa**, pela boa vontade em contribuir para minha formação e por estar presente desde a graduação, acompanhando-me durante toda a pós-graduação (mestrado e doutorado).

Ao Prof. Dr. **Sidney de Almeida Ferreira** e ao Prof. Dr. **Eric Francelino Andrade**, a quem tive a grande sorte de conhecer, deixo meu agradecimento por aceitarem compor a banca do meu doutorado.

Ao Prof. Dr. **Rafael Neodini Remédio**, meu orientador, faltam-me palavras para descrever seu extraordinário profissionalismo. Confesso que nunca antes recebi tanto conhecimento em tão pouco tempo de convivência. Como professor que também sou, espero um dia alcançar o seu nível, para transmitir adiante seus ensinamentos com tamanha destreza e sapiência, tal qual me foram apresentados. Acredito firmemente que a maior satisfação de um educador é observar a evolução de seu pupilo na busca pelo conhecimento. (Nesta parte, tive que me inspirar nos agradecimentos do mestrado, pois nada mudou: você continua o mesmo profissional dedicado que tanto admiro. Muito obrigado por tudo!).

“O fato de a gente não entender
alguma coisa não significa que ela
precisa ser explicada de uma forma
sobrenatural. A ciência vive da dúvida.
E a gente não precisa entender tudo
Para ter uma vida feliz e completa.
Prefiro viver com a dúvida do que ser
enganado por uma ilusão”

(Marcelo Gleiser)

RESUMO

Os carrapatos são ectoparasitos de grande importância médico-veterinária, principalmente devido ao fato de transmitirem diferentes patógenos. No entanto, o uso prolongado e indiscriminado de acaricidas sintéticos tem resultado na seleção de cepas resistentes. Por esta razão, nos últimos anos, o uso de extratos de plantas para o controle de carrapatos se intensificou. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar a toxicidade oral do acetilcarvacrol em ratos Wistar, a fim de se definir dosagens efetivas e seguras para seu uso no controle de carrapatos. Para isso, foram utilizados 20 ratos adultos da linhagem Wistar (fêmeas). Os grupos de tratamento receberam, diariamente por gavagem, 26, 52 e 104 μ L de acetilcarvacrol diluído em 1mL de óleo de milho, por 30 dias. O grupo controle recebeu apenas o veículo (óleo de milho), pelo mesmo período de tempo. Amostras de sangue foram coletadas logo após a eutanásia por aprofundamento de anestesia e punção cardíaca para determinar a contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e contagem de plaquetas. Os ratos foram dissecados para remoção dos seguintes órgãos: estômago, intestino delgado, fígado, pâncreas, coração e pulmão que foram fixados em paraformaldeído a 4%. As amostras foram, então, desidratadas em etanol e, em seguida, embebidas e incluídas em parafina. Os blocos foram seccionados em micrótomo, e as secções coradas com hematoxilina-eosina e montadas em bálsamo do Canadá. Embora leves alterações tenham de fato sido observadas em ratos expostos ao acetilcarvacrol por via oral, sua extensão não foi grande o suficiente para ocasionar danos permanentes ou irreversíveis.

Palavras-Chave: Toxicologia; Acaricida; Fitoterápico.

ABSTRACT

Ticks are ectoparasites of great medical-veterinary importance, mainly due to their ability to transmit various pathogens. However, the prolonged and indiscriminate use of synthetic acaricides has led to the selection of resistant strains. For this reason, in recent years, the use of plant extracts for tick control has intensified. Therefore, the objective of this study is to evaluate the oral toxicity of acetylcarvacrol in Wistar rats in order to determine effective and safe dosages for its use in tick control. For this, 20 adult female Wistar rats were used. The treatment groups received 26, 52, and 104 μL of acetylcarvacrol diluted in 1 mL of corn oil by gavage daily for 30 days. The control group received only the vehicle (corn oil) for the same period. Blood samples were collected immediately after euthanasia by deepening anesthesia and cardiac puncture to determine erythrocyte count, total and differential leukocyte count, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, and platelet count. The rats were dissected for the removal of the following organs: stomach, small intestine, liver, pancreas, heart, and lungs, which were fixed in 4% paraformaldehyde. The samples were then dehydrated in ethanol, embedded in paraffin, and sectioned with a microtome. The sections were stained with hematoxylin and eosin and mounted in Canada balsam. Although slight changes were indeed observed in rats exposed to oral acetylcarvacrol, their extent was not large enough to cause permanent or irreversible damage.

Keywords: Toxicology; Acaricide; Phytotherapy.

INDICADORES DE IMPACTO

O objetivo deste trabalho é avaliar a toxicidade oral do acetilcarvacrol em ratos Wistar, a fim de se definir dosagens efetivas e seguras para seu uso no controle de carrapatos. Diante dos resultados obtidos, embora leves alterações tenham de fato sido observadas em ratos expostos ao acetilcarvacrol por via oral, sua extensão não foi grande o suficiente para ocasionar danos permanentes ou irreversíveis. Entre as alterações estatisticamente significativas encontradas e as hipóteses levantadas, é indispensável enfatizar a proporção das alterações e a significância estatística dos dados obtidos. As concentrações equivalentes aos tratamentos 1 e 2 não produziram efeitos adversos relevantes, podendo ser consideradas seguras para uso, tendo em vista, especificamente, os parâmetros aqui analisados. Considerando seu potencial no controle de carrapatos, sugere-se que a aplicação de acetilcarvacrol, em associação com outros produtos químicos que atuem de forma sinérgica, possa potencializar seus resultados e reduzir seus efeitos tóxicos no organismo dos hospedeiros.

IMPACT INDICATORS

The objective of this study is to evaluate the oral toxicity of acetylcarvacrol in Wistar rats in order to define effective and safe dosages for its use in tick control. Based on the results obtained, although slight changes were indeed observed in rats exposed to oral acetylcarvacrol, their extent was not large enough to cause permanent or irreversible damage. Among the statistically significant changes found and the hypotheses raised, it is essential to emphasize the proportion of the changes and the statistical significance of the obtained data. The concentrations corresponding to treatments 1 and 2 did not produce any relevant adverse effects and can be considered safe for use, specifically regarding the parameters analyzed here. Considering its potential for tick control, it is suggested that the application of acetylcarvacrol, in combination with other chemicals that act synergistically, may enhance its results and reduce its toxic effects on host organisms.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais alterações encontradas no estômago de ratos expostos a substâncias químicas e seus respectivos fatores de importância (w).

Tabela 2. Principais alterações encontradas no intestino delgado de ratos expostos a substâncias químicas e seus respectivos fatores de importância (w).

Tabela 3. Principais alterações observadas no fígado de ratos expostos a substâncias químicas e seus respectivos fatores de importância (w).

Tabela 4. Principais alterações encontradas no pâncreas de ratos expostos a substâncias químicas e seus respectivos fatores de importância (w).

Tabela 5. Média \pm desvio padrão do peso corporal (g) de ratos Wistar ao longo dos 28 dias.

Tabela 6. Eritrograma de ratos Wistar albinos após 28 dias.

Tabela 7. Leucograma de ratos Wistar albinos após 28 dias.

Tabela 8. Concentração de AST (U/L) e ALT (U/L) em ratos Wistar albinos após 28 dias.

Tabela 9. Média \pm desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) e dos índices individuais (INDEXind) observados no estômago.

Tabela 10. Medidas da espessura da mucosa (μm), espessura da submucosa (μm) e espessura da camada muscular externa (μm) em ratos.

Tabela 11. Medidas do comprimento do vilão (μm), espessura do vilão (μm) e profundidade da cripta (μm) e espessura da submucosa (μm) em ratos.

Tabela 12. Média \pm desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) e dos índices individuais (INDEXind) observados no fígado.

Tabela 13. Medidas da área do núcleo (μm) e densidade dos hepatócitos para cada ($\times 10^3/\mu\text{m}^2$), porcentagem de núcleos de hepatócitos alterados (%) e porcentagem de sinusoides presentes no tecido (%).

Tabela 14. Medidas da área da ilhota (μm^2), média do número de ilhotas por imagem ($70,6 \times 10^3/\mu\text{m}^2$) e área do ácino (μm^2) em ratos.

Tabela 15. Média \pm desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) e dos índices individuais (INDEXind) observados no coração.

Tabela 16. Diâmetro dos cardiomiócitos ($\times 10^3\mu\text{m}$) e porcentagem do tecido ocupada pelo interstício (%) no coração.

Tabela 17. Média \pm desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) e dos índices individuais (INDEXind) observados no pulmão.

Tabela 18. Porcentagem do tecido ocupado por septos alveolares (%), porcentagem do tecido ocupada por células (%) e densidade do número de alvéolos (por mm²) no pulmão.

LISTA DE GRÁFICOS

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

Gráfico 2. Descamação epitelial, hipertrofia das células mucosas superficiais, dilatação das glândulas gástricas, congestão dos vasos sanguíneos e dos índices individuais (INDEXind) observados no estômago.

Gráfico 3. Espessura da mucosa (μm^2), espessura da submucosa (μm^2) e espessura da muscular externa (μm^2) em ratos.

Gráfico 4. Comprimento do vilosidade, espessura do vilosidade, profundidade da cripta e espessura da submucosa em ratos.

Gráfico 5. Vacuolização citoplasmática, dilatação do lúmen do sinusóide e dos índices individuais (INDEXind) observados no fígado.

Gráfico 6. Área do núcleo (μm^2), densidade de hepatócitos ($\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2$) e porcentagem de sinusoides no tecido (%) em ratos.

Gráfico 7. Área da ilhota (μm^2), média do número de ilhotas por imagem ($70,6 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) e área do ácino (μm^2) em ratos.

Gráfico 8. Aumento do interstício, congestão de vasos sanguíneos e dos índices individuais (INDEXind) observados no coração.

Gráfico 9. Porcentagem do órgão ocupada por interstício (%) e o diâmetro dos cardiomiócitos ($\times 10^3 \mu\text{m}$) em ratos.

Gráfico 10. Espessamento dos septos, congestão de vasos sanguíneos, agregados linfoides, infiltrado inflamatório, hemácias intra-alveolares e dos índices individuais (INDEXind) observados no pulmão.

Gráfico 11. Porcentagem do tecido ocupada pelos septos alveolares, a porcentagem ocupada por células e a densidade dos alvéolos no tecido em ratos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do carvacrol.

Figura 2. Síntese de acetilcarvacrol a partir da reação do carvacrol com anidrido acético e hidróxido de sódio.

Figura 3. Estrutura química e estrutura tridimensional do acetilcarvacrol.

Figura 4. Esquema do estômago de rato.

Figura 5. O corte histológico da região fúndica do roedor.

Figura 6. Esquema de intestino delgado de rato.

Figura 7. Fotomicrografia de intestino delgado de rato em corte transversal.

Figura 8. Corte histológico do fígado de rato.

Figura 9. Imagem esquemática dos segmentos do pâncreas.

Figura 10. Corte histológico do pâncreas de rato.

Figura 11. Imagem esquemática do coração de rato.

Figura 12. Cortes histológicos do coração de rato.

Figura 13. Imagem esquemática dos pulmões de rato.

Figura 14. Corte histológico do pulmão de rato.

Figura 15. Fotomicrografias da mucosa do estômago de ratos.

Figura 16. Fotomicrografias do intestino delgado de ratos.

Figura 17. Fotomicrografias do fígado de ratos.

Figura 18. Fotomicrografias do pâncreas de ratos.

Figura 19. Fotomicrografias do coração de ratos.

Figura 20. Fotomicrografias do pulmão de ratos.

LISTA DE SIGLAS

AIT - Teste de imersão em adultos

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

BCSTM - Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology

BIOPAR - Laboratório de Biologia Parasitária

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CL50 - Concentração Letal 50%

CL90 - Concentração Letal 90%

CHCM - Concentração da hemoglobina corpuscular média

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMV - Departamento de Medicina Veterinária

DQI - Departamento de Química

EPA - Agência Americana de Proteção Ambiental

GHS - Sistema Globalmente Harmonizado

HCM - Hemoglobina corpuscular média

INDEXalt - Índices de cada alteração

INDEXind - Índices individuais

RDW - Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos

UFLA - Universidade Federal de Lavras

VCM - Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1. Carrapatos	16
2.2. Controle	18
3. OBJETIVOS.....	49
3.1. Objetivo geral	49
3.2. Objetivos específicos	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1. Locais de estudo.....	49
4.2. Acetilação do carvacrol	50
4.3. Animais	50
4.4. Delineamento experimental.....	51
4.4.1. Toxicidade oral com dose repetida	51
4.4.2. Pontos finais humanitários (“endpoints”)	52
4.5. Material biológico	53
4.5.1. Análises hematológicas e bioquímicas	53
4.5.2. Avaliação histopatológica	53
4.5.2.1. Análise morfométrica.....	54
4.5.2.2. Análise semiquantitativa.....	56
6. DISCUSSÃO.....	93
7. CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS.....	98

1. INTRODUÇÃO

Rhipicephalus sanguineus é um dos carrapatos mais disseminados no mundo, sendo um ectoparasito comum de cães que vivem em áreas urbanas e rurais. A distribuição cosmopolita deste carrapato é, em parte, favorecida por sua capacidade de sobreviver em diferentes contextos ambientais e sob condições climáticas variáveis. Embora *R. sanguineus* seja um ectoparasito típico de cães, ele pode ocasionalmente parasitar outros hospedeiros, incluindo humanos. Assim, *R. sanguineus* é um vetor competente de vários patógenos causadores de doenças em cães, como *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*, e em humanos, é transmissor de *Rickettsia conorii* e *R. rickettsii*.

Por essa razão, é fundamental o controle desses parasitos, comumente realizado pelo uso de defensivos químicos, principalmente acaricidas sintéticos, que são a forma de controle de carrapatos mais utilizada comercialmente. Dentre os grupamentos químicos sintéticos mais aplicados no controle de carrapatos em animais de pequeno porte estão os carbamatos, os organofosforados, os piretroides, as lactonas macrocíclicas, os fenilpirazóis e as amidinas, com modos de ação e eficácia distintos, embora provoquem danos generalizados ao atacar tanto organismos-alvo quanto não-alvo. Seu uso indiscriminado promove a seleção de populações resistentes, além de resultar em bioacumulação em toda a cadeia alimentar e em efeitos tóxicos e/ou alérgicos em seres humanos e outros animais, o que aumentou o interesse de cientistas no aprimoramento das formas de controle.

Com um conceito mais sustentável, deu-se início à procura por produtos não tradicionais para conter a proliferação de carrapatos. Evitar o uso de produtos sintéticos convencionais em busca de uma solução alternativa é um pensamento que vem crescendo. Uma nação como o Brasil dispõe de vasta biodiversidade em nível de flora, o que oferece enorme oferta de extratos de plantas, óleos essenciais e seus princípios ativos. Isso pode reduzir os custos de aplicação em comparação aos compostos sintéticos. Além disso, esses produtos apresentam rápida degradação e geram baixa contaminação ao meio ambiente.

O carvacrol, um monoterpene aromático oxigenado geralmente presente nos óleos essenciais de plantas como *Origanum* sp. e *Thymus* sp., tem sido utilizado em baixas concentrações como aromatizante e conservante de alimentos, bem como fragrância em formulações cosméticas. Também demonstrou atividade acaricida significativa, podendo ser

considerado uma opção promissora para o controle dos carrapatos. Entretanto, de maneira oposta à crença popular, o uso de plantas medicinais não é desprovido de risco, levando em conta que, além do princípio ativo terapêutico, a mesma planta pode conter outras substâncias que podem ser tóxicas. A aplicação do carvacrol, por exemplo, ocasionou irritações na pele de coelhos após sua utilização na dose de 2.700 mg/kg.

Alguns estudos relataram que a acetilação do carvacrol pode aumentar sua ação biológica, ao mesmo tempo em que diminui sua toxicidade para mamíferos. O processo de substituição nucleofílica acídica possibilita a obtenção do acetilcarvacrol (5-isopropil-2-metilfenolacetato), um composto semissintético com atividade anti-helmíntica, antiesquistossômica e carrapaticida, além de atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante, anticonvulsivante e potencial ansiolítico. A aplicação de acaricidas alternativos, isolados e/ou em combinação com outros métodos ou produtos, pode ter um papel importante no controle parasitário, contribuindo para a redução do uso de pesticidas sintéticos e, conseqüentemente, gerando menores impactos ao meio ambiente.

Colocando à prova o carvacrol e o acetilcarvacrol, foi demonstrado que o composto acetilado apresentou menor toxicidade aguda em camundongos após administração em dose única por gavagem. Em um teste de toxicidade subcrônica, os parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos tratados com acetilcarvacrol e acetilcarvacrol nanoencapsulado não diferiram significativamente em relação ao grupo controle. No entanto, foram observadas alterações em alguns órgãos, como o fígado, rim e baço, nos animais tratados, mas o mesmo não ocorreu no pulmão, estômago e intestino.

Observou-se que a concentração de 26,16 $\mu\text{L/mL}$ de acetilcarvacrol foi capaz de causar a mortalidade de 90% dos carrapatos da espécie *R. sanguineus* em testes in vitro. Além disso, a concentração de 8,0 $\mu\text{L/mL}$ deste produto foi suficiente para gerar 91% de eficácia, afetando a reprodução de *R. sanguineus*. Contudo, embora alguns estudos tenham demonstrado efeitos tóxicos do acetilcarvacrol em animais vertebrados, nenhum dos experimentos utilizou concentrações comprovadamente eficazes no controle de *R. sanguineus*. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar e determinar a toxicidade oral do acetilcarvacrol após a aplicação de doses repetidas por gavagem em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), utilizando valores de concentração baseados em estudos prévios com *R. sanguineus*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Carrapatos

Em torno de 900 espécies de carrapatos já foram descritas, pertencentes ao domínio Eucariota, reino Animal, sub-reino Metazoa, filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Ixodida. Estão distribuídos em três famílias: Nuttalliellidae, Argasidae e Ixodidae (PFÄFFLE *et al.*, 2013; REY, 2013; EPICENTRO, 2022).

São ectoparasitos hematófagos obrigatórios em pelo menos uma fase de sua vida (BARKER *et al.*, 2004). São de pequeno porte, em torno de 0,25 mm de diâmetro quando não alimentados ou pouco alimentados, achatados dorsoventralmente, com a extremidade ovalada ou elíptica e a superfície dorsal moderadamente convexa. Seu aparelho bucal é muito quitinoso, com uma única estrutura denominada capítulo ou gnatossoma, que se divide em base do capítulo, palpos, hipostômio e quelíceras. Os dois últimos formam as peças bucais (NEVES *et al.*, 2016).

Na parte dorsal do idiossoma (corpo) dos carrapatos ixodídeos encontra-se o escudo, que nos machos cobre praticamente todo o dorso, enquanto nas larvas, ninfas e fêmeas reveste aproximadamente um terço da região anterior dorsal. Na parte ventral do idiossoma estão as pernas, dispostas em quatro pares em ninfas e adultos, e apenas três pares em larvas. A abertura anal e os orifícios genitais, ausentes em larvas e ninfas, podem ser encontrados na porção posterior do ventre. Em todos os grupos de carrapatos, o ciclo de vida consiste em quatro estágios de desenvolvimento: o ovo e três fases parasitárias ativas, larva, ninfa e adultos, que podem ser divididos em machos e fêmeas (SONENSHINE; ROE, 2014; TAYLOR *et al.*, 2017).

Já os argasídeos são chamados de "carrapatos moles" por não possuírem um escudo dorsal. Os Nuttalliellidae, por sua vez, contam com apenas uma espécie descrita, *Nuttalliella namaqua*, conhecida como "fóssil vivo" pois apresenta características exclusivas tanto dos carrapatos duros quanto dos moles, o que a coloca em uma posição basal na árvore evolutiva dos carrapatos (SONENSHINE; ROE, 2014).

O método espoliativo provocado pela alimentação desses carrapatos interfere no ganho de peso ao longo da vida do animal vertebrado, podendo causar anemias severas

(NOGUEIRA *et al.*, 2020). Além disso, a inoculação de toxinas no sistema circulatório do hospedeiro pode influenciar na síntese proteica, resultando em uma desordem na quantidade de lipídeos e proteínas, com aumento no volume de gorduras (GOMES, 1998). Na saliva de várias espécies de carrapatos estão presentes neurotoxinas que podem ser inoculadas na corrente sanguínea do hospedeiro durante a alimentação do parasito, podendo bloquear a condução neuromuscular de forma ascendente, estimulando uma paralisia flácida que se instala rapidamente, dependendo do nível de acometimento, podendo ocasionar insuficiência cardíaca e até mesmo levar à morte (EDLOW; Mc GILLICUDDY, 2008). Durante o repasto sanguíneo, os carrapatos também podem estimular resposta imunológica leve ou severa, devido à saliva, que carrega uma enorme variedade de moléculas farmacologicamente ativas voltadas para facilitar o processo de sucção de sangue (ALARCON-CHAIDEZ *et al.*, 2006; NICHOLSON *et al.*, 2019). Outro dano direto não menos importante é causado pela espoliação do parasito no couro do animal da pecuária, pois, ao se prender, o carrapato introduz o hipostômio, um órgão quitinoso e serrilhado, que lesiona o couro, contribuindo para o surgimento de novas patologias secundárias, como miíases cutâneas, ocasionando grandes perdas econômicas no setor de couro na pecuária (GONZALES; SERRA-FREIRE, 1992).

Tudo isso se deve à incrível capacidade vetorial dos carrapatos de transmitirem doenças, aplicando-se às seguintes particularidades parasitárias: hábito alimentar exclusivo de sangue em todos os seus estágios de vida; boa adesão aos hospedeiros, impossibilitando sua remoção; ingurgitamento longo, permitindo ao carrapato tanto adquirir quanto inocular patógenos; adaptação a diferentes vertebrados, possibilitando a veiculação de microrganismos entre espécies distintas; grande resistência nos estágios de vida livre que ocorrem no ambiente, proporcionando tempo para a proliferação de microrganismos; transmissão transovariana, gerando descendentes com a habilidade de transmitir e funcionar como eficientes reservatórios de patógenos; raros inimigos naturais; e um grande escudo que gera resistência às intempéries ambientais, permitindo a perpetuação da espécie (HARWOOD & JAMES, 1979; SONENSHINE; ROE, 2014).

O ciclo de vida de todos os carrapatos duros consiste em quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adultos. Em cada fase de vida ativa, o carrapato se alimenta apenas uma vez, embora as fêmeas separadas à força de seus hospedeiros sejam capazes de se reafixar e continuar a ingestão de sangue. No entanto, após atingir uma massa crítica, as fêmeas desprendidas não conseguem se reconectar ao hospedeiro, embora possam produzir alguns ovócitos. Vale notar

que, após um determinado período de alimentação e o consumo de certa quantidade de sangue, as fêmeas separadas de seus hospedeiros podem realizar a oviposição (BALASHOV, 1998; SZABO, BECHARA, 1999).

O carrapato-vermelho-do-cão, *Rhipicephalus sanguineus*, é capaz de transmitir uma grande variedade de microrganismos causadores de doenças, como, por exemplo: *Ehrlichia canis*, bactéria causadora da *erliquiose monocítica* canina (GROVES *et al.*, 1975; MORAES-FILHO *et al.*, 2015); *Babesia canis vogeli*, protozoário causador da *babesiose canina* (REGENDANZ, MUNIZ, 1936; MGHIRBI, BOUATTOUR, 2008); *Hepatozoon canis*, protozoário causador da *hepatozoonose canina* (NORDGREN e CRAIG, 1984; BANETH *et al.*, 2001); *Rickettsia conorii*, bactéria causadora da febre maculosa do mediterrâneo (BRUMPT, 1932; MATSUMOTO *et al.*, 2005); *R. rickettsii*, causadora da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (DEMMA *et al.*, 2005; WIKSWO *et al.*, 2007). Além disso, esses carrapatos podem transmitir mais de um microrganismo concomitantemente em um mesmo repasto sanguíneo, permitindo que o animal hospedeiro adquira mais de uma doença ao mesmo tempo (VAIRAMUTHU *et al.*, 2012). Particularmente em suas fases de larva e ninfa, esse parasito é capaz de se alimentar em humanos com maior frequência do que se julgava anteriormente (CARPENTER *et al.*, 1990; HARRISON *et al.*, 1997; MANFREDI *et al.*, 1999), sendo possível que, nesses estágios, atue como vetor de *R. conorii* e *R. rickettsii* (PALMAS *et al.*, 2001).

2.2. Controle

O controle de ectoparasitos por meio do uso de produtos químicos ainda é a forma mais utilizada e eficaz de tratamento, tanto no meio agropecuário quanto em animais domésticos, desde que aplicado de forma adequada (GOMES *et al.*, 2011; CAMPOS, 2022). Entre os conglomerados de produtos químicos sintéticos mais utilizados no controle de carrapatos em vertebrados estão os fenilpirazóis, as lactonas macrocíclicas, as amidinas, os piretroides, os organofosforados e os carbamatos, que possuem diferentes mecanismos de ação e eficácia (FERNANDES *et al.*, 2010). Quando utilizados incorretamente e de forma indiscriminada, esses produtos aceleram a seleção de populações de carrapatos resistentes aos diferentes tipos de defensivos químicos (FREITAS *et al.*, 2004; JUNIOR *et al.*, 2005), gerando a necessidade de dosagens maiores e aplicações em intervalos menores (KLAFKE *et al.*, 2017). Além disso, esses produtos podem causar efeitos tóxicos em animais, plantas e seres humanos, bem como contaminar o solo e a água (TSABOULA *et al.*, 2016).

De modo geral, a maior parte dos carrapaticidas exerce ação neurotóxica, e os carrapatos, em contrapartida, podem desenvolver vários mecanismos de resistência ao ataque químico, uma vez que a resistência é uma característica natural da evolução de cada espécie. Como consequência, a resistência pode surgir de três formas principais: resistência metabólica e detoxificação celular, perda de sensibilidade no sítio de ação e redução da penetração do produto na cutícula do carrapato (HEMINGWAY *et al.*, 1998; OAKESHOTT *et al.*, 2003; FFRENCH-CONSTANT *et al.*, 2004).

Nas populações, ocorrem naturalmente alterações no DNA, como mutações genéticas. Quando um novo acaricida sintético é introduzido pela primeira vez para o controle de um parasito, indivíduos resistentes são raros; entretanto, com o aumento da frequência de aplicação do produto, há uma pressão seletiva nos indivíduos, resultando em um aumento no número de indivíduos resistentes. Devido ao curto ciclo de vida dos carrapatos e à sua alta fecundidade, a resistência pode se expandir e se espalhar rapidamente através da população (WOLSTENHOLME *et al.*, 2004).

2.3. Fitoterápicos

A utilização em longo prazo dos carrapaticidas tradicionais tem sido responsável pela seleção de linhagens de carrapatos resistentes, bem como por efeitos tóxicos observados em hospedeiros. Esses fatores, somados às necessidades indispensáveis de cuidado com o meio ambiente, tornam necessária a busca por produtos alternativos para o controle desses parasitos, que sejam mais ecológicos e sustentáveis (BENELLI *et al.*, 2016). Como o Brasil possui uma grande diversidade de plantas, seus derivados vêm ganhando espaço no controle populacional desses animais (ALVES *et al.*, 2012). Assim, o uso de produtos de origem vegetal contendo compostos acaricidas tem sido proposto para reduzir o impacto ambiental e econômico dos produtos sintéticos (CRUZ *et al.*, 2013; BENELLI, 2015; BENELLI *et al.*, 2016; HABEEB, 2010).

Óleos essenciais e extratos vegetais se mostram como uma alternativa promissora no controle desses parasitos, devido à ampla variedade de espécies de plantas com propriedades antiparasitárias, à grande abundância e ao baixo custo (BENELLI *et al.*, 2016). Inúmeros experimentos com extratos vegetais, óleos essenciais e princípios ativos isolados de diversas espécies de plantas têm sido realizados em todo o mundo, na tentativa de controlar populações de carrapatos em diferentes estágios de vida. Esses métodos de controle podem ocorrer tanto

por meio da mortalidade quanto pela redução do potencial reprodutivo dos parasitos, demonstrando resultados significativos (KHODADAD; MEHDI, 2007; ANDREOTTI *et al.*, 2013; CAMPOS *et al.*, 2015; PAZINATO *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias lipofílicas, voláteis, em sua maioria líquidas e odoríferas. Também podem ser denominados óleos etéreos ou óleos voláteis. Essas denominações decorrem de suas propriedades físico-químicas, como o fato de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente e possuírem aroma agradável e intenso (BRUNETON, 1995; SIMÕES; SPITZER, 1999). Embora sejam misturas complexas, contendo uma enorme quantidade de compostos diferentes, a predominância de compostos fenilpropanóides e/ou terpênicos com conformações químicas interligadas torna a sua composição relativamente simples (TAPPIN *et al.*, 2004).

A extração desses óleos pode ser feita a partir de diferentes partes da planta, como sementes, raízes, brotos, madeiras, cascas, folhas, flores e frutos. Na botânica, esses óleos desempenham funções como a atração de insetos polinizadores, aumentando a efetividade da reprodução, além de atuarem como repelentes contra insetos predadores de plantas, protegendo o tecido vegetal contra fungos e bactérias prejudiciais. Eles também podem inibir a germinação de sementes de plantas parasitos ou competidoras nas proximidades (alelopatia) (PINHEIRO, 2003).

Em uma revisão sistemática, verificou-se que os diferentes óleos essenciais estudados provocaram ação repelente, independentemente da espécie e do estágio de vida dos carrapatos. Observou-se ainda que, em testes de curto prazo, concentrações de óleos essenciais acima de 1% já causavam mais de 70% de repelência, enquanto concentrações superiores a 10% geralmente levavam à repelência total (BENELLI; PAVELA, 2018).

Compostos acaricidas presentes nos óleos essenciais de muitas plantas têm sido investigados para o controle de carrapatos, por causarem alterações em várias partes internas dos parasitos, afetando o funcionamento fisiológico e/ou metabólico, o repasto sanguíneo e a fecundação (ANHOLETO *et al.*, 2020; LIMA DE SOUZA *et al.*, 2019; REMEDIO *et al.*, 2015). Em estudos laboratoriais, plantas da família Lamiaceae, como o *Origanum bilgeri*, demonstraram grande capacidade de fornecer produtos com o princípio ativo carvacrol, molécula presente em maior concentração nos extratos vegetais dessa família, que atua no controle de carrapatos (KOC *et al.*, 2013). Em nova revisão sistemática, verificou-se que vários bioativos naturais retirados de extratos vegetais testados no Brasil têm potencial no

controle de carrapatos, sendo o carvacrol e o timol as substâncias com maior concentração nesses bioativos naturais (BRESSANIN *et al.*, 2020).

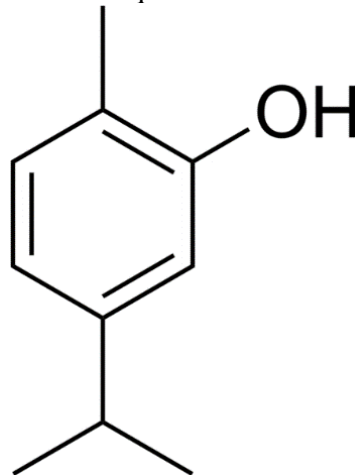
Contudo, algumas limitações dos produtos vegetais precisam ser superadas, como a baixa hidrossolubilidade, instabilidade química e alta volatilidade (GAÑÁN; BRIGNOLE, 2011). Além disso, diversos fatores podem alterar a quantidade, qualidade e composição dos extratos vegetais, como temperatura, maturidade da planta, constituição do solo, volume de água, parte da planta utilizada para a extração, predadores naturais, composição do ar, clima, nutrientes, altitude e intensidade luminosa (BAKKALI *et al.*, 2008; SIMÕES *et al.*, 2003).

2.4. Carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) (Figura 1) é um monoterpeneo fenólico com fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$. Está presente em várias espécies de plantas medicinais e aromáticas, especialmente no tomilho (*Thymus* sp.) e no orégano (*Origanum* sp.), assim como seu isômero, o timol (KULISIC *et al.*, 2004; SANTORO *et al.*, 2007). Em temperatura ambiente, apresenta-se na forma líquida, de cor amarelo claro, com densidade de 0,975 g/mL, odor aromático semelhante ao do orégano e coeficiente de partição n-octanol/água de 3,52. Seu ponto de fusão é de 2°C e seu ponto de ebulição varia entre 234°C e 236°C (NEVES, 2009). O carvacrol tem alta afinidade com produtos oleosos (lipofílico), baixa solubilidade em água e características pungentes. Há muito tempo é utilizado em larga escala como aditivo pela indústria alimentícia, por ser capaz de conservar alimentos (BASER, 2008; GUARDA *et al.*, 2011).

Os monoterpeneos pertencem a um grande e diverso grupo de compostos químicos chamados terpenos, e são representantes de uma classe de compostos orgânicos de ocorrência natural cuja estrutura química 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 1. Estrutura química do carvacrol.



Fonte: PEIXOTO-NEVES *et al.*, (2010).

O carvacrol, assim como seu isômero, o timol, apresenta boas propriedades toxicológicas e provoca pouca irritação epidérmica quando aplicado em baixas concentrações. Posto isso, intensificou-se o interesse pelo uso desse princípio ativo como promotor de penetração cutânea para melhorar a administração de fármacos por via tópica (CHANTARSAT, 2009).

Após a exposição e metabolização, o carvacrol é eliminado depois de 24 horas, em quantidades decrescentes na urina (SCHELIN, 1991). Este composto foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA, Estados Unidos) para uso em alimentos e seu emprego foi incorporado pelo Conselho da Europa na lista de aromas químicos que podem ser adicionados a alimentos em níveis de até 2 ppm em bebidas, 5 ppm em comidas e 25 ppm em doces (DE VINCENZI *et al.*, 2004). O carvacrol também demonstrou atividade antioxidante, comparável à de vários óleos essenciais. Antioxidantes protegem as células de danos causados por radicais livres, atuando na prevenção e neutralização do dano oxidativo, o que é essencial para a manutenção da saúde e prevenção de doenças (ANTHONY *et al.*, 2012).

Segundo Lai *et al.* (2012), o carvacrol mostrou atividade antiviral contra o Herpes Simplex tipo 1, possivelmente devido à sua interação com o envelope viral. Sua aplicação tópica pode ser uma alternativa mais acessível para o tratamento dessas infecções. Também apresentou atividade fungicida contra cepas de *Candida albicans*, enquanto o fluconazol, utilizado como controle, exibiu efeito fungistático. A ação antifúngica do carvacrol foi atribuída à inibição da biossíntese de ergosterol e à indução de porosidade na membrana do fungo (AHMAD *et al.*, 2011). Além disso, o carvacrol demonstrou forte atividade antibacteriana contra onze espécies de bactérias patogênicas para seres humanos, superando até a estreptomicina, um antibiótico usado como controle. Sua ação antimicrobiana está

relacionada à sua estrutura fenólica, que pode interferir em enzimas da parede celular bacteriana, como quitina sintetase ou quitinase (SOKOVIC *et al.*, 2010). O carvacrol também apresentou atividade significativa contra parasitos, com uma concentração letal média (CL50) de 3,0 µg/mL contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* e de 28,0 µg/mL contra a forma promastigota de *Leishmania chagasi* (ESCOBAR *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais de *Origanum minutiflorum* e *O. onites* L., ricos em carvacrol, demonstraram propriedades inseticidas contra o mosquito *Culex pipiens* L. A eficácia larvicida foi positivamente correlacionada com a concentração de carvacrol nos óleos, sugerindo que o acúmulo de carvacrol nas plantas aumenta sua ação inseticida (CETIN; YANIKOGLU, 2008). O uso de óleos essenciais contendo carvacrol também causou alta mortalidade de carrapatos. Em *Rhipicephalus turanicus*, o óleo de *O. bilgeri* e o carvacrol resultaram em mortalidade de 73,30% e 70,00%, respectivamente, em fêmeas adultas, mesmo em baixas concentrações (KOC *et al.*, 2013). As concentrações letais de carvacrol diluído em álcool para matar 50% (CL50) e 90% (CL90) de *R. turanicus* foram de 2,34% e 7,12%, respectivamente, e o carvacrol causou mortalidade total após seis horas de exposição (COSKUN *et al.*, 2008).

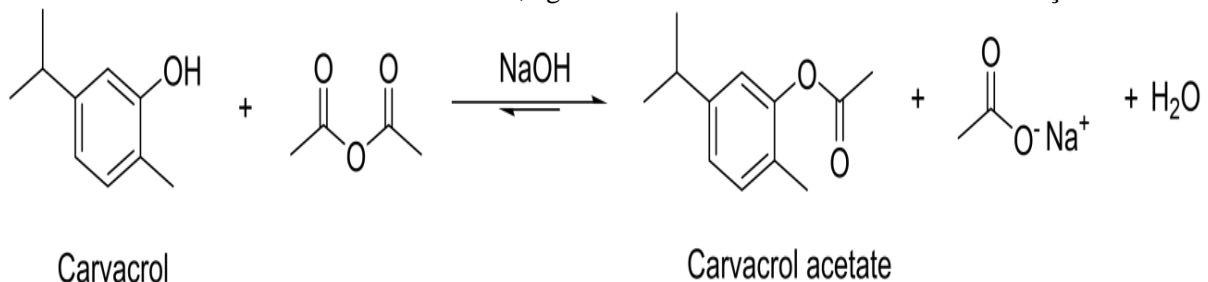
O óleo essencial de *Lippia* sp., que apresenta em sua composição o carvacrol como composto majoritário, na concentração de 5 mg/mL, foi capaz de matar 100% das larvas de *Rhipicephalus microplus*, enquanto a dosagem de 50 mg/mL apresentou 98% de eficácia contra fêmeas totalmente alimentadas (LAGE *et al.*, 2013). A exposição dos animais ao extrato de *Lippia* sp. resultou em 50% de mortalidade de larvas e fêmeas totalmente alimentadas nas dosagens de 1,31 mg/mL e 4,66 mg/mL, respectivamente. Já o carvacrol, nas concentrações de 0,22 mg/mL e 4,46 mg/mL, também causou 50% de mortalidade em larvas e fêmeas, respectivamente (CRUZ *et al.*, 2013). O carvacrol diluído em álcool demonstrou bom potencial no controle reprodutivo de *R. microplus*. Na concentração correspondente a 100% da CL50 (20,11 mg/mL), reduziu a oviposição em 61,59%, com 61,10% de eficácia, impactando diretamente o ciclo de vida do parasito e diminuindo o número de indivíduos nas gerações futuras (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2019). Em larvas de *R. microplus* em jejum, as concentrações letais 50 (CL50) e 90 (CL90) do carvacrol foram 0,83 mg/mL e 2,02 mg/mL, respectivamente. Além disso, a dosagem de 2,50 mg/mL causou 100% de mortalidade nestes animais (NOVATO *et al.*, 2018). O carvacrol dissolvido em álcool a 50% (2,50 µL/mL) mostrou toxicidade contra larvas e ninfas de *A. cajennense*, com mortalidade de 45% e 64,60%, respectivamente. Na mesma dosagem, causou 100% de mortalidade em larvas e

ninfas de *R. sanguineus* (SENRA *et al.*, 2013). Plantas medicinais, como *L. origanoides*, têm o carvacrol como principal componente do óleo essencial. Testes de toxicidade desse extrato em ratos Wistar não revelaram alterações significativas nos parâmetros bioquímicos, histopatológicos, hematológicos, no peso ou no comportamento dos animais (ANDRADE *et al.*, 2014).

2.5. Acetilcarvacrol

Através de um processo químico de substituição nucleofílica acílica, ou acetilação, o carvacrol é convertido em acetilcarvacrol, um acetato de 5-isopropil-2-metilfenol. A substituição do grupo hidroxila pelo grupo éster no carvacrol pode trazer maior segurança e eficácia, aumentando a estabilidade do composto. Por essa razão, a síntese desse derivado visa obter um perfil farmacológico aprimorado e menor toxicidade para organismos não alvo (DAMASCENO *et al.*, 2014; SOLOMONS *et al.*, 2016; PUB CHEM, 2018).

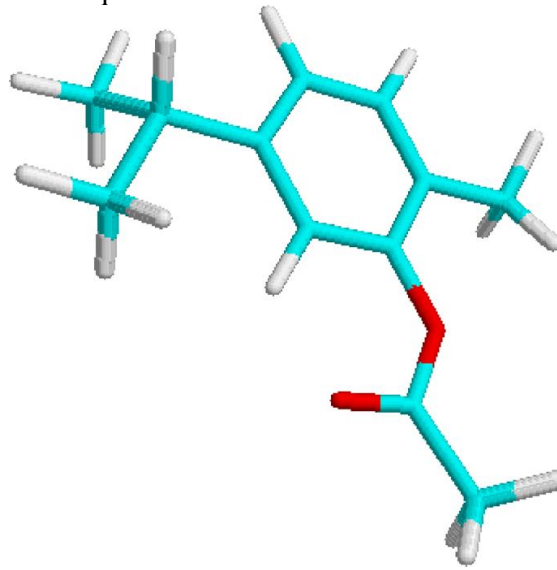
Figura 2. Síntese de acetilcarvacrol a partir da reação do carvacrol com anidrido acético e hidróxido de sódio. Além do acetilcarvacrol, água e acetato de sódio são formados na reação.



Fonte: OLIVEIRA *et al.* (2020).

A fabricação do acetilcarvacrol ocorre pela reação entre anidrido acético, carvacrol e hidróxido de sódio, resultando na formação de acetilcarvacrol, além de acetato de sódio e água (Figuras 2 e 3) (SOLOMONS *et al.*, 2016). A adição de um radical acetil à estrutura molecular do carvacrol aumenta sua lipofilicidade, facilitando sua penetração no exoesqueleto de artrópodes (MORAES *et al.*, 2013). Assim, compostos acetilados surgem como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos produtos químicos com propriedades antiparasitárias (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Figura 3. Estrutura química e estrutura tridimensional do acetilcarvacrol.



Fonte: PIRES *et al.* (2014).

Quatro tipos distintos de bactérias, incluindo *Bacillus polymyxa*, *B. megaterium*, *B. subtilize*, *Bradyr hizobium japonicum*, foram submetidos a tratamento com acetilcarvacrol em uma concentração de 20,00 mg/mL, dissolvido em acetona. Esse composto exibiu uma ação antibacteriana eficaz, superando a bioatividade do carvacrol, seu composto original (NIKUMBH *et al.*, 2003).

Quando diluído em Tween 80, o acetilcarvacrol demonstrou atividade contra nematódeos gastrointestinais de ovelhas, especificamente *Haemonchus contortus*. Apesar de terem sido utilizadas doses mais elevadas em comparação ao carvacrol, houve uma inibição significativa na conversão larval, além de um aumento na mortalidade das larvas conforme a dosagem foi incrementada (ANDRÉ *et al.*, 2016).

Homogeneizado em DMSO a 0,05%, o acetilcarvacrol revelou-se pioneiro ao apresentar atividade anti-helmíntica contra adultos de *Schistosoma mansoni*, paralisando sua movimentação e levando à morte de 100% dos parasitos em concentrações de 10,00 µg/mL. Além disso, a substância mostrou uma inibição significativa da produção de ovos diários, com efeito notável a partir de 3,12 µg/mL ao longo do período de observação (MORAES *et al.*, 2012).

Carvacrol e acetilcarvacrol foram avaliados em diferentes fases de desenvolvimento do carrapato-do-boi, *R. microplus*. Na fase larval, o acetilcarvacrol foi responsável por taxas de mortalidade mais elevadas. No estágio adulto, tanto na redução da oviposição quanto no bloqueio da eclosão das larvas, ambos os compostos exibiram efeitos semelhantes e em

proporções comparáveis. Entretanto, nos demais testes realizados na fase adulta de *R. microplus*, o acetilcarvacrol mostrou-se mais eficaz como agente carrapaticida (RAMÍREZ *et al.*, 2016).

Em outro estudo, carvacrol e acetilcarvacrol foram avaliados em larvas do carrapato-do-boi em jejum. O acetilcarvacrol mostrou-se menos letal, exigindo uma concentração 50,00% maior para alcançar o mesmo nível de mortalidade de 100,00% obtido com o carvacrol. Segundo os autores, essa diferença pode estar relacionada à ausência do grupo hidroxila na molécula do acetilcarvacrol, o que reduz sua atividade em carrapatos nessa fase (NOVATO *et al.*, 2018). No entanto, vale mencionar que Novato *et al.* (2018) utilizaram álcool absoluto como solvente, e o uso de outros solventes pode gerar resultados diferentes (KARAASLAN *et al.*, 2018).

Foi avaliado o potencial acaricida do acetilcarvacrol contra fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. Por meio do teste de imersão em adultos (AIT), os autores definiram que as concentrações de 2,8 e 7,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ são suficientes para induzir 50% e 90% de mortalidade (CL50 e CL90) em animais expostos em jejum. Além disso, o composto induziu alterações morfológicas significativas no exoesqueleto dos carrapatos, observadas na cutícula e no epitélio (OLIVEIRA *et al.*, 2020). König *et al.* (2021) encontraram valores de 17,8 e 26,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para a CL50 e CL90, respectivamente, após a exposição de *R. sanguineus* s.l. ingurgitados ao acetilcarvacrol. Isso indica que carrapatos pós-alimentação requerem quantidade maior do produto para morrer em comparação com carrapatos em jejum. Além disso, o acetilcarvacrol mostrou capacidade de alterar a morfologia dos órgãos reprodutivos das fêmeas de *R. sanguineus* s.l., causando danos aos ovos e, assim, impedindo a eclosão de novas larvas. Essas alterações foram dose-dependentes, com os melhores resultados observados no grupo exposto à maior concentração do produto (4,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (KONIG *et al.*, 2020).

Foi sugerido que o acetilcarvacrol tem maior potencial para ser explorado como um composto alternativo para o tratamento de transtornos de ansiedade sem afetar a função psicomotora nas doses aplicadas em ratos (PIRES *et al.*, 2013). Há evidências de que provavelmente atue no sistema GABAérgico, mas não no receptor 5-HT1A. Além disso, é necessária uma dose menor de acetilcarvacrol para obter efeitos ansiolíticos em comparação ao seu precursor carvacrol, o que se acredita aumentar a segurança do uso da droga (MELO *et al.*, 2010).

2.6. Efeitos do carvacrol e acetilcarvacrol em vertebrados

Embora muitos estudos tenham demonstrado a atividade acaricida de alguns substâncias vegetais em laboratório, ainda são necessários muitos outros antes que esses produtos possam ser utilizados em hospedeiros vertebrados e validados como estratégia de controle (ARAÚJO *et al.*, 2016). Ao contrário da crença popular, o uso de plantas medicinais não está isento de riscos, pois a mesma planta pode conter substâncias tóxicas além da substância ativa (GOODMAN, 2006).

O óleo essencial de *Origanum vulgare*, cujo principal componente é o carvacrol, não causou efeitos tóxicos quando administrado por via oral e intravaginal em ratos Wistar por 30 dias, uma vez que não houve alterações na massa dos órgãos, no peso corporal nem nos parâmetros sanguíneos e histopatológicos (CLEFF *et al.*, 2008). Após a administração do complexo carvacrol/beta-ciclodextrina por via oral em ratos Wistar, não foram encontradas alterações no hemograma, e concluiu-se que o produto não causou hepatotoxicidade em relação ao grupo controle, já que não houve alterações nos níveis séricos de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase). A complexação com beta-ciclodextrina aumentou a estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade do monoterpene (RIBEIRO *et al.*, 2019).

Este trabalho mostra que em toda a massa cefálica, há uma composição rica em lipídios, mais suscetível do que qualquer outro órgão aos produtos da peroxidação lipídica, ou seja, à degradação oxidativa dos lipídios pelos radicais livres (COSTA *et al.*, 2012). A estrutura química do acetilcarvacrol possui três hidrogênios benzílicos e três alfa-hidrogênios que podem facilmente se ligar a radicais livres e neutralizá-los, conferindo a esse composto a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e promover efeitos antioxidantes no hipocampo (PIRES *et al.*, 2014).

Todos esses resultados sugerem que o acetilcarvacrol pode prevenir e tratar doenças neurodegenerativas cujas hipóteses fisiopatológicas incluem superprodução de radicais livres e deficiência de enzimas antioxidantes (PIRES *et al.*, 2014). Efeitos anti-inflamatórios, como a inibição de histamina, serotonina e prostaglandinas, bem como a redução da degranulação de mastócitos, a inibição de citocinas pró-inflamatórias, a redução da migração de neutrófilos e a antinocicepção por meio das vias da capsaicina e do glutamato, foram observados após a administração de acetilcarvacrol em ratos (DAMASCENO *et al.*, 2014).

Esse estudo mostra, que após três aplicações orais de carvacrol na dose de 810 mg/kg de peso corporal (0, 24 e 48 horas), não foram observadas alterações histopatológicas ou efeitos genotóxicos no estômago e fígado de ratos (LLANA-RUIZ-CABELLO *et al.*, 2016). No entanto, a exposição ao carvacrol causou severa irritação cutânea após aplicação dérmica em coelhos na dose de 2.700 mg/kg, visto que o composto permaneceu em contato com a pele por 24 horas, fixado com gaze nas primeiras 6 horas (MCOMIE *et al.*, 1949). A dose letal média estimada (DL50) de carvacrol administrado por via intravenosa e intraperitoneal em camundongos foi de 80 mg/kg de peso corporal e 73,3 mg/kg de peso corporal, respectivamente (ANDERSEN, 2006).

O extrato vegetal de *Chenopodium ambrosioides*, que contém carvacrol em sua composição, e o carvacrol isolado foram comparados quanto à toxicidade em células e organelas de diferentes mamíferos, como rato, camundongo e boi. O carvacrol apresentou toxicidade significativamente menor do que o óleo essencial de *C. ambrosioides* (MONZOTE *et al.*, 2009). Também não houve alterações no comportamento de camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) submetidos ao teste de toxicidade aguda, nas dosagens de 250, 500, 1000 e 2000 mg/ml de carvacrol, observados por 15 dias (ANDRÉ *et al.*, 2016).

Comparado ao carvacrol, o acetilcarvacrol apresentou baixa toxicidade aguda em camundongos. Após administração oral em ratos, o DL10 e DL50 de acetilcarvacrol foram calculados em 566,7 e 1.544,5 mg/kg, respectivamente, e DL10 = 546,8 e DL50 = 919 mg/kg para carvacrol (ANDRÉ *et al.*, 2016).

Foi demonstrado que doses orais únicas de acetilcarvacrol de até 2.000 mg/kg em camundongos não causaram mortalidade nem sinais de toxicidade (OLIVEIRA *et al.*, 2020). No entanto, mortalidade, hipoatividade e fraqueza foram observadas em camundongos recebendo acetilcarvacrol na dose de 2.000 mg/kg (DL50 = 2.287 mg/kg, i.p.) administrado por via intraperitoneal. A DL50 oral é, portanto, superior a 2.000 mg/kg, o que permite sua inclusão na categoria 5 de substâncias com toxicidade aguda relativamente baixa, segundo o Sistema Globalmente Harmonizado (GHS, 2007). No mesmo estudo, não foram observadas alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos quando o acetilcarvacrol foi administrado em diferentes doses. Os parâmetros hepáticos (ALT e AST), de função renal (ureia e creatinina) e metabólicos (glicose, triglicerídeos e colesterol total) não apresentaram alterações em relação ao grupo controle, indicando ausência de efeitos colaterais como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Em um teste de toxicidade aguda, camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) fêmeas foram divididos aleatoriamente em nove grupos de tratamento: os grupos G1 a G4 receberam 500, 1.000, 2.000 e 4.000 mg/ml de acetilcarvacrol; os grupos G5 a G8 receberam 250, 500, 1.000 e 2.000 mg/ml de carvacrol; e o grupo G9 recebeu Tween 80 a 1% (grupo controle). Os tratamentos foram administrados por gavagem esofágica, e o composto acetilado demonstrou ser menos tóxico em camundongos, mesmo quando utilizada o dobro da dosagem de carvacrol, sem alterações no comportamento e mortalidade (ANDRÉ *et al.*, 2016).

Em um experimento de toxicidade subcrônica em ratos tratados com acetilcarvacrol (250 mg/kg/dia por via oral durante 28 dias), as análises bioquímicas e hematológicas mostraram que os parâmetros não foram significativamente diferentes em relação ao grupo controle. No entanto, foram observadas alterações no fígado (inchaço dos hepatócitos, hipertrofia das células de Kupffer e oclusão das veias porta e centrolobular), nos rins (edema moderado e vacuolização no epitélio tubular e nas camadas hialinas) e no baço (ectasia e pigmentos sugestivos de lipofuscina e hemossiderina), além de resposta inflamatória nesses três órgãos (ANDRÉ *et al.*, 2020).

Esses estudos mostram que a administração por longos períodos pode causar maior toxicidade, mesmo em concentrações mais baixas de acetilcarvacrol. Por esse motivo, é importante realizar estudos com doses comprovadas para controle de carrapatos. A dificuldade em encontrar informações na literatura para análise e discussão da toxicidade do acetilcarvacrol reforça a necessidade de mais pesquisas para subsidiar estudos pré-clínicos e garantir o uso seguro desse composto em humanos e animais não humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

2.7. Produção de fármacos

O caminho desde a criação de uma molécula promissora até sua utilização como produto de uso comercial é longo, caro e bastante complexo, principalmente nas etapas de pesquisa básica (seleção da molécula-alvo) e na fase pré-clínica (uso de animais de experimentação para confirmação de eficácia e segurança/toxicidade molecular) (KNOP; MARIA, 2016). A metodologia de desenvolvimento de um novo composto inicia-se com a descoberta ou síntese de uma nova molécula, muitas vezes guiada pelo conhecimento empírico das características terapêuticas já comprovadas em produtos naturais provenientes de plantas, insetos, fungos e bactérias (TRIST, 2011).

A molécula, então, é desenvolvida, ou seja, sua estrutura é projetada de acordo com os receptores de regiões preestabelecidas, nas quais se deseja o efeito. Após a identificação de um composto modelo, as moléculas candidatas são otimizadas para melhorar sua eficácia, levando em consideração os parâmetros farmacocinéticos observados (ELEBRING, 2012).

Antes de iniciar os testes toxicológicos pré-clínicos em células, órgãos, tecidos e animais, é realizada uma série de ensaios, acompanhada da correspondente caracterização dos dados obtidos, a fim de escolher a molécula que melhor se adapta à finalidade terapêutica para a qual foi criada, considerando seu mecanismo de ação e sua seletividade para receptores-alvo (NASCIUTTI, 2012).

O composto candidato é, então, submetido a uma série de testes toxicológicos pré-clínicos para detectar perigos e analisar riscos. A identificação do perigo inclui tanto o grau de gravidade de um novo composto no organismo quanto a possível reversibilidade ou irreversibilidade, ou seja, determina-se o tipo e o grau de toxicidade, a relação dose-resposta, e são gerados dados sobre a atividade e o efeito da nova substância química na região-alvo e, na maioria das vezes, o modo de toxicidade. Uma vez concluída a identificação do perigo e a avaliação do risco, inicia-se a extrapolação das informações de animais para ensaios clínicos (DENNY; STEWART, 2013).

Apesar do forte investimento da indústria farmacêutica no desenvolvimento de medicamentos, o ritmo de lançamento de novos produtos não acompanha esse investimento, pois 99,9% dos compostos estudados são considerados obsoletos ou tóxicos antes do início dos ensaios clínicos (DORATO; VODICNIK, 2001).

2.8. Avaliação da toxicidade

O potencial tóxico de um composto químico para um organismo depende de vários fatores, e vale salientar que não existem substâncias químicas sem toxicidade. Os principais fatores que influenciam a toxicidade de um composto químico são: frequência da exposição, duração da exposição e via de administração. Existe uma relação direta entre a frequência e a duração da exposição na toxicidade de uma substância. A toxicidade de uma substância pode ser classificada de várias formas: pelo tempo de resposta, que é dividido em agudo, subcrônico e crônico; e pela severidade, que pode ser leve, moderada ou severa, sendo a toxicidade reversível rapidamente, reversível a longo prazo ou irreversível (DUX; STALZER, 1998).

Para a Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA), há uma classificação de toxicidade diferente: os níveis de toxicidade — leve, moderada e severa — são subdivididos em toxicidade local aguda, sistêmica aguda, local crônica, sistêmica crônica, desconhecida, imediata e retardada, todos dependendo do local, frequência, duração e resposta da exposição para serem classificados (EPA, 2022).

Um estudo toxicológico é uma avaliação preliminar e estimada das características tóxicas de um composto químico, com o objetivo de obter informações sobre os riscos à saúde dos usuários. O uso de ratos, camundongos e coelhos como modelos experimentais é comum nesse tipo de pesquisa, devido ao seu pequeno tamanho, potencial reprodutivo, sensibilidade, menores quantidades de substância administrada, cepas isogênicas definidas e características fisiológicas conhecidas (VRBANAC *et al.*, 2013). A análise do potencial de toxicidade deve ser realizada por meio de exames clínicos, laboratoriais e histopatológicos dos animais após exposição às substâncias ativas em diferentes intervalos de tempo. A avaliação da toxicidade prediz o risco e reduz a probabilidade de falha de compostos promissores nas fases avançadas do processo de pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco, evitando assim a perda de recursos materiais e financeiros (ROZZA; PELLIZZON, 2013).

Os testes de toxicidade pré-clínicos são uma ótima maneira de analisar os potenciais efeitos nocivos das substâncias, pois são realizados sob alto controle em relação às condições de exposição, populações expostas e detecção dos efeitos da exposição. Com eles, é possível manipular modelos experimentais em condições pré-determinadas, coletar dados sobre os mecanismos de ação da droga, medir tipos de reações e identificar seus efeitos no organismo hospedeiro. Entretanto, existem limitações para essas análises, como a incerteza associada à extrapolação de dados de modelos experimentais para indivíduos que vivem em situações ambientais e estilos de vida não controlados, bem como diferenças nas doses aplicadas e na janela terapêutica (BECK *et al.*, 2001).

O hemograma é a forma mais direta e prática de estudar os elementos do sangue periférico. Essas estruturas celulares mudam durante quase todas as doenças (SANDERSON; PHILIPS, 1981). Essas alterações são praticamente inespecíficas, comuns a diversas patologias, mas fornecem valiosas informações para diagnósticos sobre o sistema sanguíneo e outros sistemas orgânicos, além de informações sobre prognóstico, resposta ao tratamento e recuperação (DUNCAN; PRASSE, 1982). A maioria das doenças hematológicas pode ser identificada por anormalidades específicas nos resultados, e muitas vezes o sangue pode

fornecer valiosas informações diagnósticas na identificação de condições patológicas (GUIMARÃES, 1990).

Muitos estudos biológicos dependem de algum tipo de análise bioquímica, na qual uma determinada molécula é detectada e medida quantitativamente através de um protocolo ou ensaio específico (COOPER, 1977). Os testes bioquímicos têm o objetivo de avaliar as inúmeras funções metabólicas exercidas pelos órgãos e tecidos, entregando resultados diretos, satisfatórios e de fácil compreensão e interpretação. Inúmeros testes especializados em avaliar a função de uma variedade de órgãos e tecidos podem ser realizados (GAW *et al.*, 2015).

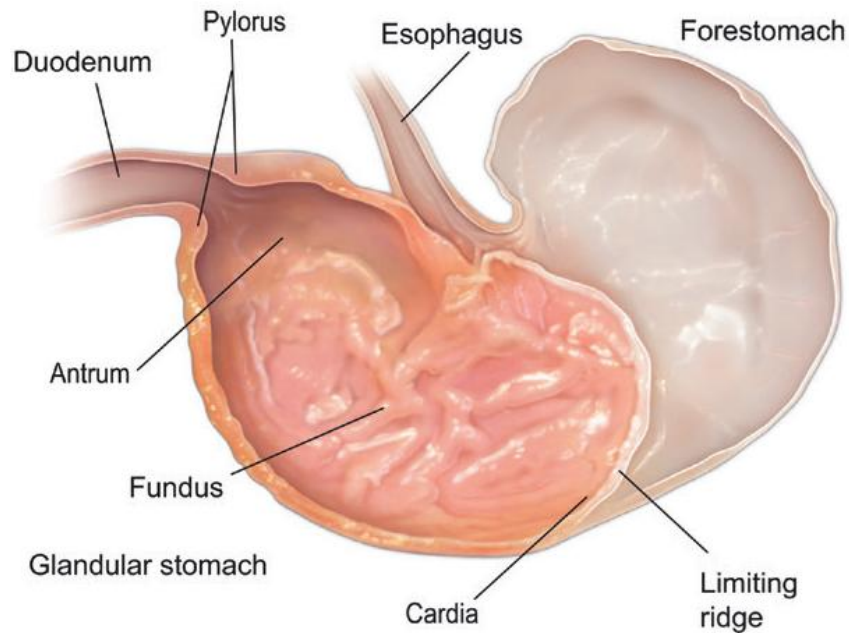
O exame histopatológico, por sua vez, é essencialmente uma análise detalhada de tecido biológico sob um microscópio, realizada por um profissional especializado. Essa análise é crucial para identificar qualquer anormalidade ou lesão que possa estar presente no tecido, seja ela benigna ou maligna. Os histopatologistas são treinados para interpretar as alterações teciduais e fornecer informações precisas sobre a natureza, gravidade e extensão de qualquer condição patológica presente. Essas informações são fundamentais para o diagnóstico correto e adequado de doenças (KIERSZENBAUM, 2008).

2.9. Anatomia e fisiologia dos órgãos

2.9.1. Estômago

O estômago do rato é dividido em duas partes: o pré-estômago, ou porção da cárdia, que não é glandular; e o corpo, ou porção pilórica, que é glandular (Figura 4). O estômago de pequenos roedores possui uma porção sem glândulas, que é uma extensão à esquerda do corpo do animal, a qual parece não fazer parte do estômago e ocupa cerca de três quintos da área total. O estômago glandular (corpo), por sua vez, é dividido em fundo e piloro (ou antro) e se comunica com o duodeno no anel pilórico (Figura 4) (HORN *et al.*, 2013).

Figura 4. Esquema do estômago de rato. O estômago do roedor é dividido em duas regiões: estômago anterior não glandular e estômago glandular. O estômago glandular é subdividido na pequena cárdia, adjacente à crista limitante; no fundo, onde a mucosa é dobrada em rugas, que são mais proeminentes no rato; e no antro, que possui mucosa relativamente lisa. A crista limitante é a divisão visível e ligeiramente elevada entre as regiões não glandular e glandular, chamada de crista limitante gástrica.



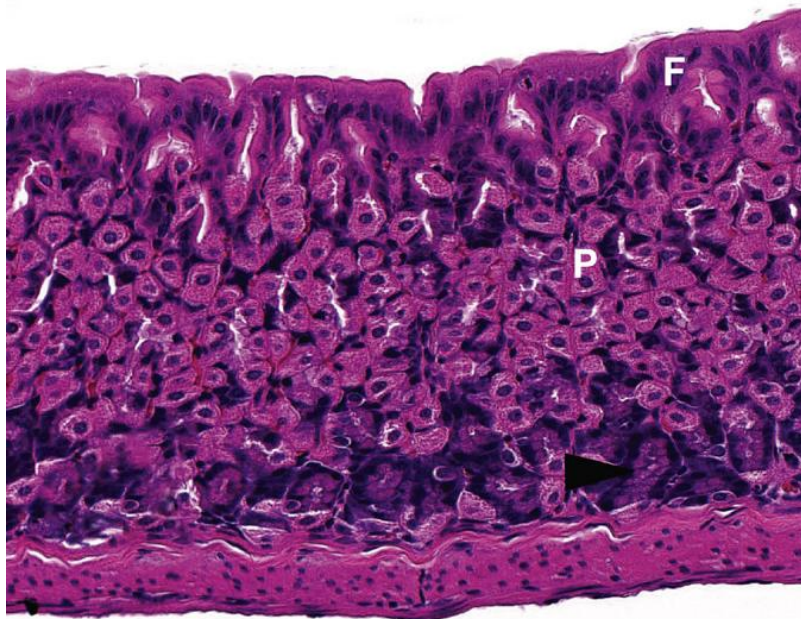
Fonte: TREUTING *et al.* (2017).

A superfície mucosa do estômago é marrom-esbranquiçada. A fronteira entre o estômago anterior e o estômago glandular é formada por uma estrutura elevada distinta, denominada crista limitante. No estômago glandular, o fundo aparece como uma mucosa rugosa e avermelhada ao longo da curvatura maior, e o píloro (antro), como uma mucosa relativamente esbranquiçada ao longo de sua curvatura menor. A mucosa é mais espessa na região do fundo. O sangue é fornecido ao estômago pelo tronco celíaco, que é o primeiro ramo da aorta abdominal (GREENE, 1963).

A mucosa do estômago na região não glandular do rato é coberta por epitélio escamoso estratificado fortemente cornificado, com cerca de duas a três camadas de espessura. A crista limitante forma uma borda elevada, resultado do dobramento na junção entre o epitélio escamoso e o colunar. A superfície mucosa da crista limitante se projeta para dentro do lúmen, e essa protuberância é facilmente reconhecida no corte histológico. A

mucosa do estômago glandular é composta por células colunares que formam numerosas fossas gástricas, as quais se encontram na lâmina muscular da mucosa e se abrem no lúmen (Figura 5). As glândulas fúndicas são compostas por epitélio foveolar (superficial) e secretam através das células principais (zimogênicas, pépticas), parietais (oxínticas) e mucosas do pescoço (acessórias) (JONES *et al.*, 1997).

Figura 5. O corte histológico da região fúndica do roedor corresponde à maior porção do estômago glandular. Ele é revestido por glândulas gástricas simples e ramificadas, que parecem relativamente retas em corte. As células secretoras de muco, colunares foveolares (F), revestem a parte superior superficial da glândula gástrica. As células parietais, claras e eosinofílicas (P), que secretam ácido, ocupam as seções intermediárias, enquanto as células principais, que secretam zimogênio e possuem coloração mais escura (ponta de seta), revestem a região basal das glândulas retas simples.



Fonte: TREUTING *et al.* (2017).

O estômago de ratos pode sofrer alterações quando exposto a diversas substâncias. A solução aquosa de etanol a 50%, por exemplo, foi administrada por via oral em ratos machos e fêmeas, revelando lesões extensas no epitélio da mucosa, com descamação e ruptura das células superficiais, hemorragia, lesões necróticas profundas, aumento da migração de leucócitos, extenso edema, vasodilatação e úlceras gástricas (UNLUÇERÇI *et al.*, 1999; SANPINIT *et al.*, 2023).

O estudo de Motawi et al. (2013), investigou a toxicidade da cisplatina (CP), do 5-fluorouracil (FU) e da mitomicina C (MMC) no estômago de ratos machos Wistar, que ocasionaram várias alterações morfológicas. Ratos tratados com CP apresentaram dilatação cística glandular na região do fundo, infiltração de células inflamatórias, vasos sanguíneos congestionados, e hemorragias foram detectadas na lâmina própria da camada mucosa do estômago não glandular. A região do fundo apresentou dilatação cística glandular com extravasamento focal de hemácias, e no piloro foi observada a descamação da mucosa.

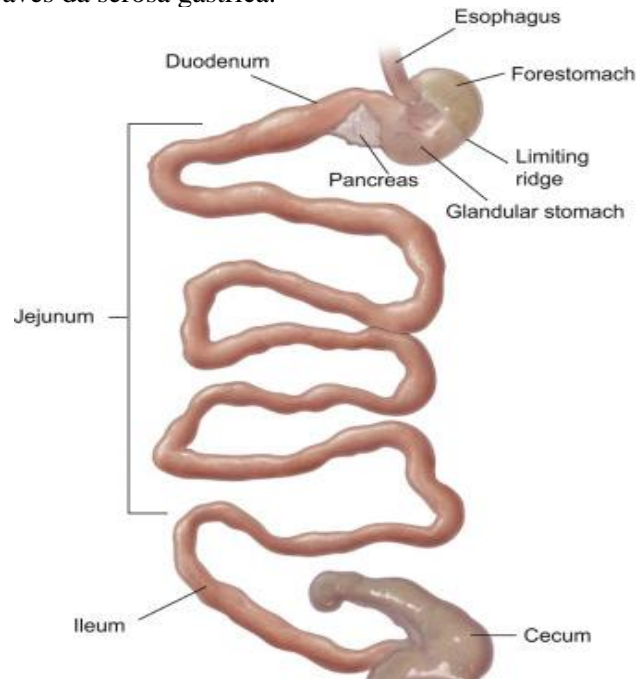
Os ratos tratados com FU apresentaram leve dilatação cística glandular na porção glandular do fundo, associada à infiltração de células inflamatórias na lâmina própria do piloro. Além disso, os ratos tratados com FU exibiram hiperqueratose com proliferação no epitélio estratificado da mucosa do estômago não glandular, associado à dilatação cística grave com achatamento no epitélio de revestimento e descamação de células epiteliais no lúmen das glândulas fúndicas (MOTAWI *et al.*, 2013).

Ratos tratados com MMC, por sua vez, exibiram hiperqueratose na camada mucosa de revestimento, hiperplasia com espessamento no epitélio estratificado da mucosa de revestimento no estômago anterior, bem como hiperplasia nas células epiteliais que revestem a camada mucosa do fundo e hiperplasia, juntamente com descamação da mucosa no piloro (MOTAWI *et al.*, 2013).

2.9.2. Intestino Delgado

O intestino delgado dos ratos adultos da linhagem Wistar está localizado na cavidade abdominal e é dividido em três regiões. A primeira é o duodeno, a região mais curta, que representa uma importante porção do intestino delgado, com formato em "C". Seu comprimento é de aproximadamente 10 cm, até que se une ao jejuno. O jejuno é a região mais longa do intestino delgado, com cerca de 140 cm de comprimento, e se estende até o íleo, que mede cerca de 20 cm e está unido ao intestino grosso por um esfíncter de músculo liso (Figura 6) (DRAKE; VOGL; MITCHEL, 2015; OTTO *et al.*, 2015).

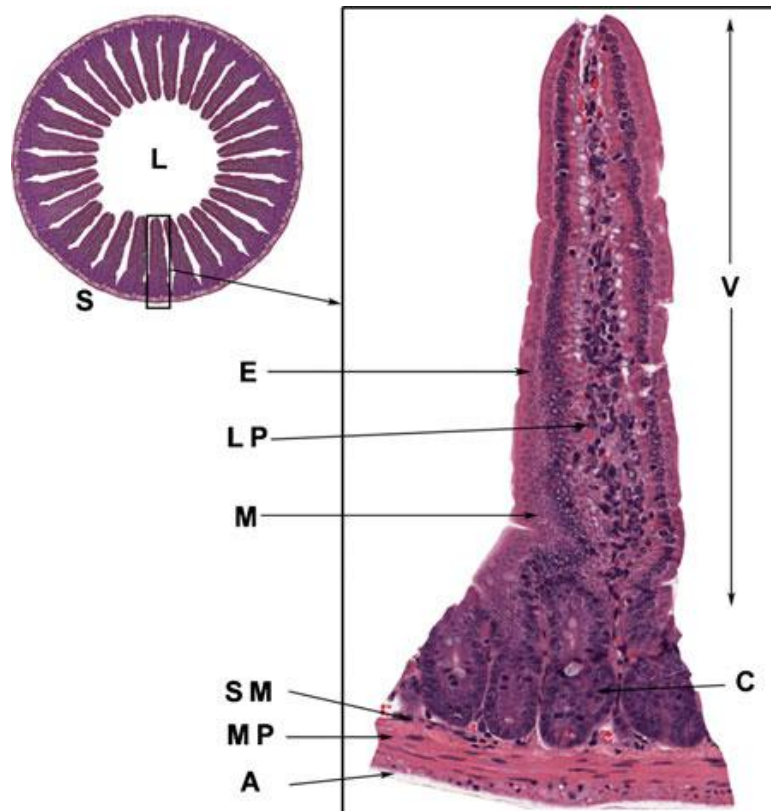
Figura 6. Esquema de intestino delgado de rato. A maioria dos anexos mesentéricos não foram representados. Uma pequena quantidade de pâncreas normalmente está firmemente aderida ao duodeno, ao nível do ducto pancreático. As duas regiões gástricas são reconhecíveis através da serosa gástrica.



Fonte: TREUTING *et al.* (2017).

O intestino delgado é responsável pelas atividades de absorção dos nutrientes ingeridos na alimentação, pelo transporte do quimo e pela secreção de substâncias, representando a maior parte do trato gastrointestinal. A parede do intestino delgado é composta por quatro camadas principais. Do centro para fora da circunferência do intestino delgado, essas camadas estão dispostas na seguinte ordem: mucosa (que consiste nas vilosidades e glândulas intestinais), submucosa, muscular (uma camada interna e outra externa) e serosa (Figura 7). Esta última camada costuma não ser conservada em estudos histológicos desse órgão (SHA *et al.*, 2006; RANDALL *et al.*, 2011).

Figura 7. Fotomicrografia de intestino delgado de rato em corte transversal. A mucosa (M) reveste o lúmen (L) e consiste em epitélio (E) sustentado pela lâmina própria (LP). Abaixo da mucosa encontra-se a submucosa (SM) e a muscular própria (MP). A adventícia (A) é a camada externa e é chamada de serosa (S) nas partes do intestino cobertas por mesotélio. A mucosa é formada por vilosidades (V) e criptas intermediárias (C).



Fonte: RANDALL *et al.* (2011).

De forma semelhante ao que ocorre no estômago, o intestino também pode apresentar alterações quando em contato com produtos tóxicos. Kauser *et al.* (2023), por exemplo, administraram o extrato de *Artemisia absinthium* por gavagem em ratas Wistar, ocasionando alterações na arquitetura intestinal, com infiltrado celular inflamatório, ulceração da mucosa intestinal, seguida de densos infiltrados inflamatórios no epitélio intestinal e na lâmina própria (KAUSER *et al.*, 2023).

No estudo de toxicidade, realizado com ratos machos da linhagem Wistar tratados com extrato de rizoma de *Boesenbergia rotunda* e com quercetina, a avaliação histopatológica do intestino delgado revelou inflamação ativa indicada pela infiltração de neutrófilos

granulócitos, ulceração de grau 1,0 a 1,5 para *Boesenbergia rotunda* e ulceração de grau 0,33 para quercetina (ROSDIANTO *et al.*, 2020).

2.9.3. Fígado

Nos vertebrados, mais especificamente nos mamíferos, o fígado é um órgão de grande complexidade, especialmente quando se estuda a toxicidade de compostos administrados em diferentes modelos experimentais (AHN; BAKER, 2015). O fígado do rato é multilobulado, assim como em outros mamíferos. Nos ratos, a massa hepática representa aproximadamente 5% do peso corporal total, enquanto em humanos adultos representa 2,5%. Em ratos com peso entre 250 e 300 g, o peso médio do fígado é de 13,6 g, e o diâmetro transversal do fígado varia de 7,5 a 8,0 cm. O diâmetro súpero-inferior é de 3,8 a 4,2 cm, enquanto o diâmetro ântero-posterior varia de 2,2 a 2,5 cm (MARTINS; NEUHAUS, 2007). Diferentemente dos humanos, cães, porcos e camundongos, o rato não possui vesícula biliar. No entanto, outros mamíferos, como o cavalo e o veado, também não a possuem. As implicações funcionais disso não são conhecidas. Acredita-se que pequenos ductos biliares intra-hepáticos em ratos correspondem aos ductos biliares em humanos, e os grandes ductos biliares em ratos podem corresponder aos ductos biliares interlobulares humanos (MANN *et al.*, 1920; TREUTING *et al.*, 2017).

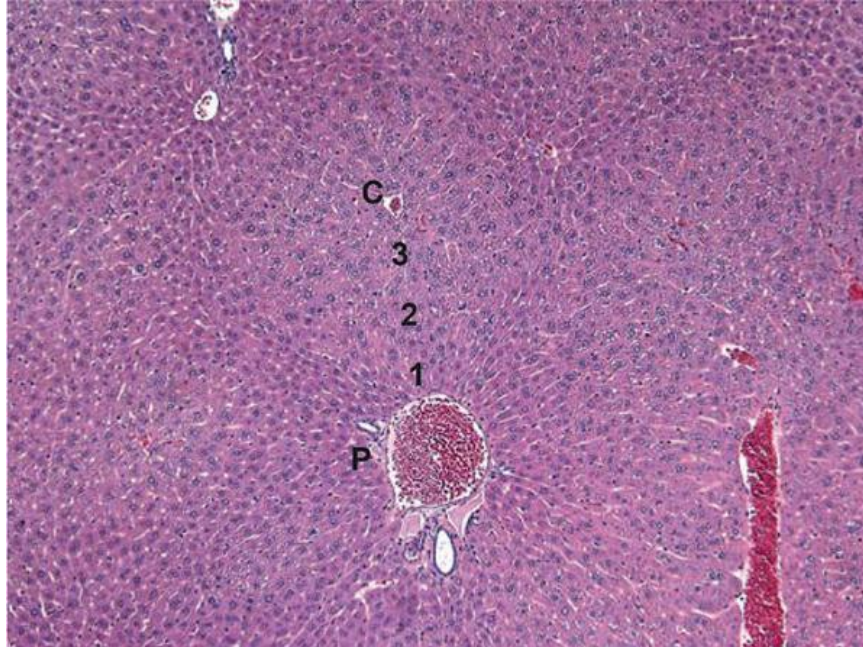
Este órgão está estrategicamente localizado em uma posição que facilita sua função metabolizadora, acumulando e neutralizando as substâncias absorvidas pelo intestino. O fígado recebe um duplo suprimento sanguíneo: aproximadamente 20% de seu fluxo é rico em oxigênio vindo da artéria hepática, enquanto o restante é rico em nutrientes, provenientes da veia porta (TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2013). O sangue arterial e venoso misto se move das regiões portais para a veia central através de sinusoides, enquanto a bile secretada nos canalículos é direcionada para as regiões portais por meio de microvilosidades hepatocelulares especializadas. Cordões ou placas hepáticas compreendem colunas de hepatócitos que se estendem da região portal até a veia central. Os espaços entre as placas contêm os sinusoides hepáticos, ou "capilares" do fígado. As paredes dos sinusoides são minimamente espessas, com fenestrações e grandes discontinuidades entre as células endoteliais. Entre o sinusoide e a célula hepática está o espaço pericapilar de Disse, onde o plasma sanguíneo está em contato direto com os hepatócitos, permitindo a livre troca de macromoléculas (TREUTING *et al.*, 2017).

Os hepatócitos são células epiteliais e também as células mais importantes do fígado, representando aproximadamente dois terços de seu volume. Entre os cordões de células hepáticas, existem sinusoides vasculares cobertos por células endoteliais fenestradas e descontínuas, que margeiam o espaço de Disse. Dentro desse espaço, além de várias estruturas de suporte, existem outros tipos de células, como as células de Kupffer e Ito, entre outras estruturas de suporte (CRAWFORD, 2000).

A arquitetura microscópica do fígado em ratos, camundongos e humanos pode ser descrita no contexto dos "lóbulos hepáticos clássicos". São estruturas poligonais com veias portais na periferia circundando uma veia central (TREUTING *et al.*, 2017).

Devido ao seu tamanho menor e à menor quantidade de tecido conjuntivo, algumas regiões portais de roedores podem passar despercebidas em cortes histológicos, especialmente em camundongos. Em um corte do fígado de rato, ocorre a divisão do lóbulo nas regiões periportal (zona acinar 1), zona mediana (zona acinar 2) e centro-lobular (zona acinar 3), com base na função enzimática dos hepatócitos e na oxigenação do sangue. Essa divisão é equivalente nas três espécies (ratos, camundongos e humanos) (Figura 8). Embora frequentemente chamadas de "tríades portais", nas três espécies as regiões portais compreendem, na verdade, quatro componentes: arteríolas, vênulas, ductos biliares e vasos linfáticos (TREUTING *et al.*, 2017).

Figura 8. Corte histológico do fígado de rato. No lóbulo do rato, múltiplas regiões portais (P) e veias centrais (C) são evidentes na mesma ampliação. Observe a transição da coloração dos hepatócitos do escuro para o claro nas regiões periportal (1), zona mediana (2) e centrolobular (3) devido ao acúmulo de glicogênio.



Fonte: TREUTING *et al.*, 2017.

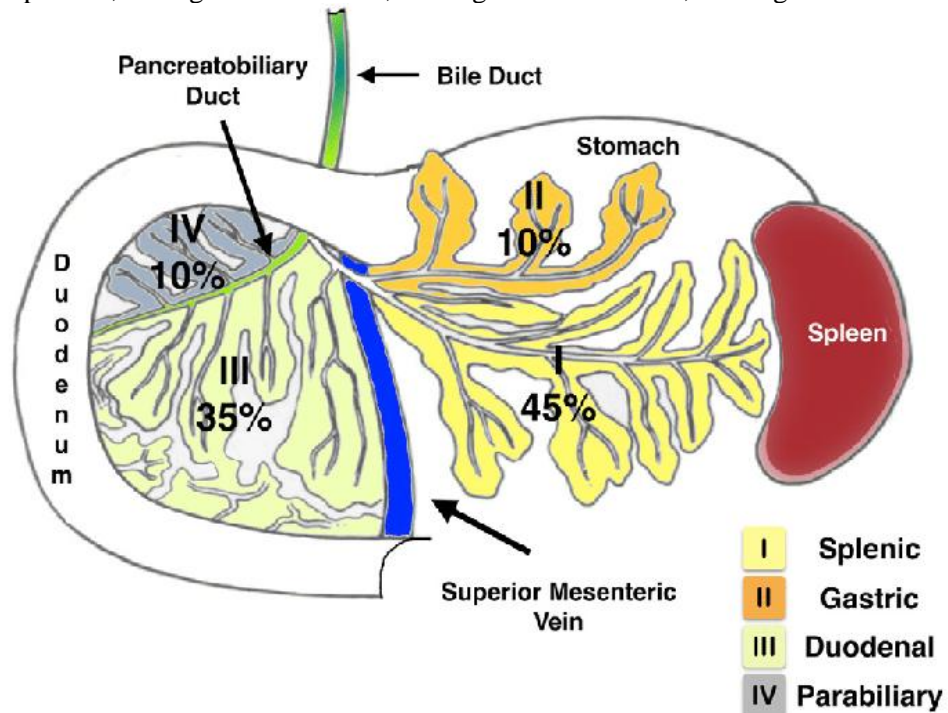
Abbasi-Oshaghi *et al.* (2019) avaliaram os efeitos de nanopartículas de dióxido de titânio no fígado de ratos Wistar machos. Os resultados dos exames histopatológicos mostraram degeneração das células hepáticas, necrose, congestão dos sinusóides, infiltração linfocítica, necrose e deposição acentuada de colágeno de maneira dose-dependente. Esses resultados indicam que, após a administração de dióxido de titânio, foram observadas alterações histopatológicas no fígado após 30 dias (ABBASI-OSHAGHI *et al.*, 2019).

A toxicidade do pó das raízes da planta *Asarum heterotropoides* var. foi testada em 152 ratos machos e fêmeas da linhagem Sprague-Dawley, após administração por via oral. Os resultados mostraram nódulos hepáticos em um rato macho e uma fêmea. Linfonodos mesentéricos aumentados foram observados em três ratos machos e uma fêmea. Cistos e nódulos no fígado foram observados apenas em uma rata. O peso relativo do fígado aumentou significativamente nos machos, e os pesos absoluto e relativo do fígado aumentaram significativamente nas fêmeas, todos em concentrações diferentes de *A. heterotropoides* var. (GU *et al.*, 2023).

2.9.4. Pâncreas

O pâncreas em humanos, cães e gatos é uma glândula bem distinta e definida, enquanto em ratos e camundongos é um órgão bastante difuso, localizado no mesentério dorsal e lobulado, podendo ser diferenciado do tecido adiposo adjacente por sua cor mais escura e consistência firme. Numerosos ductos excretores se fundem em dois a oito ductos grandes, que desembocam no ducto biliar comum (Figura 9) (BIVIN *et al.*, 1979).

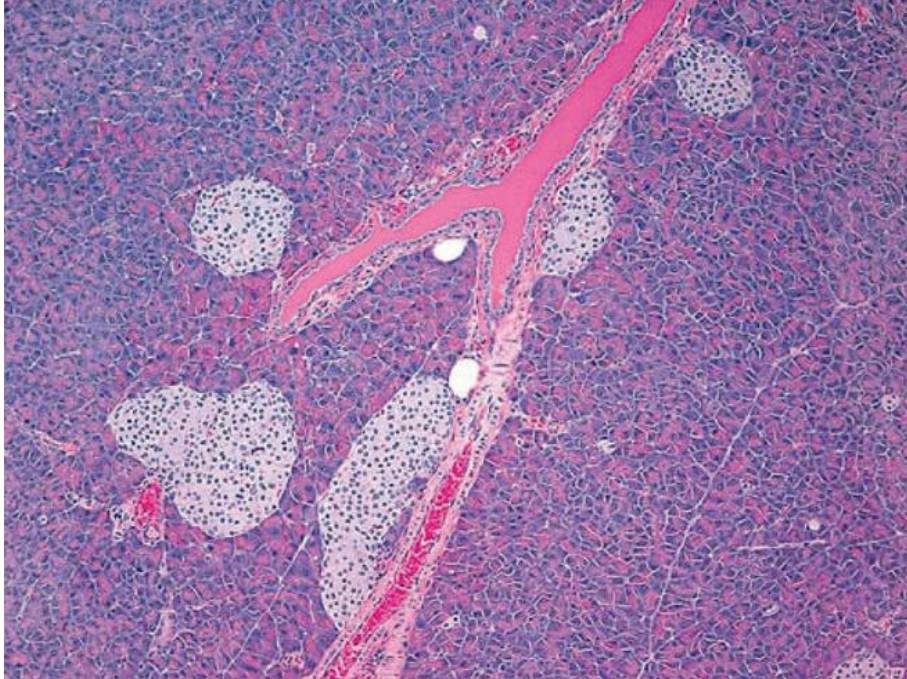
Figura 9. Imagem esquemática dos segmentos do pâncreas. Divisão segmentar do pâncreas de rato: I. Segmento Esplênico; II. Segmento Gástrico; III. Segmento Duodenal; IV. Segmento Parabiliar.



Fonte: EULÁLIOI *et al.*, (2016).

Os ácinos pancreáticos representam as células terminais diferenciadas dessa massa ductular (Figura 10). Superficialmente, eles parecem muito semelhantes em todas as espécies. Os ácinos são revestidos por células centroacinares, que são, na verdade, as extremidades distais dos ductos intercalados, que conectam os ácinos aos ductos intralobulares, isto é, ductos que correm dentro dos lóbulos pancreáticos. Estes, por sua vez, desembocam em ductos interlobulares, ou seja, ductos que correm entre os lóbulos. Em ratos, camundongos e hamsters, os ductos interlobulares desembocam em um ducto biliar/pancreático comum (MANN *et al.*, 1920; TAKAHASHI *et al.*, 1977).

Figura 10. Corte histológico do pâncreas de rato. A maioria das ilhotas nos roedores está localizada em espaços interlobulares e são frequentemente periductais ou perivascularares. Nesta figura, o ducto interlobular contém material secretor rosa, e a artéria está preenchida com glóbulos vermelhos.



Fonte:TREUTING *et al.*, 2017.

Em humanos e em muitas outras espécies, as ilhotas pancreáticas são geralmente de localização intralobular e são drenadas por numerosos vasos portais insulo-acinares, que conduzem o sangue das ilhotas à rede capilar lobular. Em contraste, nos ratos, um considerável número de ilhotas está localizado interlobularmente, de onde elas drenam diretamente para as veias. Em resumo, a anatomia ductal do rato difere daquela do ser humano mais do que a de qualquer outra espécie de animal de laboratório (MURAKAMI *et al.*, 1993).

No pâncreas, por ser um órgão menos definido anatomicamente, especialmente em ratos, as alterações morfológicas após exposição a produtos tóxicos ocorrem com a mesma frequência. Entretanto, em ratos tratados por via intraperitoneal com acetato de chumbo, a avaliação microscópica do pâncreas revelou que os ácinos estavam alterados, enquanto variações degenerativas e necróticas, bem como o encolhimento das ilhotas de Langerhans, também foram observadas nos grupos tratados (WARDANI *et al.*, 2019).

Já no estudo de Fujiwara *et al.* (2023), o tratamento de ratos com maltol de zinco durante 4 semanas, por via oral, desencadeou atrofia acinar grave, com diminuição dos

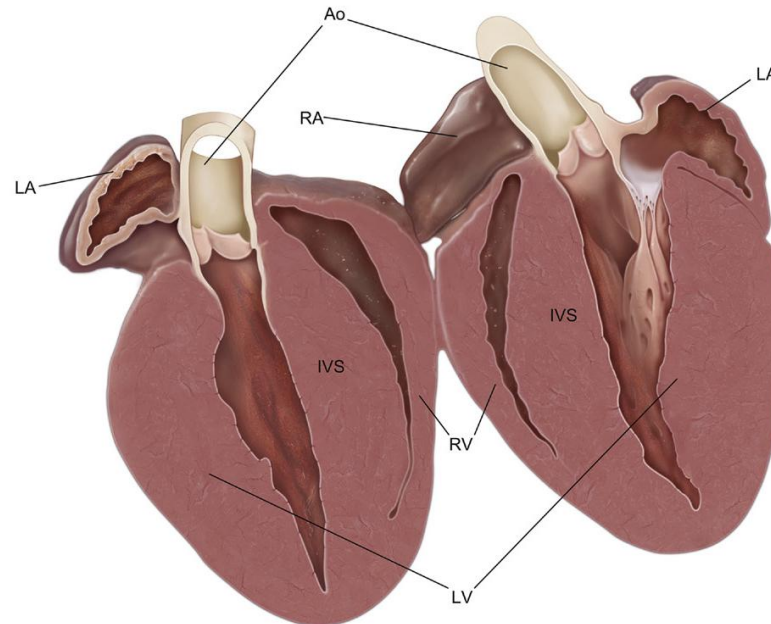
grânulos e lúmen dilatado, bem como aumento no número de células mitóticas. Quase todos os ácinos foram perdidos e substituídos por estruturas semelhantes a ductos. Os ácinos afetados ocasionalmente continham menos grânulos no citoplasma e um lúmen dilatado. Infiltração de células mononucleares e aumento de tecido fibroso também foram observados no estroma que envolve o ácino atrofiado (FUJIWARA *et al.*, 2023).

2.9.5. Coração

O coração dos ratos possui algumas características anatômicas muito semelhantes às de outros mamíferos, incluindo a forma triangular piramidal. Essa estrutura é bastante eficiente para bombear o sangue através do sistema circulatório desses pequenos roedores. A divisão do coração em duas metades, separadas por um septo, é uma característica comum em muitos mamíferos, incluindo os ratos, e é fundamental para garantir que o sangue oxigenado e o não oxigenado não se misturem (COVELLI, 1999).

Tanto em roedores quanto em humanos, o coração reside no mediastino e é dividido em quatro câmaras: os átrios esquerdo e direito, que são separados pelo septo interatrial, e os ventrículos esquerdo e direito, que são separados pelo septo interventricular (Figura 11). O aspecto ventral do coração do roedor corresponde ao aspecto esternocostal do coração humano, enquanto o aspecto dorsal do coração do roedor corresponde aproximadamente ao aspecto diafragmático do coração humano (TREUTING *et al.*, 2017).

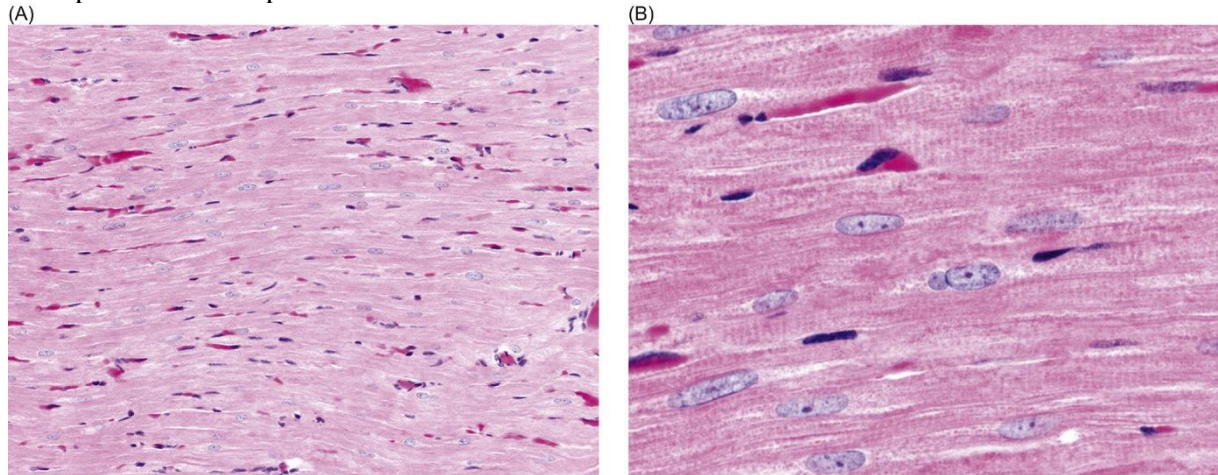
Figura 11. Imagem esquemática do coração de rato. Este coração de roedor foi dividido ao meio para revelar as câmaras internas. Devido ao pequeno tamanho, é difícil examinar estruturas, como válvulas, ou medir grosseiramente a espessura da parede.



Fonte: TREUTING *et al.*, (2017).

A maioria das características anteriores é melhor visualizada quando os cardiomiócitos são examinados em corte longitudinal, isto é, orientados de ponta a ponta, paralelamente ao plano de corte. Invariavelmente, em alguns campos microscópicos, os cardiomiócitos serão seccionados transversalmente (Figura 12). Nesta visão, as estrias e os discos intercalares são imperceptíveis, mas o interstício cardíaco e os tipos de células não miócitos são melhor revelados. Semelhante à estrutura análoga do músculo esquelético, o endomísio é uma rede de colágeno que envolve as fibras musculares individuais.

Figura 12. Cortes histológicos do coração de rato. Miocárdio ventricular esquerdo do roedor em ampliação baixa 10x (A) e 40x alta (B). A maior parte da área é ocupada pelo grande citoplasma eosinofílico dos cardiomiócitos. Nessas fotomicrografias, a maioria dos cardiomiócitos está orientada longitudinalmente, e as estrias transversais fracas são evidentes em grande aumento em B. Os núcleos dos cardiomiócitos são grandes, ovais ou retangulares e contêm cromatina granular, com um ou dois nucléolos. Entre os cardiomiócitos, existe um delicado interstício contendo fibroblastos e capilares revestidos por células endoteliais. Os fibroblastos e as células endoteliais parecem semelhantes: ambos têm citoplasma escasso e núcleos pequenos, ovais, planos e densamente basofílicos. Os eritrócitos estão presentes nos capilares.



Fonte: TREUTING *et al.*, (2017).

Como os outros órgãos, o coração não está livre dos efeitos tóxicos ocasionados por substâncias químicas. Os efeitos da toxicidade cardíaca crônica induzida por doxorubicina foram demonstrados em ratos Wistar, e houve alterações significativas no grupo tratado, incluindo vacuolização citoplasmática, edema intersticial, degeneração hialina e necrose. Além disso, a doxorubicina parece ter efeitos adversos significativos no tecido cardíaco de ratos, ou seja, hemorragias extensas, acúmulo de células inflamatórias agudas, estruturas vasculares lesionadas, alterações necróticas nos núcleos dos cardiomiócitos e fibrose cardíaca leve (RAZMARAI, N. *et al.*, 2016).

Estudo com oitenta ratos Wistar machos avaliou o efeito da toxicidade das nanopartículas de óxido de zinco no coração. Os resultados mostraram alterações no tecido cardíaco, com algumas lesões, como necrose, hiperemia e degeneração vacuolar, após o uso de diferentes doses de nanopartículas de óxido de zinco (MOSHREFI, A. H. *et al.*, 2021).

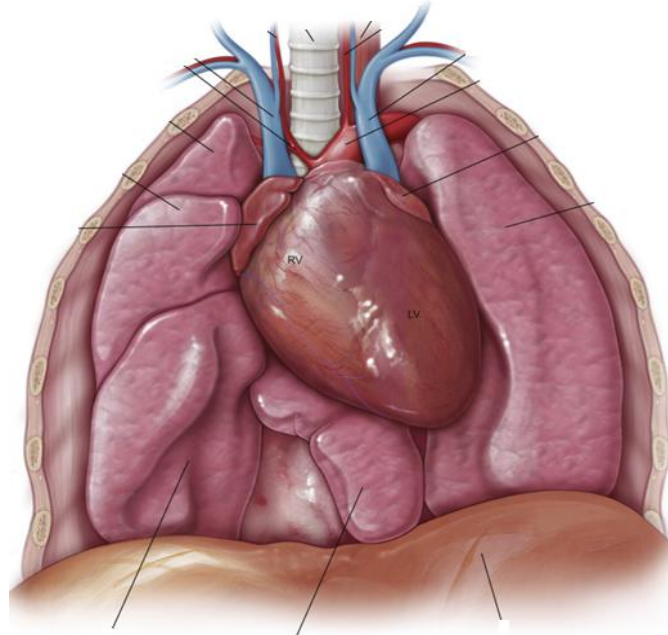
2.9.6. Pulmão

Os pulmões dos mamíferos possuem uma estrutura altamente ramificada para garantir a eficiência na troca de gases. Os brônquios e bronquíolos fornecem o caminho para o ar chegar aos alvéolos, onde ocorre a troca gasosa entre o oxigênio inspirado e o dióxido de carbono produzido pelo metabolismo celular. Essa estrutura complexa aumenta significativamente a área de superfície disponível para a troca gasosa, facilitando a absorção de oxigênio e a eliminação de dióxido de carbono (GASPAROTTO *et al.*, 2011).

Anatomicamente, os pulmões dos ratos, assim como em muitos outros mamíferos, são divididos em lobos. No caso dos ratos e outros roedores pequenos, como hamsters e gerbils, o pulmão direito é geralmente maior que o esquerdo, devido à posição ocupada pelo coração na cavidade torácica. O coração tende a ocupar mais espaço no lado esquerdo, deixando menos espaço para o pulmão esquerdo se desenvolver completamente (COVELLI, 1999).

Embora haja variações estruturais entre os sistemas respiratórios de diferentes espécies, os mamíferos compartilham muitas semelhanças na estrutura anatômica de seus pulmões, e em modelos experimentais, como os ratos, as estruturas pulmonares são muito semelhantes às do pulmão humano (Figura 13) (GOMES *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2009; SUDY *et al.*, 2019).

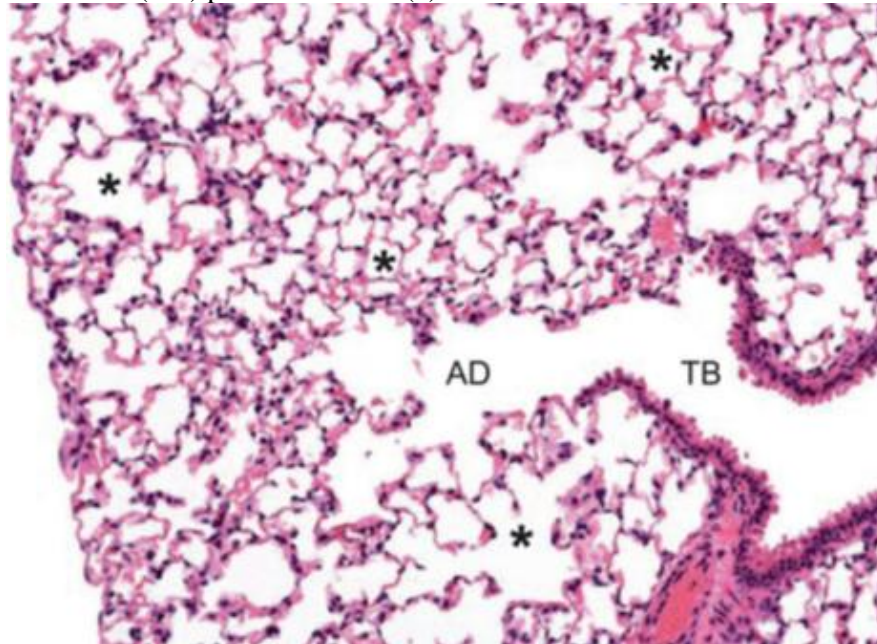
Figura 13. Imagem esquemática dos pulmões de rato. Em roedores, o pulmão direito consiste em quatro lobos: cranial, médio, caudal e acessório. O pulmão esquerdo possui apenas um lobo.



Fonte: TREUTING *et al.*, (2017).

A estrutura histológica do bronquíolo respiratório dos ratos se assemelha à do bronquíolo terminal, exceto por alvéolos ocasionais na parede do bronquíolo respiratório (Figura 14). A parede do ducto alveolar é formada por alvéolos e feixes esparsos de músculo liso que atravessam a fina parede do ducto alveolar e se condensam em torno das aberturas dos alvéolos, criando uma estrutura semelhante a um esfíncter. Em contraste, os sacos alveolares possuem uma parede formada completamente por septos alveolares (TREUTING *et al.*, 2017).

Figura 14. Corte histológico do pulmão de rato. Os ratos possuem bronquíolo terminal, onde em seguida o ar normalmente flui sequencialmente dos bronquíolos respiratórios (TB) para os ductos alveolares (AD) para os alvéolos (*).



Fonte: TREUTING *et al.*, (2017).

Para investigar os efeitos da toxicidade no pulmão induzida por cádmio, ratos Wistar machos adultos receberam diariamente, por via intraperitoneal, 3 mg/kg desse produto. No grupo tratado com cádmio, foi observado acúmulo de tecido conjuntivo e fibroblastos no espaço alveolar, espessamento da parede alveolar, destruição extensa e grave dos alvéolos, aparecimento de grandes espaços, acúmulo de fibroblastos e fibras colágenas em algumas áreas do pulmão, além de sangramento intrapulmonar (DASHTBANEI; KESHTMAND, 2023).

Em outro estudo, quarenta e oito ratos Wistar machos adultos foram submetidos à toxicidade pulmonar induzida pela ciclofosfamida. Os pulmões apresentaram lesão alveolar acentuada, na forma de numerosos alvéolos colapsados, com septos interalveolares e paredes brônquicas gravemente espessados. Além disso, apresentavam forte infiltrado inflamatório e infiltrações de células gordurosas, com parede espessada nos vasos sanguíneos pulmonares (ALSEMEH *et al.*, 2022).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos da administração oral com doses repetidas de acetilcarvacrol em ratos Wistar, com base nos valores de concentração letal previamente definidos *in vitro* para carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, por meio de análises hematológicas, bioquímicas e histopatológicas.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a contagem de glóbulos brancos e glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, hemoglobina corpuscular média e contagem de plaquetas, a fim de verificar variações nos índices de referência desses elementos celulares;
- Estabelecer possíveis variações nas concentrações de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), em relação aos índices de referência;
- Descrever a morfologia do estômago, fígado, intestino delgado, pâncreas, coração e pulmão por meio de análises morfométricas e morfológicas, a fim de identificar possíveis danos a esses órgãos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de estudo

O desenvolvimento do trabalho foi realizado utilizando os equipamentos e laboratórios, Biologia Parasitária (PETI BIOPAR) disponíveis nas dependências do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) e do Departamento de Medicina (DM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA, Lavras/MG, Brasil).

4.2. 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 o processo de acetilação foi realizado de acordo com a metodologia de König et al. (2019). Para isso, 5 mL de carvacrol foram adicionados a um balão volumétrico contendo 25 mL de solução de hidróxido de sódio a 10%, à temperatura ambiente. Em seguida, 5,5 mL de anidrido acético foram adicionados ao frasco sob refrigeração. A mistura foi mantida sob agitação por 15 minutos, e o óleo obtido foi separado da solução e caracterizado de acordo com seu ponto de fusão e por espectroscopia de infravermelho (SOLOMONS *et al.*, 2016; KONIG *et al.*, 2019), em espectrômetro IR Affinity-1 Shimadzu, operando na faixa espectral de 4000-400 cm^{-1} . A ausência de uma banda larga intensa entre 3000 e 4000 cm^{-1} foi utilizada como indicativo da ausência de fenol residual no reagente. Além disso, a presença de uma banda intensa a 1753 cm^{-1} foi utilizada como confirmação da estrutura do éster carbonílico.

4.3. Animais

Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus*) adultos da linhagem Wistar (20 fêmeas adultas), com aproximadamente 9 semanas de idade e peso variando entre 200 e 300 g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os animais foram identificados e acondicionados em grupos de no máximo 5 indivíduos em caixas de polipropileno medindo 40x34x17cm por pelo menos 5 dias antes do início do estudo, para permitir aclimatação às condições laboratoriais. Os ratos foram mantidos em temperatura ambiente ($22 \pm 3^{\circ}C$, umidade relativa de 50-60%), com luz artificial e fotoperíodo de 12/12 h (claro/escuro), recebendo água e ração *ad libitum*. (OECD, 1981, 2008).

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).

4.4. Delineamento experimental

4.4.1. Toxicidade oral com dose repetida

Os procedimentos para determinação da toxicidade oral do acetilcarvacrol em ratos foram baseados na Guideline 407 da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (OECD, 1995) e nos experimentos desenvolvidos por Barros et al. (2014) e André et al. (2019).

Antes do início dos procedimentos experimentais, os ratos foram pesados e divididos em 4 grupos (n = 5 animais por grupo). Os tratamentos foram realizados por meio da administração de uma dose única diária de acetilcarvacrol, diluído em óleo de milho (volume de 1,0 mL/kg por animal), por gavagem, utilizando-se uma cânula esofágica, durante 28 dias. As doses foram administradas sempre no mesmo horário do dia.

Em experimento *in vitro*, no qual carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* foram imersos em soluções contendo acetilcarvacrol, König et al. (2020) determinaram estatisticamente que a concentração de 26 µL/mL é suficiente para gerar mortalidade em 90% dos indivíduos (CL90). Com base nesse valor, foram definidas as doses utilizadas no presente trabalho. O grupo Tratamento 1 (T1) recebeu diariamente 26 µL de acetilcarvacrol (1 x CL90) diluído em 1 mL de óleo de milho; o grupo Tratamento 2 (T2) foi tratado com 52 µL de acetilcarvacrol (2 x CL90) diluído em 1 mL de óleo de milho; e o grupo Tratamento 3 (T3) foi tratado com 104 µL de acetilcarvacrol (4 x CL90) diluído em 1 mL de óleo de milho. O grupo Controle (C) recebeu apenas o veículo (1,0 mL de óleo de milho/dia).

O acetilcarvacrol foi diluído imediatamente antes de sua administração. Os animais foram observados diariamente, sempre no mesmo horário, para detecção de sinais de toxicidade sistêmica, irritação, morbidade e mortalidade. Ao final do experimento, os ratos sobreviventes foram novamente pesados e mantidos em jejum por 12 horas. Após esse período, foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (90 mg/kg), diluídas em solução de cloreto de sódio a 0,9%, aplicadas por via intraperitoneal. Posteriormente, foram eutanasiados pelo método de exsanguinação por punção cardíaca, para a coleta do material biológico. Durante o experimento, animais com sinais graves de toxicidade ou moribundos foram retirados e eutanasiados assim que observados, a fim de evitar sofrimento excessivo.

De acordo com o Plano de Gestão de Resíduos da UFLA, as carcaças e outros resíduos biológicos gerados por esse processo foram colocados em saco plástico branco e descartados adequadamente como resíduo biológico.

4.4.2. Pontos finais humanitários (“endpoints”)

Os animais foram monitorados individualmente pelo menos uma vez nos primeiros trinta minutos, imediatamente após a administração das doses, com especial atenção às primeiras quatro horas após o tratamento. Essas observações possibilitaram a documentação de quaisquer anormalidades, incluindo informações sobre o início, a duração e a gravidade dos sinais, que serviram como indicadores para a necessidade de eutanásia, conforme a gravidade da condição, a identificação de dor e sofrimento, o prognóstico e a possível perda de dados relevantes (OCDE, 2000).

Os pontos finais humanitários, que indicam a necessidade de encerrar o experimento antecipadamente para minimizar ou evitar dor e sofrimento, seguiram as diretrizes da OCDE (2000) e de Stokes (2002). Os sinais clínicos utilizados como indicadores de condição moribunda ou morte iminente incluíram: dificuldade de locomoção, problemas para se alimentar ou beber água, anorexia prolongada, perda de peso excessiva, desidratação severa, hemorragia significativa, ausência de respostas voluntárias a estímulos externos, dificuldade respiratória, incapacidade de se manter em pé, convulsões, automutilação, diarreia persistente, variações significativas na temperatura corporal, presença de tumores e indícios de falência de órgãos específicos (OCDE, 2000; STOKES, 2002).

A necessidade de eutanásia antes do término do experimento foi avaliada com base nos seguintes sinais clínicos: anormalidades na vocalização, comportamento agressivo, alterações posturais, reações à manipulação, traumas autoinduzidos, úlceras ou feridas abertas, dificuldades respiratórias, fraturas, relutância em se mover, aparência externa anormal, rápida perda de peso e sangramentos significativos (OCDE, 2000; STOKES, 2002).

4.5. Material biológico

4.5.1. Análises hematológicas e bioquímicas

Amostras de 4 mL de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA (K3EDTA Biocon®) para a realização das análises hematológicas. O material foi homogeneizado manualmente e os seguintes parâmetros hematológicos foram determinados em um analisador hematológico ABX Micros 60 (Horiba): contagem de leucócitos, contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular, hemoglobina corpuscular média e contagem de plaquetas.

Para as análises bioquímicas, 4 mL de sangue foram coletados em tubos secos Vactube e centrifugados em centrífuga Excelsa Baby 2, modelo 206-R, (Fanem®), por 10 minutos, a 4000 rotações por minuto. Em seguida, foi coletada a parte sobrenadante (soro), que foi utilizada para a determinação das concentrações de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As quantificações foram realizadas utilizando kits Gold Analisa Diagnóstica Ltda®. A análise de AST e ALT foi realizada pelo método cinético contínuo em ultravioleta. Em todas as análises, foram rigorosamente seguidos os protocolos dos manuais dos fabricantes. As amostras foram colocadas em microtubos tipo Eppendorf de 1,5 mL com o uso de uma pipeta multicanal modelo Transferpette®-8 de 20–200 µL, da marca BRAND®. Em seguida, foram colocadas em banho-maria a 37°C, por 2 minutos, para todos os procedimentos. Depois, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro UV (com leitura entre 500 e 540 nm), modelo EPOCH, da marca BioTek®, equipado com cubeta termostatizada para o procedimento cinético.

4.5.2. Avaliação histopatológica

Amostras de estômago, intestino delgado (duodeno), fígado, pâncreas, coração e pulmão foram clivadas e imediatamente imersas em solução fixadora de formaldeído a 4% por 72 horas. As amostras foram, então, transferidas para uma solução de tampão fosfato de sódio (pH 7,2) por 24 horas e, em seguida, desidratadas em uma série gradativa de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 95%, por 20 minutos cada), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina histológica. Os blocos foram seccionados em micrótomo Lupetec MRP09 na espessura de 4 µm de espessura e as lâminas foram submetidas à coloração com

hematoxilina-eosina, para a observação das características gerais dos tecidos. As lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá, examinadas e fotografadas em microscópio de luz convencional modelo DM500 da marca Leica®, equipado com câmera modelo ICC50W.

4.5.2.1. Análise morfométrica

As análises morfométricas foram realizadas em software Image J (NIH, versão 1.53k). Todos os animais em todos os grupos foram avaliados.

Nas amostras de estômago, foram avaliadas a espessura da mucosa gástrica, da submucosa e da camada muscular externa. As medidas de espessura foram realizadas em 10 secções histológicas em imagens com aumento de 400x, resultando em valores médios de espessura da mucosa, submucosa e muscular para cada indivíduo, em todos os grupos.

Na análise das camadas da parede intestinal, foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento e espessura dos vilos, profundidade das criptas intestinais e espessura da submucosa. Para todas as medidas, foram utilizadas 10 secções histológicas selecionadas aleatoriamente em imagens com aumento de 400x, para cada indivíduo, em todos os grupos. Os valores utilizados na análise estatística foram a média das medidas obtidas nas diferentes secções, para cada indivíduo.

Foram avaliadas as seguintes variáveis para o tecido hepático: área e perímetro dos núcleos e dos hepatócitos, densidade numérica de hepatócitos no tecido e a porcentagem de tecido ocupada por sinusoides hepáticos. Para as medidas de área e o perímetro, 50 núcleos e 50 hepatócitos foram selecionados aleatoriamente em imagens com aumento de 400x para cada indivíduo, em todos os grupos. Apenas células com núcleo e limites celulares visíveis foram incluídas, resultando em valores médios de área celular e nuclear por indivíduo. A densidade numérica de hepatócitos (N_{hep}) no tecido foi determinada contando-se o número de hepatócitos presentes em 10 regiões de área conhecida ($6000 \mu m^2$) para cada indivíduo, em todos os grupos, resultando no número de hepatócitos por μm^2 por meio da seguinte fórmula: $N_{hep} = \Sigma_{hep}/TA$, em que Σ_{hep} é o número de hepatócitos identificados no plano focal e TA é a área de teste total. A porcentagem de tecido ocupada por sinusoides hepáticos foi medida em 5 imagens com aumento de 400x para cada indivíduo, em todos os grupos. Em cada imagem, um grid de 713 pontos foi aplicado, e os pontos de intersecção situados sobre os

sinusoides foram contados. A porcentagem foi calculada a partir da razão entre o número de pontos localizados sobre os sinusoides (P_{sin}) e o total de pontos da imagem (P_{total}), de acordo com a fórmula: $\%sin = (P_{sin}/P_{total}) \times 100$. Imagens que continham vasos de maior calibre ou artefatos de técnica foram excluídas da análise.

A porcentagem de tecido ocupada por sinusoides hepáticos foi medida em 5 imagens com aumento de 400x para cada indivíduo, em todos os grupos. Em cada imagem, um grid de 713 pontos foi aplicado, e os pontos de intersecção situados sobre os sinusoides foram contados. A porcentagem foi calculada a partir da razão entre o número de pontos localizados sobre os sinusoides (P_{sin}) e o total de pontos da imagem (P_{total}), de acordo com a fórmula: $\%sin = (P_{sin}/P_{total}) \times 100$. Imagens que continham vasos de maior calibre ou artefatos de técnica foram excluídas da análise.

Na avaliação do tecido pancreático, foram consideradas as seguintes variáveis: área das ilhotas de Langerhans, número de ilhotas de Langerhans e área dos ácinos. Para mensurar a área das ilhotas de Langerhans, 5 ilhotas foram mensuradas aleatoriamente por indivíduo em imagens com aumento de 400x, resultando em um valor médio de área por indivíduo. A estimativa de número de ilhotas presentes em cada rato foi realizada em cinco imagens, selecionadas aleatoriamente, com aumento de 400x e área de $70,6 \times 10^3 \mu m^2$ cada, para cada indivíduo em todos os grupos. O valor final considerado foi o número de ilhotas presentes em cada em uma área total de $353 \times 10^3 \mu m^2$. Para mensurar a área dos ácinos, 50 ácinos foram selecionados aleatoriamente em imagens com aumento de 400x para cada indivíduo, em todos os grupos. Apenas ácinos contendo células com núcleo e limites celulares visíveis foram incluídas na avaliação, resultando em um valor médio de área do ácino para cada indivíduo, em cada grupo.

No tecido cardíaco, foram avaliadas a porcentagem do órgão ocupada por interstício e o diâmetro dos cardiomiócitos. A porcentagem do órgão ocupada por interstício foi avaliada a partir da inserção de um grid com 234 pontos em 10 imagens para cada indivíduo, no aumento de 400x. Foram contabilizados apenas os pontos situados sobre as regiões de interstício, e a porcentagem final foi calculada a partir da razão entre o número de pontos sobre o interstício (P_{int}) e o total de pontos da imagem (P_{total}), conforme a equação: $\%int = (P_{int}/P_{total}) \times 100$. Além disso, na morfometria cardíaca, foi medido o diâmetro de 50 cardiomiócitos por indivíduo, traçando-se uma reta perpendicular ao comprimento da célula, na altura do núcleo.

Para o tecido pulmonar, foram avaliadas: a porcentagem do tecido ocupada por septos alveolares, porcentagem do tecido ocupada por células e densidade numérica de alvéolos no tecido. A porcentagem do tecido ocupada por septos alveolares foi avaliada por meio da ferramenta "Threshold", sendo mensuradas 10 imagens por indivíduo, com aumento de 400x.

A porcentagem do tecido ocupada por células foi medida a partir da inserção de um grid com 352 pontos de intersecção em 10 imagens por indivíduo, em aumento de 400x. Foram contabilizados apenas os pontos situados sobre as células pulmonares e a porcentagem final foi calculada a partir da razão entre o número de pontos sobre as células pulmonares (Pcel) e o total de pontos da imagem (Ptotal), conforme a equação: $\% \text{ cel} = (P_{\text{cel}}/P_{\text{total}}) \times 100$. A densidade do número de alvéolos pulmonares (Nalv), por sua vez, foi obtida por meio da contagem do número de alvéolos presentes em 10 regiões de área conhecida ($70,6 \times 10^3$) para cada indivíduo, em todos os grupos, resultando no número de alvéolos por mm^2 por meio da fórmula: $N_{\text{alv}} = \Sigma_{\text{alv}}/\text{TA}$, em que Σ_{alv} é o número de alvéolos identificados no plano focal e TA é a área de teste total.

4.5.2.2. Análise semiquantitativa

As alterações estruturais mais relevantes observadas no estômago, intestino, fígado, pâncreas, coração e pulmão de ratos expostos a substâncias tóxicas foram obtidas a partir de dados disponíveis na literatura, e listadas nas Tabelas 1-4. Para cada alteração, foi atribuído um fator de importância (w), variando de 1 a 3, definido pelos pesquisadores do presente estudo conforme sua relevância no desenvolvimento e na sobrevivência das células e tecidos afetados: (1) baixa importância, quando a lesão afeta minimamente a função e viabilidade da célula ou tecido avaliado; (2) importância moderada, quando a alteração leva à perda parcial de função; e (3) alta importância, quando a lesão é irreversível, resultando na perda total da função celular ou tecidual.

Após análise histopatológica, as alterações morfológicas visualizadas em ratos tratados com acetilcarvacrol foram classificadas em escores (a), variando de 0 a 5, dependendo da extensão do dano no tecido. A classificação em escores se baseou na estimativa da porcentagem de tecido afetada pela alteração, sendo o valor mínimo (0) indicativo de ausência de lesão, e o valor máximo (5) correspondente à ocorrência muito frequente, com mais de 80% do tecido afetado. A multiplicação do fator de importância (w) pelo escore (a) permitiu a obtenção do índice de cada alteração ($\text{INDEX}_{\text{alt}} = w \times a$). Para cada indivíduo, o índice

individual (INDEXind) foi obtido a partir da soma dos índices de todas as alterações observadas, conforme a fórmula: $INDEXind = \Sigma (w \times a)$ (Marinho *et al.* 2014).

Os dados hematológicos, bioquímicos, morfológicos e morfométricos foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis com distribuição normal foram comparadas estatisticamente por meio do teste de ANOVA *one way* seguido de teste post hoc de Tukey, e os valores sem distribuição normal foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn ($\alpha = 0,05$; Graph Pad Prism 8, v.8.4.3).

Tabela 1. Principais alterações encontradas no estômago de ratos expostos a substâncias químicas e seus respectivos fatores de importância (w).

Alterações morfológicas	Fator de importância (w)	Referências
Descamação epitelial	2	(Unluçerçi, <i>et al.</i> , 1999, Motawi, <i>et al.</i> , 2013, Ostovaneh, <i>et al.</i> , 2023)
Ruptura das células mucosas	2	(Unluçerçi, <i>et al.</i> , 1999, Gu, <i>et al.</i> , 2023, Hamza, <i>et al.</i> , 2023, Sanpinit, <i>et al.</i> , 2023)
Hemorragia	3	(Unluçerçi, <i>et al.</i> , 1999, Motawi, <i>et al.</i> , 2013, Ostovaneh, <i>et al.</i> , 2023)
Necrose	3	(Unluçerçi, <i>et al.</i> , 1999, Hamza, <i>et al.</i> , 2023)
Infiltração inflamatória	2	(Motawi, <i>et al.</i> , 2013, Rosdianto, <i>et al.</i> , 2020, Gu, <i>et al.</i> , 2023, Hamza, <i>et al.</i> , 2023, Ostovaneh, <i>et al.</i> , 2023, Sanpinit, <i>et al.</i> , 2023)
Edema	1	(Motawi, <i>et al.</i> , 2013, Sanpinit, <i>et al.</i> , 2023)
Vasodilatação	1	(Sanpinit, <i>et al.</i> , 2023)
Ulceração	3	(Hamza, <i>et al.</i> , 2023, Ostovaneh, <i>et al.</i> , 2023, Sanpinit, <i>et al.</i> , 2023)
Hiperqueratinização na mucosa	2	(Motawi, <i>et al.</i> , 2013, Li, <i>et al.</i> , 2022).
Dilatação glandular gástrica	1	(Motawi, <i>et al.</i> , 2013, Gu, <i>et al.</i> , 2023).
Vasos sanguíneos congestionados	1	(Motawi, <i>et al.</i> , 2013, Ismail; El-Meligy, 2022).
Hiperplasia nas células epiteliais	1	(Motawi, <i>et al.</i> , 2013, Li, <i>et al.</i> , 2022, Gu, <i>et al.</i> , 2023).
Apoptose	3	(Li, <i>et al.</i> , 2022).
Glândulas gástricas destruídas	3	(Ismail; El-Meligy, 2022)
Vacuolização citoplasmática	2	(Ismail; El-Meligy, 2022)

Tabela 2. Principais alterações encontradas no intestino delgado de ratos expostos a substâncias químicas e seus respectivos fatores de importância (w).

Alterações morfológicas	Fator de importância (w)	Referências
Descamação epitelial	2	(Abbasi-Oshaghi, <i>et al.</i> , 2019, Ahlawat, <i>et al.</i> , 2021, Ruan, <i>et al.</i> , 2023)
Ruptura das células mucosas	3	(Abbasi-Oshaghi, <i>et al.</i> , 2019, Dashtbanei; Keshtmand, 2023)
Hemorragia	3	(Dashtbanei; Keshtmand, 2023)
Necrose	3	(Abbasi-Oshaghi, <i>et al.</i> , 2019, Dashtbanei; Keshtmand, 2023)
Infiltração inflamatória	2	(Abbasi-Oshaghi, <i>et al.</i> , 2019, Rosdianto, <i>et al.</i> , 2020, Ahlawat, <i>et al.</i> , 2021, Pogozhykh, <i>et al.</i> , 2021, Dashtbanei; Keshtmand, 2023, Kauser, <i>et al.</i> , 2023, Ruan, <i>et al.</i> , 2023)
Descamação epitelial	2	(Abbasi-Oshaghi, <i>et al.</i> , 2019, Maheshwari, <i>et al.</i> , 2023)
Hipertrofia das vilosidades	1	(Alam, <i>et al.</i> , 2023)
Ulceração	3	(Dashtbanei; Keshtmand, 2023, Kauser, <i>et al.</i> , 2023)
Displasia	3	(Mariotti, <i>et al.</i> , 2022).
Hiperemia	1	(Dashtbanei; Keshtmand, 2023)
Redução de criptas	3	(Abbasi-Oshaghi, <i>et al.</i> , 2019, Ahlawat, <i>et al.</i> , 2021)
Redução de vilosidades	3	(Ahlawat, <i>et al.</i> , 2021, Pogozhykh, <i>et al.</i> , 2021)
Apoptose	3	(Alam, <i>et al.</i> , 2023).
Encurtamento das vilosidades	1	(Abbasi-Oshaghi, <i>et al.</i> , 2019, Ahlawat, <i>et al.</i> , 2021, Alam, <i>et al.</i> , 2023, Dashtbanei; Keshtmand, 2023, Ruan, <i>et al.</i> , 2023) (Abbasi-Oshaghi, <i>et al.</i> , 2019)
Edema	1	

Tabela 3. Principais alterações observadas no fígado de ratos expostos a substâncias químicas e seus respectivos fatores de importância (w).

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	1	(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	2	(Bakir <i>et al.</i> 2015, Cunha <i>et al.</i> 2017, Kartheek and David 2018, Hassan <i>et al.</i> 2021)
Granulação citoplasmática nos hepatócitos	1	(Cunha <i>et al.</i> 2017)
Necrose	3	(Cunha <i>et al.</i> 2009, Bakir <i>et al.</i> 2015, Kartheek and David 2018, Mohseni <i>et al.</i> 2019, Han <i>et al.</i> 2019)
Apoptose	3	(Cunha <i>et al.</i> 2017)
Hipertrofia	1	(Engelman <i>et al.</i> 2001, Cunha <i>et al.</i> 2017, Kartheek and David 2018)
Hiperplasia	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)
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 and 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	1	(Cunha <i>et al.</i> 2009, Bakir <i>et al.</i> 2015, Kartheek and David 2018, Mohseni <i>et al.</i> 2019)

Tabela 4. Principais alterações encontradas no pâncreas de ratos expostos a substâncias químicas e seus respectivos fatores de importância (w).

Alterações morfológicas	Fator de importância (w)	Referências
Ácinos alterados	1	(Wardani, <i>et al.</i> , 2019, Zhu, <i>et al.</i> , 2021, Fujiwara, <i>et al.</i> , 2023, Sakr; Rashad, 2023)
Redução do tamanho da ilhota de Langerhans	1	(Wardani, <i>et al.</i> , 2019, Abulehia, <i>et al.</i> , 2023)
Necrose	3	(Wardani, <i>et al.</i> , 2019, Ivanovic, <i>et al.</i> , 2021, Zhu, <i>et al.</i> , 2021)
Degeneração tecidopancreático	3	(Wardani, <i>et al.</i> , 2019, Karabulut; Barlas, 2022, Peña-corona, <i>et al.</i> , 2023, Sakr; Rashad, 2023)
Aumento da granulação citoplasmática	1	(Fujiwara, <i>et al.</i> , 2023)
Dilatação do lúmen dos ácinos	1	(Fujiwara, <i>et al.</i> , 2023)
Mitose atípica dos ácinos	3	(Fujiwara, <i>et al.</i> , 2023)
Infiltração inflamatória	2	(Mustofa, <i>et al.</i> , 2020, Zhu, <i>et al.</i> , 2021, Fujiwara, <i>et al.</i> , 2023, Zou, <i>et al.</i> , 2023)
Fibrose no estroma	3	(Zhu, <i>et al.</i> , 2021, Fujiwara, <i>et al.</i> , 2023)
Vacuolização citoplasmática	2	(Karabulut; Barlas, 2022, Peña-corona, <i>et al.</i> , 2023, Sakr; Rashad, 2023, Zou, <i>et al.</i> , 2023)
Redução do número de ilhotas de Langerhans	2	(Peña-corona, <i>et al.</i> , 2023, Sakr; Rashad, 2023, Zou, <i>et al.</i> , 2023)
Infiltração lipídica	2	(Peña-corona, <i>et al.</i> , 2023)
Núcleos picnóticos	3	(Zhu, <i>et al.</i> , 2021, Sakr; Rashad, 2023)
Redução de células β	2	(Sakr; Rashad, 2023, Zou, <i>et al.</i> , 2023)
Edema	1	(Zhu, <i>et al.</i> , 2021, Zou, <i>et al.</i> , 2023)

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação comportamental

A aplicação oral de acetilcarvacrol em ratos, com doses repetidas durante 28 dias e em diferentes concentrações, não provocou mortalidade. Entretanto, a utilização da sonda esofágica para a administração da substância fez com que os animais ficassem mais agitados, inquietos e agressivos imediatamente após a aplicação do produto. Em cerca de 6 dias, os animais já não apresentavam sinais de irritabilidade ou agressividade.

Além disso, após o primeiro dia de experimentação, os animais apresentaram fezes levemente pastosas, um efeito que durou por 4 dias e foi observado tanto no grupo controle quanto nos grupos de tratamento, afetando todos os indivíduos. Após esses 4 dias, as fezes dos animais retornaram à consistência normal.

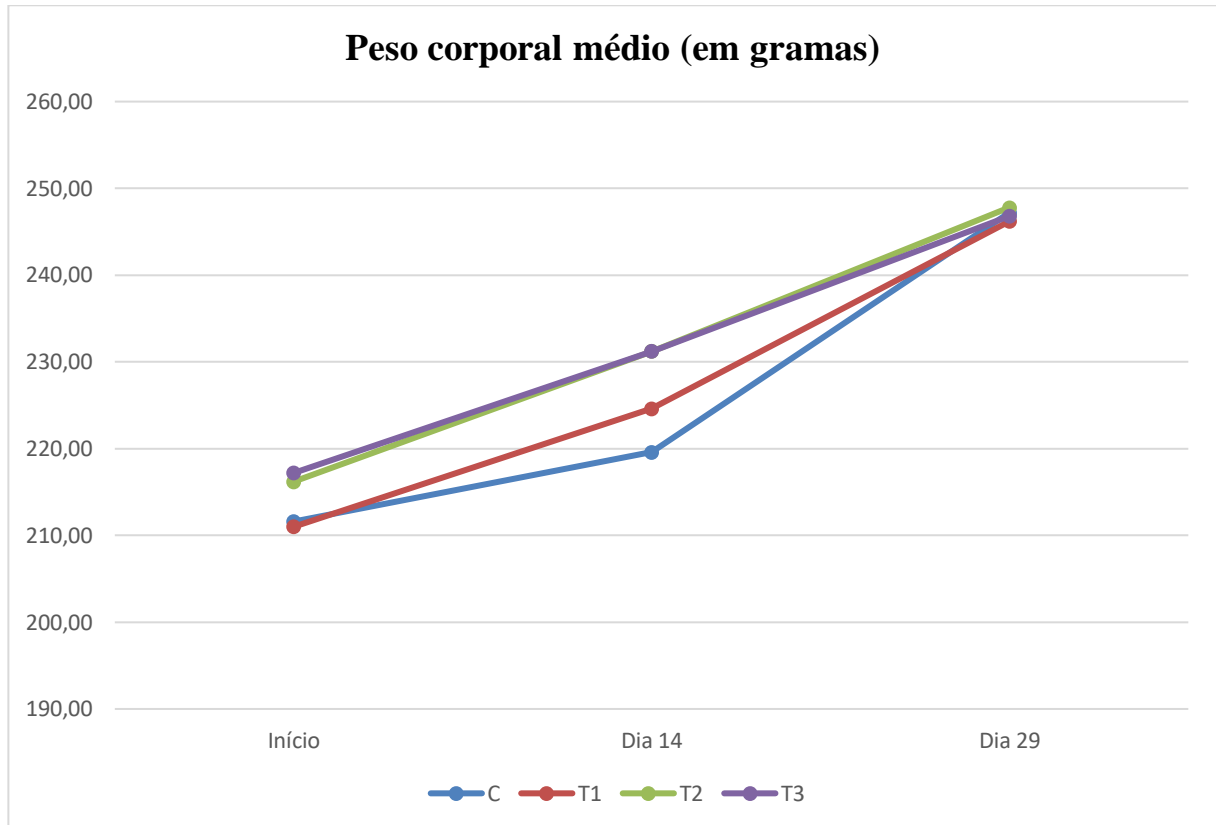
O peso corporal médio dos ratos está descrito na Tabela 5, e as variações semanais no peso corporal médio estão representadas no Gráfico 1.

Tabela 5. Média \pm desvio padrão do peso corporal (g) de ratos Wistar ao longo dos 28 dias de experimento.

Grupo	Experimento		
	Início	Dia 14	Dia 28
C (DMSO 5%)	211,6 \pm 6,10 ^a	219,6 \pm 6,42 ^a	247,20 \pm 4,08 ^a
T1 (26μL/mL)	211, \pm 5,61 ^a	224,6 \pm 6,06 ^a	246,20 \pm 4,91 ^a
T2 (52μL/mL)	216,2 \pm 4,60 ^a	231,20 \pm 4,76 ^a	247,80 \pm 5,06 ^a
T3 (104μL/mL)	217,2 \pm 4,32 ^a	231,20 \pm 1,92 ^a	246,80 \pm 5,06 ^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.

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.

5.2. Análise Hematológica

Após 28 dias de aplicação diária de acetilcarvacrol por via oral, a análise do eritrograma não revelou diferença estatística nos parâmetros de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) e plaquetas, conforme os dados listados na Tabela 6.

Os valores de hemoglobina corpuscular média (HCM) diferiram entre o grupo T1 e os grupos T2 e T3. Quanto aos valores de concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), o grupo controle e o grupo T1 não apresentaram diferença estatística entre si, mas diferiram estatisticamente dos grupos T2 e T3.

Tabela 6. Eritrograma de ratos Wistar albinos após 28 dias de aplicação oral do acetilcarvacrol em diferentes concentrações.

Eritrograma	Grupos				p-valor
	Controle	T1 (26µL/mL)	T2 (52µL/mL)	T3 (104µL/mL)	
Hemácias (m/mm ³)	6,71 ± 0,33 ^a	6,67 ± 0,35 ^a	6,40 ± 0,32 ^a	6,48 ± 0,56 ^a	0,584
Hemoglobina (g/dL)	13,20 ± 0,73 ^a	12,86 ± 0,41 ^a	13,42 ± 0,63 ^a	13,44 ± 0,84 ^a	0,543
Hematócrito (%)	37,72 ± 1,59 ^a	36,10 ± 0,89 ^a	35,86 ± 1,45 ^a	35,34 ± 2,49 ^a	0,265
VCM (fL)	56,20 ± 0,89 ^a	54,15 ± 1,58 ^a	55,98 ± 0,96 ^a	54,50 ± 1,50 ^a	0,107
HCM (pg)	19,66 ± 0,31 ^{ab}	19,29 ± 0,68 ^b	20,96 ± 0,78 ^a	20,75 ± 0,77 ^a	0,006
CHCM (%)	35,00 ± 0,99 ^a	35,82 ± 0,70 ^a	37,42 ± 0,96 ^b	38,06 ± 0,85 ^b	0,0002
RDW (%)	12,80 ± 0,46 ^a	12,72 ± 0,56 ^a	12,90 ± 0,51 ^a	13,20 ± 0,37 ^a	0,444
Plaquetas (mil/mm ³)	929,2 ± 69,48 ^a	726,2 ± 139,10 ^a	1070,6 ± 230,45 ^a	1002,8 ± 290,56 ^a	0,140

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

Na análise do leucograma, não houve diferença estatística na quantidade de leucócitos e na porcentagem de segmentados, linfócitos e monócitos entre o grupo controle e os grupos T1, T2 e T3, conforme os dados listados na Tabela 7.

Tabela 7. Leucograma de ratos Wistar albinos após 28 dias de aplicação oral do acetilcarvacrol em diferentes concentrações.

Leucograma	Grupos				p-valor
	Controle	T1 (26µL/mL)	T2 (52µL/mL)	T3 (104µL/mL)	
Leucócitos (mil/mm ³)	5,92 ± 1,93 ^a	4,34 ± 1,49 ^a	5,4 ± 1,21 ^a	5,52 ± 2,07 ^a	0,523
Segmentados (%)	17,83 ± 0,97 ^a	7,97 ± 0,47 ^a	8,81 ± 0,25 ^a	15,38 ± 0,72 ^a	0,082
Linfócitos (%)	40,58 ± 1,08 ^a	34,96 ± 1,08 ^a	44,73 ± 1,19 ^a	39,69 ± 1,34 ^a	0,637
Monócitos (%)	7,10 ± 3,26 ^a	3,62 ± 5,69 ^a	2,84 ± 2,71 ^a	1,22 ± 2,73 ^a	0,128

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

5.3. Análise Bioquímica

Após 28 dias de aplicação diária de acetilcarvacrol por via oral, a análise bioquímica não revelou diferença estatística nos parâmetros das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), conforme listado na Tabela 8.

Tabela 8. Concentração de AST (U/L) e ALT (U/L) em ratos Wistar albinos após 28 dias de experimento.

Exames bioquímicos	Grupos				p-valor
	Controle	T1 (26µL/mL)	T2 (52µL/mL)	T3 (104µL/mL)	
AST (U/L)	86,64 ± 23,62 ^a	93,31 ± 30,34 ^a	118,48 ± 68,65 ^a	139,24 ± 61,32 ^a	0,417
ALT (U/L)	45,39 ± 10,47 ^a	60,23 ± 9,04 ^a	55,87 ± 9,84 ^a	77,17 ± 27,36 ^a	0,413

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.

5.4. Avaliação Histopatológica

5.4.1. Estômago

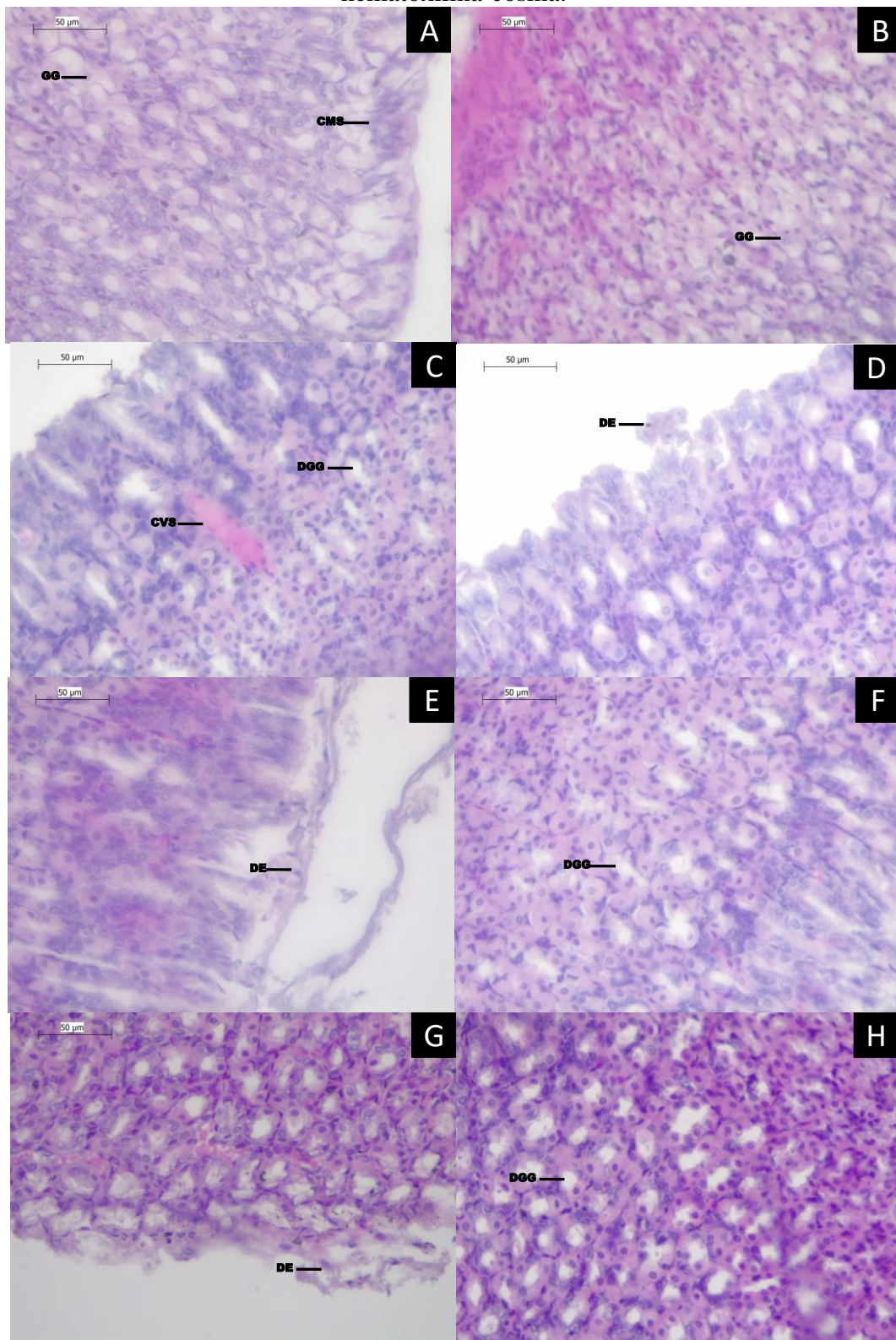
No grupo controle (Figura 15 - A, B), não foram observadas alterações nas camadas internas do estômago. Na mucosa, revestida por um epitélio colunar simples apoiado sobre uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, foram observadas numerosas fossetas e criptas gástricas e a camada muscular da mucosa, constituída por musculatura lisa. No epitélio, as células mucosas superficiais apresentaram coloração pálida, assim como as células mucosas do colo. Entre estas, as células parietais se coraram fortemente em rosa pela eosina, e as células zimogênicas foram observadas ao final das criptas. Logo abaixo da mucosa, foi possível observar acamada submucosa, composta por tecido conjuntivo denso e apoiada sobre uma musculatura lisa fortemente corada pela eosina.

No grupo tratado com a maior concentração de acetilcarvacrol (T3), foi observada leve descamação epitelial em quatro animais ($p = 0,047$). Esta alteração também foi visualizada nos grupos T1 e T2, porém em menor número de indivíduos, e sem diferença estatística em

relação ao grupo controle. Ademais, hipertrofia das células mucosas superficiais ($p = 0,068$) e dilatação das glândulas gástricas ($p = 0,183$) também foram identificadas, em 3 animais cada no grupo T3, em pequena extensão do tecido ($p = 0,183$). Também não foram observadas diferenças estatísticas em relação a estes dois parâmetros na comparação entre o grupo controle e os grupos T1 ($p = 0,183$) e T2 ($p = 0,183$). Leve congestão de vasos sanguíneos foi observada em 1 animal no grupo T1 (Figura 15 – C). Devido a estas alterações, houve diferença significativa entre os INDEXind dos grupos controle e T3, embora não tenham sido observadas diferenças entre os demais grupos (Tabela 9).

A análise morfométrica não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com relação à espessura da mucosa, da submucosa e da muscular externa, conforme dados discriminados na Tabela 10 e observados no Gráfico 3.

Figura 15. Fotomicrografias da mucosa do estômago de ratos Wistar submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol, durante 28 dias, coradas com hematoxilina-eosina.



Legenda: (A, B) Grupo Controle; (C, D) Tratamento 1; (E, F) Tratamento 2; (G, H) Tratamento 3. (CMS) Células mucosas superficiais; (CVS) Congestão dos vasos sanguíneos; (DE) Descamação epitelial; (DGG) Dilatação das glândulas gástricas; (GG) Glândulas gástricas.

Tabela 9. Média \pm desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) e dos índices individuais (INDEXind) observados no estômago de ratos submetidos ao teste de toxicidade oral do acetilcarvacrol com dose repetida.

Alteração morfológica	Fator de importância (w)	INDEXalt (w x a)				p-valor
		C1	T1	T2	T3	
Descamação epitelial	2	0,00 \pm 0,00 ^a	0,40 \pm 0,89 ^{ab}	1,20 \pm 1,10 ^{ab}	1,60 \pm 0,89 ^b	0,031
Hipertrofia das células mucosas superficiais	1	0,00 \pm 0,00 ^a	0,20 \pm 0,45 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,60 \pm 0,55 ^a	0,068
Dilatação das glândulas gástricas	1	0,00 \pm 0,00 ^a	0,60 \pm 0,55 ^a	0,40 \pm 0,55 ^a	0,80 \pm 0,84 ^a	0,183
Congestão dos vasos sanguíneos	1	0,00 \pm 0,00 ^a	0,20 \pm 0,45 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,391
INDEXind Σ (w x a)		0,00 \pm 0,00 ^a	1,40 \pm 1,14 ^{ab}	1,60 \pm 1,52 ^{ab}	3,00 \pm 1,22 ^b	0,017

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

Tabela 10. Medidas da espessura da mucosa (μm), espessura da submucosa (μm) e espessura da camada muscular externa (μm) em ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol.

Parâmetros	Grupos				p-valor
	C	T1	T2	T3	
Espessura da mucosa	430,82 \pm 98,51 ^a	493,30 \pm 36,81 ^a	503,05 \pm 68,46 ^a	478,63 \pm 54,30 ^a	0,709
Espessura da submucosa	19,97 \pm 1643,46 ^a	16,30 \pm 3693,40 ^a	15,66 \pm 4745,19 ^a	16,54 \pm 2290,76 ^a	0,219
Espessura da muscular	89,46 \pm 28949,62 ^a	87,33 \pm 10839,83 ^a	105,12 \pm 9899,80 ^a	88,14 \pm 13152,98 ^a	0,308

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

Gráfico 2. Descamação epitelial, hipertrofia das células mucosas superficiais, dilatação das glândulas gástricas, congestão dos vasos sanguíneos e dos índices individuais (INDEXind) observados no estômago de ratos submetidos ao teste de toxicidade oral do acetilcarvacrol com dose repetida.

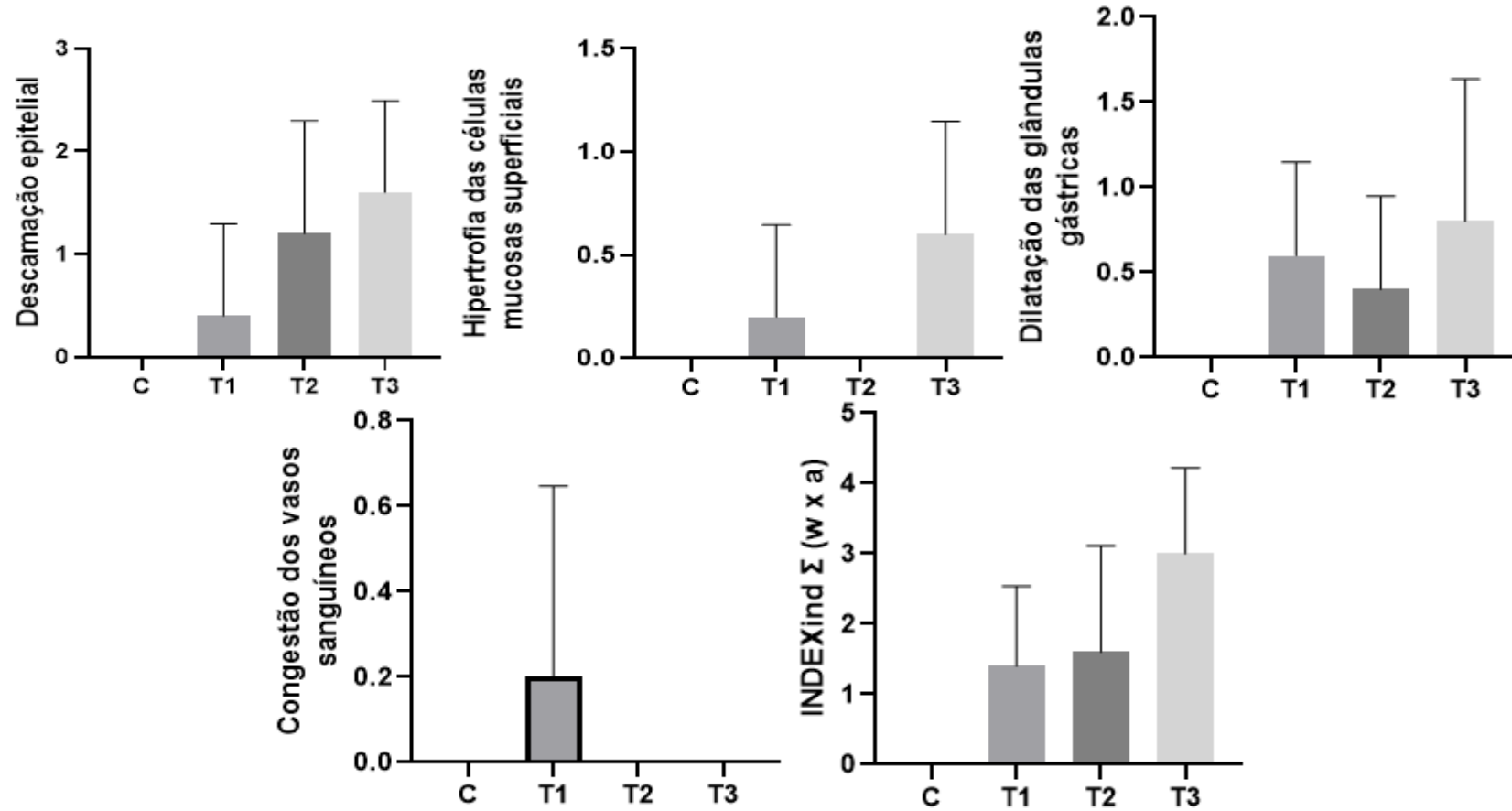
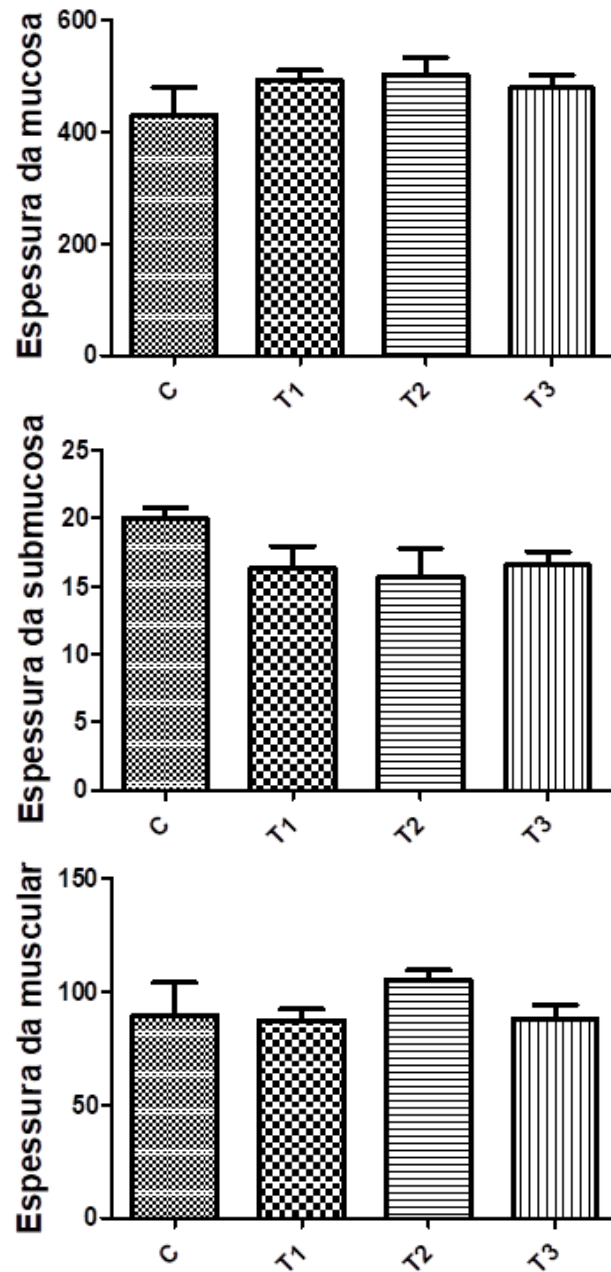


Gráfico 3. Espessura da mucosa (μm^2), espessura da submucosa (μm^2) e espessura da muscular externa (μm^2) em ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol.

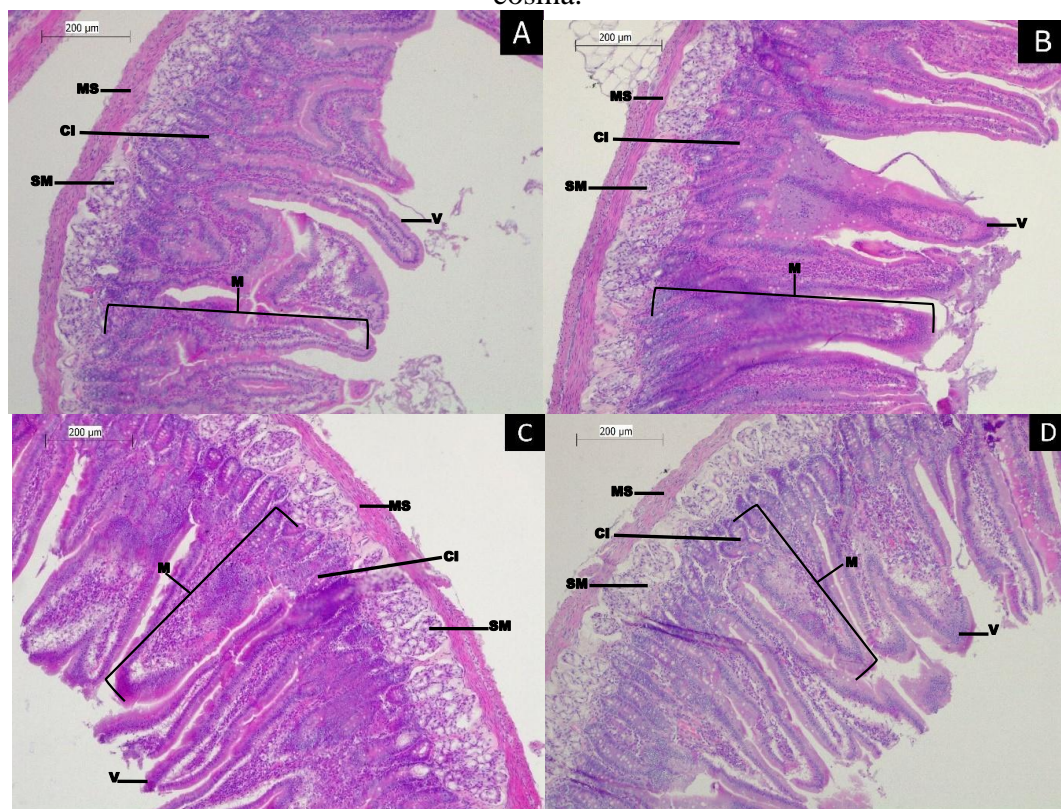


5.4.2. Intestino Delgado (duodeno)

No grupo controle, o duodeno apresentou características de normalidade condizentes com a literatura. No epitélio simples colunar da mucosa, sustentado pela lâmina própria foram observadas células caliciformes fracamente coradas e células absortivas, com coloração acidófila. Abaixo da mucosa, a submucosa corou fracamente em rosa e continha, em seu interior, as glândulas de Brunner, de coloração pálida. Em seguida, uma camada muscular externa fortemente corada pela eosina, e uma serosa, com coloração mais fraca, puderam ser visualizadas (Figura 16 - A). Nos grupos tratados, nenhuma alteração foi identificada após análise histopatológica.

Em relação à avaliação morfométrica, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação aos seguintes parâmetros: comprimento e espessura das vilosidades, profundidade das criptas intestinais e espessura da submucosa, conforme dados discriminados na Tabela 11 e observados no Gráfico 4.

Figura 16. Fotomicrografias do intestino delgado de ratos Wistar tratados com acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade oral com dose repetida, durante 28 dias, coradas com hematoxilina-eosina.



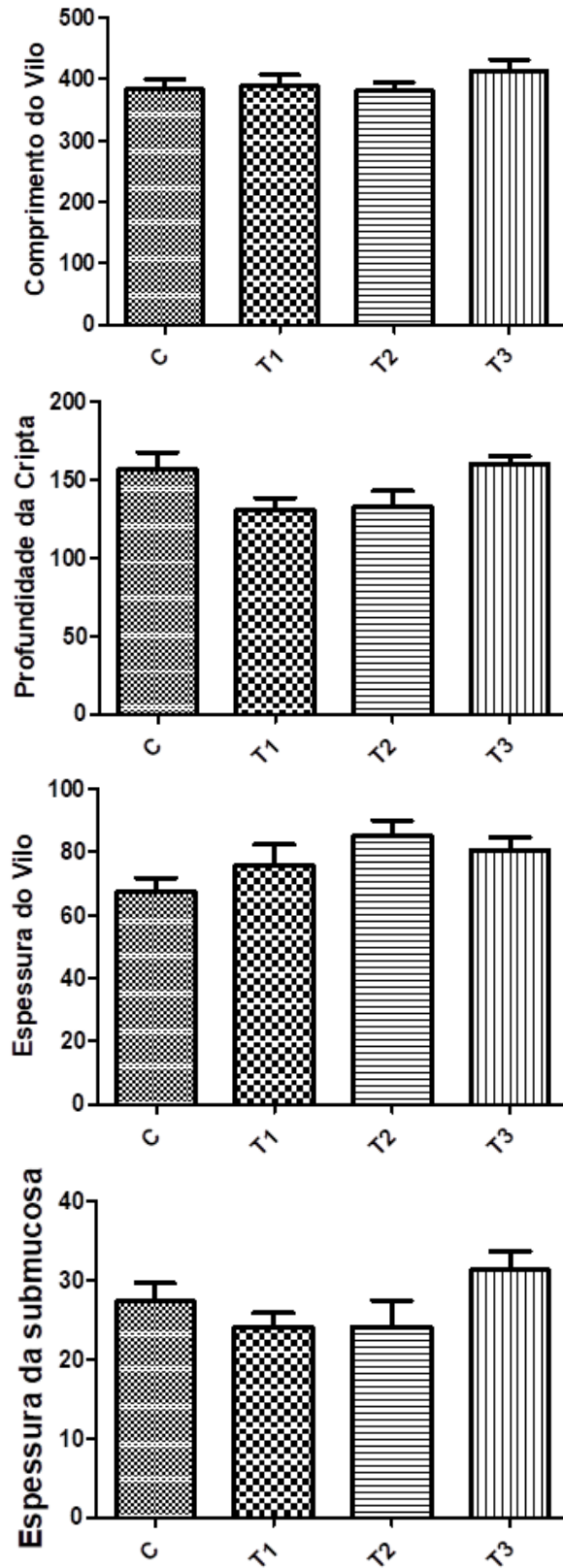
Legenda: (A) Grupo Controle; (B) Tratamento 1; (C) Tratamento 2; (D) Tratamento 3. (CI) Criptas intermediárias; (M) mucosa; (MS) muscular; (SM) submucosa; (V) vilosidade.

Tabela 11. Medidas do comprimento do vilo (μm), espessura do vilo(μm) e profundidade da cripta (μm) e espessura da submucosa (μm)em ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol.

Parâmetros	Grupos				p-valor
	C	T1	T2	T3	
Comprimento do vilo	383,38 \pm 36,02 ^a	389,49 \pm 40,396 ^a	381,61 \pm 29,89 ^a	413,42 \pm 42,34 ^a	0,528
Espessura do vilo	67,30 \pm 10303,59 ^a	75,66 \pm 14992,23 ^a	85,10 \pm 11103,59 ^a	80,67 \pm 8948,30 ^a	0,130
Profundidade da cripta	156,82 \pm 24472,73 ^a	126,78 \pm 19402,59 ^a	132,47 \pm 23093,86 ^a	159,74 \pm 11765,63 ^a	0,057
Espessura da submucosa	27,31 \pm 5183,90 ^a	20,00 \pm 4879,32 ^a	24,09 \pm 7458,86 ^a	37,29 \pm 5334,30 ^a	0,177

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

Gráfico 4. Comprimento do vilão, espessura do vilão, profundidade da cripta e espessura da submucosa em ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol.

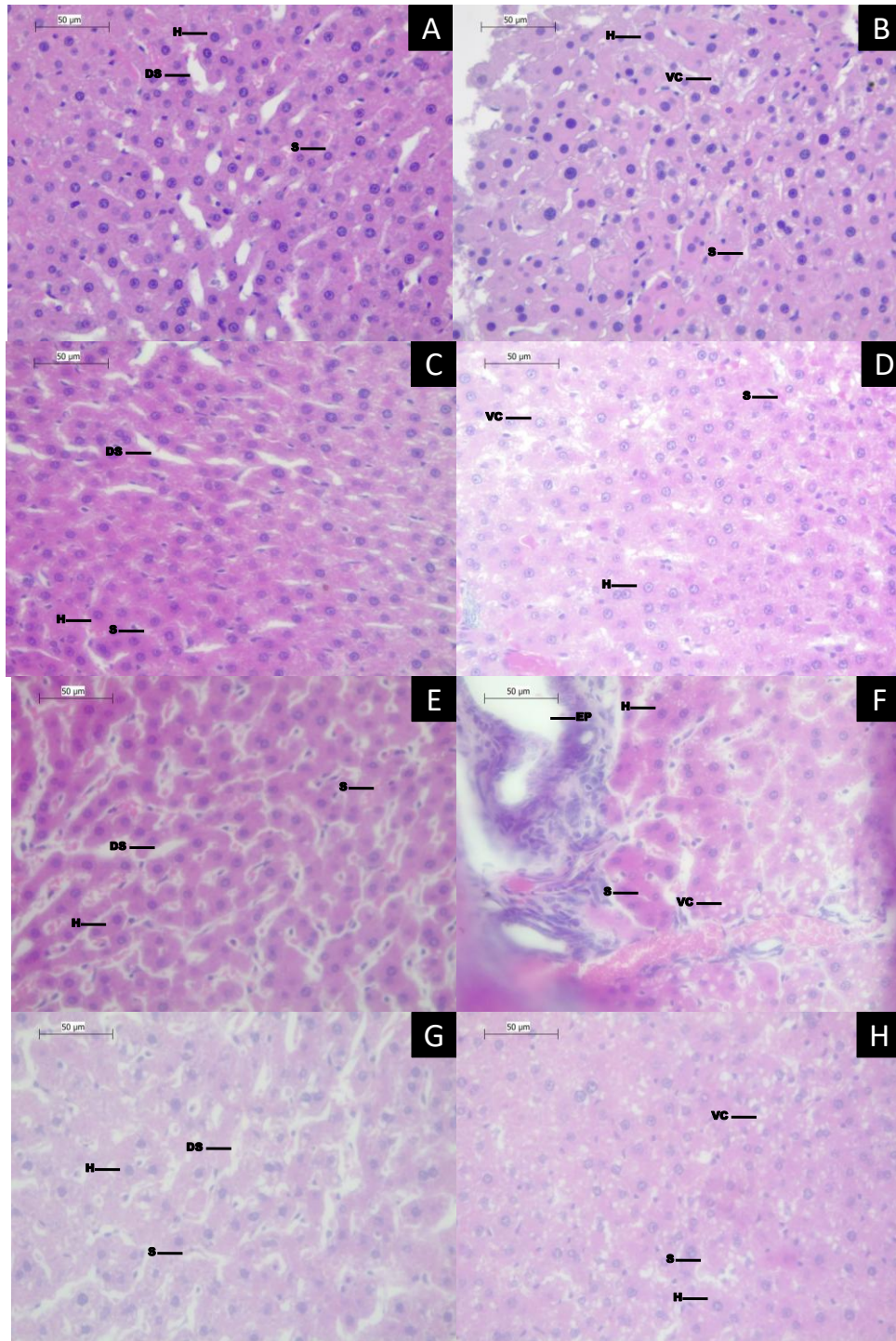


5.4.3. Fígado

No grupo controle, observou-se a presença de hepatócitos com 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. Entre as células hepáticas, uma rede anastomosada de capilares sinusoides, que convergem para a veia central e são revestidos por células endoteliais pavimentosas, foi visualizada. Entre os lóbulos hepáticos foram localizados os ramos da veia porta hepática e da artéria hepática, bem como os ductos biliares (Figura 17 - A, B). Em três animais, leve vacuolização citoplasmática localizada foi identificada, além de discreta dilatação do lúmen do sinusoide, também em três animais. Vacuolização ($p = 0,061$) e dilatação do sinusoide ($p = 0,376$) também foram encontradas nos grupos de tratamento, sem diferenças em relação ao grupo controle, contudo (Figura 17 - C - H). Na análise semiquantitativa, estas alterações não resultaram em diferenças estatísticas significativas quanto ao INDEXind entre os grupos de tratamento e o grupo controle (Tabela 12).

A análise morfométrica não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com relação à área do núcleo, densidade de hepatócitos, porcentagem de núcleos alterados e porcentagem do tecido ocupada por sinusoides hepáticos, conforme dados discriminados na Tabela 13 e observados no Gráfico 6.

Figura 17. Fotomicrografias do fígado de ratos Wistar tratados com acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade oral com dose repetida, durante 28 dias, coradas com hematoxilina-eosina.



Legenda: (A, B) Grupo Controle; (C, D) Tratamento 1; (E, F) Tratamento 2; (G, H) Tratamento 3. (DS) Dilatação do lúmen do sinusoide; (EP) Espaço porta; (H) Hepatócito; (S) sinusoide; (VC) Vacuolização citoplasmática.

Tabela 12. 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 oral do acetilcarvacrol com dose repetida.

Alteração morfológica	(w)	INDEXalt (w x a)				p-valor
		C1	T1	T2	T3	
Vacuolização citoplasmática	2	1,20 \pm 1,10 ^a	1,20 \pm 1,10 ^a	0,80 \pm 1,79 ^a	2,00 \pm 1,10 ^a	0,061
Dilatação do lúmen do sinusóide	1	1,20 \pm 1,30 ^a	1,60 \pm 0,55 ^a	1,20 \pm 1,10 ^a	0,60 \pm 0,89 ^a	0,376
INDEXindΣ (w x a)		2,40 \pm 1,52 ^a	2,80 \pm 1,30 ^a	2,00 \pm 2,83 ^a	4,60 \pm 1,95 ^a	0,208

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 (2024).

Tabela 13. Medidas da área do núcleo (μm) e densidade dos hepatócitos para cada ($\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2$), porcentagem de núcleos de hepatócitos alterados (%) e porcentagem de sinusoides presentes no tecido (%) em ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol.

Parâmetros	Grupos				p-valor
	C	T1	T2	T3	
Área do Núcleo	30,91 \pm 4301,99 ^a	29,18 \pm 4592,33 ^a	30,81 \pm 4024,03 ^a	31,10 \pm 4020,81 ^a	0,789
Densidade de hepatócitos	40,50 \pm 12,07 ^a	38,40 \pm 9,84 ^a	40,20 \pm 8,29 ^a	27,60 \pm 5,77 ^a	0,105
% de núcleos alterados	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	-
% de Sinusóide	0,35 \pm 0,23 ^a	0,42 \pm 0,16 ^a	0,29 \pm 0,24 ^a	0,24 \pm 0,18 ^a	0,434

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

Gráfico 5. Vacuolização citoplasmática, dilatação do lúmen do sinusóide e dos índices individuais (INDEXind) observados no fígado de ratos submetidos ao teste de toxicidade oral do acetilcarvacrol com dose repetida.

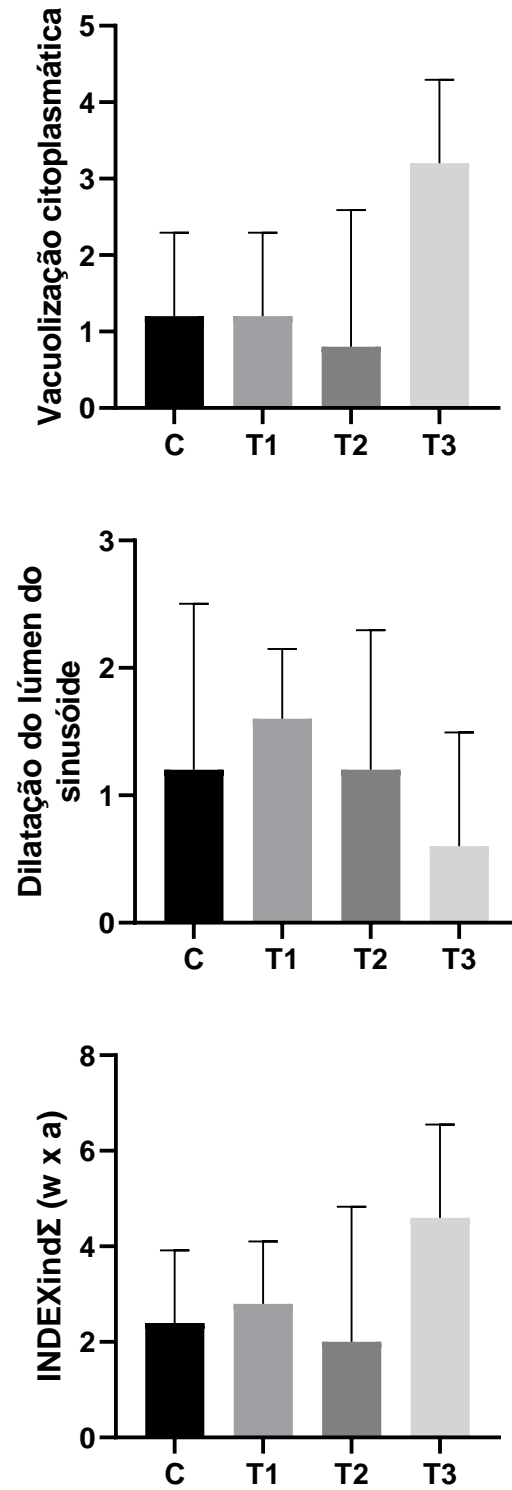
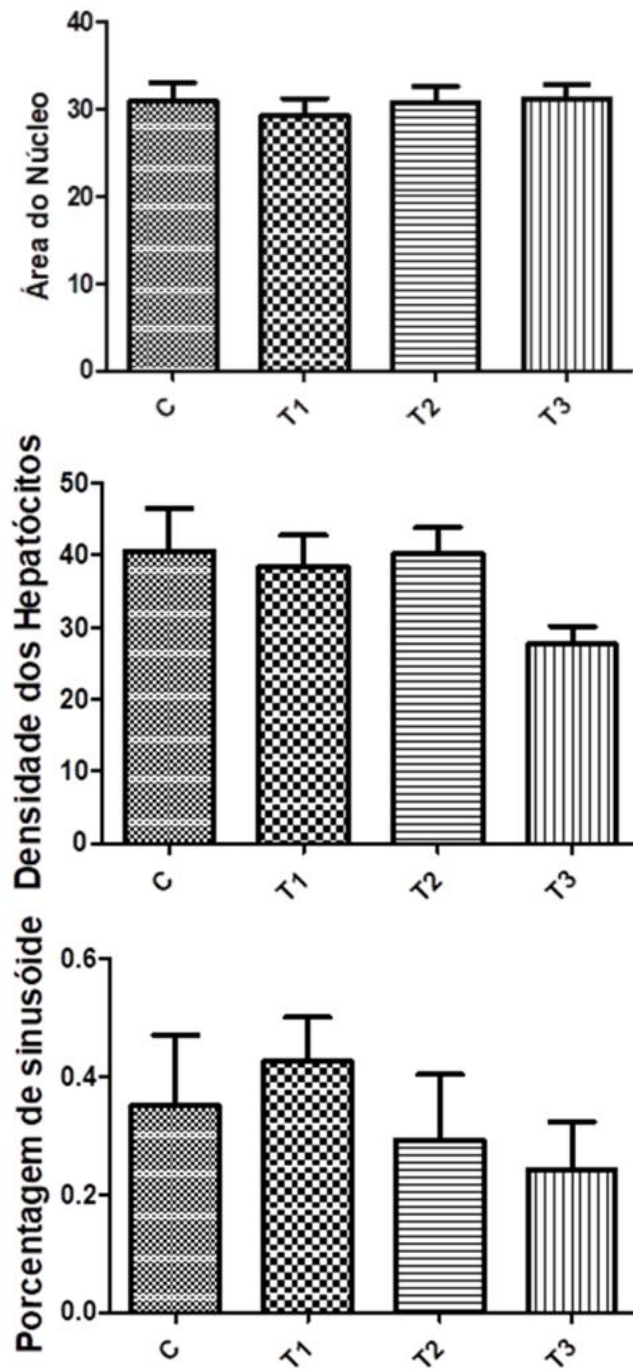


Gráfico 6. Área do núcleo (μm^2), densidade de hepatócitos ($\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2$) e porcentagem de sinusóides no tecido (%) em ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol.

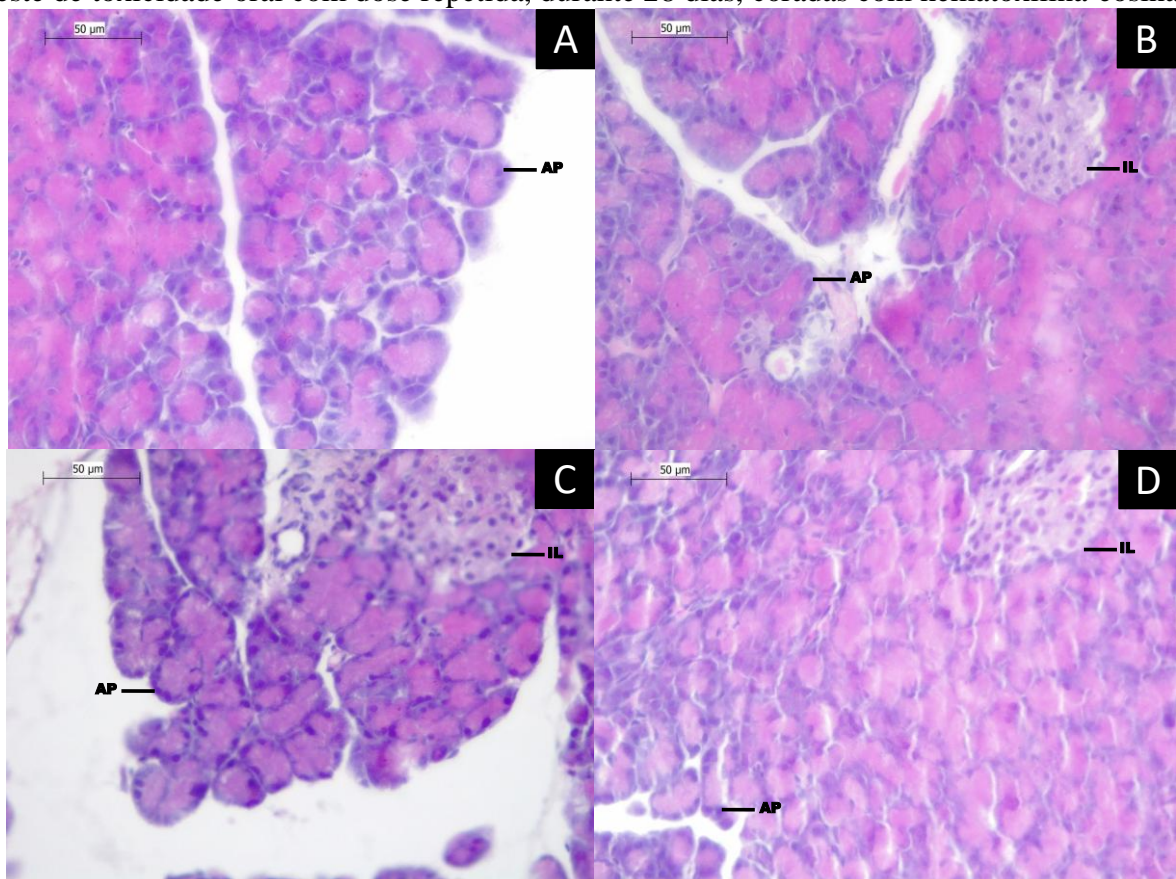


5.4.4. Pâncreas

No grupo controle, o pâncreas apresentou morfologia condizente com a literatura. Foram observados ácinos com células serosas contendo núcleos arredondados localizados na região basal, corada em roxo pela hematoxilina. A região apical destas células, por sua vez, corou em rosa pela eosina. As ilhotas pancreáticas foram coradas levemente em lilás e seus núcleos foram corados em roxo pela hematoxilina (Figura 18 - A-D).

A análise semiquantitativa não revelou alterações em nenhum dos parâmetros histológicos, em todos os animais do grupo controle, T1, T2 e T3 (Figura 18 - A, B, C e D).

Figura 18. Fotomicrografias do pâncreas de ratos Wistar tratados com acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade oral com dose repetida, durante 28 dias, coradas com hematoxilina-eosina.



Legenda: (A) Grupo Controle; (B) Tratamento 1; (C) Tratamento 2; (D) Tratamento 3. (AP) Ácinos pancreáticos; (IL) ilhota de Langerhans.

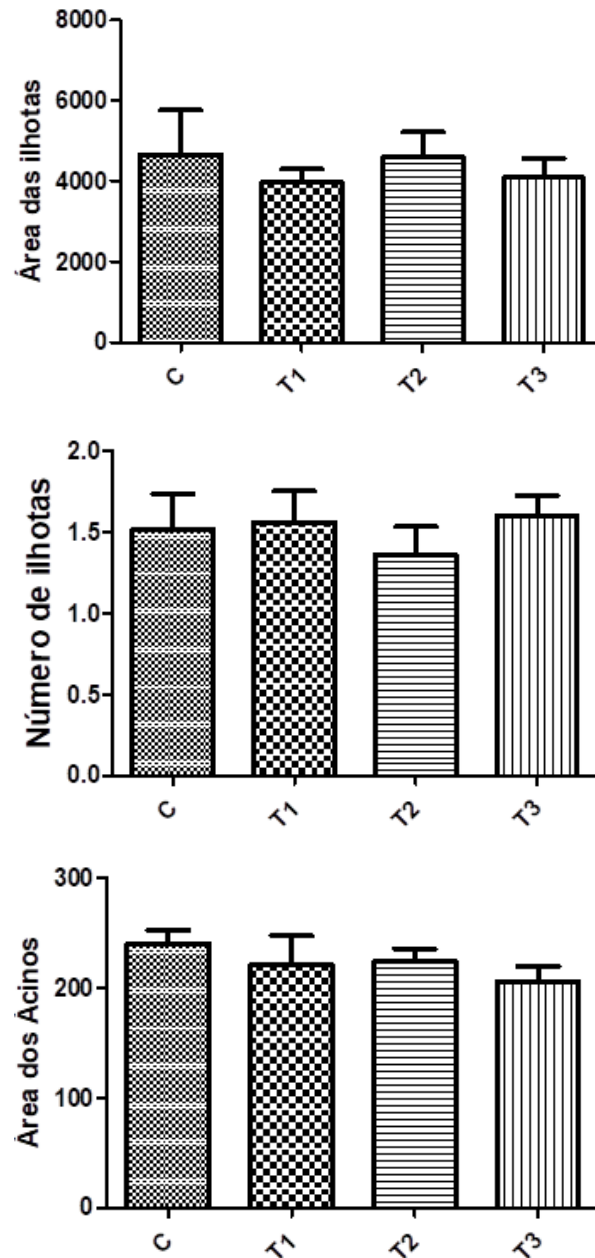
Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à área da ilhota de Langerhans, ao número de ilhotas e à área do ácino, conforme dados discriminados na Tabela 14 e no Gráfico 7.

Tabela 14. Medidas da área da ilhota(μm^2), média do número de ilhotas por imagem ($70,6 \times 10^3\mu\text{m}^2$) e área do ácino (μm^2) em ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol.

Parâmetros	Grupos				p-valor
	C	T1	T2	T3	
Área da ilhota	$4665,39 \pm 2453,79^a$	$3961,83 \pm 747,65^a$	$4587,78 \pm 1396,64^a$	$4081,46 \pm 1057,33^a$	0,853
Número de ilhotas	$1,52 \pm 0,48^a$	$1,56 \pm 0,43^a$	$1,36 \pm 0,38^a$	$1,60 \pm 0,28^a$	0,795
Área do ácino	$240,41 \pm 26646,30^a$	$220,68 \pm 60038,70^a$	$223,71 \pm 26889,31^a$	$205,62 \pm 31083,30^a$	0,578

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

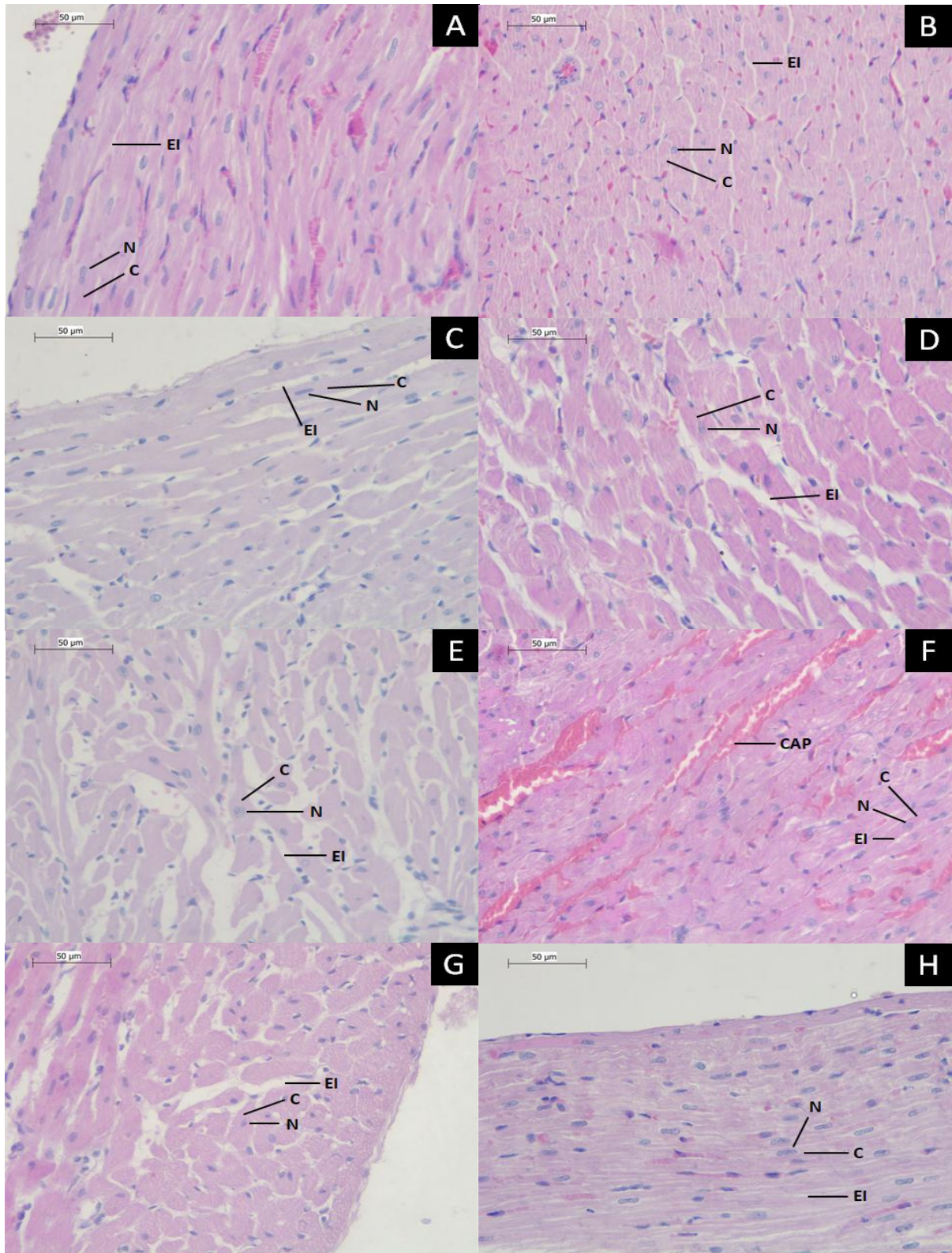
Gráfico 7. Área da ilhota (μm^2), média do número de ilhotas por imagem ($70,6 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) e área do ácino (μm^2) em ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol.



5.4.5. Coração

No grupo controle, foram observados cardiomiócitos com coloração fortemente acidófila e núcleos centrais corados de forma intensa pela hematoxilina, em corte predominantemente longitudinal, com diâmetros homogêneos e entremeados por escasso interstício (Figura 19 - A, B). Nos tratamentos, foram observados espaços intersticiais levemente aumentados, sem diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,498$) (Figura 19 - C, H). Nos grupos T1 e T2, leve congestão foi observada nos capilares sanguíneos, também sem diferenças entre os grupos ($p = 0,549$) (Figura 19 - F). Também não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação ao INDEXind ($p = 0,239$) (Figura 19 - A, H).

Figura 19. Fotomicrografias do coração de ratos Wistar tratados com acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade oral com dose repetida, durante 28 dias, coradas com hematoxilina-eosina.



Legenda: (A, B) Grupo Controle; (C, D) Tratamento 1; (E, F) Tratamento 2; (G, H) Tratamento 3. (C) Citoplasma do cardiomiócito; (CAP) Capilar sanguíneo; (EI) Espaço Intersticial; (N) Núcleo do cardiomiócito.

Tabela 15. Média \pm desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) e dos índices individuais (INDEXind) observados no coração de indivíduos expostos ao acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade oral com dose repetida.

Alteração morfológica	Fator de importância (w)	INDEXalt (w x a)				p-valor
		C1	T1	T2	T3	
Aumento do interstício	1	0,00 \pm 0,00 ^a	0,40 \pm 0,55 ^a	0,20 \pm 0,45 ^a	0,20 \pm 0,45 ^a	0,498
Congestão de vasos sanguíneos	1	0,00 \pm 0,00 ^a	0,20 \pm 0,45 ^a	0,20 \pm 0,45 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,549
INDEXindΣ (w x a)		0,00 \pm 0,00 ^a	0,60 \pm 0,55 ^a	0,40 \pm 0,89 ^a	0,20 \pm 0,45 ^a	0,239

Valores seguidos por letras diferentes em cada coluna diferem estatisticamente entre si (ANOVA *oneway* seguido de teste *post-hoc* de Dunn, $p < 0.05$).

A análise morfométrica não identificou diferenças na porcentagem de interstício ocupando o órgão ($p = 0,1557$). No entanto, observou-se diferença estatística significativa no diâmetro dos cardiomiócitos, que apresentou um aumento progressivo nos três grupos de tratamento, em relação ao grupo controle ($p = 0,0001$), conforme dados discriminados na Tabela 16 e observados no Gráfico 9.

Tabela 16. Diâmetro dos cardiomiócitos ($\times 10^3\mu\text{m}$) e porcentagem do tecido ocupada pelo interstício (%) no coração de indivíduos expostos ao acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade oral com dose repetida.

Parâmetros do Coração	Grupos				p-valor
	C	T1	T2	T3	
Diâmetro dos cardiomiócitos	9.17 ± 0.63^a	10.94 ± 0.13^b	12.58 ± 0.95^c	12.72 ± 1.05^c	0,0001
% Interstício	23.53 ± 5.57^a	23.29 ± 4.07^a	22.32 ± 1.92^a	27.92 ± 2.19^a	0,1557

Valores seguidos por letras diferentes em cada coluna diferem estatisticamente entre si (ANOVA *oneway* seguido de teste *post-hoc* de Dunn, $p < 0.05$).

Gráfico 8. Aumento do interstício, congestão de vasos sanguíneos e dos índices individuais (INDEXind) observados no coração em ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol.

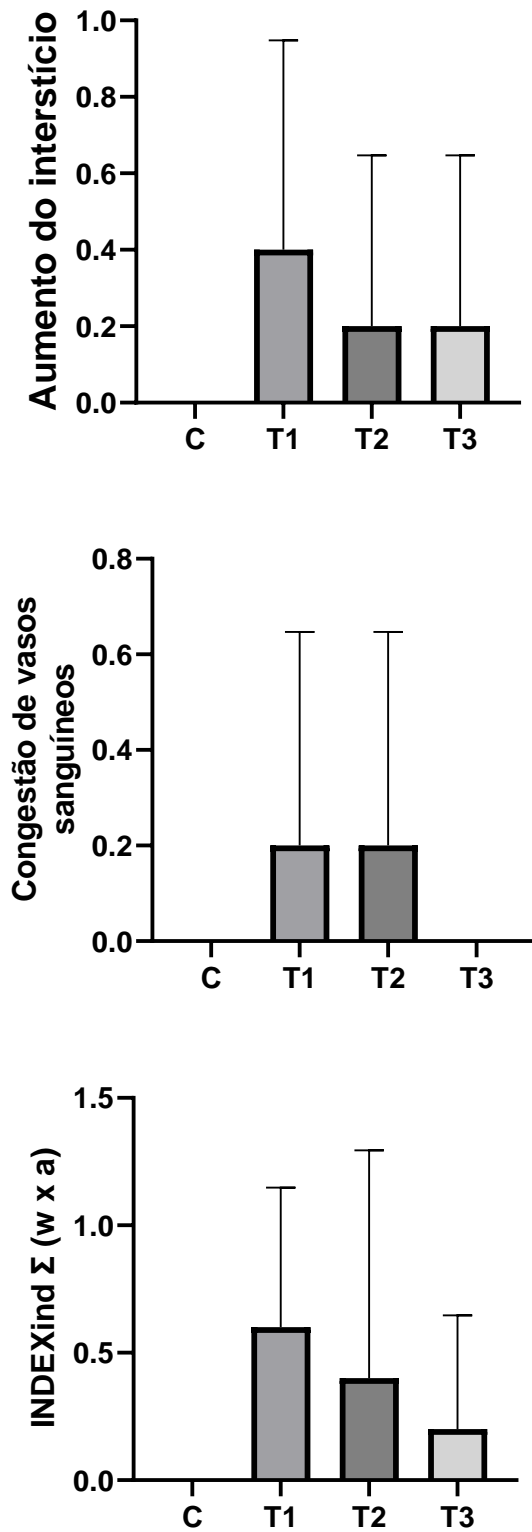
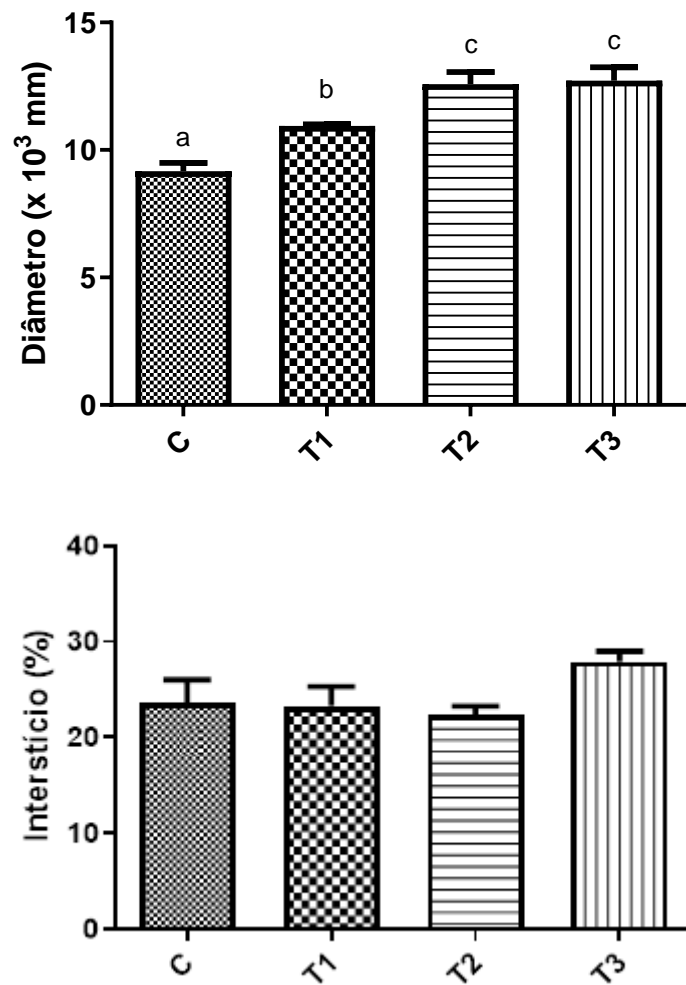


Gráfico 9. Porcentagem do órgão ocupada por interstício (%) e o diâmetro dos cardiomiócitos ($\times 10^3 \mu\text{m}$) em ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol.

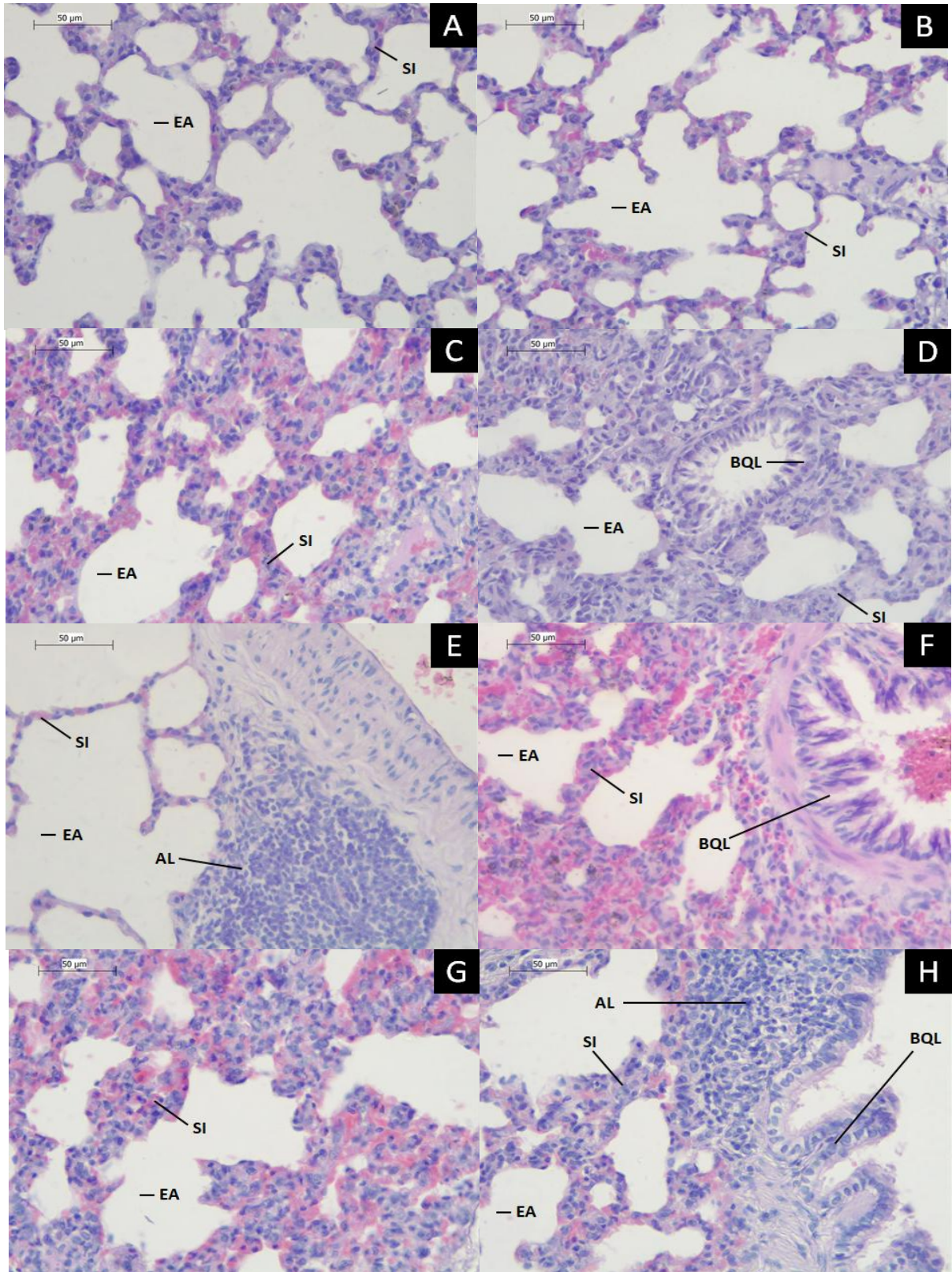


5.4.6. Pulmão

No grupo controle, observaram-se ductos alveolares, alvéolos e sacos alveolares com morfologia normal. Os espaços alveolares apresentaram diâmetros variados, e os septos interalveolares eram compostos por pneumócitos, macrófagos alveolares e capilares sanguíneos contendo hemácias. Os núcleos de todas as células analisadas foram corados de maneira intensa e homogênea com hematoxilina, enquanto o citoplasma apresentou coloração leve e homogênea pela eosina. As hemácias foram coradas intensamente com eosina, apresentando coloração avermelhada (Figura 20 - A, B). Septos interalveolares com espessamento leve foram observados (Figura 20 - C, D). Também foram identificados agregados linfoides em alguns indivíduos (Figura 20 - E, H).

Na análise semiquantitativa, não foram identificadas diferenças quanto ao espessamento do septo alveolar ($p = 0,513$), congestão de vasos sanguíneos ($p = 0,130$), presença de agregados linfoides ($p = 0,191$), infiltrados inflamatórios ($p = 0,549$) e de hemáticas intralveolares ($p = 0,096$) entre o grupo controle e demais tratamentos. Os grupos também não diferiram quanto ao INDEXind ($p = 0,268$).

Figura 20. Fotomicrografias do pulmão de ratos Wistar tratados com acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade oral com dose repetida, durante 28 dias, coradas com hematoxilina-eosina.



Legenda: (A, B) Grupo Controle; (C, D) Tratamento 1; (E, F) Tratamento 2; (G, H) Tratamento 3. (AL) Agregado Linfoide; (BQL) Bronquíolo; (EA) Espaço Alveolar; (SI) Septo Interalveolar.

Tabela 17. Média \pm desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) e dos índices individuais (INDEXind) observados no pulmão de indivíduos expostos ao acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade oral com dose repetida.

Alteração morfológica	Fator de importância (w)	INDEXalt (w x a)				p-valor
		C1	T1	T2	T3	
Espessamento dos septos	1	0,40 \pm 0,55 ^a	0,60 \pm 0,55 ^a	0,20 \pm 0,45 ^a	0,20 \pm 0,45 ^a	0,513
Congestão de vasos sanguíneos	1	0,60 \pm 0,55 ^a	0,60 \pm 0,55 ^a	0,20 \pm 0,45 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,130
Agregados linfoides	1	0,80 \pm 1,10 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,80 \pm 1,10 ^a	0,191
Infiltrado inflamatório	1	0,00 \pm 0,00 ^a	0,40 \pm 0,89 ^a	0,40 \pm 0,89 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,549
Hemácias intra-alveolares	1	0,00 \pm 0,00 ^a	0,80 \pm 1,10 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,096
INDEXind Σ (w x a)		1,80 \pm 1,30 ^a	2,40 \pm 1,82 ^a	0,80 \pm 1,10 ^a	1,00 \pm 1,41 ^a	0,268

Valores seguidos por letras diferentes em cada coluna diferem estatisticamente entre si (ANOVA *oneway* seguido de teste *post-hoc* de Dunn, $p < 0.05$).

A análise morfométrica também não revelou diferenças estatísticas quanto à porcentagem de septos alveolares ($p = 0,278$) e de células ($p = 0,899$), e densidade numérica de alvéolos pulmonares ($p = 0,152$), conforme dados discriminados na Tabela 18 e observados no Gráfico 11.

Tabela 18. Porcentagem do tecido ocupado por septos alveolares (%), porcentagem do tecido ocupada por células (%) e densidade do número de alvéolos (por mm^2) no pulmão de indivíduos expostos ao acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade oral com dose repetida.

Parâmetros do Pulmão	Grupos				p-valor
	C	T1	T2	T3	
% Septos alveolares	45.31 ± 3.99 ^a	48.91 ± 5.82 ^a	42.97 ± 4.15 ^a	45.89 ± 4.27 ^a	0,278
% Células	20.98 ± 5.25 ^a	20.34 ± 4.18 ^a	19.84 ± 1.83 ^a	18.63 ± 3.78 ^a	0,899
Densidade de alvéolos	241.34 ± 59.75 ^a	252.15 ± 68.77 ^a	188.59 ± 27.04 ^a	190.17 ± 45.31 ^a	0,152

Valores seguidos por letras diferentes em cada coluna diferem estatisticamente entre si (ANOVA *one-way* seguido de teste *post-hoc* de Dunn, $p < 0.05$).

Gráfico 10. Espessamento dos septos, congestão de vasos sanguíneos, agregados linfóides, infiltrado inflamatório, hemácias intra-alveolares dos índices individuais (INDEXind) observados no pulmão em ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol.

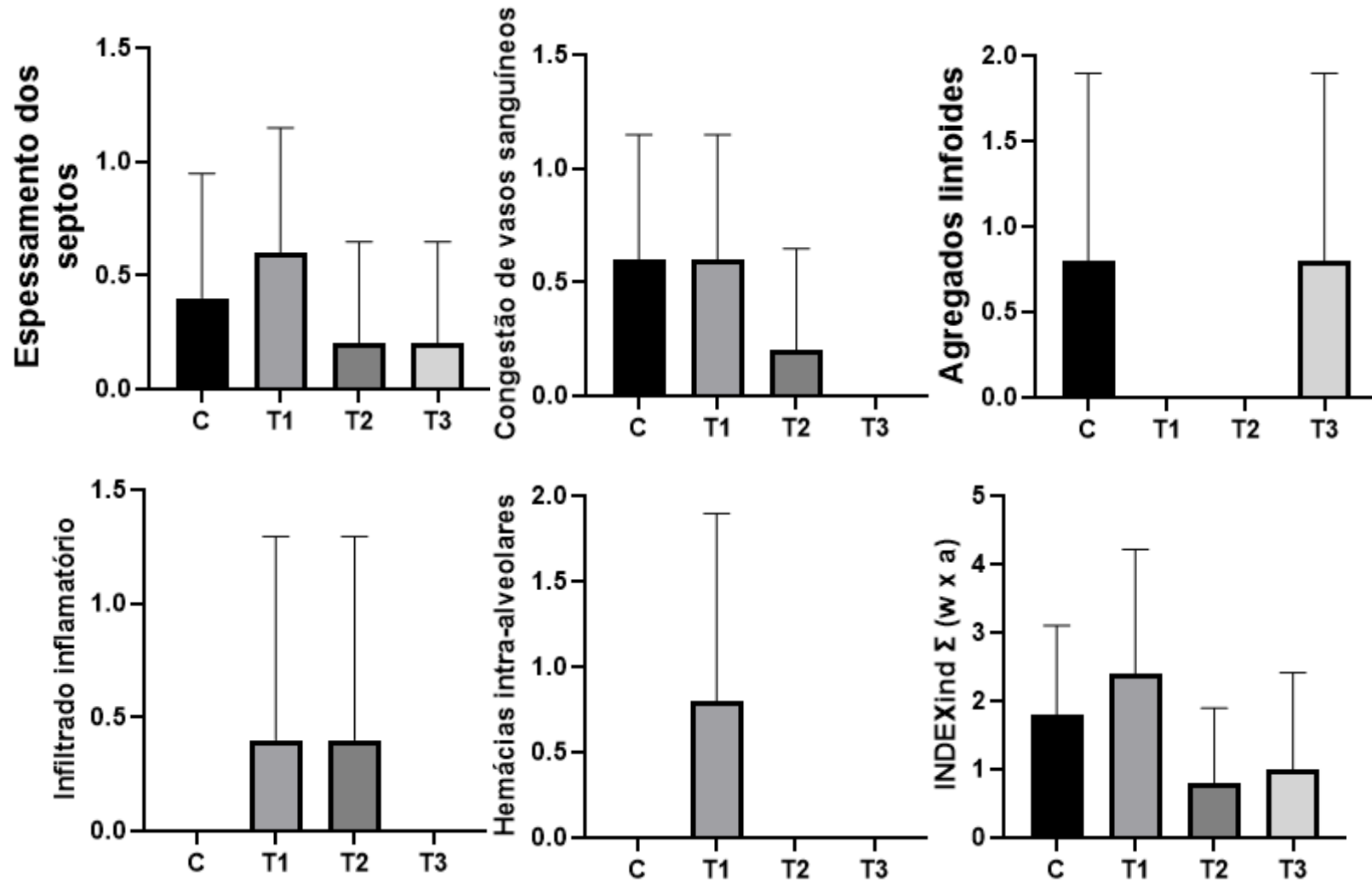
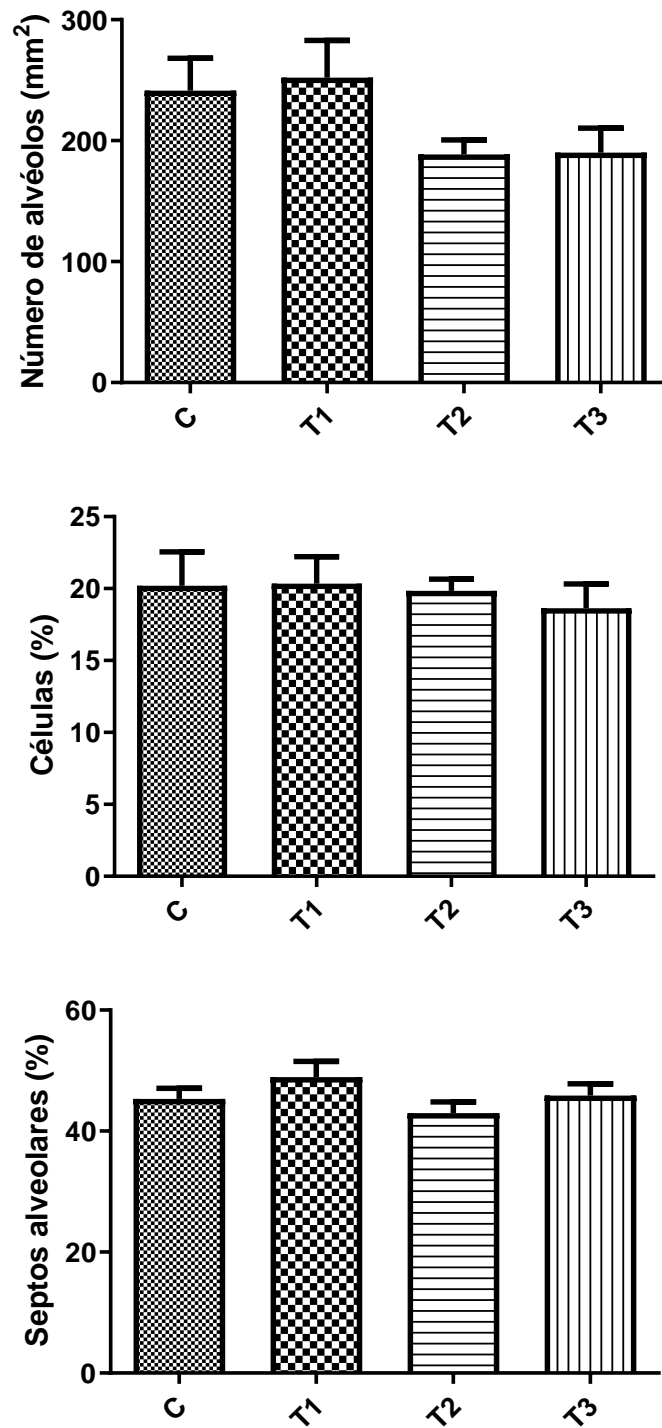


Gráfico 11. Porcentagem do tecido ocupada pelos septos alveolares, a porcentagem ocupada por células e a densidade dos alvéolos no tecido em ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida de acetilcarvacrol.



6. DISCUSSÃO

A atividade acaricida do acetilcarvacrol já foi demonstrada contra várias espécies de carrapatos e em diferentes estágios de vida. Este princípio ativo foi responsável pela mortalidade de larvas e adultos de *Rhipicephalus microplus* e, no estágio adulto, ocasionou tanto a redução da oviposição quanto o bloqueio da eclosão das larvas (RAMÍREZ *et al.*, 2016; NOVATO *et al.*, 2018). Em fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l., também se observou atividade acaricida, refletida tanto na mortalidade quanto na redução da oviposição e na eclosão de larvas (OLIVEIRA *et al.*, 2020; KONIG *et al.*, 2020). Apesar dessas evidências, é importante que seus efeitos tóxicos, quando aplicado diretamente no hospedeiro não-alvo, sejam investigados, permitindo inferir sobre a segurança da sua aplicação em animais infestados naturalmente, ou seja, no hospedeiro específico para cada espécie de carrapato.

No presente estudo, a avaliação comportamental de ratos submetidos à aplicação oral de acetilcarvacrol, com doses repetidas durante 28 dias, não revelou efeitos clínicos significativos e o produto não ocasionou a morte de nenhum animal. A presença de fezes pastosas, contudo, pode estar correlacionada à adaptação dos animais à dieta rica em lipídios, em virtude do uso de óleo de milho como veículo. André *et al.* (2016) também não observaram nenhuma morte no teste de toxicidade aguda em camundongos albinos suíços fêmeas que receberam acetilcarvacrol por gavagem esofágica durante 15 dias (ANDRÉ *et al.*, 2016).

Do início do experimento até o dia da eutanásia, não houve diferença estatística nas médias de peso corporal dos ratos entre o grupo controle e os grupos T1, T2 e T3. Os animais apresentaram aumento de peso constante em todos os grupos ao longo do experimento, seguindo o padrão normal de crescimento dos animais criados em biotério. Além disso, o peso corporal médio destes ratos encontrava-se dentro do esperado para a mesma faixa etária (NERY *et al.*, 2011). Após exposição de ratos Wistar ao óleo essencial de *Cinnamomum tamala* diluído em óleo de milho, administrado por gavagem em doses repetidas, todos os grupos avaliados também apresentaram aumento de peso corporal no decorrer do experimento (NAJNIN, *et al.*, 2019), de forma semelhante ao presente estudo.

A análise hematológica é a forma mais comum e fácil de estudar determinadas alterações específicas e inespecíficas, e muitas patologias podem ser identificadas a partir dos resultados obtidos no hemograma (SANDERSON; PHILIPS, 1981; GUIMARÃES, 1990). Neste estudo, não houve diferença estatística na quantidade de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos, leucócitos, segmentados, linfócitos e monócitos. Também não houve diferença

estatística para os mesmos parâmetros em ratos Wistar expostos ao óleo essencial e ao extrato de *C. tamala* em acetato de etila, administrados por via oral durante 90 dias (MABEKU *et al.*, 2007; NAJNIN, *et al.*, 2019). A exposição subcrônica de ratos ao tratamento com acetilcarvacrol nanoencapsulado, administrado diariamente por gavagem durante 28 dias, também não resultou em diferenças significativas nos mesmos parâmetros (ANDRÉ *et al.*, 2020).

Houve diferença estatística na comparação com o grupo controle, em relação à hemoglobina corpuscular média e à concentração de hemoglobina corpuscular média. Essa diferença estatística, contudo, não tem significância biológica, pois os resultados do presente estudo estão dentro dos limites de referência para animais de laboratório de diferentes regiões (DINIZ *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2014), mesmo que haja alguma variação nestes valores. O acetilcarvacrol, mesmo quando aplicado em camundongos por via oral e também por via intraperitoneal, não foi capaz de alterar a hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média, em comparação com o grupo controle (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Exames bioquímicos podem revelar danos ocorridos em nível celular, causados por agentes tóxicos que afetam vários órgãos, alterando suas funções fisiológicas ou até mesmo estruturais. Esses testes entregam resultados diretos, satisfatórios e de fácil compreensão e interpretação (TESHOME *et al.*, 2008; GAW *et al.*, 2015). Neste trabalho, não houve diferença estatística significativa na concentração das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), embora seja possível notar leve tendência de aumento dos valores de ambas as enzimas, conforme se elevou a concentração do produto.

As principais alterações histopatológicas observadas no estômago de ratos tratados com acetilcarvacrol foram a descamação epitelial, a hipertrofia das células mucosas superficiais e a dilatação das glândulas gástricas. Devido à ação tóxica do produto neste órgão, houve diferença estatística significativa no INDEXind obtido para o grupo T3, quando comparado ao grupo controle. A administração de etanol por via oral em diferentes doses em ratos também foi responsável pelas mesmas alterações (UNLUÇERÇI *et al.*, 1999; OSTOVANEH *et al.*, 2023; SANPINIT *et al.*, 2023). No entanto, vale salientar que, nos estudos mencionados anteriormente, esses achados ocorreram em grau muito mais acentuado, afetando maior extensão do tecido estomacal em todos os animais tratados. Por outro lado, no presente estudo, essas alterações foram observadas em regiões limitadas da mucosa estomacal, em apenas 2 indivíduos e principalmente nas concentrações mais elevadas do

produto. Em contrapartida, o óleo essencial de *Thymus fontanesii*, cujo princípio ativo majoritário é o carvacrol, molécula estruturalmente semelhante ao acetilcarvacrol, apresentou ação cicatrizante e gastroprotetora em lesões gástricas induzidas por etanol. O carvacrol isolado, por sua vez, demonstrou ação protetora após carcinogênese gástrica induzida por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina em ratos e camundongos (OLIVEIRA *et al.*, 2012; MOUHI *et al.*, 2017; GUNES-BAYIR *et al.*, 2022).

Ratos expostos oralmente a diferentes concentrações de extratos de plantas como *Artemisia absinthium* e *Boesen bergia rotunda* apresentaram alterações em toda a arquitetura intestinal, como ulceração da mucosa, densos infiltrados inflamatórios, degeneração e corrosão (ROSDIANTO *et al.*, 2020; KAUSER *et al.*, 2023). No presente estudo, contudo, nenhuma alteração foi observada no duodeno. Em um estudo em que o carvacrol foi administrado oralmente em diferentes doses em ratos e porcos, demonstrou-se que sua absorção ocorre principalmente no estômago e no intestino (SCHRODER; VOLLMER, 1932; MICHIELS *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009). Considerando-se que as alterações provenientes da administração de acetilcarvacrol tenham sido observadas principalmente na mucosa estomacal, e levando-se em conta que o acetilcarvacrol seja absorvido de forma semelhante ao carvacrol, pode-se supor que grande parte do produto tenha sido absorvida no estômago, diminuindo sua disponibilidade no intestino delgado e, portanto, minimizando seus efeitos tóxicos neste local.

Cunha *et al.* (2017), em estudo realizado com fêmeas de camundongos expostas ao timol, isômero do carvacrol, demonstraram importantes alterações histológicas no fígado, como vacuolização citoplasmática e dilatação de vasos sanguíneos. Além disso, a exposição subcrônica de ratos Wistar ao acetilcarvacrol (250 mg/kg), administrado diariamente por gavagem durante 28 dias, resultou em alterações hepáticas, como inchaço dos hepatócitos, hiperplasia das células de Kupffer, congestão das veias porta e centro lobular, e presença de células inflamatórias nos animais tratados (ANDRÉ *et al.*, 2020). Estes resultados contrastam com os do presente estudo, em que apenas leves alterações hepáticas foram identificadas, como vacuolização citoplasmática dos hepatócitos e dilatação dos sinusoides, mesmo após a exposição à quantidades significativamente maiores de acetilcarvacrol. Em contrapartida, um estudo com camundongos, utilizando o extrato etanólico de *Thymbra spicata*, que possui o carvacrol como seu principal constituinte, demonstrou atividade hepatoprotetora, indicando que esses extratos possuem algum valor medicinal potencial (AKKOL *et al.*, 2009). As alterações hepáticas verificadas no presente estudo, no entanto, podem ser consideradas reversíveis, uma vez que as células sofreram alterações funcionais e morfológicas, mas

mantiveram-se vivas, podendo se recuperar assim que o estímulo nocivo for suspenso (JUNG; YIM, 2017). Os resultados das análises bioquímicas para as enzimas hepáticas ALT e AST, mencionados anteriormente, corroboram os resultados das análises semiquantitativa e morfométrica para o fígado.

Após a exposição a produtos tóxicos, o pâncreas pode sofrer alterações morfológicas com a mesma frequência do que os demais órgãos (WARDANI *et al.*, 2019). Stojanovic et al. (2019) aplicaram oralmente 10, 100 e 500 mg/kg de carvacrol dissolvido em azeite de oliva em ratos Wistar. Em doses mais altas (500 mg/kg), o uso de carvacrol foi responsável pela ocorrência de edema pancreático e infiltrados inflamatórios. A dose mais baixa deste produto, contudo, foi capaz de prevenir o aumento na infiltração de células inflamatórias induzido pela L-arginina (STOJANOVIC *et al.*, 2019). No presente estudo, a exposição ao acetilcarvacrol não foi capaz de ocasionar quaisquer alterações morfológicas em nenhum dos ratos tratados com acetilcarvacrol por via oral, indicando que o processo de acetilação do carvacrol pode conferir melhor atividade quando comparado com o carvacrol. Entretanto, Bakir et al. (2016) e Kiliç et al. (2016) trataram ratos com pancreatite aguda com carvacrol, e as alterações histopatológicas observadas no tecido pancreático foram aliviadas, permitindo a sugestão de que o carvacrol possa ser um novo candidato a fármaco seguro e potente para o tratamento da pancreatite aguda (BAKIR *et al.*, 2016; KILIÇ *et al.*, 2016).

Na avaliação morfológica do coração, não houve aumento do interstício e congestão de capilares sanguíneos. Também não foi identificada a presença de infiltrados inflamatórios. A ausência de infiltrados inflamatórios junto às alterações morfológicas sugere que a toxicidade do acetilcarvacrol no coração pode decorrer de um mecanismo de ação direto, independente do sistema imunológico (GOUDA *et al.*, 2018). Por sua vez, a análise morfométrica cardíaca não indicou diferenças significativas entre os grupos com relação à porcentagem do órgão ocupada pelo interstício, mas indicou um aumento significativo no diâmetro dos cardiomiócitos nos animais tratados com acetilcarvacrol. Possível explicação para essa hipertrofia está na atividade anticolinesterásica do acetilcarvacrol (COSTA-JUNIOR *et al.*, 2016). A exposição ao composto pode levar ao acúmulo de acetilcolina e à superestimulação dos receptores colinérgicos que, no coração, estão associados à redução da frequência cardíaca. Para manter o débito cardíaco, o organismo compensaria aumentando o volume sistólico, o que eleva a demanda funcional dos cardiomiócitos, culminando em sua hipertrofia (JANKOWSKA, 2017).

Estudos que investigaram a toxicidade pulmonar em ratos expostos à desoxirrubicina, ao extrato metanólico de sementes de *Tetracarpidium conophorum* e à fumaça de óleo de

cozinha (Owumi *et al.*, 2021; Oriakhi *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2021) demonstraram a ocorrência de alterações como espessamento dos septos interalveolares, congestão de capilares sanguíneos e infiltração inflamatória. No presente estudo, entretanto, essas alterações afetaram um número limitado de indivíduos, em uma área reduzida dos órgãos avaliados. Mesmo assim, as análises morfológicas e morfométricas pulmonares não identificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

A avaliação toxicológica comparativa entre carvacrol, acetilcarvacrol e um pesticida à base de fipronil em células sanguíneas humanas mostrou que a acetilação do carvacrol reduziu sua toxicidade para essas células. De fato, o acetilcarvacrol foi menos tóxico para eritrócitos e leucócitos em comparação com outros produtos químicos (KONIG *et al.*, 2022). Além disso, o acetil-timol, um isômero do acetilcarvacrol, foi testado em camundongos, e observou-se uma redução na toxicidade do produto acetilado ao compará-lo com o seu composto de origem, o timol. No ensaio de citotoxicidade em macrófagos, o timol reduziu a sobrevivência celular para 36,5%, enquanto o acetil-timol não demonstrou toxicidade para essas células (MORAIS *et al.*, 2014). Esses resultados destacam mais uma vez as vantagens do processo de acetilação de substâncias naturais.

Considerando seu potencial no controle de carrapatos, sugere-se que a aplicação de acetilcarvacrol, em associação com outros produtos químicos que atuem de forma sinérgica, possa potencializar seus resultados e reduzir seus efeitos tóxicos no organismo dos hospedeiros.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, embora leves alterações tenham de fato sido observadas em ratos expostos ao acetilcarvacrol por via oral, sua extensão não foi grande o suficiente para ocasionar danos permanentes ou irreversíveis. Entre as alterações estatisticamente significativas encontradas e as hipóteses levantadas, é indispensável enfatizar a proporção das alterações e a significância estatística dos dados obtidos. As concentrações equivalentes aos tratamentos 1 e 2 não produziram efeitos adversos relevantes, podendo ser consideradas seguras para uso, tendo em vista, especificamente, os parâmetros aqui analisados.

REFERÊNCIAS

- ABBASI-OSHAGHI, E. *et al.* NLRP3 inflamma some, oxidative stress, and apoptosis induced in the intestine and liver of rats treated with titanium dioxide nanoparticles: *in vivo* and *in vitro* study. **International Journal of Nanomedicine**, Iran, v. 14, n. 201914, p. 1919-1936, 2019.
- AHMAD, A. *et al.* Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, India, n. 30, p. 41-50, 2010.
- 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.
- AKKOL, E. K. *et al.* Cholesterol-reducer, antioxidant and liver protective effects of *Thymbra spicata* L. var. *spicata*. **Journal of Ethnopharmacology**, Turkey, v. 126, n. 2, p. 314-319, 2009.
- ALARCON-CHAIDEZ F. *et al.* Confirmation of tick bite by detection of antibody to *Ixodes calreticulin* salivary protein. **Clin. Vacc. Immunol.**, v. 13, 2006.
- ALSEMEH, A. E. *et al.* Protective effect of alogliptin against cyclophosphamide-induced lung toxicity in gats: Impact on PIK/Akt/Fox01 pathway and downstream inflammatory cascades. **Cell and Tissue Research**: Egypt, v. 388, n. 1, p. 417-438, 2022.
- ALVARENGA, E. M. *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. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 2. n. 2, p. 14-25, 2012.

ANDERSEN, A. Final report on the safety assessment of sodium p-chlorom- cresol, p-chloro-m-cresol, chloro thymol, 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.

ANDRALOJC K. M. *et al.* Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. **Diabetologia.** v. 52, p. 486–493, 2009.

ANDRE, W. P. P. *et al.* Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Veterinary Parasitology, Brazil**, n. 218, p. 52-58, 2016.

ANDRE, W. P. P. *et al.*, Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. **Veterinary Parasitology, Brazil**, 26, 323–330, 2017.

ANDRE, W. P. P. *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.

ANDRADE, V. A. *et al.* Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Montes Claros, Brazil, v. 34, n. 12, p. :1153-1161, 2014.

ANDREOTTI, R. *et al.* Protective action of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial. **Veterinary Parasitology**, Campo Grande, Brazil, v. 197, p. 341–345, 2013.

ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. (Ed.). **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília, DF: Embrapa, p. 240, 2019.

ANHOLETO, L. A *et al.* Ação do extrato etanólico bruto de *Acmella oleracea* em carrapatos *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): avaliação ultraestrutural do sistema reprodutor masculino. **Biodiversidade e Biotecnologia no Brasil 1**. Rio Branco, AC. 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. *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**, Juiz de Fora, MG, Brazil, v. 30, p. 377–382, 2016.

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

BALASHOV, YU. S. **Ixodid ticks as parasites and vectors of infections**. Russian: Nauka, St. Petersburg, 1998.

BANDARA K, KARUNARATNE S. Mechanisms of acaricide resistance in the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* in Sri Lanka. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 139:68–72. doi: 10.1016, 2017.

BANETH, G. *et al.* Transmission of *Hepatozoon canis* to Dogs by Naturally-Fed or Percutaneously-Injected *Rhipicephalus sanguineus* Ticks. **Journal of Parasitology**, Israel, v. 87, n. 3, p. 606-611, 2001.

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

BAKIR, M. *et al.* The carvacrol ameliorates acute pancreatitis-induced liver injury via antioxidant response. **Cytotechnology**, Turkey, v. 68, n. 4, p. 1131-1146, 2016.

BASER, K. HUSNU C. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. **Current Pharmaceutical Design**, Turkey, v. 14, n. 29, p. 3106-3120, 2008.

BECHARA, G. H. *et al.* *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.4, n.2, p.61-66, 1995.

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.

BELLATO, V.; DAEMON, E. Efeitos de três tempera turassobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** n.6, p.21–27, 1997.

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.

BERNET, D. *et al.* Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BOOTH, T. F. *et al.* The Effects Of Precocene Treatment On Egg Wax Production In Gene's Organ And Egg Viability In The Cattle Tick *Boophilus Microplus* (Acarina Ixodidae): An Ultrastructural Study. **Experimental & Applied Acarology**, London, Great Britain, v. 2, p. 187--198, 1986.

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; BARBOSA, C. S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 89-96, 2011.

BROWN, S. J. Characterization of Tick Antigens Inducing Host Immune Resistance. II. Description of Rabbit Acquired Immunity to *Amblyomma americanum* Ticks and Identification of Potential Tick Antigens by Western Blot Analysis. **Veterinary Parasitology**, Los Angeles, U.S.A., n. 28, p. 245-259, 1988.

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.

BRUMPT, E. Longevité du virus de la fièvre boutonneuse (*Rickettsia conorii*, n. sp.) chez la tique *Rhipicephalus sanguineus*. **C. R. Soc. Biol.** v. 110, p. 1197–1199, 1932.

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

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. *et al.* Carvacrol Codrugs: A New Approach in the Antimicrobial Plan. **PloS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.

CAMICAS, J. L. *et al.* Nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition (Acarida, Ixodida). **Les tiques du Monde, Paris**, v. 1, n. 1, 1998.

CAMPOS, R. N. S. *et al.* Acaricidal properties of vetiver essential oil from *Chrysopogon zizanioides* (Poaceae) against the tick species *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, São Cristóvão, Brazil, n. 212, p. 324–330, 2015.

CAMPOS, A. K. Ectoparasitas: principais agentes e estratégias de controle. **Leite Integral**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-1, 2022.

CARVALHO, G. D. *et al.* Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, Brasil, v. 56, n. 01, p. 51-57, 2009.

CASTRO-JANER, E. *et al.* *In vitro* tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 120-128, 2009.

CETIN, H.; YANIKOGLU, A. A study of the larvicidal activity of *Origanum* (Labiatae) species from southwest Turkey. **BIO One**, Turkey, v. 31, n. 1, p. 118-122, 2006.

CHAGAS, A. C. S. *et al.* *In vitro* efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res**, Rio de Janeiro, Brazil, v. 110, p. 295–303, 2012.

CHANTASART, D. *et al.* 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. *et al.* Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em ratos Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 704-9, 2008.

COOPER, Terrance Gary *et al.* Tools of Biochemistry. **John Wiley & Sons**, New York, NY, 1977.

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. *et al.* Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do composto ciano-carvona. **J Basic Appl Pharm Sci.**, v. 33, p. 567–575, 2012.

COSTA-JÚNIOR, L. M. *et al.* Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phyto chemicals against or ganophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus microplus* (Boophilus). **Vet. Parasitol**, v.228, p.60-64, 2016.

COVELLI, V. **Guide to the Necropsy of the Mouse**: Division of Protection of Man and Ecosystems. 5. ed. Italy: ENEA. p. 1-39, 1999.

CRAWFORD, J. M. O Fígado e o Trato Biliar. **Patologia Estrutural e Funcional**, ed 6, 2000.

CRUZ, E. M. O. *et al.* Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*. **Veterinary Parasitology**, São Cristóvão, Brazil, v. 195, p. 198– 202, 2013.

CUNHA, E. L. R. *et al.* 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.

DAEMON, E. *et al.* Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res**, Juiz de Fora, Brazil, v. 105, p. 495–497, 2009.

DAMASCENO, A, S. *et al.* Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Sciences**, Brazil, v. 94, n. 1, p. 58-66, 2014.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Science Direct**, Pernambuco, Brazil, n. 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. *et al.* Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. **Parasites & Vectors**, Brasil, n. 6, p. 1-17, 2013.

DASHTBANEI, S.; KESHTMAND, Z. A Mixture of Multi-Strain Probiotics (*Lactobacillus Rhamnosus*, *Lactobacillus Helveticus*, and *Lactobacillus Casei*) had Anti-Inflammatory, Anti-Apoptotic, and Anti-Oxidative Effects in Oxidative Injuries Induced By Cadmium in Small Intestine and Lung. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, Iran, v. 15, n. 432, p. 226-238, 2023.

DEMMA, L. J. *et al.* Rocky Mountain Spotted Fever from an Unexpected Tick Vector in Arizona. **The new england journal of medicine**, Massachusetts, USA, v. 6, n. 353, 2005.

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. *et al.* Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801-804, 2004.

DINIZ, *et al.* Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss e ratos Wistar do Biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba. **CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS**, Brasil, v. 1, n. 26, p. 1-10, 1999.

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.

DRAKE, R. L. *et al.* **Gray's anatomioclínica para estudantes**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

DRUMMOND, R. O. *et al.* *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. **Patologia Clínica Veterinária**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1982.

DUX, J. P., STALZER, R.F. Managing Safety in the Chemical Laboratory. **Van Nostrand Reinhold**, v. 60, n. 18, 1988.

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.

ESCOBARI, P. *et al.* Chemical composition and antiprotozoal activities of *Colombian Lippia* sp. essential oils and their major components. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Colombia, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

EULÁLIOI, J. M. R. *et al.* Critical analysis and systematization of rat pancreatotomy terminology. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Brazil, v. 31, n. 10, p. 698-704, 2016.

FACCINI, J. L. H. *et al.* Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as experimental hosts for *Amblyomma dubitatum* Neumann (Acari: Ixodidae). **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.58, n.6, p.1236-1239, 2006.

FERNANDES, J. I. *et al.* 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.

FERNÁNDEZ-SALAS, A. *et al.* In vitro acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Veracruz, Mexico, n. 175, p. 113–118, 2011.

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.

FLAMINI, G. Acaricides of natural origin, personal experiences and review of literature (1990- 2001). **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 28, p. 381-451, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistics data bases**. 2018.

FREITAS, D. R. J.; POHL, P. C.; JR., I. S. F. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. **ACTA Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 2, p. 109-117, 2004.

FUJIWARA, S. *et al.* Pathological analysis of lesions in the exocrine pancreas of rats induced by Zinc Maltol. **The Japanese Society of Toxicologic Pathology**, Japan, v. 36, n. 4, p. 205-211, 2023.

FURLONG, J. *et al.* O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar?. **A Hora Veterinária**, Juiz de Fora, BRASIL, v. 27, n. 159, p. 1-7, 2007.

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, 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.

GARCIA, M. V. *et al.* Colonization and lesions on engorged female *Rhipicephalus sanguineus*, caused by *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1513-1518, 2004.

GASPAROTTO, O. C. *et al.* Fisiologia Animal Comparada. 1. ed. Florianópolis: **BIOLOGIA/EAD/UFSC**, p. 15-238, 2011.

GAZIM, Z. C. *et al.* Acaricidal activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari; Ixodidae). **Experimental Parasitology**, Maringá, Brazil, v. 129, p. 175–178, 2011.

GAW, A. *et al.* Bioquímica Clínica. 5. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p. 9-520, 2015.

G. H. S. Globally Harmonized System for the classification and labelling of chemicals, 2007.

GODARA, R. *et al.* Acaricidal activity of extract of *Artemisia absinthium* against *Rhipicephalus sanguineus* of dogs. **Parasitol Res**, Berlin, Germany, n. 113, p. 747–754, 2014.

GOMES, A. O carrapato do boi *Boophilus microplus*: ciclo, epidemiologia, patogenia e controle. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande, p. 157, 1998.

GOMES, R. F. *et al.* Comparative respiratory system mechanics in rodents. **J Appl Physiol**, v. 89, n. 3, p. 908-16, 2000.

GOMES, A. *et al.* Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1447-1452, ago. 2011.

GOMES, G. A. *et al.* Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor ornitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Brazil, v. 111, n. 6, p. 2423–2430, 2012.

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.

GREENE E. C. Anatomy of the Rat. **Hafner Publ. Co.**; New York: 1963.

GROVES, M. G. *et al.* Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks *Rhipicephalus sanguineus*. **Am. J. Vet. Res.** 36, 937–940, 1975.

GU, E. *et al.* Evaluation of genotoxicity and 13-week subchronic toxicity of root of *Asarumhetero ropoides* var. *seoulense* (Nakai) Kitag. **Journal of Ethno pharmacology**, Republic of Korea, v. 305, n. 116012, p. 1-11, 2023.

GUARDA, A. *et al.* The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 144–150, 2011.

GUGLIELMONE, A. A. *et al.* Redescription of the male and description of the female of *Ixodes abrocomae* Lahille, 1916 (Acari: Ixodidae). **SystParasitol**, Nunoa, Chile, v. 77, p. 153–160, 2010.

GUIMARÃES, R. X. **Clínica e Laboratório: Interpretação Clínica das provas laboratoriais**, Ed. Sarvier: São Paulo, 1990.

GUNES-BAYIR, A. *et al.* Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Carvacrol on N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG) Induced Gastric Carcinogenesis in Wistar Rats. **Nutrients**. Turkey, v. 12, n. 14, p. 28-48, 2022.

HABEEB, S. M. Ethno-Veterinary and Medical Know ledge of crude plant extracts and its methods of application (traditional and modern) for tickcontrol. **Word. Appl. Sci. J.**, v. 11, n. 9, p. 1047-1054, 2010.

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 humanand animal health**. Washington, N.7, p. 548, 1979.

HEMINGWAY, J. *et al.* 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.

HIGA L. *et al.* Evaluation of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulation using samples from Brazilian properties. **Braz. J. Vet. Parasitol** 25(2):163-171, 2016.

HORN C. C. *et al.* Why can't rodents vomit? A comparative behavioral, anatomical, and physiological study. **PLoS One**. 2013.

IBGE. **Biblioteca**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=equinos&searchphrase=all>>. 2018.

JANKOWSKA, M. *et al.* Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System-A Review. **Molecules**. 2017.

JONJEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. S3-S14, 2004

JONES, T. E.; MOHR, V.; HUNT, D. **Digestive System**. 2. ed. USA: Springer-Verlag, p. 1-384, 1997.

JUNIOR, O. A. C.; MURAD, J. C. B. Animais de Grande Porte II. **Recursos Naturais**, Brasília, p. 1-28, 2016.

KAKUDA, H. *et al.* Functional morphology of Gen O'sorgan in *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). **Experimental & Applied Acarology**, Fukuoka, Japan, n. 16, p. 263-275, 1992.

KARAASLAN, N. M.; KARAASLAN, M. G.; ATES, B. Effectsof Some Extraction Solventson the Antioxidant Properties of Strawberry Fruit. **International Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 4, n. 2, p. 102–109, 2018.

KAUSER, S. *et al.* Pre-clinical toxicity assessment of *Artemisia absinthium* extract-load edpolymeric nanoparticles associated with their oral administration. **Frontiers in Pharmacology**, India, v. 14, n. 234, p. 1-17, 2023.

Khan, A. S. *et al.* Semente de panacea “Nigella”: Uma revisão com foco nos efeitos regenerativos para doenças gástricas. **Saudi J. Biol. Sci.** v. 23, p. 542–553, 2016.

KHODADAD, P.; MEHDI, R. Biological activities of chamomile (*Matricaria chamomile*) flowers’ extract against the survival and egg laying of the cattle fever tick (Acari Ixodidae). **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, Shahrekord, Iran, v. 8, n. 9, p. 693-696, 2007.

KIERSZENBAUM, A. L. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. 1. ed. [S.I.): **Elsevier**, p. 8-677, 2008.

KILIÇ, Y. *et al.* Carvacrol modulates oxidative stress and decreases cell injury in pancreas of rats with acute pancreatitis. **Cytotechnology**, Turkey, v. 68, n. 4, p. 1243-1256, 2016.

KLAFKE, G. *et al.* Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus*. 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, 2013.

KOCH C.L. Systematische Uebersicht über die Ordnung der Zecken. *Arch Naturgesch*, 10: 238, 1844.

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, 1982.

KONIG, I. F. M. *et al.* Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks Tick-Borne Dis.** v. 10, p. 766–774, 2019.

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

KONIG, I. F. M. *et al.* 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.

KONIG, I. F. M. *et al.* Comparati vetoxi cological evaluation of carvacrol, acetylcarvacrol and a fipronil-based pesticide in human blood cells. **DRUG AND CHEMICAL TOXICOLOGY**, Brazil, v. 47, n. 2, p. 203-212, 2022.

KOSHY, T. J. *et al.* Onthe life cycle of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Indian Councilof Agricultural Research. Cheiron**, v. 12, p. 337–338, 1983.

KOVAR, L. *et al.* Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick polarizes thecytokine profile toward Th2 and suppresses proliferation of *T. lymphocytes* in human PBMC culture. **J. Parasitol**, České Budějovice, CzechRepublic, v. 87, p. 1342–1348, 2001.

KULISIC, T. *et al.* Use of different methods for test in ganti oxidative activity of orégano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633–640, 2004.

LABUDA, M.; NUTTALL, P. A. Tick-borne viruses. **Parasitology**, Bratislava, v. 129, p. 221-245, 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**, n. 78, p. 1636-1638, 2012.

LATREILLE P. A. *Genera crustaceorum et insectorum: secundum ordinem naturalem in famílias disposita, iconi busexemplisque plurimis explicata*. Parisiis et Argentorati: Amand Koenig, **bibliopolam**; 1809.

LIMA, C. M. *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **SCIENTIA PLENA**, Brasil, v. 10, n. 03, p. 1-9, 2014.

LIMA DE SOUZA, J. R. *et al.* 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. *et al.* Genotoxicity evaluation of carvacrol in rats using a combined micronucleus and comet assay. **Food and Chemical Toxicology**. v. 98, p. 240-250, 2016.

LOPES, W. D. Z. *et al.* Effects of macrocyclic lactones on the reproductive parameters of engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females detached from experimentally infested cattle. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 72-78, 2013.

MABEKU, L. B. K. *et al.* Toxicological evaluation of ethyl acetate extract of *Cylicodiscus ga bunensis* stem bark (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 598-606, 2007.

MANFREDI, M. T. *et al.* 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.

MANN, F. C. *et al.* The extrahepatic biliary tract in common domestic and laboratory animals. **The Anatomical Record**, Chile, v. 18, n. 1, p. 44-66, fev. /1920.

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, P. N. A; NEUHAUS, P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. **Liver International**, Boston, USA, v. 27, n. 3, p. 384-392, 2007.

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

MATOS, R.S. *et al.* Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. **Parasitology Research**, v. 113, p. 669-673, 2014.

MATSUMOTO, K. *et al.* Experimental Infection Models of Ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* Group with *Rickettsia conorii*. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**, v. 5, n. 4, p. 363–372, 2005.

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.

MEJRI, N. *et al.* Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. **Parasite Immunol**, Neuchâtel, Switzerland, v. 23, p. 61–69, 2001.

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, M. G. D. *et al.* Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **SCIENTIA PLENA**, Brasil, v. 8, n. 4, p. 1-7, 2012.

MICHIELS, J. *et al.* *In vitro* degradation and *in vivo* passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Belgium, v. 88, n. 13, p. 2371-2381, 2008.

MGHIRBI, Y.; BOUATTOUR, A. Detection and molecular characterization of *Babesia canisvogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. **Veterinary Parasitology**, Tunis, Tunisia, v. 152, n. 2, p. 1-7, 2008.

MONTEIRO, C. M. O. *et al.* Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res**, Juiz de Fora, Brazil, v. 105, p. 1093–1097, 2009.

MONZOTE, L. *et al.* Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Havana City, Cuba, v. 240, p. 337–347, 2009.

MORAES, J. D. *et al.* Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitol**, Brazil, n. 112, p. 603-610, 2012.

MORAES, J. *et al.* Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 603–610, 2013.

MORAES-FILHO, J. *et al.* Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the Bacterium *Ehrlichia canis*, the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **Plos One**, Cruz Alta, Brazil, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2015.

MORAIS, S. M. D. *et al.* Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Brazil, v. 22, n. 21, p. 6250-6255, 2014.

MOSHREFI, A. H. *et al.* Toxicological effect of exposure to different doses of zinc oxide nanoparticles on brain and heart structures of male wistar rats. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Iran, v. 26, n. 4, p. 510-523, 2021.

MOTAWI, T. K. *et al.* Effect of protein malnutrition on the metal lism and toxicity of cisplatin, 5-fluorouracil and mitomycin C in rat stomach. **Food and Chemical Toxicology**. Egypt, v. 56, n. 1, p. 467-482, 2013.

MOUHI, L. *et al.* Anti-inflammatory activity of essential oil an endemic *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. With chemotype carvacrol, and its healing capacity on gastric lesions. **Journal of Food Biochemistry**, Argelia, v. 41, n. 3, p. 216-221, 2017.

MURAKAMI, T. *et al.* The insulo-acinar portal and insulo-venous drainage systems in the pancreas of the mouse, dog, monkey and certain other animals: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. **Arch Histol Cytol.** V. 56, p. 127–147, 1993.

NAJNIN, H. *et al.* Biochemical and toxicological analysis of *Cinnamomum tamala* essential oil in Wistar rats. **Journal of Food Processing & Preservation**, India, v. 44, n. 2, p. 216-221, 2019.

NASCIUTTI, P. R. Processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. **Desenvolvimento de novos fármacos.** p. 17, 2012.

NAVA, S. *et al.* Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology**, Argentina, n. 190, p. 547–555, 2012.

NAVA, S. *et al.* The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary parasitology**, Argentina, v.00, n. 208, p. 2-8, 2015.

NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). **Onderstepoort J Vet Res**, v.38, p.215-224, 1971.

NERY, C. D. S. *et al.* Murinometric Evaluations and Feed Efficiency in Rats from Reduced Litter During Lactation and Submitted or Not to Swimming Exercise. **CIÊNCIAS DO EXERCÍCIO E DO ESPORTE**, Recife-PE, v. 17, n. 1, p. 49-55, 2011.

NICHOLSON, W.L. *et al.* "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, 2003.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia humana**. 13 ed. São Paulo: Atheneu, 2016. 588 p, 2009.

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.

NORDGREN, R. M.; CRAIG, T. M. Experimental transmission of the texas strain of *Hepatozoon canis*. **Vet. Parasitol.** v. 16, p. 207–214, 1984.

NOVATO, T. P. L. *et al.* Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, Juiz de Fora, MG, Brazil, v. 212, p. 331–335, 2015.

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, n. 260, p. 1-4, 2018.

NUNES, P. H. *et al.* Morphological changes in the salivary glands of *Amblyomma cajennense* females (Acari: Ixodidae) in different feeding stages on rabbits at first infestation. **Experimental and Applied Acarology**, Sao Paulo, Brazil, n. 45, p. 199–209, 2008.

OAKESHOTT, J. G. *et al.* The genomics of insecticide resistance. **Genome Biology**, v.4, Issue1. Article 202, p. 1-4, 2003.

OLIVEIRA, P. R. *et al.* Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.129, n. 1-2, p. 139-147, 2005.

OLIVEIRA, I. S. *et al.* Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** Brazil, v. 385, n. 9, p. 899-908, 2012.

OLIVEIRA, P. R. *et al.* Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2459–2465, 2008.

OLIVEIRA, F. R. A. M. *et al.* 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. *et al.* Carvacryl Acetate: synthesis and toxicological and pharmacological activities. **Rev. Virtual Quimica**, v. 12, n. 3, 2020.

OLIVEIRA, M. V. S *et al.* Sublethal concentrations of acetylcarvacrol affect reproduction and integument morphology in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, 2020.

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

OSTOVANEH, A. *et al.* Gastroprotective effect of sumatriptan Againstin domethacin, stress and ethanol-induced gastric damage in male rats: Possiblem odulatory role of 5-hydroxy tryptamine 1B/1 D receptorsand pro-inflammatory cytokines. **Basic Clin PharmacolToxicol.** Iran, v. 5, n. 133, p. 156-167, 2023.

OTTO, G. M. *et al.* Biology and Diseases of Rats. **Elsevier Inc**, USA, v. 4, n. 3, p. 151-196, 2015.

PALMAS, C. *et al.* Study on immunobiology in ectoparasites of public health interest: *Rhipicephalus sanguineus*. **Parassitologia**, Cagliari, Itália, v. 43, p. 29–35, 2001.

PAPPAS, P. J.; OLIVER, JR., J. H. Mating necessary for complete feeding of female *Dermacentor variabilis* (acari: ixodidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, Georgia, USA, v. 6, n. 2, p. 122-124, jun. 1971.

PARKER, R. R. et al. Rocky Mountain spotted fever: potentialities of tick transmission in relation to geographical occurrence in the United States. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 13, p. 341–379, 1933.

PAZ, G. F. et al. *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) De Cães Artificialmente Infestados. **Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 139-144, 2008.

PAZINATO, R. et al. In vitro effect of seven essential oils on the reproduction of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Advanced Research**, Chapeco, Brazil, v. 7, p. 1029–1034, 2016.

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, 1987.

PEIXOTO-NEVES, D. et al. 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. 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, A. I. S. et al. 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 JUNIOR, A. M. et al. Efficacy of carvacrol on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* engorged female ticks (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): effects on mortality and reproduction. **Natural Product Research**, Lavras, Brasil, v. 1, p. 1-4, 2019.

PFAFFLE, M. *et al.* The ecology of tick borne 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. *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. *et al.* Is there a correlation between in vitro antioxidant potential and in vivo effect of carvacryl acetate against oxidative stress in mice hippocampus? **Neuro chem Res.**, v. 39, p. 758-769, 2014.

PRETTE, N. *et al.* Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 855-861, 2005.

PUB CHEM. **Carvacryl acetate.** Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carvacryl_acetate#section=top>. 2018.

RANDALL, K. J. *et al.* Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. **Cell Biology and Toxicology**, UK, p. 1-19, 2011.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Marseille, France, v. 10, n. 4, p. 694–719, 1997.

RAZMARAI, N. *et al.* Cardioprotective Effect of Grape Seed Extract on Chronic Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Wistar Rats. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**. Iran, v. 6, n. 3, p. 423-433, 2016.

REGENDANZ, P., MUNIZ, J. O *Rhipicephalus sanguineus* como transmissor da piroplasmose canina no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 81–84, 1936.

REMEDIO, R. N. *et al.* The extensible integument of *Rhipicephalus sanguineus* female ticks in different feeding stages: a morphological approach. **Acta Zoologica**, Rio Claro, Brazil, v. 1, p. 1-9, 2014.

REMEDIO, R. N. *et al.* Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 114, p. 431-444, 2015.

REY, L. Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 351 2013.

RIBEIRO, V. L. S. *et al.* Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, Porto Alegre, Brazil, v. 115, p. 351–354, 2008.

RIBEIRO, C. T. *et al.* Oral administration of carvacrol/ β -cyclodextrin complex protects against 6-hydroxy dopamine-induced dopaminergic denervation. **Neurochemistry International**, v. 126, p. 27-35, 2019.

RICHARDS, C. *et al.* Segmental Division of the rat pancreas for experimental procedures. **Lab Invest.** v. 13, p. 03-21, 1964.

ROMA, G. C. *et al.* Determination of LC₅₀ of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae), **Experimental Parasitology**, v. 123, p. 269-272, 2009.

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

ROSDIANTO, A. M. *et al.* Inhibitory Activity of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Rhizome wards the Expression of Akt and NF-KappaB p65 in Acetic Acid-Induced Wistar Rats. **Hindawi**, Indonesia, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2020.

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.

SANTORO, G. F. *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.

SANCHES, G. S. *et al.* Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Brasil, n. 215, p. 78–87, 2016.

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

SANPINIT, S. *et al.* Repeated 28-Day Oral Toxicological Study and Gastroprotective Effects of *Nigella sativa* L. Oil (Shuhada) against Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. **Nutrients**, Indonesia, v. 15, n. 1532, p. 1-16, 2023.

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

SCHOL, H. *et al.* Morphology and structural organization of the genital organ in Argas walkerae. **Medical and Veterinary Entomology**, Munich, Germany, n. 15, p. 422-432, 2001.

SCHRODER, J; VOLLMER, H. The excretion of thymol, carvacrol, eugenol and guaiacol and the distribution of these substances in the organism. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, Germany, v. 168, n. 1, p. 331-353, 1932.

SENRA, T. O. S. *et al.* Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res**, Juiz de Fora, Brasil, n. 112, p. 3471–3476, jun. 2013.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta a medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1999.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta a medicamento**. Ed. UFRGS: Porto Alegre, p. 1102, 2003.

SMITH, J. C. *et al.* Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1529, p. 2577-87, 2009.

SOKOVIĆ, M. *et al.* Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. **Molecules**, Netherlands, n. 15, p. 7532-7546, out. 2010.

SOLOMONS, T. W. *et al.* **Organic chemistry**. 12 ed. NJ: Hoboken, 2016.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. 2 ed. UK: Oxford, p. 540, 2014.

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

STOJANOVIC, N. M. *et al.* Low dose of carvacrol prevents rat pancreas tissue damage after L-arginine application, while higher doses cause pancreatic tissue impairment. **Food and Chemical Toxicology, Serbia**, v. 128, n. 1, P. 280-285, 2019.

SUDY, R. *et al.* Different contributions from lung and chest wall respiratory mechanics in mice, rats, and rabbits. **J Appl Physiol**, v. 127, n. 1, p. 198-204, 2019.

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, 1999.

SZABÓ, M.P.J. *et al.* Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari, Ixodidae) in South America. **Vet. Parasitol.** Jaboticabal, SP, Brazil v. 130, p. 131–140, 2005.

TAKAHASHI, M. *et al.* The pancreas of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). **Anatomical study.** Lab Anim Sci, v. 27, p. 336–342, 1977.

TAPPIN, M. R. R. *et al.* 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.

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

TESHOME, K. *et al.* Toxicity studies on dermal application of plant extract of *Plumbagozeylanica* used in Ethiopian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 236–248, 2008.

TREUTING, Piper M.; MONTINE, S. M. D. A. K. S. **Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas.** 2. ed. United States: Elsevier Inc, p. 5-498, 2017.

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

TROUGHTON, D. R.; LEVIN, M. L. Life Cycles of Seven Ixodid Tick Species (Acari: Ixodidae) Under Standardized Laboratory Conditions. **Journal Of Medical Entomology**, Atlanta, USA, v. 44, n. 5, p. 732-740, 2007.

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

UNLUÇERÇİ, Y. *et al.* Selenium as Protection Against Ethanol-Induced Toxicity in Rat Stomach. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Istanbul, v. 13, n. 3, p. 170–175, 1999.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Chemical and Toxic Product Topics**. Disponível em: <https://www.epa.gov/chemicals-under-tsca>. 2022.

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, n. 38, p. 193–195, 2012.

VERONEZ, V. A. *et al.* Histopathology of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks fed on resistant hosts. **Experimental and Applied Acarology**, Jaboticabal, Brazil, v. 50, n. 2, p. 151–161, 2010.

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

WANG, Q. *et al.* *In vitro* evaluation of the activity of microencapsulated carvacrol Against *Escherichia coli* with K88 pili. **Journal of Applied Microbiology**. Canada, v. 107, n. 6, p. 1781-1788, 2009.

WARDANI, G. *et al.* The Role of Antioxidant Activity of Chitosan-Pinus merkusii Extract Nanoparticle in against Lead Acetate-Induced Toxicity in Rat Pancreas. **Veterinary Medicine International, Indonesia**, v. 2, n. 9874601, p. 1-6, 2019.

WEST, J.B. **Respiratory physiology, the essentials.** 3 ed. United States: John Wiley & Sons, 1985.

WIKSWO, M. E. *et al.* Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* Ticks from California. **Journal of Medical Entomology**, California, v. 44, n. 1, p. 158-162, 2007.

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

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