



GABRIELA PEREIRA BRITO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ACETILCARVACROL NA
MORFOLOGIA DA TIREOIDE DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO
TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA E ORAL COM DOSE REPETIDA**

LAVRAS – MG

2022

GABRIELA PEREIRA BRITO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ACETILCARVACROL NA
MORFOLOGIA DA TIREOIDE DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO
TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA E ORAL COM DOSE REPETIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal de Lavras, como parte
das exigências do Curso de Ciências
Biológicas, para a obtenção do título de
Licenciatura.

Prof. Dr. Rafael Neodini Remédio

Orientador

LAVRAS – MG

2022

GABRIELA PEREIRA BRITO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ACETILCARVACROL NA MORFOLOGIA DA
TIROIDE DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO TESTE DE TOXICIDADE
DÉRMICA E ORAL COM DOSE REPETIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal de Lavras, como parte
das exigências do Curso de Ciências
Biológicas, para a obtenção do título de
Licenciatura.

EM ANDAMENTO em 15 de setembro de 2022
Dr. Rafael Neodini Remédio – DME/UFLA
Dr.(a) Cristina Delarete Drummond – DME/UFLA
Dr. Dirceu de Souza Melo – DBI/UFLA

Dr. Rafael Neodini Remédio
Orientador

**LAVRAS-MG
2022**

RESUMO

O controle de carrapatos por meio de produtos acaricidas sintéticos tem como resultado resíduos no meio ambiente e prejuízos aos hospedeiros, além de ocasionar a seleção de carrapatos resistentes. O acetilcarvacrol é um produto semi-sintético derivado do carvacrol, e possui propriedades acaricidas e repelentes. A tireoide, devido à sua sensibilidade aos fatores externos, tem sido utilizada como bioindicador em trabalhos de toxicidade. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos do acetilcarvacrol em ratos Wistar submetidos aos testes de toxicidade tópica e oral com dose repetida por meio da análise histopatológica e morfométrica de amostras da tireoide. Para isso, foram utilizados 40 ratos Wistar fêmeas e adultas, em dois experimentos diferentes. Para cada teste, os ratos foram divididos em 4 grupos contendo 5 animais cada. Nos animais submetidos ao tratamento por via tópica, o acetilcarvacrol foi diluído em DMSO a 5% e 5mL da solução foram aplicados com pipeta Pasteur no dorso tricotomizado de cada animal por 21 dias. Os grupos tratados (TI-TIII) foram expostos, respectivamente, a 26, 52 e 104 μ L/mL do produto diariamente. O grupo controle foi tratado apenas com o veículo (5mL de DMSO a 5%/dia). Já para o teste por via oral, os animais receberam dose única diária de acetilcarvacrol, diluído em óleo de milho (1,0 mL/kg por animal), por gavagem, durante 30 dias. Os grupos de tratamento (TI-TIII) receberam, respectivamente, 26, 52 e 104 μ L do produto diariamente, e o grupo controle foi alimentado com 1,0 mL óleo de milho/dia (veículo). As amostras de tireoide foram coletadas para análises de alterações morfológicas por meio de análise qualitativa, semiquantitativa e morfométrica. Como resultado, nos testes por via tópica, não foram observadas diferenças significativas na morfologia da tireoide entre os grupos, exceto em relação ao aumento da vascularização do tecido intersticial, que se mostrou mais elevada no grupo TIII em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Nos testes por via oral, não houve diferença estatística nas alterações morfológicas observadas nos diferentes grupos ($p > 0,05$). Nas análises morfométricas do teste por via tópica, não houve diferença estatística significativa entre as medidas da área e perímetro (coloide e folículo) e razão área do coloide/área do folículo ($p > 0,05$), área e perímetro nuclear. No teste oral, houve diferença estatística significativa apenas entre os grupos TII e TIII ($p < 0,05$) para as medições do perímetro do coloide, área e perímetro do folículo. No teste tópico, não houve diferença significativa na razão entre os diâmetros maior e menor do núcleo (LSratio) ($p > 0,05$), embora estas alterações tenham diferido significativamente entre os grupos TI e TIII no tratamento oral ($p < 0,05$). Também não houve diferença estatística no coeficiente de variação nuclear em ambos os tratamentos. Assim, embora poucas alterações tenham sido observadas, em extensão reduzida no tecido, é necessário que se tenha cautela ao utilizar o produto, principalmente em concentrações mais elevadas. A avaliação de outros órgãos é fundamental para uma análise completa da segurança de aplicação deste produto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1.1. Acetilação do carvacrol.....	12
2.1.2. Animais.....	12
2.2. Delineamento experimental.....	13
2.2.1. Toxicidade dérmica com dose repetida.....	13
2.2.2. Toxicidade oral com dose repetida.....	14
2.3. Material biológico.....	14
2.3.1. Avaliação morfológica.....	14
3. RESULTADOS.....	17
3.1. Toxicidade dérmica com dose repetida.....	17
3.1.1. Análise morfológica.....	17
3.1.2. Análise semiquantitativa.....	20
3.1.3. Análise morfométrica.....	22
3.2. Toxicidade oral com dose repetida.....	25
3.2.1. Análise morfológica.....	25
3.2.2. Análise semiquantitativa.....	28
3.2.3. Análise morfométrica.....	29
4. DISCUSSÃO.....	32
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

Carrapatos são artrópodes ectoparasitas obrigatórios, que podem se alimentar exclusivamente de sangue, linfa ou tecidos digeridos de vertebrados (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008). Os carrapatos são vetores de inúmeros microorganismos patógenos como vírus, bactérias e protozoários que podem afetar bois, cachorros e seres humanos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004), além de outros animais. Ademais, o animal vertebrado, ao ser parasitado, também pode apresentar prejuízos diretos como a perda de sangue e irritabilidade (FAO, 2004).

Rhipicephalus sanguineus é um exemplo de espécie de carrapato que tem como hospedeiros principais os cães, mas que também podem parasitar humanos (DANTAS-TORRES, 2010). Estudos apontam esta espécie de carrapato como vetor de *Rickettsia rickettsii*, despertando um alerta na população, pois seria a primeira evidência de que *R. sanguineus* pode estar associado a transmissão de febre maculosa nos Estados Unidos (DEMMA et al., 2006). Trabalhos realizados na Argentina, detectaram a presença da bactéria *Anaplasma platys* em carrapatos *R. sanguineus*, podendo então ser considerado um potencial vetor de casos da trombocitopenia cíclica em cães na região (CICUTTIN et al., 2015). As zoonoses erliquiose monocítica e babesiose também são exemplos de doenças transmitidas por indivíduos desta espécie, afetando cães do mundo todo (VARGAS-HERNANDEZ et al., 2012). Devido a essa relevância, muito se tem discutido sobre novas formas de controle.

Atualmente o controle de carrapatos tem sido feito com produtos químicos que tem como base hidrocarbonetos clorados, organofosforados e arsenicais; esses compostos sintéticos possuem um alto efeito residual, tornando o produto uma má opção tanto para o meio ambiente quanto para os hospedeiros já que são produtos tão agressivos (ADENUBI et al., 2016) porém ainda são usados pelo fator econômico. Produtos que visam um menor dano ambiental então sendo procurados cada vez mais pelos consumidores, já que questões ambientais passaram a ser percebidas como qualidade de vida e responsabilidade social (GONZAGA, 2005).

Além da carga residual, outro fato associado ao uso de acaricidas químicos sintéticos é a seleção de carrapatos resistentes, que pode acontecer inclusive com produtos pertencentes à mesma família ou grupo químico (MARTINS; FURLONG; PRATA, 2005). Ao ser aplicado um produto acaricida na população de carrapatos, gera-se uma condição ambiental que cria um processo de

seleção artificial no qual nem todos os indivíduos serão eliminados, tornando aquela população resistente ao composto (KOLLER et al., 2019).

Uma das estratégias para novos acaricidas e repelentes que pode reduzir os resíduos ambientais e a seleção de linhagens resistentes é o uso de plantas medicinais como base na sua formulação química, já que elas possuem mecanismos próprios contra predadores e patógenos (ADENUBI et al., 2016). As plantas medicinais são utilizadas na cura e na prevenção de doenças há milhares de anos pelo homem (GADELHA et al., 2013). Por isso a importância de se explorar cada vez mais os benefícios que elas podem proporcionar.

Os monoterpenos estão entre os principais componentes dos óleos essenciais e vem sendo utilizados em várias áreas, desde a culinária à saúde humana, devido às suas propriedades farmacológicas (KOZIOL et al., 2014). Dentre esses compostos, pode-se citar o carvacrol, um monoterpeno bioativo isômero do timol, encontrado em membros da família herbácea Lamiaceae, como o orégano e tomilho, por exemplo (KACHUR; SUNTRES, 2019).

Com várias aplicações, o carvacrol se destaca por ter propriedades antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, hepatoprotetora, espasmolítica e vasorrelaxante (SUNTRES, COCCIMIGLIO, ALIPOUR, 2014). Além disso, seu uso tópico para auxiliar na cicatrização de lesões também foi avaliado em ratos, devido ao seu potencial antimicrobiano (GUNAL; HEPER; ZALOGU, 2014).

A ação do carvacrol sobre carrapatos também vem sendo estudada frequentemente já que seus modos de ação ainda são incertos (ANDERSON; COATS, 2012). Pesquisas para entender melhor os modos de ação do carvacrol avaliaram a inibição da acetilcolinesterase e revelaram efeitos positivos em diversos artrópodes como a mosca doméstica (*Musca domestica*), o carrapato americano (*Dermacentor variabilis*) e a barata americana (*Periplaneta americana*) (ANDERSON; COATS, 2012). Testes de campo utilizando óleo essencial da espécie *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, rico em carvacrol, também demonstraram um potente efeito larvicida e repelente contra mosquitos da espécie *Aedes albopictus* (EVERGETIS, 2018).

O uso do carvacrol como acaricida vem trazendo resultados positivos como é o caso da pulverização em massas de ovos de *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), obtendo uma diminuição significativa na taxa de eclosão (TABARI et al., 2017). Este mesmo estudo também revelou que o tratamento de larvas com o carvacrol atingiu uma taxa de mortalidade de 100% após o período de 24 horas. Além disso, foi relatado também que o carvacrol inibiu o desenvolvimento oocitário de

carrapatos fêmeas, prejudicando a geração de novos indivíduos, e possibilitando então uma forma de controle ao longo prazo (SOUZA et al., 2019).

Como consequência, muitos estudos têm explorado as características do carvacrol e as formas de adquirir um melhor desempenho deste composto, como por exemplo, o uso em nanocápsulas (CACCIATORE, 2019). Este composto apresenta natureza volátil e, por este motivo, tem sido avaliada a possibilidade do seu encapsulamento, que resultaria em um maior período residual, aumentando, assim, sua eficácia (LIMA et al., 2017). Outras propostas são os desenvolvimentos de co-fármacos de carvacrol, obtendo então novos compostos que possuem como diferencial uma toxicidade reduzida e atividade antimicrobiana elevada quando comparado ao carvacrol isolado (CACCIATORE et al., 2015).

Um dos fatores que limitam o maior uso de óleos essenciais é sua toxicidade, que pode causar efeitos indesejáveis como inflamação e corrosão celular no hospedeiro (MEMAR et al., 2017). O carvacrol também possui possível ação tóxica, conforme demonstrado em estudos que indicaram o carvacrol como um potencial irritante (PINTO; MORAIS; NERI, 2015). A baixa solubilidade em água também é uma característica do carvacrol (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2014). Estes são fatores que podem influenciar no potencial do composto e em como ele irá atuar. Portanto, é de grande relevância estudos que possam amenizar essas propriedades para que o composto tenha uma melhor atuação.

Com base nessas informações, alguns tipos de alterações na estrutura química de produtos acaricidas têm demonstrado um bom desempenho para amenizarem essas características, como é o caso do processo de acetilação. Esse procedimento pode ser realizado no carvacrol, tendo como base a conversão do grupo hidroxila fenólico em um grupo éster, o que resulta em uma molécula com maior estabilidade, denominada acetilcarvacrol (KONIG et al., 2020). Essas alterações químicas contribuem para um melhor uso de um princípio ativo, permitindo, assim, a obtenção de melhores resultados.

Diante disso, a acetilação do carvacrol se tornou uma opção para aumentar a atividade nematicida e acaricida deste composto, além de diminuir sua toxicidade nos hospedeiros vertebrados (RAMÍREZ et al., 2016; ANDRÉ et al., 2016). O uso do acetilcarvacrol ainda é pouco explorado, porém, testes em camundongos para avaliar efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos, demonstraram resultados positivos (DAMASCENO et al., 2014). Outro estudo demonstrou menor toxicidade aguda do acetilcarvacrol em camundongos quando comparado ao

carvacrol e atividade anti-helmíntica tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo* (ANDRÉ et al., 2016). Além disso, estudos indicaram que o acetilcarvacrol demonstrou ótimo desempenho, ocasionando cem por cento de mortalidade contra *R. microplus* na concentração de 5 mg/mL (NOVATO et al. 2018).

O uso de animais como modelo de estudo tem sido uma ferramenta amplamente utilizada ao longo dos anos. A busca por novos medicamentos ou componentes, os estudos toxicológicos e a avaliação dos efeitos colaterais de um determinado produto são exemplos de estudos que podem ser realizados *in vivo*, ressaltando a contribuição do uso de modelos animais para pesquisas (MUKHERJEE et al., 2022). É importante destacar que as pesquisas envolvendo vertebrados devem ser realizadas com maior responsabilidade, tendo como base o conhecimento dos princípios éticos e das regulamentações (RÖCKLINSBERG; GJERRIS; OLSSON, 2017).

Nestes estudos, as técnicas histológicas podem ser utilizadas como método de avaliação, permitindo a avaliação da toxicidade de uma substância química por meio da observação das alterações na morfologia que esses produtos podem ter causado em um determinado tecido. Dentro deste contexto, a tireoide pode ser considerada um órgão muito explorado nos estudos toxicológicos por ser um excelente bioindicador devido à sua sensibilidade à exposição tóxica, mesmo em dosagens mínimas (CUNHA et al., 2017).

Nos mamíferos, a tireoide é um órgão vital e de extrema importância para regulação do metabolismo em geral. Essa glândula é necessária para o crescimento e maturação do corpo, aumentando o oxigênio consumido e atuando nos processos regulatórios de lipídeos e carboidratos (MAHMOOD; QURESHI; IQBAL, 2010). A tireoide é uma glândula endócrina que possui a função de sintetizar os hormônios tiroxina (T4) e tri-iodotironina (T3), responsáveis por regular a taxa de metabolismo do corpo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Segundo o mesmo autor, esta glândula é composta por milhares de folículos tireoidianos, que são pequenas esferas revestidas por epitélio simples, que possui no seu interior uma substância gelatinosa denominada coloide. A vascularização é primordial para este órgão, possuindo então uma rede capilar sanguínea e linfática que recobre os folículos incluindo as células endoteliais fenestradas dos capilares sanguíneos. Todo esse arranjo colabora com o transporte de substâncias para o sangue.

Na literatura, diferentes estudos demonstraram, nos tecidos que compõem a tireoide, os efeitos tóxicos que as substâncias podem causar, como a destruição dos folículos, núcleos danificados dentro do lúmen do folículo e estroma disperso na tireoide de camundongos expostos

ao alumínio (AKTAÇ; BAKAR, 2002). Em teste utilizando ratos machos Wistar expostos ao composto tóxico 2,3',4,4',5-Pentaclorobifenil (PCB 118), os animais apresentaram alterações na tireoide como hiperplasia e expansão folicular, descamação de células epiteliais e necrose fibrinóide, além de alterações nas concentrações séricas dos hormônios tiroxina (T4), triiodotironina (T3) e tireoestimulante TSH (TANG et al., 2013). Camundongos machos e fêmeas expostos por gavagem ao extrato de ginko biloba demonstraram incidência de hepatoblastomas e evidências de potencial carcinogênico na glândula tireoide (RIDER et al., 2014). Estudos utilizando éter decabromodifenílico (BDE-209) indicaram indução ao hipertireoidismo e hepatotoxicidade, além de degeneração de áreas do epitélio folicular em exposições de altas doses (LEE et al., 2010). A exposição ao triclosan indicou afetar significativamente as concentrações de hormônio tireoidiano (ZORRILA et al., 2008). Em exposições combinadas de Clofen A60 e DEP (Ftalato de dietila), ratos machos e fêmeas apresentaram efeitos como perda de tireoglobulina e encolhimento dos folículos na tireóide (PEREIRA; MAPUSKAR; RAO, 2007). Experimentos analisando a tireoide de ratos expostos a baixas dosagens de DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), um conhecido inseticida, revelaram, por meio de análises histológicas, alterações no epitélio do folículo (YAGLOVA; YAGLOV, 2017).

Mais estudos também apontam que a exposição de animais a agrotóxicos, podem induzir alterações na estrutura da tireoide como folículos hiperplásticos e danificados (HADIE; MANSOR; SHARIFF, 2012). Pesquisas indicaram também a sensibilidade da tireoide à exposição à metais como cromo hexavalente (MAHMOOD; QURESHI; IQBAL, 2010). Ratos expostos a nitrato também apresentaram alterações como hipertrofia e hiperplasia das células foliculares, aumento da vascularização no tecido tireoidiano, além de alterações no metabolismo hormonal da glândula como a diminuição dos níveis séricos de tiroxina (KOSTOGRYS; PISULEWSKI; PECIO, 2006). Todos esses estudos indicam que a tireoide pode ser usada como bioindicadora em pesquisas envolvendo toxicidade, principalmente em estudos histológicos. Isso porque a glândula tireoide é intensamente afetada por fatores internos e altamente sensível à toxicidade de muitos fatores ambientais externos, incluindo herbicidas, fungicidas e inseticidas. (ABUSER et al., 2021).

Modificações no tecido contribuem na avaliação e na continuidade de estudos a fim de que novos compostos sejam pesquisados. A realização de testes com compostos ainda não tão explorados proporcionam novos resultados para problemas de importância médica, econômica e ambiental. O presente estudo possui relevância já que problemas com resistência de acaricidas, alto

efeito residual e impactos nos hospedeiros podem ser resolvidos ou amenizados com produtos de base natural, como é o caso do acetilcarvacrol. Este composto, conforme já descrito por Ramirez et al. (2016), Novato et al. (2018) e König et al. (2020) apresentaram resultados positivos em testes realizados com carrapatos, tornando uma opção significativa como novos acaricidas.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos tóxicos do acetilcarvacrol em ratos Wistar submetidos aos testes de toxicidade tópica e oral com dose repetida por meio da análise histopatológica e morfométrica de amostras da tireoide.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1. Acetilação do carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol, fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$) foi adquirido da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha) com 99% de pureza e o processo de acetilação foi realizado de acordo com metodologia proposta por König et al. (2019). Para isso, 5mL de carvacrol foram adicionados a um balão volumétrico contendo 25mL de solução de hidróxido de sódio a 10%, em temperatura ambiente. Em seguida, 5,5mL de anidrido acético foram adicionados ao frasco sob refrigeração. A mistura foi mantida em 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, funcionando em faixa espectral de 4000-400 cm^{-1} . A ausência de banda larga intensa entre 3000 a 4000 cm^{-1} foi utilizada como indicativo da ausência de fenol residual do reagente. Além disso, a presença de uma banda intensa a 1753 cm^{-1} foi utilizada como método de confirmação da estrutura do éster carbonílico.

2.1.2. Animais

Foram utilizados 40 ratos fêmeas adultos da linhagem Wistar, com aproximadamente 9 semanas de idade e peso variando entre 200-300g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A variação de peso dos animais no início do estudo não excedeu $\pm 20\%$ do peso médio. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente ($22 \pm 3^{\circ}C$, umidade relativa 50-60%), com luz artificial e fotoperíodo de 12/12h (claro/escuro), recebendo água e ração *ad libitum*. Os animais foram acondicionados em grupos de não mais que 5 indivíduos em caixas de polipropileno medindo 40x34x17cm. Os animais foram identificados e mantidos nas gaiolas por pelo menos 5 dias antes do início do estudo, para permitir aclimação às condições laboratoriais (OCDE, 1981, 1995). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (Protocolo n° 002/21).

2.2. Delineamento experimental

2.2.1. Toxicidade dérmica com dose repetida

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

Um dia antes do início dos procedimentos experimentais, a pelagem de cerca de 10-20% do dorso dos ratos foi cortada utilizando-se tosador profissional. Os animais foram, então, pesados e divididos em 4 grupos (n = 5 animais por grupo). Os tratamentos foram realizados por meio de aplicação do acetilcarvacrol, diluído em DMSO a 5%, que não foi injetado e sim aplicado sobre a pele (área tricotomizada) com auxílio de uma pipeta de Pasteur (volume de 5mL de solução por animal), durante 21 dias, no mesmo horário, às 8:00. O tempo do experimento foi baseado na Guideline 410 da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) (OCDE, 1981) no qual pode ser realizado em um tempo de 21 a 28 dias, à critério do pesquisador.

Em experimento *in vitro*, em que carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* foram imersos em soluções contendo acetilcarvacrol, König et al. (2020) determinaram estatisticamente que a concentração de 26 $\mu\text{L}/\text{mL}$ é suficiente para gerar mortalidade em 90% dos indivíduos (CL90). Com base neste valor, foram definidas as doses a serem utilizadas no presente trabalho. O grupo Tratamento I recebeu diariamente a aplicação de 5mL de solução de acetilcarvacrol na concentração de 26 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (1 x CL90); o Tratamento II foi tratado com 5mL de solução de acetilcarvacrol a 52 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (2 x CL90); e o Tratamento III foi exposto a 5mL de solução de acetilcarvacrol a 104 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (4 x CL90). O grupo Controle foi tratado apenas com o veículo (5mL de DMSO a 5%/dia).

O acetilcarvacrol foi diluído imediatamente antes de sua administração. Os animais foram diariamente observados, sempre no mesmo horário, para detecção de sinais de irritação, toxicidade sistêmica, morbidade e mortalidade. Ao final do experimento, não houve mortalidade e os ratos foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e cetamina (90mg/kg), eutanasiados por exsanguinação por punção cardíaca e dissecados para coleta das amostras de tireoide.

2.2.2. Toxicidade oral com dose repetida

Os procedimentos para determinação da toxicidade oral do acetilcarvacrol em ratos foram baseados no 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. (2020).

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 de administração de dose única diária de acetilcarvacrol, diluído em óleo de milho (volume de 1,0 mL/kg por animal), por gavagem, utilizando-se tubo estomacal, durante 30 dias, no mesmo horário às 11:00. O tempo do experimento foi baseado na Guideline 407 da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) (OCDE, 1995).

Em experimento *in vitro*, em que carrapatos *R. 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 neste valor, foram definidas as doses a serem utilizadas no presente trabalho. O grupo Tratamento 1 recebeu diariamente 26µL de acetilcarvacrol (1 x CL90) diluído em 1mL de óleo de milho; o grupo Tratamento 2 foi tratado com 52µL de acetilcarvacrol (2 x CL90) diluído em 1mL de óleo de milho; e o grupo Tratamento 3 foi tratado com 104µL de acetilcarvacrol (4 x CL90) diluído em 1mL de óleo de milho. O grupo Controle recebeu apenas o veículo (1,0 mL óleo de milho/dia).

O acetilcarvacrol foi diluído imediatamente antes de sua administração. Os animais foram diariamente observados, sempre no mesmo horário, para detecção de sinais de toxicidade sistêmica, morbidade e mortalidade. Ao final do experimento, não houve mortalidade e os ratos foram mantidos em jejum de 12h antes da eutanásia. Após este período, foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e cetamina (90mg/kg), eutanasiados por punção cardíaca e dissecados para coleta das amostras de tireoide.

2.3. Material biológico

2.3.1. Avaliação morfológica

Para avaliação histopatológica, o material coletado foi seccionado e imediatamente imerso em solução fixadora de paraformaldeído a 4% por pelo menos 72h. A amostra foi, então, desidratada em série gradativa de álcool etílico (70, 80, 90 e 95%, por 20 minutos cada), embebida

e incluída em historesina. Os blocos foram seccionados em micrótomo, e as secções submetidas à técnica de hematoxilina-eosina, para observação das características gerais do material (JUNQUEIRA, 1983). As lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá e fotografadas em fotomicroscópio.

A partir das fotomicrografias obtidas, foi realizada a análise qualitativa e semiquantitativa das alterações morfológicas observadas na tireoide, que permitiu a comparação da morfologia dos indivíduos por meio de análise estatística. Para isso, foi estabelecido um protocolo de avaliação baseado no trabalho conduzido por Bernet et al (1999) e modificado por Marinho et al. (2014). Este sistema de análise poderá servir como referência para futuras análises morfológicas da tireoide de ratos expostos a produtos potencialmente tóxicos, podendo ser readequado para outros órgãos, outras metodologias e inclusive outras espécies de vertebrados.

A partir das informações disponíveis na literatura, as principais alterações estruturais que podem ser observadas na tireoide de ratos expostos a produtos tóxicos foram sumarizadas em tabela. Cada alteração recebeu um fator de importância (w), definido previamente pelos pesquisadores participantes do projeto, de acordo com sua relevância no desenvolvimento e sobrevivência das células em questão. Foram considerados três fatores de importância: (1) importância mínima, quando a lesão é facilmente reversível após a interrupção da exposição ao agente químico; (2) importância moderada, quando na maioria dos casos a lesão pode ser reversível, após a neutralização do agente estressor; (3) importância elevada, quando a lesão é irreversível, levando à perda parcial ou total da função da célula. As alterações morfológicas observadas na tireoide de ratos tratados com acetilcarvacrol foram, então, classificadas em escores (a), que variaram de 0 a 5, dependendo do grau de extensão da alteração no tecido, sendo (0) nenhuma ocorrência e (5) ocorrência muito frequente. Multiplicando-se o fator de importância pelo escore, obteve-se o índice de cada alteração ($INDEX_{alt} = w \times a$). O índice total de cada indivíduo foi determinado pela somatória dos índices de cada alteração: $INDEX_{ind} = \Sigma (INDEX_{alt})$. A partir dos índices individuais, foram obtidos os valores de média e desvio padrão para cada grupo, que foram avaliados estatisticamente por meio do teste de ANOVA one way com nível de 5% de significância, utilizando-se o programa GraphPad Prism (v.7.00).

A análise morfométrica foi realizada em software Image J (NIH). Foram avaliados a área e perímetro do núcleo, do folículo e do coloide, bem como a variação no formato do núcleo. Para as medidas de área e perímetro, 100 núcleos e 20 folículos foram avaliados de forma randomizada em

10 imagens em aumento de 400x para cada indivíduo, em todos os grupos. Regiões com possíveis lesões em que forem observados núcleos sobrepostos ou células degeneradas foram desconsideradas. A razão coloide/folículo foi calculada a partir da divisão entre os valores de área de ambas as regiões. As variações de formato do núcleo foram avaliadas a partir da razão entre a dimensão maior e a dimensão menor do núcleo (LSratio); nesta análise, foram avaliados os diâmetros maior e menor de 100 núcleos randomizados de células foliculares, em 10 imagens no aumento de 400x para cada indivíduo, de cada grupo. Os resultados foram calculados por meio da seguinte fórmula: $LSratio = \text{maior diâmetro} / \text{menor diâmetro}$; nesta análise, valores iguais a 1 correspondem a núcleo circular, e valores >1 indicam núcleo elíptico. Também foi calculado o coeficiente de variação da área nuclear (NACV) por indivíduo, por meio da fórmula: $NACV = (\text{desvio padrão da área nuclear} / \text{área nuclear média}) \times 100$ (NAGASHIMA et al., 1997). Os resultados serão analisados estatisticamente por meio de análise ANOVA com teste *post-hoc* de Tukey para variáveis com distribuição normal e Kruskal-Wallis seguida de teste de Dunn para variáveis sem distribuição normal. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Toxicidade dérmica com dose repetida

3.1.1. Análise morfológica

- Grupo Controle (DMSO a 5%)

No grupo controle, foram observados folículos de tamanhos variados, sendo maiores na região limítrofe e menores na região central. Os folículos apresentaram formas arredondadas a irregulares e eram revestidos por uma única camada de epitélio com células achatadas mononucleadas nos folículos maiores e cúbicas nos menores. Os núcleos, em sua maioria, apresentaram forma arredondada e coraram uniformemente com a hematoxilina. O interior dos folículos era preenchido por coloide; em alguns indivíduos, contudo, foi observada a presença de células descamadas, dispersas pelo coloide. Nos espaços interfoliculares foram notados vasos sanguíneos de calibres variados espalhados pelo tecido. Em pouca frequência, foi observado espaços entre os folículos e a presença de folículos fusionados. Os resultados podem ser observados na Figura 1.

- Grupo Tratamento I (26 μ L/mL)

As amostras de tireoide de ratos tratados com 26 μ L/mL de acetilcarvacrol mostraram algumas alterações em comparação com os ratos do tratamento controle. Um indivíduo desse grupo apresentou ruptura folicular e diminuição na quantidade de coloide quando comparado ao controle. Também foi observado em dois indivíduos um aumento do espaço intersticial entre os folículos. Um indivíduo apresentou aumento da vascularização em aproximadamente 20% do tecido tireoidiano analisado, quando comparado ao grupo controle. Folículos irregulares e descamação no lúmen folicular também foram observados em maior frequência. Em todos os indivíduos foi possível notar folículos fusionados, assim como no grupo controle. Os resultados podem ser observados na Figura 1.

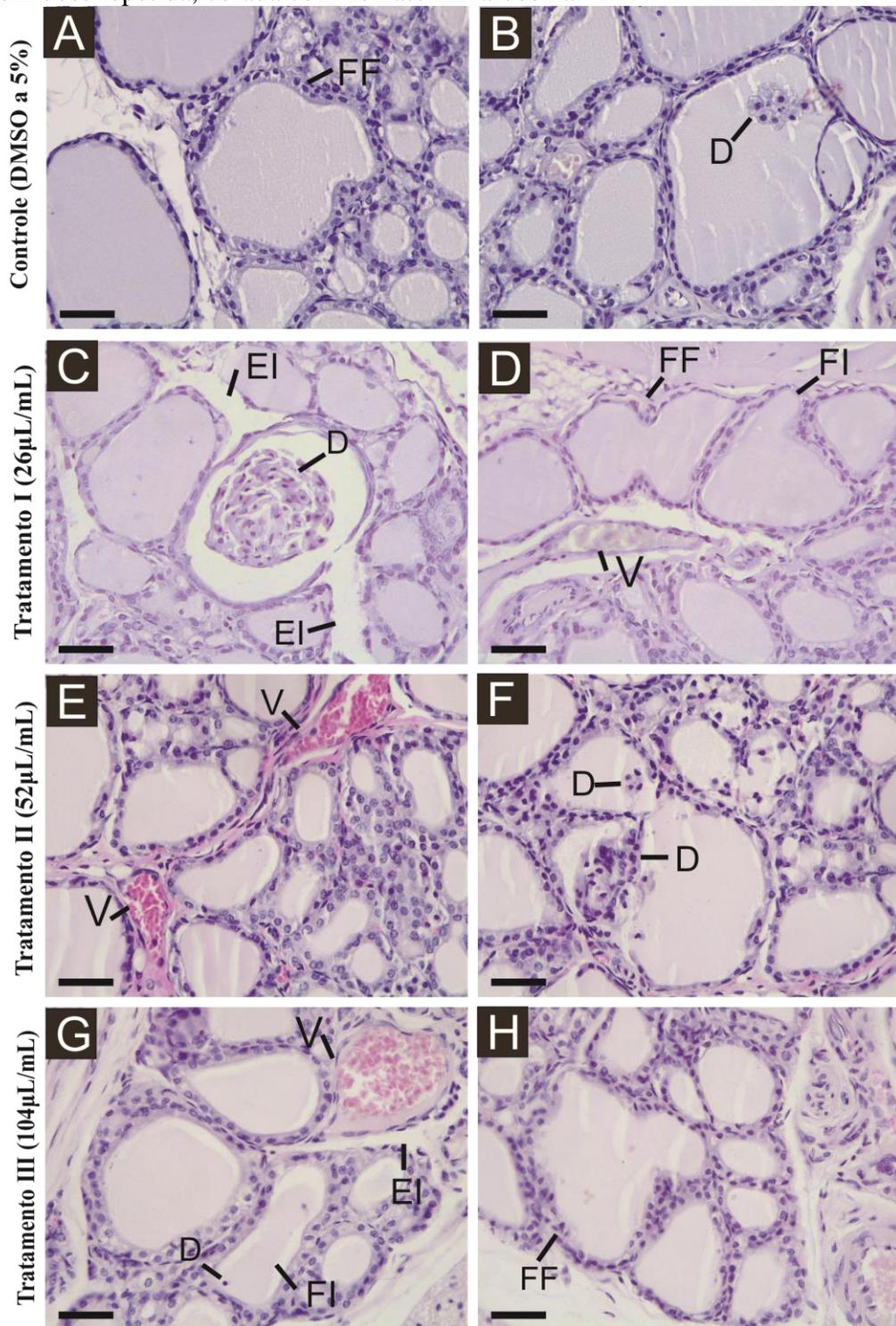
- Grupo Tratamento II (52 μ L/mL)

Nesse tratamento, o aumento da vascularização do tecido tireoidiano foi mais evidente, tendo sido observada em cerca de 20 a 40% das amostras analisadas de todos os indivíduos deste grupo. Também foi notado o aumento do espaço intersticial em dois indivíduos e maior frequência de ruptura folicular em comparação ao grupo I. Folículos irregulares também foram visualizados em maior frequência quando comparados ao grupo controle; entretanto, aparentemente não houve diferença em relação ao grupo TI. Um indivíduo deste grupo apresentou vasos sanguíneos congestionados, o que não havia sido encontrado no grupo controle e no grupo TI. A presença de células descamadas no lúmen folicular foi mais frequente neste tratamento em comparação ao grupo controle, porém semelhante ao grupo TI. A fusão dos folículos, contudo, foi evidenciada apenas em um indivíduo deste tratamento, diferente dos outros grupos, em que esteve presente em todos os indivíduos. Os resultados podem ser observados na Figura 1.

- Grupo Tratamento III (104µL/mL)

Em todos os indivíduos, houve aumento da vascularização do tecido tireoidiano comparado ao grupo controle. Estas alterações também foram visualizadas em maior frequência quando comparadas aos demais tratamentos. Neste grupo, a descamação do lúmen folicular foi mais evidente, estando presente em uma maior área, quando comparado com os demais grupos. Dois indivíduos apresentaram aumento do espaço intersticial em relação ao grupo controle. Além disso, o aumento da quantidade de coloide foi notado em dois indivíduos neste grupo. Em contraste, um indivíduo apresentou diminuição na quantidade de coloide em relação aos indivíduos do grupo controle. A ruptura folicular ocorreu em maior frequência em relação aos controles e ao Tratamento I, mas de forma semelhante ao grupo TII. Folículos irregulares também foram identificados em uma maior extensão do tecido. Todos os indivíduos do tratamento apresentaram folículos fusionados em distribuição semelhante com os outros grupos. Os resultados podem ser observados na Figura 1.

Figura 1– Tireoide de ratos Wistar tratados com acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade dérmica com dose repetida, corada com hematoxilina-eosina.



Legenda:(A,B) Grupo Controle; (C,D) Tratamento I; (E,F) Tratamento II; (G,H) Tratamento III. (FF) Folículos fusionados, (FI) folículos irregulares, (EI) espaço intersticial, (V) vasos sanguíneos, (D) descamação do lúmen. Barra de escala: 40 µm.

Fonte: Do autor (2022)

3.1.2. Análise semiquantitativa

A partir das informações disponíveis na literatura, as principais alterações observadas na tireoide de ratos expostos a substâncias químicas e seus respectivos fatores de importância estão listadas na Tabela 1. Os índices de cada alteração observada em ratos expostos topicamente às diferentes concentrações de acetilcarvacrol (INDEXalt), bem como a média dos índices individuais (INDEXind) e seu respectivo desvio padrão, para cada grupo, estão apresentados na Tabela 2. A comparação estatística não evidenciou diferenças significativas entre os grupos com relação às alterações observadas, exceto em relação ao aumento da vascularização do tecido intersticial, que se mostrou mais elevada em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). O INDEXind, contudo, evidenciou diferença significativa entre o grupo TIII e o grupo controle, demonstrando os efeitos do acetilcarvacrol administrado topicamente nos indivíduos avaliados ($p < 0,05$). Os resultados podem ser observados na Tabela 2 e no Gráfico 1.

Tabela 1– Principais alterações encontradas na tireoide de ratos expostos a substâncias químicas seus respectivos fatores de importância (w).

Alterações morfológicas	Fator de importância	Referências
Encolhimento folicular	1	PEREIRA; MAPUSKAR; VAMAN RAO, 2007; KHALAF; ARAFAT, 2015; SAKR; OKDAH; EL-ADLY, 2007)
Ruptura folicular	3	(PITSIAVAS et al., 1997; TANG et al., 2013)
Fusão de folículos	3	(CUNHA et al., 2017; FERREIRA et al., 2012)
Folículos irregulares	2	(EHSAN et al., 2016; ABUSRER et al, 2021; HANIM HADIE; MANSOR; TUAN SHARIFF, 2012; AL-AMOUDI, 2018; KOSTOGRYS; PISULEWSKI; PECIO, 2006; FERREIRA et al., 2012)
Aumento da altura do epitélio folicular	1	(KHALAF; ARAFAT, 2015; KOSTOGRYS; PISULEWSKI; PECIO, 2006)
Diminuição da altura do epitélio folicular	1	(TEBOURBI, 2010, KAVITHA; FRANCIS; VARIYAR, 2016)
Núcleos picnóticos em células foliculares	3	(KHALAF; ARAFAT, 2015; CUNHA et al., 2017)
Núcleos picnóticos em células interfoliculares	3	(KHALAF; ARAFAT, 2015; CUNHA et al., 2017)
Apoptose das células foliculares	3	(CUNHA et al., 2017)
Hiperplasia das células foliculares	1	(KHALAF; ARAFAT, 2015; TANG et al., 2013; KOSTOGRYS; PISULEWSKI; PECIO, 2006; EL-BANNA et al., 2014; ABUSRER et al., 2021)
Placas hiperplásicas no epitélio folicular	1	(LÜ; ZHAN, 2010)
Hipertrofia das células foliculares	1	(KOSTOGRYS; PISULEWSKI; PECIO, 2006; FERREIRA et al., 2012)
Vacuolização citoplasmática nas células foliculares	2	(CUNHA et al., 2017; SAKR; OKDAH; EL-ADLY, 2007; AL-AMOUDI et al., 2018; EL-BANNA et al., 2014)
Degeneração hidrópica	3	(HANIM HADIE; MANSOR; TUAN SHARIFF, 2012)
Aumento da quantidade de coloide	1	(AL-AMOUDI, 2018)
Diminuição na quantidade de coloide	1	(KOSTOGRYS; PISULEWSKI; PECIO, 2006; SAKR; OKDAH; EL-ADLY, 2007; PEREIRA et al. 2007; KAVITHA; FRANCIS; VARIYAR, 2016)
Descamação no lúmen folicular	3	(HANIM HADIE; MANSOR; TUAN SHARIFF, 2012; KAVITHA; FRANCIS; VARIYAR, 2016, AL-AMOUDI, 2018, DE ANGELIS et al., 2009)
Aumento da vascularização do tecido tireoidiano	2	(KOSTOGRYS; PISULEWSKI; PECIO, 2006; CUNHA et al., 2017)
Redução do estroma interfolicular	2	(LÜ; ZHAN, 2010)
Presença de células de gordura	2	(CUNHA et al., 2017)
Vasos sanguíneos congestionados	1	(SAKR; OKDAH; EL-ADLY, 2007; HALOI et al., 2017; ABUSRER et al., 2021)
Aumento do espaço intersticial	2	(HANIM HADIE; MANSOR; TUAN SHARIFF, 2012; SAKR; OKDAH; EL-ADLY, 2007)
Distribuição irregular do tecido conjuntivo	2	(HALOI et al., 2017)
Fibrose do epitélio interfolicular	3	(PEREIRA et al., 2007)

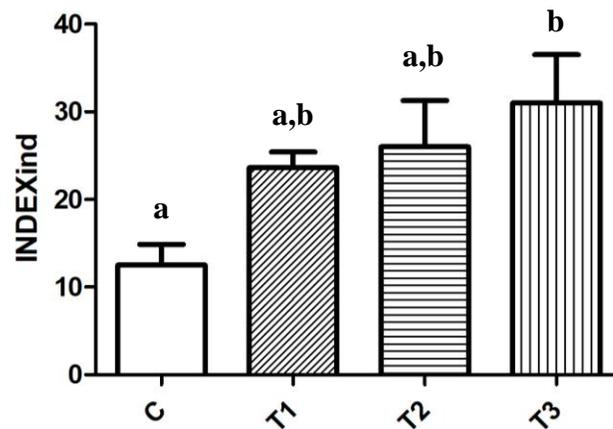
Fonte: Do autor (2022).

Tabela 2 – Média \pm desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) e dos índices individuais (INDEXind) observados na tireoide de ratos submetidos ao teste de toxicidade dérmica com dose repetida.

Alteração morfológica	Fator de importância (w)	Controle	TI	TII	TIII
Ruptura folicular	3	0,75 \pm 1,50a	1,00 \pm 1,73a	3,00 \pm 3,00a	3,00 \pm 3,00a
Fusão de folículos	3	3,00 \pm 0,00a	4,00 \pm 1,73a	1,00 \pm 1,73a	4,00 \pm 1,73a
Folículos irregulares	2	3,50 \pm 1,00a	5,30 \pm 1,15a	4,66 \pm 1,15a	5,33 \pm 1,15a
Aumento da quantidade de coloide	1	0,00 \pm 0,00a	0,00 \pm 0,00a	0,33 \pm 0,57a	1,66 \pm 1,52a
Diminuição na quantidade de coloide	1	0,00 \pm 0,00a	1,00 \pm 1,73a	0,66 \pm 1,15a	0,66 \pm 1,15a
Descamação no lúmen folicular	3	5,25 \pm 2,87a	7,00 \pm 1,73a	8,00 \pm 1,73a	9,00 \pm 3,00a
Aumento da vascularização do tecido	2	0,00 \pm 0,00a	2,00 \pm 3,46a,b	4,00 \pm 0,00a,b	4,66 \pm 1,15b
Vasos sanguíneos congestionados	1	0,00 \pm 0,00a	0,00 \pm 0,00a	0,33 \pm 0,57a	0,00 \pm 0,00a
Aumento do espaço intersticial	2	0,00 \pm 0,00a	3,33 \pm 3,05a	4,00 \pm 3,46a	2,66 \pm 2,31a
Índice individual		12,50 \pm 4,70a	23,60 \pm 3,05a,b	26,00 \pm 9,10a,b	31,00 \pm 9,50b

Fonte: Do autor (2022)

Gráfico 1 – Índices individuais (teste de toxicidade dérmica com dose repetida).

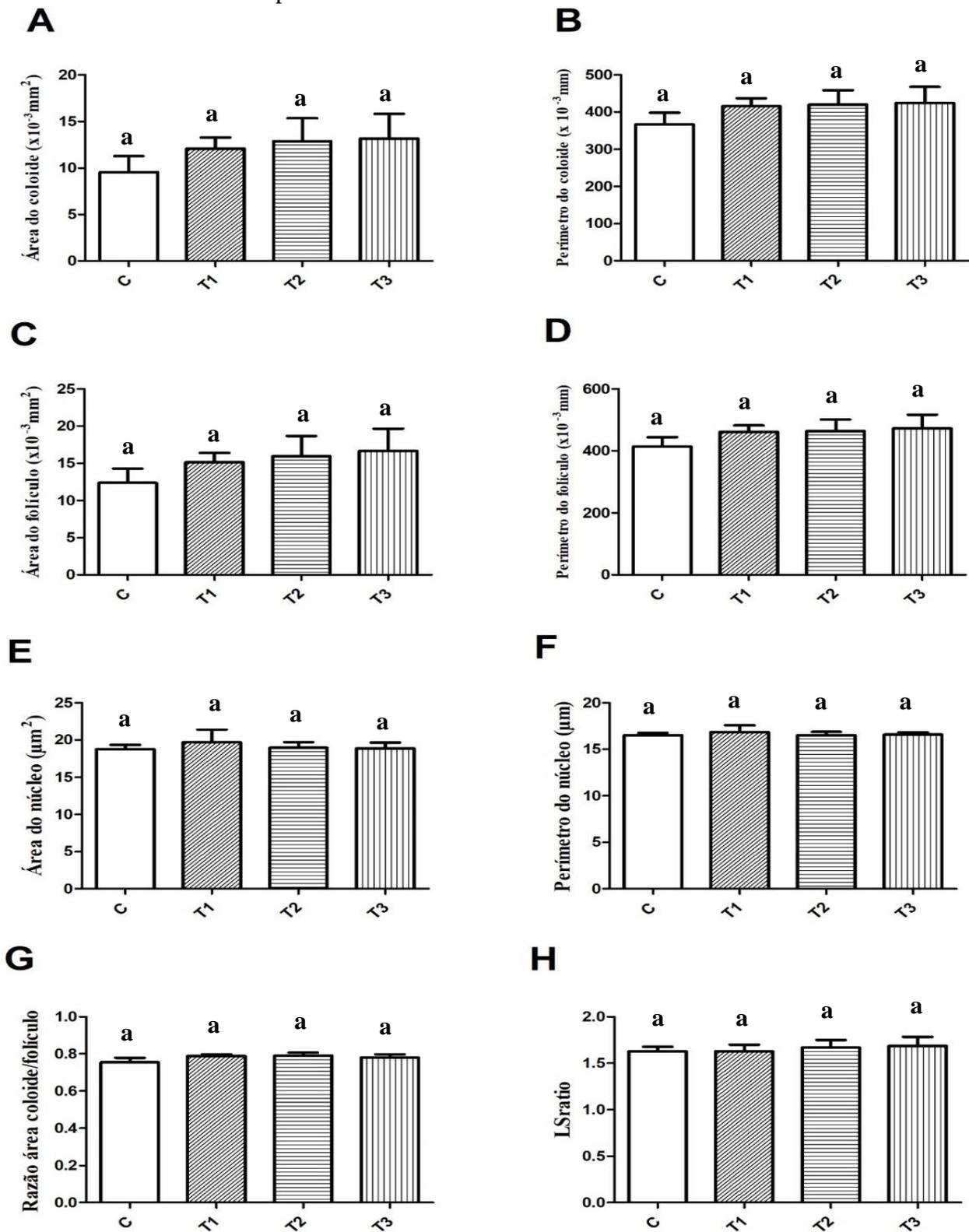


Fonte: Do autor (2022)

3.1.3. Análise morfométrica

Não houve diferença estatística significativa entre as medidas da área e perímetro do coloide e área e perímetro do folículo, bem como em relação à razão área do coloide/área do folículo ($p > 0,05$). Também não foram observadas diferenças na área e perímetro nuclear, e na razão entre os diâmetros maior e menor do núcleo (LSratio) ($p > 0,05$). Com relação ao coeficiente de variação nuclear (NACV) o grupo TI apresentou maior porcentagem de variação (15,34%). Os resultados podem ser observados no Gráfico 2 e nas Tabelas 3, 4 e 5.

Gráfico 2– Área e perímetro do coloide, do folículo e do núcleo das células foliculares, razão área do coloide/área do folículo e LSratio, em indivíduos submetidos ao teste de toxicidade dérmica com dose repetida.



Fonte: Do autor (2022).

Tabela 3 – Medidas da área ($\times 10^{-3}\text{mm}^2$) e perímetro ($\times 10^{-3}\text{mm}$) do coloide e do folículo, bem como a razão entre as áreas de ambas as regiões em indivíduos submetidos ao teste de toxicidade dérmica com dose repetida.

Grupo	Coloide		Folículo		Razão coloide/folículo
	Área	Perímetro	Área	Perímetro	
Controle	9.54 ± 3.46a	366.68 ± 63.49a	12.38 ± 3.80a	414.11 ± 60.69a	0.75 ± 0.05a
TI	12.09 ± 2.05a	415.76 ± 36.33a	15.14 ± 2.17a	461.33 ± 36.33a	0.79 ± 0.02a
TII	12.87 ± 4.28a	420.11 ± 66.75a	15.94 ± 4.69a	464.06 ± 64.76a	0.79 ± 0.03a
TIII	13.18 ± 4.57a	424.40 ± 75.04a	16.65 ± 5.20a	473.06 ± 76.00a	0.78 ± 0.03a

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 4 – Medidas da área (μm^2), perímetro (μm), diâmetro maior e menor (μm) do núcleo do folículo, bem como valores de NACV (coeficiente de variação da área nuclear) em indivíduos submetidos ao teste de toxicidade dérmica com dose repetida.

Grupo	Núcleo				
	Área	Perímetro	Diâmetro maior	Diâmetro menor	NACV
Controle	18.78 ± 1.13a	16.53 ± 0.45a	5.79 ± 0.06a	3.75 ± 0.18a	25.31 ± 4.24a
TI	19.68 ± 3.02a	16.85 ± 1.27a	5.90 ± 0.53a	3.83 ± 0.36a	24.32 ± 3.67a
TII	18.96 ± 1.33a	16.53 ± 0.59a	5.83 ± 0.26a	3.69 ± 0.17a	27.53 ± 3.23a
TIII	18.86 ± 1.37a	16.58 ± 0.41a	5.82 ± 0.17a	3.66 ± 0.26a	27.14 ± 1.54a

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 5 – Valores de LSratio (razão entre o maior e menor diâmetro do núcleo) e a classificação nuclear em indivíduos submetidos ao teste de toxicidade dérmica com dose repetida.

Grupo	LSratio	Classificação
Controle	1.63 ± 0.10a	Elíptico
TI	1.63 ± 0.13a	Elíptico
TII	1.67 ± 0.14a	Elíptico
TIII	1.69 ± 0.17a	Elíptico

Fonte: Do autor (2022).

3.2. Toxicidade oral com dose repetida

3.2.1. Análise morfológica

- Grupo Controle (DMSO a 5%)

Neste grupo, os folículos da região limítrofe foram observados com maior tamanho, enquanto os da região central se apresentaram menores; ambos demonstraram formas arredondadas a irregulares. Nos folículos maiores, foi observado epitélio simples com células achatadas diferentemente dos folículos menores, no qual observou-se epitélio simples cúbico. No interior do coloide foram observadas células foliculares descamadas, além de alguns folículos fusionados, porém em pouca frequência. As células apresentaram núcleo de forma circular a ovalada, corado uniformemente. Em um dos indivíduos, foi identificada ruptura folicular em pequena extensão ao longo da amostra analisada. Os resultados podem ser observados na Figura 2.

- Grupo Tratamento I

Neste grupo, três indivíduos apresentaram aumento do espaço intersticial, em comparação ao grupo controle. Um indivíduo deste tratamento demonstrou leve aumento na vascularização do tecido tireoidiano. Além disso, maior frequência de descamação no lúmen folicular e presença mais frequente de folículos irregulares também foram visualizados neste grupo de tratamento, se comparado ao grupo controle. Também foi observado, em um indivíduo, a ocorrência de ruptura folicular, de forma semelhante ao grupo controle. Os resultados podem ser observados na Figura 2.

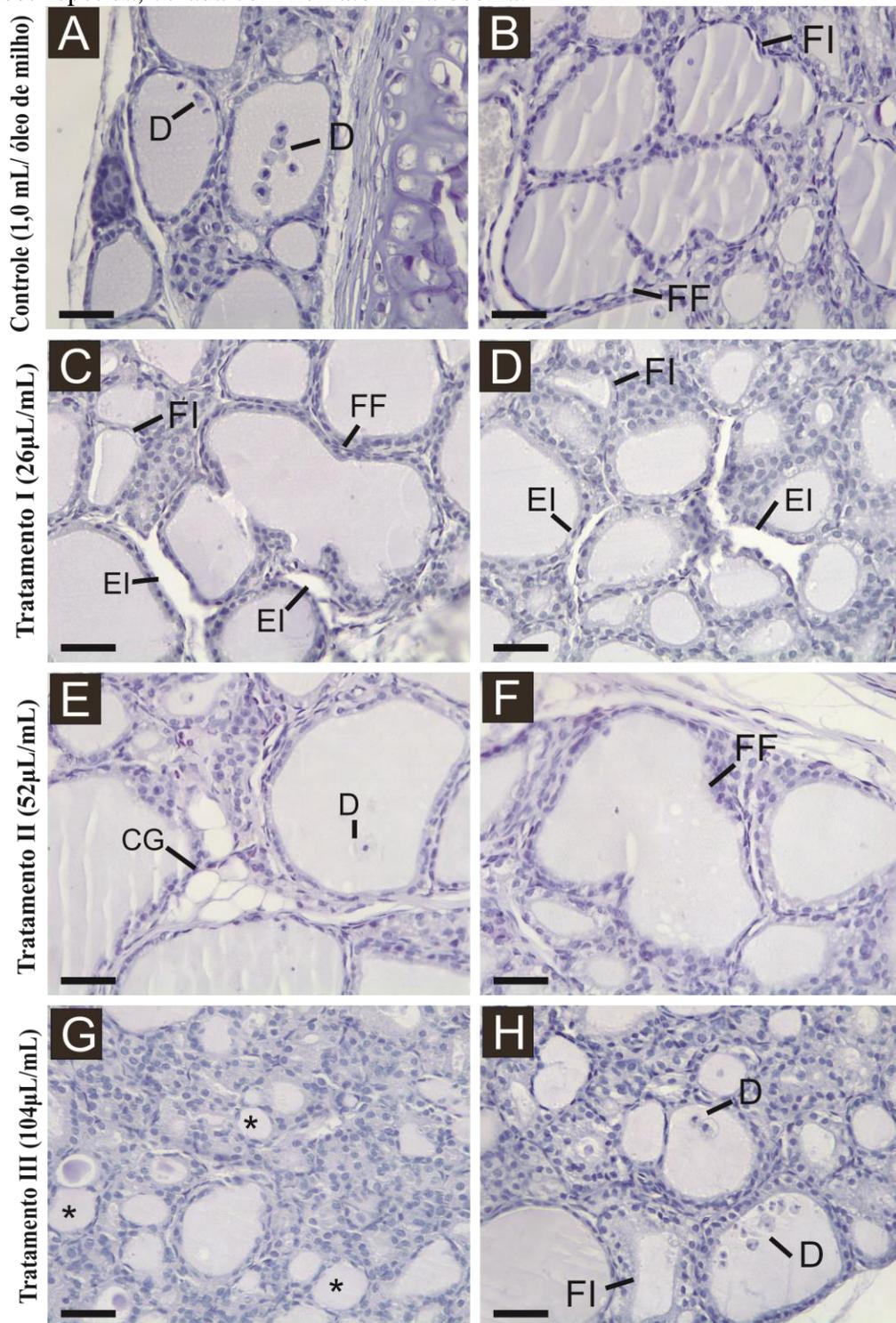
- Grupo Tratamento II

Neste grupo, notou-se o aumento do espaço intersticial em relação ao grupo controle, porém em menor frequência com relação ao grupo TI. Em todos os indivíduos, foi possível observar o aumento da vascularização no tecido tireoidiano, quando comparados ao grupo controle e ao grupo TI. Em um indivíduo, foram encontradas células de gordura no tecido tireoidiano, característica que ainda não havia sido observada nos grupos anteriores. A descamação do lúmen folicular se manteve similar ao grupo de TI, com maior frequência em relação ao controle. A presença de folículos irregulares e fusão de folículos foi semelhante aos grupos anteriores. Os resultados podem ser observados na Figura 2.

- Grupo Tratamento III

Neste tratamento de maior concentração, foi observado em dois indivíduos a diminuição da quantidade de coloide presente no tecido tireoidiano. Esta característica ainda não havia sido visualizada nos grupos de tratamento. O aumento no espaço intersticial, embora menos extenso que no grupo TI, foi mais frequente, sendo observado em todos os indivíduos tratados. A descamação no lúmen folicular se assemelhou aos demais grupos de tratamento, porém ocorreu em maior frequência quando comparada ao grupo controle. Folículos irregulares e fusão dos folículos também foram observados de forma similar aos demais grupos de tratamento e ao grupo controle. Um indivíduo apresentou presença de células de gordura, assim como no grupo TII. Os resultados podem ser observados na Figura 2.

Figura 2– Tireoide de ratos Wistar tratados com acetilcarvacrol pelo teste de toxicidade oral com dose repetida, corada com hematoxilina-eosina.



Legenda: (A, B) Grupo Controle; (C, D) Tratamento I; (E, F) Tratamento II; (G, H) Tratamento III. (FF) Foliculos fusionados, (FI) foliculos irregulares, (EI) espaco intersticial, (V) vasos sanguineos, (D) descamação do lumen, (*) Foliculos menores, (CG) Células de gordura. Barra de escala: 40 µm.

Fonte: Do autor (2022).

3.2.2. Análise semiquantitativa

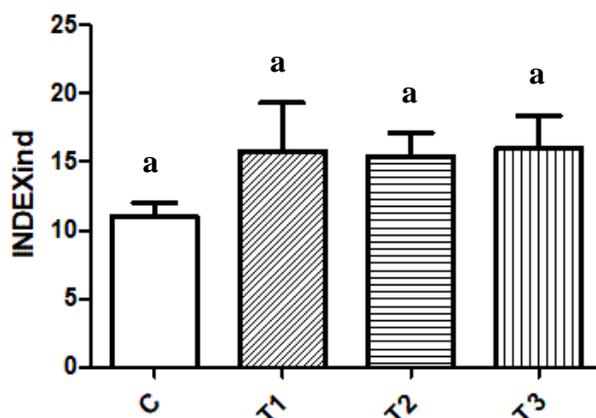
A Tabela 6 lista os índices de cada alteração (INDEXalt) observada nos indivíduos submetidos ao tratamento oral com acetilcarvacrol, bem como os valores médios dos índices individuais (INDEXind) e seus respectivos desvios padrão, para cada grupo. Estatisticamente, não foram observadas diferenças entre os grupos com relação a cada alteração ($p > 0,05$). Também não houve diferença significativa entre os grupos com relação aos INDEXind ($p > 0,05$). Os resultados podem ser observados na Tabela 6 e no Gráfico 3.

Tabela 6 – Média \pm desvio padrão dos índices de cada alteração (INDEXalt) e dos índices individuais (INDEXind) observados na tireoide de ratos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida.

Alteração morfológica	Fator de importância (w)	Controle	T1	TII	TIII
Ruptura folicular	3	1,00 \pm 1,73a	0,60 \pm 1,34a	0,00 \pm 0,00a	0,00 \pm 0,00a
Fusão de folículos	3	3,00 \pm 0,00a	3,00 \pm 0,00a	3,60 \pm 1,34a	3,60 \pm 1,34a
Folículos irregulares	2	4,00 \pm 0,00a	4,40 \pm 0,89a	4,40 \pm 0,89a	4,00 \pm 1,41a
Diminuição na quantidade de coloide	1	0,00 \pm 0,00a	0,00 \pm 0,00a	0,00 \pm 0,00a	0,80 \pm 1,09a
Descamação no lúmen folicular	3	3,00 \pm 0,00a	4,20 \pm 2,68a	4,20 \pm 1,64a	3,60 \pm 1,34a
Aumento da vascularização do tecido	2	0,00 \pm 0,00a	0,40 \pm 0,89a	2,00 \pm 0,00a	1,20 \pm 1,79a
Presença de células de gordura	2	0,00 \pm 0,00a	0,00 \pm 0,00a	0,40 \pm 0,89a	0,40 \pm 0,89a
Aumento do espaço intersticial	2	0,00 \pm 0,00a	3,20 \pm 3,03a	0,80 \pm 1,09a	2,40 \pm 0,89a
Ruptura folicular	3	1,00 \pm 1,73a	0,60 \pm 1,34a	0,00 \pm 0,00a	0,00 \pm 0,00a
Índice individual		11,00 \pm 1,73a	15,80 \pm 7,82a	15,40 \pm 3,85a	16,00 \pm 5,30a

Fonte: Do autor (2022).

Gráfico 3 – Índices individuais (teste de toxicidade oral com dose repetida).

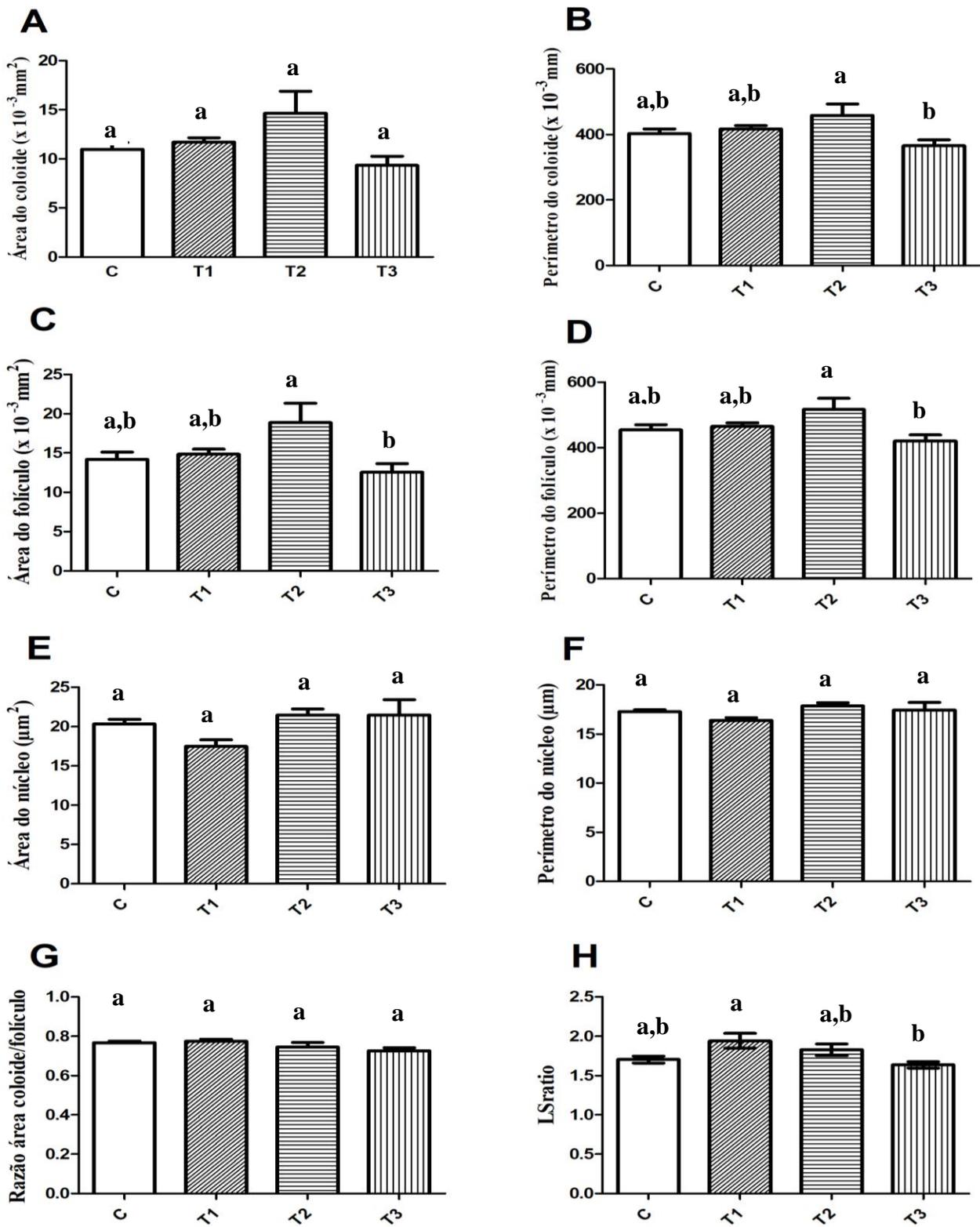


Fonte: Do autor (2022).

3.2.3. Análise morfométrica

Nas medições realizadas, não houve diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos com relação à área do coloide, área e perímetro do núcleo e razão entre coloide e folículo. Já nos resultados das medições para perímetro do coloide, área e perímetro do folículo houve diferença estatística significativa entre os grupos TII e TIII ($p < 0,05$). Também foi observada diferença estatística na razão entre os diâmetros maior e menor dos núcleos (LSratio), no qual os grupos TI e TIII se mostraram diferentes estatisticamente. Com relação ao coeficiente de variação nuclear (NACV) o grupo TIII apresentou maior porcentagem de variação (20,04%). Os resultados podem ser observados no Gráfico 4 e nas Tabelas 7, 8 e 9.

Gráfico 4 – Área e perímetro do coloide, do folículo e do núcleo das células foliculares, razão área do coloide/área do folículo e LSratio, em indivíduos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida.



Fonte: Do autor (2022).

Tabela 7 – Medidas da área ($\times 10^{-3}\text{mm}^2$) e perímetro ($\times 10^{-3}\text{mm}$) do coloide e do folículo, bem como a razão entre as áreas de ambas as regiões em indivíduos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida.

Grupo	Coloide		Folículo		Razão coloide/folículo
	Área	Perímetro	Área	Perímetro	
Controle	$10.97 \pm 1.22a$	$403,20 \pm 24,22a,b$	$14.18 \pm 1.61a,b$	$454,36 \pm 27,89a,b$	$0.77 \pm 0.01a$
TI	$11.72 \pm 0.98a$	$417,39 \pm 22,21a,b$	$14.84 \pm 1.46a,b$	$464,83 \pm 25,96a,b$	$0.77 \pm 0.02a$
TII	$14.66 \pm 4.94a$	$458,19 \pm 78,76a$	$18.87 \pm 5.50a$	$516,55 \pm 77,12a$	$0.75 \pm 0.05a$
TIII	$9.33 \pm 2.06a$	$365,60 \pm 41,01b$	$12.58 \pm 2.39b$	$420,39 \pm 41,80b$	$0.73 \pm 0.03a$

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 8 – Medidas da área (μm^2), perímetro (μm), diâmetro maior e menor (μm) do núcleo do folículo, bem como valores de NACV (coeficiente de variação da área nuclear) em indivíduos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida.

Grupo	Núcleo				
	Área	Perímetro	Diâmetro maior	Diâmetro menor	NACV
Controle	$20.32 \pm 1.02a$	$17.30 \pm 0.32a$	$6.05 \pm 0.16a$	$3.86 \pm 0.04a$	$32.67 \pm 9.52a$
TI	$17.48 \pm 1.88a$	$16.39 \pm 0.64a$	$5.90 \pm 0.13a$	$3.34 \pm 0.34a$	$28.83 \pm 2.47a$
TII	$21.45 \pm 1.76a$	$17.87 \pm 0.72a$	$6.40 \pm 0.39a$	$3.75 \pm 0.19a$	$25.96 \pm 0.19a$
TIII	$21.48 \pm 4.31a$	$17.46 \pm 1.70a$	$6.03 \pm 0.59a$	$3.93 \pm 0.54a$	$24.00 \pm 1,80a$

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 9 – Valores de LSratio (razão entre o maior e menor diâmetro do núcleo) e a classificação nuclear em indivíduos submetidos ao teste de toxicidade oral com dose repetida.

Grupo	LSratio	Classificação
Controle	$1.70 \pm 0.08a,b$	Elíptico
TI	$1.94 \pm 0.21b$	Elíptico
TII	$1.83 \pm 0.16a,b$	Elíptico
TIII	$1.64 \pm 0.09b$	Elíptico

Fonte: Do autor (2022)

4. DISCUSSÃO

A tireoide pode ser altamente afetada por fatores externos sendo muito sensível à toxicidade quando exposta a compostos como herbicidas, fungicidas e inseticidas (ABUSER et al., 2021). Dentro deste contexto, o presente trabalho avaliou histologicamente as alterações causadas exposição tópica e oral ao acetilcarvacrol na tireoide de ratos Wistar fêmeas. O acetilcarvacrol é derivado da acetilação do carvacrol, e apresenta propriedades acaricidas e atividade repelente contra carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (KONIG et al., 2020), e *Rhipicephalus microplus* (KONIG et al., 2019). Estudos utilizando o acetilcarvacrol no controle de nematoides também demonstram resultados positivos (ANDRÉ et al., 2016). No entanto, este composto ainda é pouco explorado, sendo este estudo o primeiro relato da sua ação na tireoide.

No presente estudo, a presença de folículos irregulares foi observada em todos os indivíduos, tanto no tratamento tópico quanto oral, o que pode indicar uma ocorrência normal na tireoide. Entretanto, especialmente nos ratos submetidos à exposição dérmica, esta alteração ocorreu em maior escala quando comparada ao grupo controle, embora sem diferenças estatísticas na análise semiquantitativa. Já no tratamento por via oral, os resultados foram similares entre os grupos de tratamento e controle. Ehsan et al. (2016), em estudos utilizando o inseticida fipronil (FPN) e exposição oral em ratos albinos machos, identificaram a presença de folículos irregulares nos grupos tratados. Entretanto, no grupo controle utilizando óleo de milho, pouca irregularidade nos folículos foi observada (EHSAN et al., 2016). A exposição de ratos Wistar ao nitrato por via oral também ocasionou irregularidade leve a moderada dos folículos (KOSTOGRYS; PISULEWSKI; PECIO, 2006). Além disso, testes por via oral utilizando o pesticida indoxacarb em camundongos revelaram que os indivíduos tratados também apresentaram irregularidade nos folículos, além de outras alterações, indicando que este pesticida pode ter um papel tóxico para a tireoide (ABUSRER et al., 2021). A presença de folículos irregulares pode estar relacionada à exposição a substâncias diferentes no organismo (ABUSRER et al., 2021). Entretanto, modificações no arranjo morfológico também podem ter relação com fatores hormonais, como uma diminuição do TSH (PENEL; BASTIANI; ROGNONI, 1982).

Abusrer et al. (2021) identificaram a dilatação e congestão dos vasos sanguíneos da tireoide após exposição ao indoxacarb. Haloi et al. (2017), após administração oral do fungicida ACTARA 250 WG em camundongos, também observaram esta alteração. Além disso, a congestão de vasos sanguíneos foi descrita em testes realizados por via oral utilizando o fungicida Mancozeb (SAKR;

OKDAH; EL-ADLY, 2007), mostrando que esta alteração pode ser indicativa para toxicidade. Entretanto, os resultados do presente trabalho revelaram pouca frequência desta alteração.

Ainda assim, o aumento na vascularização foi evidenciado em ambos os tratamentos no presente estudo, com diferenças estatisticamente significativas no grupo tratado topicamente com a maior concentração de acetilcarvacrol. Cunha et al. (2017) encontraram resultados similares na tireoide de camundongos fêmeas expostos a banhos de aspersão, com o objetivo de comparar os acaricidas timol e fipronil. Os autores observaram o aumento da vascularização da glândula e do calibre dos vasos sanguíneos, ocasionados de forma mais agressiva pelo composto sintético. A exposição por via oral ao nitrato também apontou vascularização mais desenvolvida nos grupos de tratamento em comparação ao grupo controle (KOSTOGRYS; PISULEWSK; PECIO, 2006). O aumento da vascularização pode ter ocorrido devido às propriedades vasorelaxantes do carvacrol, conforme demonstrado por Peixoto-neves et al. (2010), que observaram vasodilatação reversível em amostras de aorta. Segundo os autores, não há relação entre a vasodilatação e os possíveis efeitos tóxicos do carvacrol, já que este composto demonstra baixa toxicidade.

Nos estudos com lambda-cialotrina, ratos tratados por via oral com esse inseticida apresentaram folículos de formas variadas, além de esfoliação celular dentro de seu lúmen (AL-AMOUDI, 2018). Esta característica também foi visualizada nos ratos expostos ao acetilcarvacrol. Houve maior frequência de descamação nos grupos de tratamento para ambas as formas de exposição, tanto dérmica quando oral, na análise qualitativa. A descamação do epitélio folicular também foi demonstrada em estudos utilizando inseticidas organofosforados, como o clorpirifós em que foram avaliados os potenciais efeitos de curto e longo prazo em testes com camundongos por via subcutânea (DE ANGELIS et al., 2009). Experimentos utilizando o pesticida dicofol em dose oral em fêmeas de ratos (KAVITHA; FRANCIS; VARIYAR, 2016) e testes por via oral em ratos machos empregando o pesticida carbofurano (HANIM HADIE; MANSOR; TUAN SHARIFF, 2012) também mostraram a ocorrência de descamação no lúmen em seus tratamentos. Segundo Kavitha et al. (2016), a descamação no lúmen pode estar relacionada ao dano oxidativo que induzido pelos radicais livres das células mediado pela toxicidade do dicofol. A exposição de ratos ao Carbofurano por gavagem também ocasionou degeneração folicular, provavelmente relacionada aos danos foliculares induzidos pelo estresse (HANIM HADIE; MANSOR; TUAN SHARIFF, 2012). Cunha et al. (2017), por sua vez, também sugerem que as exposições a produtos tóxicos estão associadas à morte celular. A análise semiquantitativa, não demonstrou diferenças

estatísticas significativas entre os grupos com relação à descamação folicular. Entretanto, levando em consideração a análise qualitativa, sugere-se que exposições mais prolongadas ao acetilcarvacrol podem apresentar efeitos diretos ou indiretos nos tireócitos.

Ferreira et al. (2012) apontaram a ocorrência da fusão de vários folículos menores ao analisar a tireoide de camundongos expostos ao acaricida fipronil, principalmente no grupo de maior concentração (FERREIRA, 2012). Estes mesmos autores também observaram o aumento dos espaços que permeiam os folículos. Cunha et al (2017) também ressaltaram o aumento dos espaços interfoliculares, devido à ocorrência de edema. Neste mesmo estudo, os autores justificam a fusão dos folículos, o aumento da vascularização e do calibre dos vasos sanguíneos da glândula como alterações que provavelmente foram causadas pela presença de substâncias tóxicas no organismo, alterando a morfologia e fisiologia do órgão. Entretanto, um estudo que analisou a tireoide de ratos expostos à diferentes concentrações de iodo sugere que os mecanismos de reorganização da tireoide (migração celular e fusão folicular) podem estar relacionados à diminuição do hormônio TSH. O que pode justificar a presença de células fusionadas também no grupo controle do presente estudo, sendo algo não relacionado com o composto acetilcarvacrol e sim um rearranjo morfológico. A fusão de folículos também foi observada no presente estudo, de maneira similar entre todos os grupos do tratamento oral e dérmico, incluindo os grupos controle. Já o aumento do espaço intersticial foi notado nos tratamentos I, II e III de ambos os testes, na análise qualitativa, embora a análise semiquantitativa não tenha revelado diferenças estatísticas entre os grupos.

Tebourbi et al. (2010) observaram a redução da área folicular em ratos tratados por injeção via intraperitoneal com o pesticida diclorodifeniltricloroetano (DDT), quando comparados aos ratos do grupo controle (TEBOURBI et al 2010). Isso demonstrou que a diminuição dos folículos também pode ser um indicativo para toxicidade. Al-Amoudi (2018), por sua vez, identificou a presença de folículos degenerados com redução do coloide, bem como a diminuição dos hormônios T3 e T4 e o aumento do TSH, após exposição de ratos albinos ao inseticida lambda-cialotrina por via oral. Al-Amoudi apontou essas alterações hormonais como consequência dos efeitos tóxicos da pressão oxidativa, assim como nos estudos feitos por Abdollahi et al. (2004). Além disso, pesquisas utilizando ratos expostos ao dicofol via oral apontaram a redução da área do coloide além da diminuição significativa do nível de hormônios tireoidianos, T3 e T4 e aumento do TSH, que podem estar relacionados ao tamanho dos coloides (KAVITHA; FRANCIS; VARIYAR, 2016).

No presente estudo, na análise qualitativa, foi observada uma leve diminuição da quantidade de coloide nos grupos TI, TII e TIII no tratamento dérmico e apenas no grupo III do tratamento por via oral. Contudo, estas alterações não foram extensas o suficiente para gerar diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Na análise morfométrica, apenas os grupos TII e TIII expostos ao acetilcarvacrol via oral apresentaram diferenças entre si com relação ao perímetro e área do folículo e ao perímetro do coloide. Contudo, não houve diferença em relação ao grupo controle. Somado a isso, os indivíduos dos grupos TII e TIII do tratamento de gavagem também apresentaram células de gordura em seu tecido, alteração também observada por Cunha et al. (2017).

No tratamento tópico com acetilcarvacrol, a ruptura folicular ocorreu de forma similar entre os grupos de tratamento e controle. Já na exposição por via oral, os folículos com ruptura foram localizados em pouca frequência no grupo controle e no grupo TI. Na literatura, Pitsiavas et al. (1997) descreveram alterações como distorção e ruptura na arquitetura dos folículos na tireoide de ratos causadas pela exposição à amiodarona (AMD) por via oral. Além disso, pesquisas envolvendo testes com o composto sintético PCB 118 em ratos Wistar macho, por meio de injeção intraperitoneal, demonstraram a presença de folículos colapsados, além de outras alterações causadas pela exposição ao composto (TANG et al., 2013). Porém, folículos com essa alteração foram encontrados em pouca frequência em geral nos indivíduos, incluindo aqueles do grupo controle, o que pode indicar uma alteração comum no tecido tireoidiano.

Nagashima et al. (1998) utilizaram parâmetros morfológicos para diagnosticar doenças da tireoide como carcinomas foliculares, adenomas e bóciolos adenomatosos. Em seu estudo, foram utilizados os seguintes parâmetros morfométricos: área nuclear média, perímetro nuclear médio, razão de dimensão (LS ratio) dos núcleos, e o coeficiente de variação da área nuclear (NACV). Para os autores, valores elevados de NACV corresponderiam à tendência à malignidade na tireoide, com base nos dados obtidos nos grupos controle. A exposição ao acetilcarvacrol, contudo, não ocasionou diferenças estatísticas neste parâmetro. Resultados significativos estatisticamente foram encontrados no tratamento oral nas medições para perímetro do coloide, área e perímetro do folículo, entre os grupos TII e TIII ($p < 0,05$). A razão entre os diâmetros maior e menor dos núcleos (LSratio) entre os grupos TI e TIII também se mostraram diferentes estatisticamente no uso oral. Considerando que estas diferenças ocorreram apenas entre os tratamentos, não é possível afirmar que se tratem de alterações com significado morfológico relevante. Já no tratamento dérmico, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nestes parâmetros.

Para melhor conhecimento do metabolismo do carvacrol, estudos utilizando ratos e a exposição de 1 mmol/kg do composto, foi observado que o carvacrol é excretado na urina sem alteração ou como seus conjugados glicuronídeos e sulfatos, entretanto também pode sofrer oxidação dos grupos metil e isopropil no seu metabolismo (AUSTGULEN et al., 1987). Em pesquisas utilizando coelhos e exposição por via oral de carvacrol, os resultados foram que, o composto é absorvidos de forma lenta no intestino sendo que 30% do carvacrol se manteve no trato gastrointestinal e 25% foi excretada através da urina em menos de vinte quatro horas (SUNTRES et al., 2015).

Os testes de toxicidade em sua maioria são feitos através da via oral, sendo importante as testagens sobre via dérmica para avaliar os riscos que um determinado produto pode ter e assim avaliar de forma ampla (VAN RAVENZWAAY; LEIBOLD, 2004). Em testes por via tópica, a penetração do produto vai variar de acordo com as condições da pele, propriedades químicas do produto, tempo de exposição além de outros fatores (NGO; O'MALLEY; MAIBACH, 2010). Nos testes através da via oral, é importante ressaltar que o metabolismo intestinal e hepático é fundamental na absorção de uma substância (WACHER et al., 2001).

No presente estudo houve diferenças nos resultados entre os testes por via oral e por via tópica, o que pode ser um indicativo diante as diferentes formas de absorção. A estrutura do intestino é composta por uma enorme área de superfície devido a presença de microvilosidades que geram uma maior absorção. Esses são fatores que podem influenciar os resultados dos testes de toxicidade por via oral. Com essas informações, o produto acetilcarvacrol que é um derivado do carvacrol pode se encontra em maior tempo na corrente sanguínea quando aplicado sob o dorso dos animais do que quando aplicado sobre o método de gavagem. Essa maior permanência do produto na corrente sanguínea pode justificar então as alterações sofridas na tireoide nos testes de toxicidade via dérmica.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora algumas alterações morfológicas tenham de fato sido observadas em ratos expostos ao acetilcarvacrol por via tópica e oral, a extensão das alterações não foi grande o suficiente para ocasionar diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Entretanto, os índices individuais dos ratos expostos à maior concentração de acetilcarvacrol no tratamento dérmico foram significativamente diferentes do grupo controle. Isso indica que, embora a maioria dos parâmetros analisados não tenha diferido entre os grupos, é necessário que se tenha cautela ao utilizar o produto, principalmente em concentrações mais elevadas. As concentrações equivalentes aos tratamentos TI e TII, contudo, não produziram efeitos adversos relevantes, podendo ser consideradas seguras para uso, considerando-se especificamente os parâmetros aqui analisados. Mesmo assim, a avaliação de outros órgãos é fundamental para uma análise completa da segurança de aplicação deste produto.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M. *et al.* **Pesticides and oxidative stress: a review**, *Med. sci. monit.* 10 (6) 141–147, 2004.
- ABUSRER, S. *et al.* **Effect of Pesticide Indoxacarb on the Thyroid Gland in Swiss Albino Mice**, *Khalij-Libya Journal of Dental and Medical Research*, v. 5, n. 2, p. 23–30, 2021
- ADENUBI, O. T. *et al.* **Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis**, *Industrial Crops and Products*, v. 123, n. July, p. 779–806, 2018
- AKTAÇ, T.; BAKAR, E. **The histopathological changes in the mouse thyroid depending on the aluminium**, *Journal of Cell and Molecular Biology*, n. 1996, p. 69–72, 2002
- AL-AMOUDI, W. M. **Toxic effects of Lambda-cyhalothrin, on the rat thyroid: Involvement of oxidative stress and ameliorative effect of ginger extract**. *Toxicology Reports*, v. 5, n. March, p. 728–736, 2018.
- ANDERSON, J. A.; COATS, J. R. **Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods**, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 102, n. 2, p. 124–128, 2012
- ANDERSON, J.F., MAGNARELLI, L.A. **Biology of ticks**. *Infect Dis Clin North Am.* 2008 Jun;22(2):195-215.
- ANDRE, W.P.P. *et al.* **Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice**. *Vet Parasitol.* v. 218, p. 52-58, 2016.
- ANDRÉ, 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.
- AUSTGULEN, L. T.; SOLHEIM, E.; SCHELIN, R. R. **Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol**. *Pharmacology & Toxicology*, 61(2), 98– 102, 1987.
- BARROS *et al.* **Subacute toxicity assessment of diflubenzuron, an insect growth regulator, in adult male rats**. *Environmental Toxicology*, v.4, p.407- 414, 2014.
- 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.
- CACCIATORE, F. A. *et al.* **Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo carvacrol para inibição de Salmonella enteritidis**. *Hig. alim.*, p. 1816-1820, 2019.
- CACCIATORE, I.vana *et al.* **Carvacrol codrugs: A new approach in the antimicrobial plan.**, *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, p. 1–20, 2015.

CICUTTIN, G. L. *et al.* **Infection with Ehrlichia canis and Anaplasma platys (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina**, Ticks and Tick-borne Diseases, v. 6, n. 6, p. 724–729, 2015.

CUNHA, E. L. R. da *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, n. 1, p. 9, 2017.

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

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

DE ANGELIS, S. *et al.* **Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in CD-1 mice**. Toxicological Sciences, v. 108, n. 2, p. 311–319, 2009.

DEMMA, L. J. *et al.* **An outbreak of rocky mountain spotted fever associated with a novel tick vector, Rhipicephalus sanguineus, in Arizona, 2004: Preliminary report**, Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1078, p. 342–343, 2006.

EHSAN, H. A. *et al.* **Influence of fipronil intoxication on thyroid gland ultra-structure and hepatic microsomal enzymes expression in male albino rats**. Japanese Journal of Veterinary Research, v. 64, p. S79–S85, 2016.

EL-BANNA, A. *et al.* **A Toxicological, Histological, and Biochemical Study of the Effect of Aroclor 1254 on Thyroid Follicular Cells and the Possible Protective Role of Zinc Sulphate in Adult Male Albino Rats**. Ain Shams Journal of Forensic Medicine and Clinical Toxicology, v. 22, n. 1, p. 56–73, 2014.

EREMEEVA, M. E. *et al.* **Rickettsia rickettsii in Rhipicephalus ticks, Mexicali, Mexico**, Journal of Medical Entomology, v. 48, n. 2, p. 418–421, 2011.

EVERGETIS, E. *et al.* **From bio-prospecting to field assessment: The case of carvacrol rich essential oil as a potent mosquito larvicidal and repellent agent**, Frontiers in Ecology and Evolution, v. 29, n. 1, p. 1–11, 2018.

FERREIRA, M. *et al.* **Fipronil (active ingredient of acaricide frontline acting on the mice thyroid)**. Microscopy Research and Technique, v. 75, n. 3, p. 265–270, 2012.

FOWLES, J. R. *et al.* **Assessment of petroleum streams for thyroid toxicity**, Toxicology Letters, v. 254, p. 52–62, 2016.

FURLONG, J. **Carrapatos: problemas e soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 65 p. FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. Juiz de Fora: EMBRAPA - CNPGL Comunicado Técnico n. 36, 2003.

GADELHA, C. S. *et al.* **Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil.** *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 8, n. 5, p. 208 - 212, 14 Dec. 2013.

GONZAGA, C. A. M. **Marketing Verde De Produtos Florestais: Teoria E Prática**, Floresta, v. 35, n. 2, p. 353–368, 2005.

Guidelines Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants, FAO Animal Production and Health Division, Rome (2004).

GUNAL, M. Y.; HEPER, A. O.; ZALOGLU, N. **The effects of topical carvacrol application on wound healing process in male rats**, *Pharmacognosy Journal*, v. 6, n. 3, p. 10–14, 2014.

HALOI, A. Kr. *et al.* **Actara 25 WG Induced Histopathological Changes in Thyroid and Intestine of Swiss Albino Mice.** v. 4, n. 5, p. 226–230, 2017.

HANIM HADIE, S. N.; MANSOR, O.; TUAN SHARIFF, S. E. **The effect of carbofuran on thyroid gland of male rats.** *International Medical Journal*, v. 19, n. 1, p. 11–15, 2012.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. **The global importance of ticks**, *Parasitology*, v. 129, n. SUPPL., 2004.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 13ª edição. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 2017.

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. **The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol**, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 60, n. 18, p. 3042–3053, 2020.

KAVITHA, K V; FRANCIS, N.; CAMPUS, T. **Toxic influence of dicofol on thyroid gland in female pubertal rats.** *International Journal of Advanced Research*, v. 4, n. 2, p. 926–931, 2016.

KHALAF, H. A.; ARAFAT, E. A. **Effect of different doses of monosodium glutamate on the thyroid follicular cells of adult male albino rats: A histological study.** *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 8, n. 12, p. 15498–15510, 2015.

KOLLER, W. W., KOLLER *et al.* **Resistência dos carrapatos.**, n. March, 2019.

KONIG, I. F. M. *et al.* **Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ticks (Acari: Ixodidae)**, *Micron*, v. 129, n. September 2019, p. 102780, 2020.

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. 766774, 2019.

KOSTOGRYS, R.; PISULEWSKI, P.; PECIO, A. **Nitrates affect thyroid status and serum triacylglycerols in wistar rats**, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, v. 15, n. 1, p. 71–76, 2006;

KOZIOL, A. *et al.* **An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes**. Mini-Rev Med Chem 14:1156–1168, 2014.

LEE, E. *et al.* **Evaluation of liver and thyroid toxicity in Sprague-Dawley rats after exposure to polybrominated diphenyl ether BDE-209**, Journal of Toxicological Sciences, v. 35, n. 4, p. 535–545, 2010.

LIMA DE SOUZA, J. R. de L. *et al.* **Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged Rhipicephalus sanguineus sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae)**. Micron, v. 116, n. September 2018, p. 66–72, 2019.

LIMA DE SOUZA, J. R. *et al.* **The effects of neem oil (Azadirachta indica A. JUSS) enriched with different concentrations of azadirachtin on the integument of semi-engorged Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae) females**. Microsc Res Tech. Aug;80(8):838-844, 2017.

LÜ, B.; ZHAN, P. **Time-dependent effects of chlordane on thyroid histological structure and function in rats**. Toxicological and Environmental Chemistry, v. 92, n. 4, p. 813–821, 2010.

MAHMOOD, T.; QURESHI, I. Z.; IQBAL, M. J. **Histopathological and biochemical changes in rat thyroid following acute exposure to hexavalent chromium**, Histology and Histopathology, v. 25, n. 11, p. 1355–1370, 2010.

MANJUNATHACHAR, H. V. *et al.* **Economic importance of ticks and their effective control strategies**. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 4, S770–S779, 2014.

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.

MUKHERJEE, P. *et al.* **Role of animal models in biomedical research: a review.**, Laboratory animal research, v. 38, n. 1, p. 18, 2022.

NAGASHIMA, T. *et al.* **Morphometry in the cytologic evaluation of thyroid follicular lesions**, Cancer, v. 84, n. 2, p. 115–118, 1998.

NGO, M. A.; O'MALLEY, M.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous absorption and exposure assessment of pesticides**, Journal of Applied Toxicology, v. 30, n. 2, p. 91–114, 2010.

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, v. 260, n. April, p. 1–4, 2018.

OCDE. Organization for Economic Co-operation and Development. In: CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). Guideline 410: Repeated Dose Dermal Toxicity. Paris: Head of Publications Service, 1981.

OCDE. Organization for Economic Co-operation and Development. In: CHEMICALS, O. G. F. T. T. O. (Ed.). Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Paris: Head of Publications Service, 1995.

PENEL C.; BASTIANI P.; ROGNONI J.B. **Correlation between thyroid-follicle fusion and structural modifications of the epithelial cells. A quantitative study in the adult rat.** Cell Tissue Res. 1982;225(1):143-53, 1982.

PEREIRA, C.; MAPUSKAR, K.; VAMAN RAO, C. **A two-generation chronic mixture toxicity study of Clophen A60 and diethyl phthalate on histology of adrenal cortex and thyroid of rats,** Acta Histochemica, v. 109, n. 1, p. 29–36, 2007.

PINTO, E. B.; MORAIS, C. De; NERI, M. **Avaliação do potencial tóxico dos monoterpenos carvacrol, linalol e p-cimeno: Uma abordagem in silico,** v. 2, n. 2, p. 210–211, 2015.

PITSIAVAS, V. *et al.* **Amiodarone induces a different pattern of ultrastructural change in the thyroid to iodine excess alone in both the BB/W rat and the Wistar rat.** European Journal of Endocrinology, v. 137, n. 1, p. 89–98, 1997.

RAMÍREZ, C. *et al.* **Assessment and determination of LC50 of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of Rhipicephalus (Boophilus) microplus.** Parasite Epidemiol. Control 1, 72–77, 2016.

RIDER, C. V. *et al.* **Toxicity and Carcinogenicity Studies of Ginkgo biloba Extract in Rat and Mouse.** Toxicologic Pathology, v. 42, n. 5, p. 830–843, 2014.

RÖCKLINSBERG, H.; GJERRIS, M.; OLSSON, I. A. S. **Animal Ethics in Animal Research,** v. 78, n. 2, p. 1–174, 2017.

SAKR, S. A.; OKDAH, Y. A.; EL-ADLY, E. K. **Effect of ginger on mancozeb fungicide-induced histological and histochemical changes in thyroid gland of albino rat.** v. 107, p. 101–107, 2007.

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

STOKER, T. E. *et al.* **The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat,** Toxicological Sciences, v. 67, n. 2, p. 198–206, 2002.

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

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

TANG, J. M. *et al.* **Morphological and functional deterioration of the rat thyroid following chronic exposure to low-dose PCB118.** *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 65, n. 7–8, p. 989–994, 2013.

TEBOURBI, O. *et al.* **Subacute toxicity of p,p'-DDT on rat thyroid: Hormonal and histopathological changes.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 29, n. 3, p. 271–279, 2010.

VAN RAVENZWAAY, B.; LEIBOLD, E. **The significance of in vitro rat skin absorption studies to human risk assessment,** *Toxicology in Vitro*, v. 18, n. 2, p. 219–225, 2004.

VARGAS-HERNANDEZ, G. *et al.* **Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia.** *Veterinary Parasitology*. Amsterdam: Elsevier B.V., v. 186, n. 3-4, p. 254-260, 2012.

WACHER, V. J.; SALPHATI, L.; BENET, L. Z. **Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption.** *Adv. Drug Delivery Rev.* 46, 89 –102, 2001.

YAGLOVA, N.V.; YAGLOV, V.V. **Cytophysiological Changes in the Follicular Epithelium of the Thyroid Gland after Long-Term Exposure to Low Doses of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT).** *Bull Exp Biol Med.* 2017 Mar;162(5):699-702, 2017.

ZORRILLA, L. M. *et al.* **The effects of triclosan on puberty and thyroid hormones in male wistar rats,** *Toxicological Sciences*, v. 107, n. 1, p. 56–64, 2009.