



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**MATHEUS NOBATE GOMES**

**Efeitos citotóxicos da combinação de cipermetrina e timol na vitelogênese  
de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888)  
(Acari: Ixodidae)**

**SÃO LUÍS -MA**

**2022**

MATHEUS NOBATE GOMES

**Efeitos citotóxicos da combinação de cipermetrina e timol na vitelogênese de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lívio Martins Costa Junior

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Patrícia Rosa de Oliveira

SÃO LUÍS – MA

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Nobate Gomes, Matheus.

Efeitos citotóxicos da combinação cipermetrina e timol na vitelogênese de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1888 Acari: Ixodidae / Matheus Nobate Gomes, Caio Pavão Tavares, Isabella Chaves Sousa. - 2022.

62 p.

Coorientador(a): Patrícia Rosa de Oliveira.

Orientador(a): Livio Martins Costa Junior.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

1. Controle. 2. Monoterpeno. 3. Óleo essencial. 4. Ovário. 5. Piretróides. I. Chaves Sousa, Isabella. II. Martins Costa Junior, Livio. III. Pavão Tavares, Caio. IV. Rosa de Oliveira, Patrícia. V. Título.

**MATHEUS NOBATE GOMES**

**Efeitos citotóxicos da combinação cipermetrina e timol na vitelogênese de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Lívio Martins Costa Junior** (Orientador)

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

---

**Prof. Dr. Jose Manuel Macario Rebelo**

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

---

**Prof. Dr. Hermes Ribeiro Luz**

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

*“[...] A academia não é o paraíso, mas o aprendizado, é um lugar onde o paraíso pode ser criado. A sala de aula com todas suas limitações continua sendo ambiente de possibilidades. Nesse campo de possibilidades, temos a oportunidade de trabalhar pela liberdade, exigir de nós e de nossos camaradas uma abertura da mente e do coração que nos permite encarar a realidade ao mesmo tempo em que, coletivamente, imaginemos esquemas para cruzar fronteiras, para transgredir. Isso é a educação como prática da liberdade...”*

(bell hooks)

*Dedico este trabalho à minha avó, Jovenilde e à minha mãe,  
Lucileide.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Espiritualidade por me guiarem em silêncio em todas as minhas decisões e caminhos a serem percorridos. Sem esse afago nada disso seria possível.

Agradeço também a minha família por todos os ensinamentos e por serem meu apoio todos os dias. Em especial, a minha avó materna, **Jovenilde Nascimento Nobate** pela minha criação e por demonstrar para mim todos os dias a importância da empatia e respeito pela vida.

A minha Mãe, **Lucileide Nobate Pinheiro**, por acreditar e por me guiar em todas as minhas decisões com diálogos e amor, sem você, jamais existiria motivação para fazer tudo isso. Espero poder retribuir em dobro tudo aquilo que você me proporciona, você é meu mundo. Te amo!

Ao meu padraсто, **Ruy Dgland Pinheiro**, por todo carinho e por incentivar os meus sonhos tornando-os possíveis sempre!

Ao meu Pai, **Geilson Amorim Gomes**, por sempre estar lutando pela minha educação e por ser um grande exemplo de ser humano que nunca desistiu dos seus sonhos. A minha madrasta também, **Adinalle Oliveira**, por ser amiga e parceira, sempre incentivando os meus estudos e ressaltando a grande importância do trabalho.

Aos meus avós, **Dominici, Goreth, Adelson e Amuja**, por todo ensinamento e amor proporcionado por vocês durante todos esses anos.

Ao meu irmão, **Lucas Nobate**, por ser meu melhor amigo e sempre acreditar no meu potencial. Por todo apoio em todos os nossos momentos difíceis que nos tornaram tão unidos e sabendo que todos esses momentos são breves. Você é minha inspiração todos os dias!!!!

Agradeço também aos meus familiares queridos **Tia Luciene, Tio Rivaldo, Tia Geiza, Kamilla, Joymara, Anderson e Antony** por todo incentivo e apoio durante esses anos. Jamais esquecerei dos esforços de vocês em momentos importantes que tanto precisei.

Ao meu orientador, **Lívio Martins Costa Junior**, obrigado por estar presente durante todos esses anos. Por ser meu professor e ao mesmo tempo amigo, ensinando, motivando, corrigindo todos os meus tropeços durante esse caminho e mostrando as possibilidades que a vida nos oferece. Obrigado pela grande paciência e por não me deixar desanimar. Sua

motivação e vontade de aprender é admirável! Tenho imensa admiração pelo grande cientista e pesquisador que és. A palavra é gratidão, professor.

Aos meus amigos do Laboratório de Controle de Parasitos, em especial **Tássia, Dauana, Ellen, Naylene, Aldilene, Carol, Junior e Prof. Hermes**. Obrigado por terem me recebido, esse acolhimento foi extremamente importante. Por todo ensinamento e direcionamento durante todos esses anos. Com vocês enxerguei a grande importância da iniciação científica e espero refletir todos esses ensinamentos futuramente. Jamais esquecerei dos nossos grandes momentos juntos durante os experimentos, almoços e lanches. Gratidão!

Agradeço também aos meus coorientadores de bancada e amigos, **Caio e Isabella**, muito obrigado por todos os nossos experimentos e momentos juntos durante esses cinco anos. Gratidão pela paciência e por me ensinarem com leveza e clareza, me fazendo acreditar nas minhas ideias e no meu potencial. A confiança e amizade de vocês é um grande presente para mim, espero ser tão incrível como os grandes profissionais que vocês são. Amo vocês! meu eterno **“Tick’s Orientation”**

Agradeço também a todos os meus irmãos científicos **Juliana, Rayssa, Ruth, Geovane, Nagila e Jhone**. Obrigado por todas as conversas, sorrisos e também choros durante essa experiência. Tem sido muito significativo compartilhar esse aprendizado com vocês. Agradeço também aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica Vegetal, **Profa. Alexandra, Alana, Everton, Marcelo, Dani, Hellen e Irla**. Obrigado por todos os momentos juntos e pela nossa incrível viagem para Londrina em 2018.

A minha coorientadora, **Patrícia Rosa de Oliveira** (Patty!!!), por ser tão gentil e sempre disponível para tirar dúvidas e ensinar sobre morfologia de carrapatos! Você é especial Profa. Obrigado por me atender, ouvir e incentivar grandes passos na pesquisa.

Aos meus amigos da Biologia, **Gabi, Carol, Erick, Blenda, André, Ana Jessica, Carla e Felipe**. Em especial, **Ana Paula Soeiro e Lívia Ribeiro**, minhas grandes irmãs, biólogas, cientistas e professoras por todo amparo durante esses anos de graduação. Posso dizer que a amizade de vocês é o maior presente desse curso, obrigado por quando pensei em desanimar, vocês estiveram presentes incentivando e dividindo forças para tornar esse sonho possível. Obrigado pelas noites de vinhos, massas e músicas juntos, rindo e lembrando de todos os nossos momentos. Amo vocês.



Agradeço aos meus grandes amigos e cientistas **Bruna Emanuelle, Gustavo Ribeiro, Thais Assen, Thaís Moraes, Scarlett Veras, Meydson Benjamim e Léo Nava Piorsky** por todo apoio, incentivo e por estarem sempre disponíveis aconselhando e presentes na minha vida. Em especial também ao meu grupo, Royals (**Polly, Thuca, Thayla, Lana e Tam**) por serem meus grandes irmãos e amigos da vida.

Agradeço também a **Dona Dica, Dinalva, Zeca, Josuel e Ivaldo** durante esses anos por todo carinho e respeito.

A todos, muitíssimo obrigado.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1 Carrapatos.....	16
2.2 Teste de Imersão de Adultos – AIT.....	17
2.3 Análise Morfológica do ovário de fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	17
3. RESULTADOS .....	18
3.1 Grupo Controle (Água Destilada).....	18
3.2 Grupo Cipermetrina (0,15 mg/mL) .....	19
3.3 Grupo Cipermetrina (0,075 mg/mL) .....	19
3.4 Grupo Cipermetrina (0,0375 mg/mL) .....	20
3.5 Grupo Timol (1,3 mg/mL).....	21
3.6 Grupo Combinação Cipermetrina (0,15 mg/mL) e Timol.....	21
3.7 Grupo Combinação Cipermetrina (0,075 mg/mL) e Timol.....	22
3.8 Grupo Combinação Cipermetrina (0,0375 mg/mL) e Timol.....	23
4. DISCUSSÃO .....	32
5. CONCLUSÕES .....	35
Contribuições do Autor .....	36
6. REFERÊNCIAS .....	37
7. APÊNDICE – RESUMO DAS ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS .....	44
8. ANEXO – NORMAS DE FORMATAÇÃO DA REVISTA .....	50
8. ANEXO B - ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO .....	62

## ARTIGO

Cytotoxic effects of combination cypermethrin and thymol on vitelogenesis of females engorged *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae)

---

**Matheus Nobate Gomes**<sup>1</sup> Caio Pavão Tavares<sup>1</sup> Isabella Chaves Sousa<sup>1</sup> Dauana Mesquita-Sousa<sup>1</sup> Tássia Lopes Vale<sup>1</sup> Patrícia Rosa de Oliveira<sup>2</sup> and Lívio Martins Costa Junior<sup>1\*</sup>

1. Laboratório de Controle de Parasitos, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís MA, Brasil.

2. Programa de Pós-Graduação em Biociências, Instituto Multidisciplinar em Saúde (IMS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Bairro Candeias, Vitória da Conquista/BA, Brasil.

---

\*Corresponding author: Lívio Martins Costa Júnior. Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, 65065-545, São Luís – MA, Brasil. livio.martins@ufma.br, Tel: +55 98 33729547.

**Highlight**

- Os efeitos deletérios da combinação cipermetrina e timol sobre a morfologia ovariana do carrapato bovino são mais significativos que os efeitos deletérios dos compostos isolados
- As principais alterações morfológicas encontradas foram vacuolização citoplasmática, córion irregular e mais espesso, formato irregular do ovócito e fragmentos dos grânulos de vitelo
- Essas alterações podem prejudicar o desenvolvimento dos ovos

## RESUMO

*Rhipicephalus microplus* é um dos ectoparasitos mais importantes de regiões tropicais e subtropicais do mundo. O uso de carrapaticidas sintéticos é o método mais comum para controle desse carrapato, com destaque para a classe das lactonas macrocíclicas, organofosforados e piretróides sintéticos. A cipermetrina (piretróide sintético) é a molécula mais comercializada no Brasil para controle do carrapato bovino, e o frequente surgimento de populações resistentes é uma realidade enfrentada em todo o mundo. A atividade do timol, um monoterpeneo natural, livre ou em combinação com outros compostos, já foi descrita em diferentes espécies e estágios de carrapatos. Além disso, já temos relato que a presença de timol aumenta a concentração de cipermetrina nos tecidos de fêmeas ingurgitadas. No entanto, não há dados na literatura sobre alterações histopatológicas da combinação de cipermetrina e timol sobre órgãos internos de *R. microplus*. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da combinação de cipermetrina e timol sobre a morfologia dos ovários de fêmeas ingurgitadas de duas populações com diferentes níveis de suscetibilidade a cipermetrina (baixa e alta suscetibilidade). A combinação com diferentes concentrações de cipermetrina e concentrações fixas de timol (1,3 mg/mL) foram realizados. Fêmeas adultas ingurgitadas foram divididas em oito grupos experimentais (n = 20): 1) Grupo controle não tratado; 2) Grupo cipermetrina: 0,15 mg/mL; 3) Grupo timol (1,3 mg/mL); 4) Grupo combinação cipermetrina (0,15 mg/mL) + timol; 5) Grupo cipermetrina (0,075 mg/mL); 6) Grupo combinação cipermetrina (0,075 mg/mL) + timol; 7) Grupo cipermetrina (0,0375 mg/mL); 8) Grupo combinação cipermetrina (0,0375 mg/mL) + timol. As alterações causadas pela ação da combinação de timol e cipermetrina nos ovários testados foram mais intensas que as causadas pelo timol e cipermetrina usadas isoladamente, sugerindo um efeito sinérgico entre os compostos químicos. As principais alterações encontradas nos ovócitos II ao V, sendo elas: grandes vacúolos na região periférica, diminuição dos grânulos de vitelo, alteração no formato do ovócito, irregularidade no córion e fragmentos de grânulos de vitelo causando processo incompleto de vitelogênese. Esses achados confirmam os resultados encontrados anteriormente em nosso grupo de pesquisa, em que a combinação de cipermetrina e timol tiveram efeito significativo na eficiência reprodutiva de fêmeas de *R. microplus* que os compostos isolados.

Palavras-chave: Monoterpeneo, Piretróides, Ovário, Óleo essencial, Carrapato

## ABSTRACT

*Rhipicephalus microplus* is one of the most important ectoparasites in tropical and subtropical regions. Synthetic pyrethroids are widely used to control this tick, regardless of the selection of resistant population be a worldwide issue. The use of synthetic ticks is the most common method to control this tick, with emphasis on the class of macrocyclic lactones, organophosphates and synthetic pyrethroids. Cypermethrin (synthetic pyrethroid) is the most commercialized molecule in Brazil to control the bovine tick, and the frequent emergence of resistant populations is a reality faced all over the world. The activity of thymol, a natural monoterpene, free or in combination with other compounds, has already been described in different species and stages of ticks. In addition, we have already reported that the presence of thymol increases the concentration of cypermethrin in tissues of engorged females. However, there are no data in the literature on histopathological alterations of the combination of cypermethrin and thymol on internal organs of *R. microplus*. The combination of different concentrations of cypermethrin and fixed concentration of thymol (1,3 mg/mL) were assessed. Adult engorged females were divided into eight experimental groups (n = 20 each): 1) untreated control group; 2) cypermethrin (0,15 mg/mL) group; 3) thymol group; 4) cypermethrin (0,15 mg/mL) + thymol group; 5) cypermethrin (0,075 mg/mL) group; 6) cypermethrin (0,075 mg/mL) + thymol group; 7) cypermethrin (0,0375 mg/mL) group; 8) cypermethrin (0,0375 mg/mL) + thymol group. The changes caused by the combination of cypermethrin and thymol on ovaries were more expressive than those caused by sole use of thymol or cypermethrin, suggesting a synergic effect between those compounds. The main alterations found in oocytes II to V were larger vacuoles in the peripheral region, decreased yolk granules, changes of oocyte shape, irregularity in the chorion and fragments of yolk granules, which caused incomplete vitelogenesis. These findings support results previously described by our research group in which combination of cypermethrin and thymol had greater effect on reproductive efficiency of females of *R. microplus* in comparison to those compounds isolatedly.

Keywords: Monoterpene, Pyretroids, Ovary morphology, Oil essential, Tick control

## 1. INTRODUÇÃO

O carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) é considerado o ectoparasita mais importante para a pecuária em todo o mundo (Ghosh et al., 2007). Além disso, são vetores de patógenos de importância médico-veterinária, como *Anaplasma* spp. e *Babesia* spp., agente etiológico do complexo da Tristeza Parasitária Bovina, resultando em grandes impactos na saúde animal e perdas econômicas. No Brasil, as perdas estimadas ultrapassam os 3,24 bilhões de dólares por ano (Grisi et al., 2014).

O uso de carrapaticidas sintéticos é o método de controle mais comum para o controle do carrapato, com destaque para a classe das lactonas macrocíclicas, organofosforados e piretróides sintéticos. A cipermetrina (piretróide sintético) é a molécula mais comercializada no Brasil para o controle do *R. microplus* (Reck et al., 2014; Secchis et al., 2022). No entanto, o uso constante e inadequado desses compostos tem gerado forte pressão seletiva sobre as populações de carrapatos, selecionando indivíduos resistentes. Atualmente existem relatos de várias populações resistentes a um ou mais acaricidas sintéticos disponíveis no mercado (Reck et al., 2014; Abbas et al., 2014; Rodriguez-Vivas et al., 2018).

Nesse contexto, há a necessidade de desenvolver novos produtos com diferentes mecanismos de ação e que sejam eficientes para o controle do carrapato, inclusive em populações resistentes. A combinação de moléculas é uma importante alternativa para aumentar a eficácia dos antiparasitários. Essas combinações podem ocorrer entre dois ou mais carrapaticidas sintéticos, bem como um carrapaticida sintético e compostos naturais (Furlong et al., 2007; Lopes et al., 2017; Lanusse et al., 2018; Secchis et al., 2022

Os monoterpenos, moléculas constituintes dos óleos essenciais, são exemplos de compostos naturais que têm potencial para integrar as ferramentas atuais contra o carrapato bovino (Costa-Júnior et al., 2016; Nwanade et al., 2020; Upadhyay et al., 2021). O timol (5-metil-2-isopropil-fenol) é um monoterpeno presente no óleo essencial de plantas da família Lamiaceae e Verbenaceae, que possui atividade acaricida e repelente em diferentes estágios e espécies de carrapatos como *R. microplus*, *R. sanguineus* e *R. annulatus* (Senra et al., 2013; Araújo et al., 2016; Arafa et al., 2020). No entanto, altas concentrações são necessárias para serem eficazes, tornando o uso desse composto isolado no controle de *R. microplus* um grande desafio (Matos et al., 2014). Diferentes misturas de monoterpenos foram avaliadas quanto à sua eficácia no controle de carrapatos, pois podem reduzir as grandes concentrações

de monoterpeno necessárias, aumentar a atividade biológica contra o organismo alvo e reduzir o custo de formulação (Delmonte et al., 2017; Coelho et al., 2020; Monteiro et al., 2021).

O uso combinado do timol com outras moléculas tem sido avaliado e considerado uma alternativa promissora em diferentes atividades biológicas (Arunkumar et al., 2015; Chang et al., 2007), porém, há poucas informações sobre os efeitos citotóxicos e mecanismos de ação do timol, livre ou associado, em carrapatos. Estudos realizados por Tavares et al. (2022) demonstraram que o timol potencializa o efeito carrapaticida da cipermetrina em larvas de *R. microplus* e que a presença deste monoterpeno aumenta a concentração de cipermetrina nos tecidos de fêmeas ingurgitadas, refletindo um aumento na porcentagem de controle de *R. microplus*. No entanto, é necessário um melhor entendimento dos efeitos fisiológicos dessa combinação (timol + cipermetrina) sobre os carrapatos, como alterações morfológicas nos tecidos de fêmeas ingurgitadas tratadas com essa combinação.

Análises morfofisiológicas podem ajudar a pesquisar e caracterizar os efeitos de diferentes compostos químicos em importantes sistemas de carrapatos (Camargo-Mathias et al., 2018). A permetrina causa alterações morfológicas em diferentes estruturas do carrapato-marrom-do-cão (*Rhipicephalus sanguineus*) como singânglio (sistema nervoso central), ovários e glândulas salivares (Roma et al., 2011, 2013; Nodari et al., 2012, 2017; Camargo-Mathias., 2017; Pereira et al., 2017). Na mesma linha, o timol tem demonstrado efeitos deletérios no ovário, singânglio, glândulas salivares e órgão de gené (Matos et al., 2014, 2019, 2020; Penha et al., 2021).

Embora, diferentes estudos tenham demonstrado diferentes efeitos de carrapaticidas sintéticos e monoterpenos em diferentes sistemas dos carrapatos, não há dados na literatura sobre alterações histopatológicas da combinação de cipermetrina e timol em órgãos internos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da combinação de cipermetrina e timol sobre a morfologia dos ovários de fêmeas ingurgitadas de duas populações de *R. microplus* com diferentes níveis de suscetibilidade a acaricidas sintéticos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Carrapatos**



Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Maranhão, Brasil, sob o número do protocolo 23.115.005443/2017-51. Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* naturalmente destacadas foram obtidos de bezerros artificialmente infestados com larvas de duas populações com diferentes perfis de suscetibilidade à carrapaticidas sintéticos (baixa e alta suscetibilidade). A população de baixa suscetibilidade aos produtos sintéticos (Jaguar) provém de gado naturalmente infestado de uma fazenda localizada em Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, em 2011. A população de alta suscetibilidade aos produtos sintéticos (Porto-Alegre) provém de uma fazenda localizada no Rio Grande do Sul, ao longo da fronteira do Brasil e do Uruguai, e foi coletado de gado naturalmente infestado em 1992 (Reck et al., 2014). Ambas as populações de carrapatos foram mantidas por pelo menos cinco anos com infestação artificial em bezerros nas dependências da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

## **2.2 Teste de Imersão de Adultos – AIT**

Um total de 160 fêmeas ingurgitadas de cada população foram submetidas ao AIT conforme descrito por Drummond et al. (1973). Para cada população, os carrapatos foram divididos em oito grupos experimentais ( $n = 20$ ) com pesos homogêneos: Grupo Controle (GC) – água destilada; G1 – Cipermetrina (0,15 mg/mL) (Barrage ®); G2 – Timol (1,3 mg/mL); G3 – Cipermetrina (0,15 mg/mL) + Timol; G4 – Cipermetrina (0,075 mg/mL); G5 – Cipermetrina (0,075 mg/mL) + timol; G6 – Cipermetrina (0,0375 mg/mL); G7 – Cipermetrina (0,0375 mg/mL) + Timol. A concentração fixa de timol utilizada em cada combinação foi de 1,3 mg/mL (Tavares et al., 2022). Cada grupo de fêmeas ingurgitadas foi imerso em sua respectiva solução por 5 minutos. Em seguida, foram secos em papel toalha, colocados em placas de Petri e mantidos em B.O.D (Demanda Biológica de Oxigênio) sob condições controladas (Temperatura: 27°C, Umidade Relativa: 80%) por 7 dias (Oliveira, 2008).

## **2.3 Análise Morfológica do ovário de fêmeas de *Rhipicephalus microplus***

As fêmeas ingurgitadas foram anestesiadas por choque térmico e posteriormente dissecadas em estereomicroscópio em placas de Petri contendo solução salina tamponada com fosfato de sódio (PBS) (NaCl: 7,5 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 2,38 g/L e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2,75 g/L). Os ovários

foram removidos e colocados em microtubos (1,5 mL) previamente preenchidos com solução fixadora.

O material foi fixado em paraformaldeído por sete dias a 4°C, em seguida as amostras foram desidratadas em série de etanol (70, 80, 90 e 95%) em intervalos de 1 hora cada, embebidas em Resina Leica por 3 a 7 dias a 4° C e transferidos para moldes plásticos de polietileno (6 x 8 mm) previamente preenchidos com Leica polimerizada. Após a polimerização da resina, os blocos foram seccionados com 3 µm de espessura em micrótomo (Leica RM 2265, Leica ®) no Laboratório de Histologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilheus/BA, Brasil com a colaboração da Profa. Dra. Aparecida do Carmo Zerbo Tremacoldi. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, seguindo os procedimentos histológicos, examinados e documentados em microscópio de campo claro com câmera acoplada (Olympus BX51/ Olympus SC30).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Grupo Controle (Água Destilada)**

Os ovários do grupo controle de ambas as populações não apresentaram alterações morfológicas e conseqüentemente não diferiram entre si. Os achados histomorfológicos desses grupos coincidem com os descritos na literatura para os ovários de *R. microplus* (Fig. 1A-B; 3A-B).

Os ovócitos I eram as menores células da linhagem germinativa. Apresentavam formato variando de arredondado a elíptico e apresentavam citoplasma homogêneo basofílico, sem granulações. Núcleo e citoplasma corados igualmente em roxo e o nucléolo raramente foi visto. Os ovócitos II eram maiores que os ovócitos I, apresentando citoplasma com granulações finas e levemente eosinofílico. O núcleo era evidente. Os ovócitos III foram maiores que os estágios anteriores. Nesta fase, a deposição do córion começa como uma camada fina e fracamente basofílica. Grânulos de gema maiores e não uniformes foram observados; os menores localizados na parte central da célula. Núcleo e nucléolo apresentam padrão de coloração semelhante aos ovócitos II. No entanto, nesta fase o nucléolo estava mais evidente (I-V). Os ovócitos IV exibiram citoplasma fortemente eosinofílico e córion iniciando a deposição. Os grânulos de vitelo eram maiores. No entanto, foi possível observar alguns grânulos de gema menores no citoplasma. Os ovócitos V são as maiores células da linhagem

germinativa e apresentaram grânulos de vitelo maiores de tamanho homogêneo e fortemente eosinofílicos. O córion foi completamente depositado nesta fase. Núcleo e nucléolo não foram observados (Fig.1A-B;3A-B).

### **3.2 Grupo Cipermetrina (0,15 mg/mL)**

As fêmeas ingurgitadas da população suscetível apresentaram alterações nos ovócitos I, III, IV e V (Fig. 1C-E). Os ovócitos I apresentaram alterações no formato celular, com constrição mediana. Os ovócitos III apresentavam vacúolos na região periférica, o núcleo era muito evidente e a forma celular alterada, as células epiteliais do pedicelo apresentavam características de hiperplasia (Fig. 1C-D). Os ovócitos IV mostraram pequenos vacúolos e aumento da espessura do córion (Fig. 1D). Os ovócitos V apresentaram deformação no córion (Fig. 1D), pequenos vacúolos e fragmentação nos grânulos de gema (Fig. 1E).

Nas fêmeas ingurgitadas da população resistente, foram observadas alterações nos ovócitos I, II, III, IV e V. O ovócito I apresentou alteração na forma. Os ovócitos II apresentaram grandes vacúolos na região periférica, além das alterações no formato celular e aumento da fusão dos grânulos vitelinos (Fig. 3C). Os ovócitos III apresentaram presença de vacúolos na região periférica, alteração na membrana, mas com poucas alterações em geral (Fig. 3C-D). Os ovócitos IV apresentaram pequenas alterações como alterações na forma, apresentando uma característica oval e foi possível perceber a fusão dos grânulos de gema (Fig. 3C). Os ovócitos V apresentaram pequenos vacúolos entre os grânulos de gema e o córion alterado. Essas alterações foram perceptíveis, pois a forma do córion era irregular (Fig. 3E).

### **3.3 Grupo Cipermetrina (0,075 mg/mL)**

A morfologia ovariana de carrapatos suscetíveis expostos à cipermetrina na concentração de 0,075 mg/mL (metade da concentração inicial) apresentou alterações nos ovócitos I, II, III, IV e V. Os ovócitos I apresentaram alterações em sua forma, com vesícula germinativa evidente, nucléolo corado com hematoxilina e pequenos vacúolos na região periférica (Fig. 1F). Os ovócitos II apresentaram grandes vacúolos na região periférica e alteração na forma celular. Além disso, foi possível notar um aumento na fusão dos grânulos de gema (Fig. 1F-

G). Os ovócitos III apresentaram vacúolos na região periférica, com pequenas deformações na vesícula germinativa e nucléolo evidente corado com hematoxilina. Também foi possível observar alterações na forma das células e aumento na espessura da membrana (Fig. 1F-G). Os ovócitos IV apresentaram pequenos vacúolos na região periférica, o nucléolo estava evidente e corado com hematoxilina e foi possível perceber uma pequena alteração na forma celular. Os ovócitos V apresentaram pequenos vacúolos na região periférica e fragmentação dos grânulos de gema (Fig. 1H).

Nas fêmeas ingurgitadas de carrapatos resistentes, foram observadas alterações nos ovócitos II, III, IV e V. O ovócito II apresentou pequenos vacúolos entre os grânulos de vitelo com vesícula germinativa e nucléolo evidente corado com hematoxilina (Fig. 3F). Os ovócitos III mostraram a presença de vacúolos na região periférica e entre os grânulos de vitelo, notando-se pequena alteração no formato do ovócito (Fig. 3F). Os ovócitos IV apresentaram grandes vacúolos na região periférica, e também foi possível perceber uma mudança na forma do córion. Além da presença desses vacúolos, era perceptível a fusão dos grânulos de gema no citoplasma do ovócito (Fig. 3F-H). O ovócito V apresentou poucas modificações, grânulos de vitelo rompidos e aumento na espessura do córion.

### **3.4 Grupo Cipermetrina (0,0375 mg/mL)**

A morfologia ovariana de carrapatos suscetíveis submetidas a este tratamento apresentaram alterações nos ovócitos I, III, IV e V. Os ovócitos I apresentaram pequenos vacúolos próximos ao citoplasma e formato ovalado. Os ovócitos III apresentaram pequenos vacúolos na região periférica, com vesícula germinativa e nucléolo evidentes quando corados com hematoxilina (Fig. 1I). Foi possível observar alteração na forma do ovócito (Fig. 1J). Os ovócitos IV apresentaram vacúolos nas regiões central e periférica e deformação no córion (Fig. 1I). Os ovócitos V apresentaram pequenos vacúolos, nucléolo evidente corado por hematoxilina, forma irregular do córion e delaminação do córion (Fig. 1K).

Nas fêmeas ingurgitadas de carrapatos resistentes expostos à cipermetrina, foram observadas alterações nos ovócitos II, IV e V. Os ovócitos II apresentaram grandes vacúolos na região periférica e alterações na forma do ovócito (Fig. 3J-K). Foi possível observar a presença de vacúolos menores entre os grânulos de gema (Fig. 3K). O ovócito IV apresentou poucas alterações, com fusão dos grânulos vitelinos. Os ovócitos V apresentavam pequenos vacúolos entre os grânulos de vitelo e o córion (Fig. 3J), embora o mesmo ovócito

apresentasse ruptura do córion, possivelmente devido à entrada de cipermetrina no citoplasma (Fig. 3I).

### **3.5 Grupo Timol (1,3 mg/mL)**

A morfologia ovariana de carrapatos suscetíveis tratadas com timol (1.3 mg/mL) apresentou pequenas alterações nos ovócitos I, II, III, IV e V. O ovócito I apresentou alteração na forma, com deformações da membrana (Fig. 2B). Os ovócitos II apresentaram grande presença de vacúolos principalmente na periferia da célula (Fig. 2B). Os ovócitos III apresentaram vesícula germinativa evidente, presença de vacúolos na região periférica (Fig. 2A). Os ovócitos IV apresentaram pequenos vacúolos e aumento da espessura do córion (Fig. 2A). Os ovócitos V apresentaram pequenos vacúolos, deformação e aumento da espessura do córion (Fig. 2A).

Nas fêmeas ingurgitadas de carrapatos resistentes tratadas com timol, foram observadas alterações nos ovócitos I, II, III, IV e V. O ovócito I apresentava formato irregular com pequenos vacúolos, vesícula germinativa e nucléolo evidente (Fig. 4B). O ovócito II apresentou pequenos vacúolos (Fig. 4A). O ovócito III apresentou vacúolos em todas as regiões, com formato irregular (Fig. 4B). Os ovócitos IV apresentavam vacúolos na região periférica, sendo possível perceber a fusão dos grânulos de gema (Fig. 4A-B). Também foi possível perceber o aumento da espessura do córion (Fig.4A). Os ovócitos V apresentaram pequenos vacúolos entre os grânulos de gema, sendo possível perceber uma mudança na forma do ovócito e do córion (Fig. 4A-B). O epitélio ovariano mostrou característica anormal com pequenos vacúolos (Fig. 4A).

### **3.6 Grupo Combinação Cipermetrina (0,15 mg/mL) e Timol**

A morfologia ovariana de carrapatos suscetíveis expostos à combinação de cipermetrina (0,15 mg/mL) e timol apresentou maiores alterações nos ovócitos I, II, III, IV e V quando comparados aos grupos tratados apenas com os compostos isolados. Os ovócitos I apresentaram pequenos vacúolos no citoplasma central e com região vacuolada em forma de halo na região periférica (Fig. 2D). Os ovócitos II apresentaram vacúolos na região periférica e ausência de vesícula germinativa (Fig. 2D). Os ovócitos III apresentaram grandes vacúolos na região periférica, grânulos de vitelo menores e menos corados com eosina, além da deformação celular (Fig. 2C). Os ovócitos IV apresentaram grandes regiões vacuoladas na

região periférica com pequenas alterações em sua forma (Fig. 2C). Além disso, foi possível perceber uma fusão grânulos de gema e uma deformação do córion (Fig. 2C). Os ovócitos V apresentaram vacúolos em diferentes regiões, fragmentação dos grânulos de gema e alteração na forma do córion (Fig. 2C).

Nas fêmeas ingurgitadas de carrapatos resistentes tratadas com a combinação maiores alterações foram observadas nos ovócitos I, II, III, IV e V. O ovócito I apresentou formato oval com vesícula germinativa evidente. Os ovócitos II apresentaram grandes vacúolos na região periférica e fusão dos grânulos vitelinos. Os ovócitos III apresentavam grandes vacúolos distribuídos por toda a célula e poucos grânulos de vitelo (Fig. 4C). Os ovócitos IV apresentavam pequenos vacúolos entre os grânulos de gema. Além disso, foi possível notar uma mudança no formato da vesícula germinativa (Fig. 4C). Os ovócitos V apresentaram grandes vacúolos entre os grânulos de gema. Também foi possível observar fragmentos dos grânulos de gema e alteração no córion (Fig. 4D) devido ao espessamento e formato irregular desta estrutura (Fig.4C-D).

### **3.7 Grupo Combinação Cipermetrina (0,075 mg/mL) e Timol**

A morfologia ovariana de carrapatos suscetíveis expostos à combinação de cipermetrina (0,075 mg/mL) e timol apresentaram alterações mais intensas nos ovócitos II, III, IV e V do que aquelas observadas em fêmeas ingurgitadas tratadas apenas com os compostos isolados. O ovócito II apresentou pequenos vacúolos e foi possível perceber a fusão dos grânulos de gema. Os ovócitos III mostraram grandes vacúolos na região periférica e fusão dos grânulos vitelinos (Fig. 2F). Os ovócitos IV mostraram pequenos vacúolos, grandes alterações na forma das células e do córion. Também foi possível notar uma mudança na forma da vesícula germinativa (Fig. 2E). Os ovócitos V apresentaram grandes vacúolos, grande mudança na forma celular, fusão dos grânulos vitelinos e alteração no córion (Fig. 2E-F).

Nas fêmeas ingurgitadas de carrapatos resistentes tratadas com a combinação de cipermetrina e timol, as maiores alterações foram observadas nos ovócitos III, IV e V. Os ovócitos III apresentaram grandes vacúolos na região periférica e fusão dos grânulos vitelinos. Além disso, a membrana era irregular (Fig. 4E). Os ovócitos IV apresentavam grandes vacúolos na região periférica, fusão dos grânulos vitelinos, forma irregular e córion alterado (Fig. 4E). Os ovócitos V apresentaram vacúolos entre os grânulos de gema e alteração no epitélio ovariano (Fig. 4E-F).

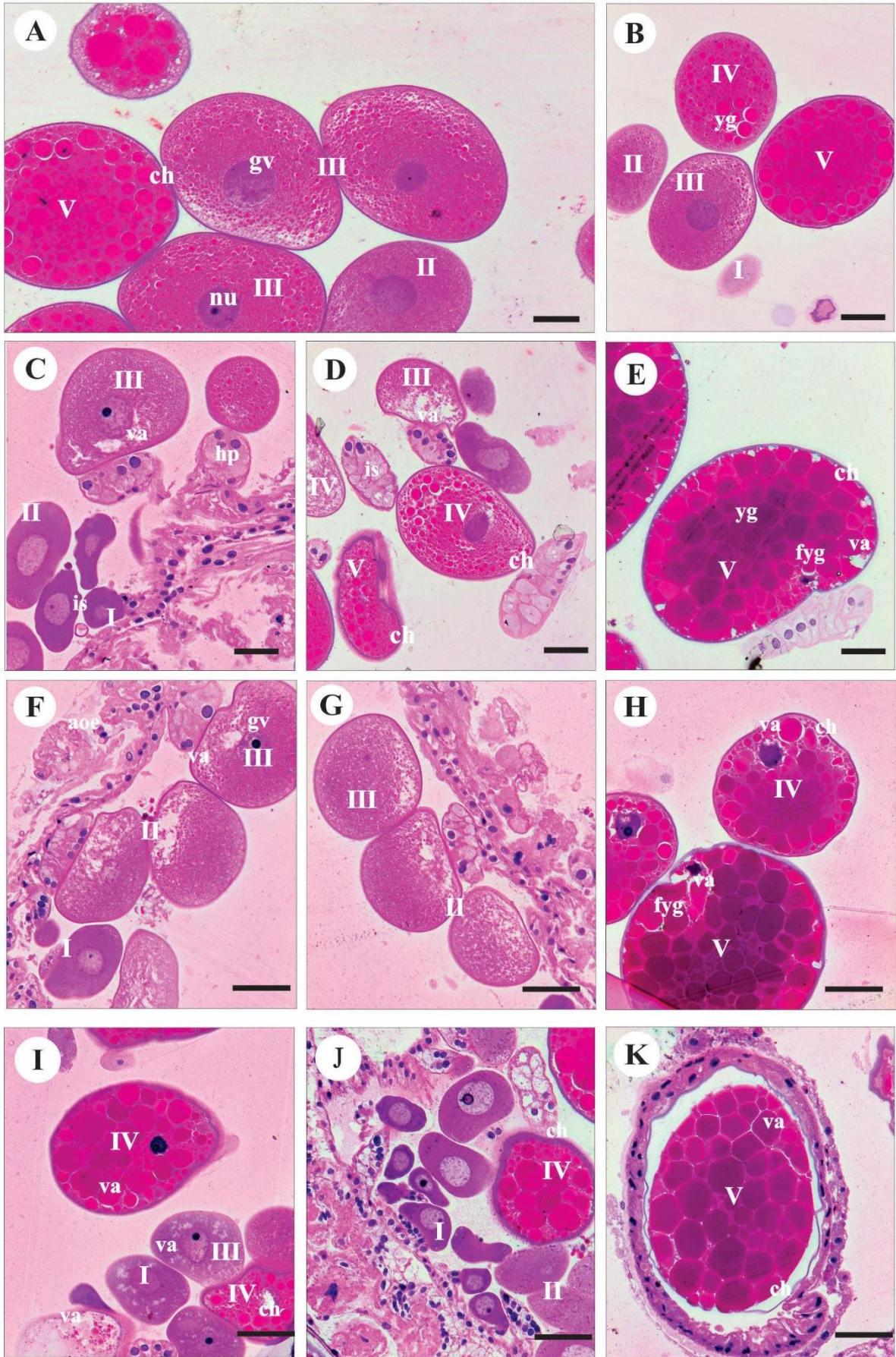
### **3.8 Grupo Combinação Cipermetrina (0,0375 mg/mL) e Timol**

A morfologia ovariana de carrapatos suscetíveis expostos à combinação de cipermetrina (0,0375 mg/mL) e timol, apresentaram alterações mais intensas nos ovócitos II, III, IV e V do que os grupos tratados apenas com os compostos isolados. Os ovócitos II apresentaram grandes vacúolos na região periférica, fusão dos grânulos vitelinos e alteração na forma do ovócito (Fig. 2I). Os ovócitos III apresentaram grandes vacúolos na região periférica, com vesícula germinativa e nucléolo evidentes quando corados com hematoxilina (Fig. 2G-I). Os ovócitos IV apresentaram poucas modificações, com a presença de pequenos vacúolos (Fig. 2H). Os ovócitos V apresentaram vacúolos entre os grânulos de gema e alterações no córion, como forma irregular e espessamento (Fig. 2G-I).

Nas fêmeas ingurgitadas de carrapatos resistentes expostos à mesma combinação, as maiores alterações foram observadas nos ovócitos III, IV e V quando comparados ao grupo cipermetrina e ao grupo timol. Os ovócitos III apresentaram grandes vacúolos nas regiões periféricas e central, bem como alterações na forma celular. A vesícula germinativa e o nucléolo eram evidentes e corados por hematoxilina (Fig. 4H). Nesta célula ainda foi possível perceber a ruptura e o extravasamento do conteúdo citoplasmático (Fig. 4H). Os ovócitos IV apresentavam grandes vacúolos na região periférica e pequenos vacúolos entre os grânulos de vitelo, com vesícula germinativa e nucléolo evidente corados por hematoxilina (Fig. 4G). Os ovócitos V apresentaram pequenos vacúolos entre os grânulos de vitelo e na periferia, grânulos de vitelo menores, formato celular irregular e alteração no córion com aumento da espessura (Fig. 4I).

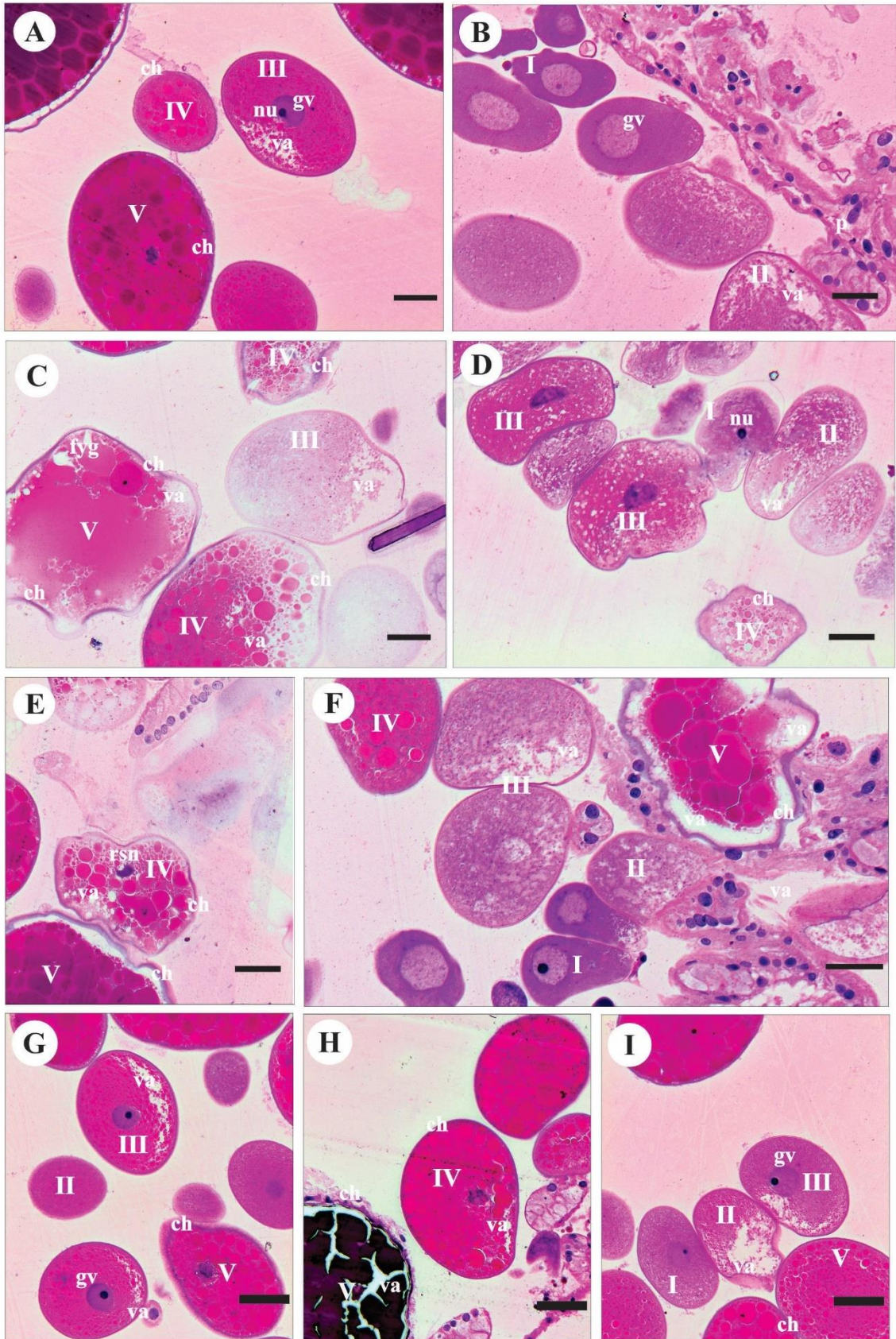


1



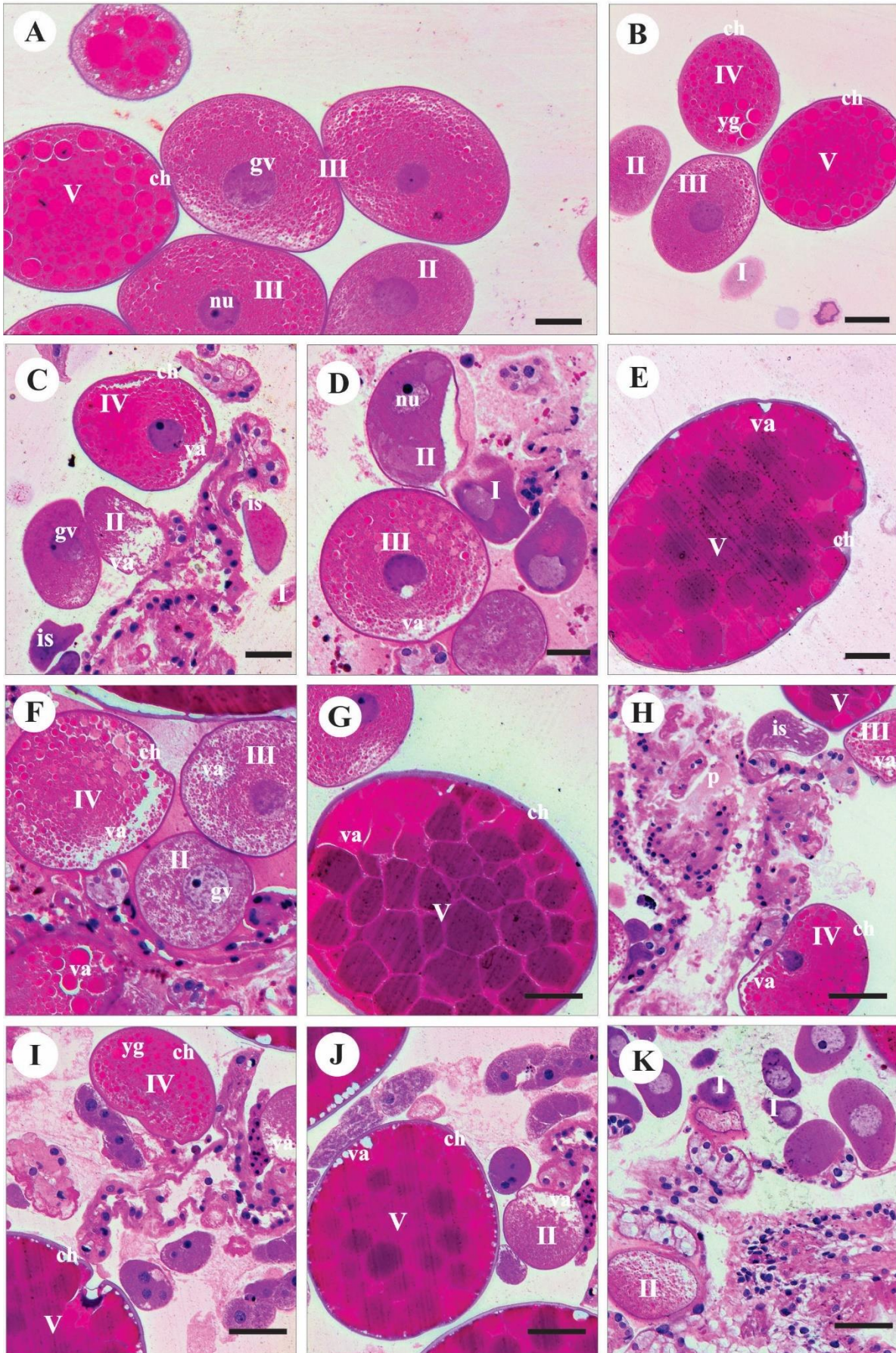


**Figura 1.** Cortes histológicos de ovócitos de *Rhipicephalus microplus* população suscetível (Porto Alegre) corados com hematoxilina e eosina (HE). Ovócitos do grupo controle (Água Destilada) (A-B). Ovócitos tratados com cipermetrina 0,15 mg/mL (C-E). Ovócitos tratados com cipermetrina 0,075 mg/mL (F-H). Ovócitos tratados com cipermetrina 0,0375 mg/mL (I-K). I- ovócito I; II – ovócito II; III – ovócito III; IV – ovócito IV; V – ovócito V; gv – vesícula germinativa; va – vacúolos; hp – hiperplasia; ch – córion; yg – grânulos de vitelo; fyg – fragmentos de grânulos de vitelo; nu – nucléolo; aoe – epitélio anormal ovário. Barras: 10 µm.



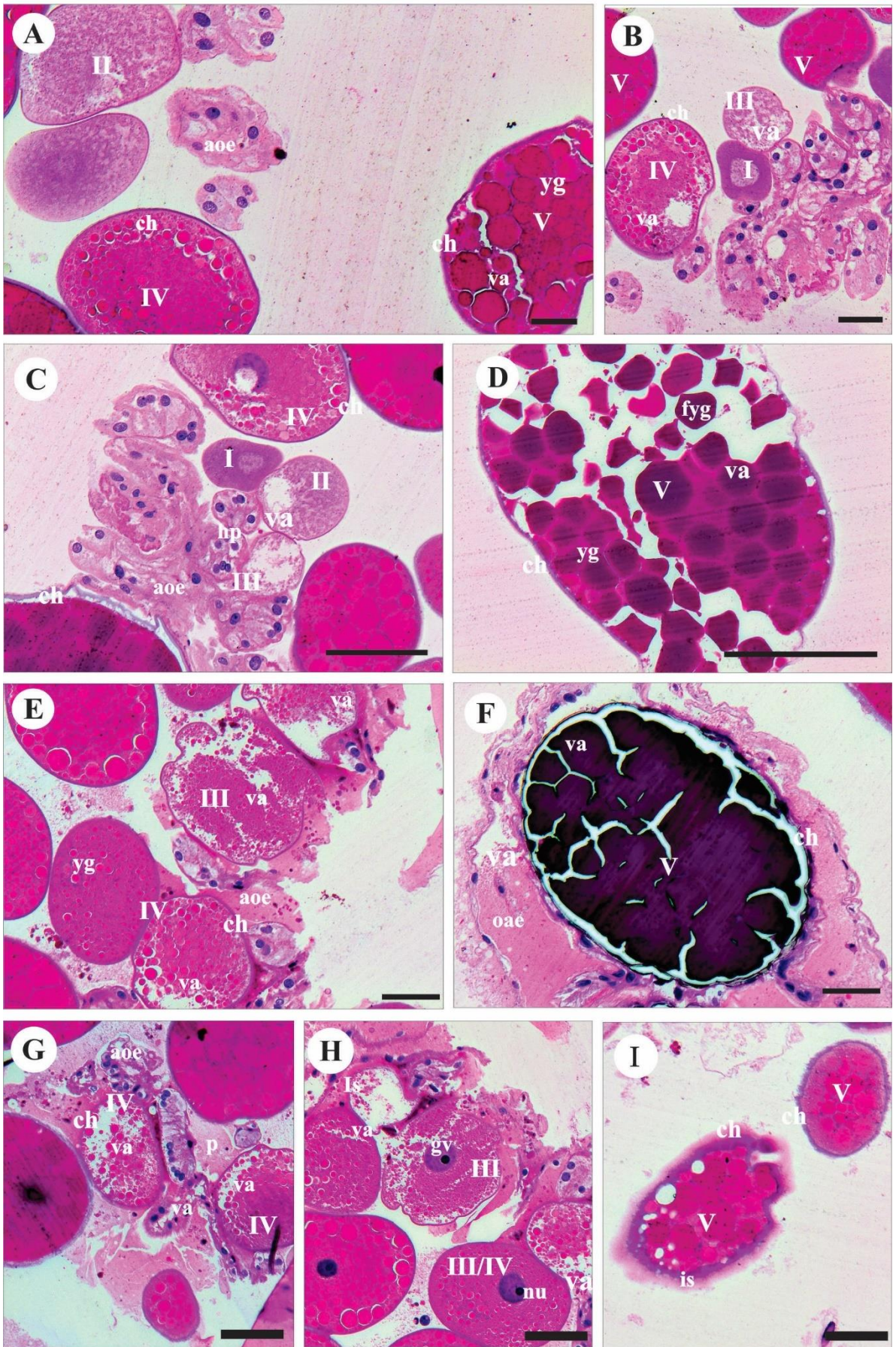
**Figura 2.** Cortes histológicos de ovócitos de *Rhipicephalus microplus* população suscetível (Porto Alegre) corados com hematoxilina e eosina (HE). Ovócitos do grupo Timol (1,3 mg/mL) (A-B). Ovócitos tratados com combinação cipermetrina (0,15 mg/mL) e timol (C-D). Ovócitos tratados com combinação cipermetrina (0,075 mg/mL) e timol (E-F). Ovócitos tratados com combinação cipermetrina (0,0375 mg/mL) e timol (G-I). I – ovócito I; II – ovócito II; III – ovócito III; IV – ovócito IV; V – ovócito V; gv – vesícula germinativa; va – vacúolos; ch – córion; nu – nucléolo; p – pedicelo; fyg – fragmentos de grânulos de vitelo. Barras: 10 µm





**Figura 3.** Cortes histológicos de ovócitos de *Rhipicephalus microplus* população resistente (Jaguar) corados com hematoxilina e eosina (HE). Ovócitos do grupo controle (Água Destilada) (A-B). Ovócitos tratados com cipermetrina 0,15 mg/mL (C-E). Ovócitos tratados com cipermetrina 0,075 mg/mL (F-H). Ovócitos tratados com cipermetrina 0,0375 mg/mL (I-K). I= ovócito I; II – ovócito II; III – ovócito III; IV – ovócito IV; V – ovócito V; gv – vesícula germinativa; va – vacúolos; ch – córion; nu – nucléolo; p – pedicelo, yg – grânulos de vitelo. Barras: 10 µm





**Figura 4.** Cortes histológicos de ovócitos de *Rhipicephalus microplus* população resistente (Jaguar) corados com hematoxilina e eosina (HE). Ovócitos do grupo Timol (1,3 mg/mL) (A-B). Ovócitos tratados com combinação cipermetrina (0,15 mg/mL) e timol (C-D). Ovócitos tratados com combinação cipermetrina (0,075 mg/mL) e timol (E-F). Ovócitos tratados com combinação cipermetrina (0,0375 mg/mL) e timol (G-I). I – ovócito I; II – ovócito II; III – ovócito III; IV – ovócito IV; V – ovócito V; gv – vesícula germinativa; va – vacúolos; ch – córion; nu – nucléolo; yg – grânulos de vitelo; p – pedicelo; aoe – epitélio ovário anormal; hp – hiperplasia; fyg – grânulos de vitelo fragmentado. Barras: 10 µm

#### 4. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar as alterações morfofisiológicas na vitelogênese de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e foi possível observar que todas as moléculas analisadas alteraram a morfologia dos ovócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Quando estruturas celulares são expostas a xenobióticos (produtos sintéticos ou naturais) em altas concentrações, o processo de vacuolização citoplasmática torna-se mais intenso. Esses vacúolos são caracterizados como autofágicos, sendo responsáveis pela degradação de organelas e estruturas danificadas pela ação de substâncias químicas naturais como óleos essenciais e terpenos (Arnosti et al., 2011; De Queiroz et al., 2020; Reis et al., 2021).

Os achados deste estudo foram semelhantes aos observados para fipronil (Oliveira et al., 2009), permetrina (Roma et al., 2010), carvacrol (De Souza et al., 2019), timol (Matos et al., 2014) e acetilcarvacrol (Konig et al., 2020) em fêmeas semi-ingurgitadas e ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. A presença de vacúolos e desorganização celular nos ovócitos indicam toxicidade celular causada por óleos essenciais e monoterpenos, onde a presença de vacuolização geralmente está associada a alterações na fisiologia e representa um mecanismo de desintoxicação celular (Penha et al., 2021).

É importante destacar que a combinação de cipermetrina e timol em todas as concentrações avaliadas foi capaz de proporcionar as maiores alterações nessas, mostrando que a presença de timol, mesmo em baixa concentração, potencializou os efeitos deletérios da cipermetrina nas células germinativa do carrapato. Esses efeitos foram observados principalmente no ovócito II, que apresentou grandes vacúolos na região periférica e diminuição dos grânulos de gema.

A combinação do timol com outras moléculas tem se caracterizado como uma possível nova tecnologia para controle do carrapato. Timol quando combinado com eugenol e carvacrol; bem como quando combinado com deltametrina e cipermetrina, mostrou efeitos importantes em diferentes estágios e espécies de carrapatos como *Rhipicephalus sanguineus*, *R. microplus*, *R. annulatus*, *Amblyomma sculptum* e *Dermacentor nitens* (Araújo et al., 2016; Novato et al., 2015, 2019; Coelho et al., 2020; Arafa et al., 2021; Vale et al., 2021; Tavares et al., 2022). No entanto, este é o primeiro estudo que descreve as alterações histopatológicas dos órgãos reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com a combinação de cipermetrina e timol.



Um dos mecanismos de ação descritos para o timol é sua capacidade de reduzir a impermeabilidade das membranas celulares (Ahmad et al., 2011), por isso é considerado um importante promotor de penetração de drogas lipofílicas na pele humana (Williams e Barry, 1991). Outro monoterpreno, 1,8 cineol, também chamado de eucaliptol, foi capaz de diminuir a tensão superficial da camada lipídica da cutícula das larvas de *Trichoplusia ni*, potencializando a penetração de outra molécula (cânfora) (Tak e Isman., 2015). As alterações morfológicas observadas nos ovócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com a combinação de timol e cipermetrina (0,15 mg/mL) podem estar mais diretamente relacionadas a esse mecanismo de aumento da permeabilidade da membrana celular, do que à ação direta dos efeitos do timol nas estruturas celulares, enquanto as alterações morfológicas observadas nas fêmeas ingurgitadas do grupo timol foram leves e restritas apenas aos ovócitos I e II. Assim, o timol pode ter potencializado a penetração da cipermetrina, intensificando os efeitos deletérios deste piretróide na vitelogênese do carrapato. Tavares et al. (2022) observaram um aumento na concentração tecidual de cipermetrina em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com a mesma combinação do presente estudo, os autores atribuíram esse aumento à presença do monoterpreno timol.

As poucas alterações como presença de vacúolos em todo o citoplasma nos ovócitos II, III e IV e aumento da espessura do córion do ovócito V de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas apenas com timol são semelhantes aos achados de Penha et al. (2021) também com *R. microplus* tratado com carvacrol e timol nas concentrações de 5,49 e 4,46 mg/mL, respectivamente. Por outro lado, todas as combinações de cipermetrina e timol proporcionaram alterações mais intensas nos ovócitos I e II das fêmeas ingurgitadas. A ausência de córion (membrana protetora do ovo e que ainda não se deposita em ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento) e a presença de timol, podem estar propiciando a entrada de maior quantidade de cipermetrina pela membrana plasmática desta célula germinativa, alterando a forma celular e o aparecimento de vacúolos (Oliveira et al., 2009; 2016).

Os efeitos deletérios observados nos ovócitos III de fêmeas ingurgitadas tratadas com todas as diferentes combinações de cipermetrina e timol sendo elas: presença de grandes vacúolos na região periférica, diminuição dos grânulos de vitelo, alteração da forma do ovócito e fusão dos grânulos de vitelo. Nesta fase, a produção de elementos endógenos e a incorporação exógena de elementos vitelogênicos são necessários para garantir o desenvolvimento do ovócito (Saito et al., 2005). Em nosso estudo, a perda de grânulos de vitelo do ovócito III

pode ser atribuída à redução na síntese e incorporação de elementos vitelinos, impedindo total ou parcialmente que as células germinativas atinjam novos estágios de desenvolvimento. Resultados semelhantes foram observados em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com óleo essencial de *Lippia sidoides* e seus compostos majoritários carvacrol e timol (Penha et al., 2021).

Os ovócitos IV apresentaram alterações semelhantes às encontradas nos ovócitos I, II e III tratados com a combinação cipermetrina (0,15 mg/mL) + timol em carrapatos resistentes, porém, uma característica marcante encontrada foi a alteração na forma da vesícula germinativa. A vacuolização da vesícula germinativa também foi observada em fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* e *R. microplus* expostas ao óleo essencial de *Satureja montana* (Segurelha-das-montanhas) e acetilcarvacrol. Segundo esses autores, essa alteração pode levar à morte celular, pois é um indicativo de degradação do material genético (Konig et al., 2019, 2020; Reis et al., 2021).

Ovócitos em estágios avançados de desenvolvimento (IV e V) possuem uma camada coriônica que tem função protetora contra o estresse mecânico levando a ovos mais densos prevenindo a predação, ressecamento e permitindo as trocas gasosas (Oliveira et al., 2005). No presente estudo, as alterações no córion nos ovócitos IV e V foram mais frequentemente observadas nos ovócitos tratados com a combinação de cipermetrina (0,15 mg/mL) e timol; cipermetrina (0,075 mg/mL) e timol. Possivelmente, isso pode estar relacionado às propriedades lipofílicas desses compostos (logP da cipermetrina = 6,6; logP do timol = 3,3) que fazem cipermetrina atravessar o córion e a membrana plasmática e ocupar o interior do citoplasma. Como mencionado anteriormente, o timol pode aumentar a penetrabilidade da cipermetrina (Tavares et al., 2022) e, assim, aumentar os danos celulares, como alteração no córion, fusão dos grânulos de gema e fragmentação de grânulos de gema.

Ovócitos V de fêmeas ingurgitadas tratadas com a combinação de cipermetrina (0,15 mg/mL) e timol; cipermetrina (0,075 mg/mL) e timol apresentaram alterações como vacúolos em todo o citoplasma, irregularidade no córion e fragmentos de grânulos vitelinos extensos. Em concentrações mais baixas de cipermetrina (0,0375 mg/mL) na combinação, as alterações tornaram-se menos intensas, com alterações apenas na forma do ovócito e aumento da espessura do córion (membrana que reveste o ovócito), achados semelhantes aos encontrados em estudos com permetrina (Roma et al., 2011), ésteres de ácido ricinoleico do óleo de

mamona de *Ricinus communis* (Arnosti et al., 2011) e acetilcarvacrol em fêmeas semi-ingurgitadas e ingurgitadas de *R. sanguineus* e *R. microplus* (Konig et al., 2019).

Nossos resultados sugerem que os principais vacúolos encontrados estão localizados na periferia da célula, o que nos permite inferir que a principal via de entrada da combinação de cipermetrina e timol é a membrana plasmática, ou seja, os compostos seriam capturados através da hemolinfa e cruzariam a parede do ovócito, como observado em fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* expostas ao fipronil (Oliveira et al., 2008) e óleo de andiroba (Vendramini et al., 2012).

## 5. CONCLUSÕES

Em conclusão, os achados deste estudo indicam que a cipermetrina e o timol são capazes de promover alterações nos ovócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, porém, a combinação dessas moléculas gera danos ainda mais intensos às células relacionadas à vitelogenese de carrapatos de ambas as populações (suscetível e resistente) analisadas. Esses resultados apresentam elementos relacionados às alterações morfofisiológicas sofridas pelo carrapato, reforçando o potencial da combinação de cipermetrina e timol como uma nova tecnologia a ser utilizada no controle do carrapato bovino. Além disso, esses resultados reforçam o incentivo a novas pesquisas para avaliar os efeitos da combinação em outros sistemas essenciais para o carrapato bovino.

## **Contribuições do Autor**

**Matheus Nobate Gomes**, Conceituação, Metodologia, Investigação. Análise formal, Redação – rascunho original, Redação – edição e revisão. **Caio Pavão Tavares** – Metodologia, Investigação, Análise formal, Redação – revisão e edição. **Isabella Chaves Sousa** - Metodologia, Investigação, Análise formal, Redação – revisão e edição. **Dauana Mesquita Sousa** – Metodologia, Investigação, Análise formal. **Tassia Lopes Vale** – Metodologia, Investigação e Análise formal. **Patrícia Rosa de Oliveira** – Conceituação, Metodologia, Investigação, Análise Formal, Redação – revisão e edição. **Lívio Martins Costa Junior** - Conceituação, Metodologia, Análise formal, Redação – revisão e edição, Visualização, Administração de projetos, Captação de recursos.

## **Agradecimentos**

Esta pesquisa foi apoiada por bolsas da FAPEMA (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Maranhão, Brasil). Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001. M.N. Gomes recebeu bolsas de graduação do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). C.P. Tavares, I.C. Sousa e D.M. Sousa recebeu bolsa de pós graduação da CAPES. Os autores também gostariam de agradecer ao CNPQ pela bolsa concedida a P. R. Oliveira e L.M. Costa-Júnior.

## 6. REFERÊNCIAS

ABBAS, Rao Z. et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary parasitology**, v. 203, n. 1-2, p. 6-20, 2014.

AHMAD, A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 30, n. 1, p. 41-50, 2011.

ARAFI, Waleed M. et al. Control of *Rhipicephalus annulatus* resistant to deltamethrin by spraying infested cattle with synergistic eucalyptus essential oil-thymol-deltamethrin combination. **Veterinary Parasitology**, v. 290, p. 109346, 2021.

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**, v. 30, n. 4, p. 377-382, 2016.

ARNOSTI, André et al. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 575-580, 2011.

ARUNKUMAR, S. et al. Effect of chemical penetration enhancer on transdermal iontophoretic delivery of diclofenac sodium under constant voltage. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 30, p. 171-179, 2015.

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

CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel et al. Deltamethrin as inductor agent of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus* sl (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 72, n. 2, p. 161-169, 2017.

CHANG, Jui-Sheng et al. The effect of mixed-solvent and terpenes on percutaneous absorption of meloxicam gel. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 33, n. 9, p. 984-989, 2007.

COELHO, Letícia et al. Combination of thymol and eugenol for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Evaluation of synergism on immature stages and formulation development. **Veterinary Parasitology**, v. 277, p. 108989, 2020.

COSTA, Jhone Robson Silva et al. Repellent Activity Of Carvacrol And Timol Encapsulated With Yeast Cell Wall Against Amblyomma Sculptum And Rhipicephalus Sanguineus (Sensu Lato) Nymphs. 2022.

COSTA-JÚNIOR, Livio M. et al. Acaricidal efficacies of Lippia gracilis essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Veterinary parasitology**, v. 228, p. 60-64, 2016.

DA SILVA LIMA, Aldilene et al. Acaricide activity of extract and an isolated compound of Lithraea brasiliensis on Rhipicephalus microplus and selectivity actions against a non-target organism. **Veterinary Parasitology**, v. 300, p. 109597, 2021.

DA SILVA MATOS, Renata et al. Histopathological study of ovaries of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology research**, v. 113, n. 12, p. 4555-4565, 2014.

DE OLIVEIRA, Patrícia Rosa et al. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1255-1264, 2009.

DE OLIVEIRA, Patrícia Rosa et al. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in the ovaries and midgut of semi-engorged females Rhipicephalus sanguineus Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks. **Parasitology research**, v. 115, n. 2, p. 829-849, 2016.

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

DE OLIVEIRA, Patrícia Rosa; BECHARA, Gervásio Henrique; CAMARGO-MATHIAS, Maria Izabel. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2459-2465, 2008.

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

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

DELMONTE, Camila et al. Evaluation of the acaricidal activity of thymol incorporated in two formulations for topical use against immature stages of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 116, n. 11, p. 2957-2964, 2017.

DOS SANTOS CARDOSO, Alana et al. Terpenes on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. **Veterinary Parasitology**, v. 280, p. 109090, 2020.

DRUMMOND, RO et al et al. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of economic entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.

FURLONG, J. et al. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar. **A hora veterinária**, v. 27, n. 159, p. 26-32, 2007.

GRISI, Laerte et al. Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.

GHOSH, Srikant et al. Status of tick distribution in Bangladesh, India and Pakistan. **Parasitology research**, v. 101, n. 2, p. 207-216, 2007.

HERMAN, Anna; HERMAN, Andrzej P. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 4, p. 473-485, 2015.

KONIG, I. F. M. et al. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 4, p. 766-774, 2019.

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

LANUSSE, Carlos et al. Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 8, p. 664-682, 2018.

LOPES, Welber Daniel Zanetti et al. The effectiveness of a fixed-dose combination pour-on formulation of 1.25% fipronil and 2.5% fluazuron against economically important ectoparasites and associated pharmacokinetics in cattle. **Parasitology international**, v. 66, n. 5, p. 627-634, 2017.

MATOS, Renata Silva 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, n. 2, p. 669-673, 2014.

MATOS, Renata Silva et al. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females (Acari: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 2, p. 314-320, 2019.

MATOS, Renata Silva et al. Thymol: Effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 11, n. 1, p. 101308, 2020.

MONTEIRO, Caio et al. Thymol and eugenol microemulsion for *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* control: Formulation development, field efficacy, and safety on dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 296, p. 109501, 2021.

NICARETTA, João Eduardo et al. Evaluation of different strategic control protocols for *Rhipicephalus microplus* on cattle according to tick burden. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 4, p. 101737, 2021.

NODARI, Elen Fernanda et al. Action of permethrin on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morpho-physiological evaluation of salivary glands. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 3, n. 4, p. 219-226, 2012.

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

NOVATO, Tatiane Lopes Pinheiro et al. Evaluation of synergism and development of a formulation with thymol, carvacrol and eugenol for *Rhipicephalus microplus* control. **Experimental Parasitology**, v. 207, p. 107774, 2019.

NOVATO, Tatiane Pinheiro Lopes 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**, v. 212, n. 3-4, p. 331-335, 2015.

NWANADE, Chuks F. et al. Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 81, n. 1, p. 1-35, 2020.

PENHA, Tatiane et al. Effects of acaricidal essential oils from *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their main components on vitellogenesis in *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 299, p. 109584, 2021.

PEREIRA, Melissa Carolina et al. Detrimental effect of deltamethrin on the central nervous system (synganglion) of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 71, n. 2, p. 159-169, 2017.

RECK, José et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 128-136, 2014.

REIS, Aline Chaves et al. Cytotoxic effects of *Satureja montana* L. essential oil on oocytes of engorged *Rhipicephalus microplus* female ticks (Acari: Ixodidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 7, p. 1375-1388, 2021.

RODRIGUEZ-VIVAS, Roger I.; JONSSON, Nicholas N.; BHUSHAN, Chandra. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology research**, v. 117, n. 1, p. 3-29, 2018.

ROMA, Gislaine Cristina et al. Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fully engorged females: I. Direct or indirect action of the acaricide in germ cells?. **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, n. 3, p. 287-299, 2011.

ROMA, Gislaine Cristina et al. Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) female ticks. Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 482-491, 2013.

ROMA, Gislaine Cristina et al. Permethrin-induced morphological changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 3, p. 825-830, 2010.

SAITO, Kelly Cristina et al. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)(Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3-4, p. 299-311, 2005.

SECCHIS, Mirna Vieira et al. Effect of the formulation with fipronil and fluazuron on the reproductive biology and ovaries histopathology of *Rhipicephalus microplus* engorged females. **Parasitology Research**, v. 121, n. 3, p. 839-849, 2022.

SENRA, Tatiane Oliveira Souza et al. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 112, n. 10, p. 3471-3476, 2013.

SILVA LIMA, Aldilene et al. Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 117, n. 1, p. 59-65, 2018.

TABARI, Mohaddeseh Abouhosseini 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, p. 86-91, 2017.

TAK, Jun-Hyung; ISMAN, Murray B. Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in *Trichoplusia ni*. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2015.

TAVARES, Caio P. et al. Combination of cypermethrin and thymol for control of *Rhipicephalus microplus*: Efficacy evaluation and description of an action mechanism. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 13, n. 1, p. 101874, 2022.

TAVARES, Caio P. et al. Effects of carvacrol and thymol on the antioxidant and detoxifying enzymes of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 13, n. 3, p. 101929, 2022.

UPADHYAY, Ravi Kant. Acaricidal potential of various plant natural products: A review. **International Journal of Green Pharmacy (IJGP)**, v. 15, n. 4, 2021.

VALE, Letícia et al. Binary combinations of thymol, carvacrol and eugenol for *Amblyomma sculptum* control: Evaluation of in vitro synergism and effectiveness under semi-field conditions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 6, p. 1018-16, 2021.

VENDRAMINI, Maria Cláudia Ramalho et al. Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1885-1894, 2012.

WILLIAMS, Adrian C.; BARRY, Brian W. Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. **Pharmaceutical research**, v. 8, n. 1, p. 17-24, 199.

## 7. APÊNDICE A – RESUMO DAS ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

**Tabela 1.** Resumo das alterações histológicas nos ovários de *Rhipicephalus microplus* população suscetível aos piretróides sintéticos (Porto Alegre) causadas pelos compostos isolados e combinados (cipermetrina e timol)

	Ovócito I	Ovócito II	Ovócito III	Ovócito IV	Ovócito V
Timol 1,3 mg/mL	Alteração no formato com deformação na membrana	Presença de vacúolos na região periférica	Presença de vacúolos na região periférica	Pequenos vacúolos e aumento da espessura no córion.	Pequenos vacúolos, deformação e aumento da espessura do córion. (w=
Cipermetrina 0,15 mg/mL	Alteração no formato da célula	-	Vacúolos na região periférica e alteração no formato da célula	Pequenos vacúolos e aumento da espessura no córion	Deformação no córion, pequenos vacúolos e fragmentação nos grânulos de vitelo

Cipermetrina 0,15 mg/mL + timol	Presença de pequenos vacúolos no citoplasma central e vacuolização em formato de halo na região periférica	Vacúolos na região periférica e ausência de vesícula germinativa	Grandes vacúolos na região periférica, grânulos de vitelo menores e deformação da célula	Grandes vacúolos na região periférica com pequenas alterações no formato da célula	Vacúolos em diferentes regiões, fragmentação dos grânulos de gema e alteração no formato do córion
Cipermetrina 0,075 mg/mL	Alteração no formato do ovócito com vesícula germinativa evidente e pequenos vacúolos na região periférica	Grandes vacúolos na região periférica, alteração no formato da célula e fusão dos grânulos de vitelo	Vacúolos na região periférica, pequenas deformações na vesícula germinativa. Alteração no formato do córion e aumento da espessura	Pequenos vacúolos na região periférica e uma pequena alteração no formato do córion	Pequenos vacúolos na região periférica e fragmentos nos grânulos de vitelo
Cipermetrina 0,075 mg/mL + timol	-	Pequenos vacúolos e fusão dos grânulos de gema	Grandes vacúolos na região periférica e fusão dos grânulos de gema	Pequenos vacúolos, alteração no formato do ovócito e córion. Alteração no formato do nucléolo em formato de anel	Grandes vacúolos, grande alteração no formato da célula e fusão dos grânulos de gema

Cipermetrina 0,0375 mg/mL	Pequenos vacúolos próximos ao citoplasma e apresentava formato ovalada	-	Pequenos vacúolos na região periférica	Pequenos vacúolos na região central e periférica e deformação no córion	Pequenos vacúolos, aumento da espessura do córion e formato irregular do córion
Cipermetrina 0,0375 mg/mL + timol	-	Grandes vacúolos na região periférica, fusão dos grânulos de vitelo e alteração no formato do ovócito	Grandes vacúolos na região periférica	Poucas modificações com a presença de pequenos vacúolos	Grandes vacúolos entre os grânulos de vitelo e alterações no córion (formato irregular e espessamento)

**Tabela 2.** Resumo das alterações histológicas nos ovários de *Rhipicephalus microplus* população resistente aos piretróides sintéticos (Jaguar) causadas pelos compostos isolados e combinados (cipermetrina e timol)

	<b>Ovócito I</b>	<b>Ovócito II</b>	<b>Ovócito III</b>	<b>Ovócito IV</b>	<b>Ovócito V</b>
Timol 1,3 mg/mL	Formato irregular e pequenos vacúolos	Presença de pequenos vacúolos	Presença de vacúolos em todo ovócito e formato irregular	Presença de vacúolos, fusão dos grânulos de vitelo e aumento da espessura do córion	Alteração no formato e córion irregular
Cipermetrina 0,15 mg/mL	Alteração no formato	Alteração no formato, presença de grandes vacúolos e fusão dos grânulos de vitelo	Presença de pequenos vacúolos e alteração na membrana	Fusão dos grânulos de vitelo	Presença de pequenos vacúolos e alteração do córion

Cipermetrina 0,15 mg/mL + timol	-	Presença de grandes vacúolos na região periférica e fusão dos grânulos de vitelo	Presença de grandes vacúolos em todo ovócito e poucos grânulos de vitelo	Presença de pequenos vacúolos entre os grânulos de vitelo e alteração no formato da vesícula germinal	Presença de grandes vacúolos, fragmentos dos grânulos de vitelo e alteração no formato do córion
Cipermetrina 0,075 mg/mL	-	Presença de pequenos vacúolos	Presença de vacúolos entre os grânulos de vitelo e pequena modificação no formato da célula	Presença de grandes vacúolos e alteração no formato do córion	Presença de pequenos vacúolos, espessamento do córion e grânulos de vitelo rompidos
Cipermetrina 0,075 mg/mL + timol	-	-	Presença de grandes vacúolos e fusão dos grânulos de vitelo	Presença de vacúolos na região periférica, fusão dos grânulos de vitelo e formato irregular com córion alterado	Presença de vacúolos e alteração no epitélio ovariano



Cipermetrina 0,0375 mg/mL	-	Presença de grandes vacúolos na região periférica e alteração no formato do ovócito	-	Fusão dos grânulos de vitelo	Pequenos vacúolos entre os grânulos de vitelo e córion e ruptura do córion
Cipermetrina 0,0375 mg/mL + timol	-	-	Presença de grandes vacúolos na região periférica, alteração no formato da célula, ruptura e extravasamento do conteúdo citoplasmático	Presença de grandes vacúolos na região periférica e entre os grânulos de vitelo	Presença de pequenos vacúolos, grânulos de vitelo menores, formato irregular do ovócito e espessamento do córion

## 8. ANEXO – NORMAS DE FORMATAÇÃO DA REVISTA

### Manuscript Preparation Resources

Check out Wiley's collection of free article preparation resources for manuscript writing and preparation guidance. [Learn more](#)



MICROSCOPY  
RESEARCH & TECHNIQUE

1. **Submission**
2. **Aims and Scope**
3. **Manuscript Categories and Requirements**
4. **Preparing the Submission**
5. **Editorial Policies and Ethical Considerations**
6. **Author Licensing**
7. **Publication Process After Acceptance**
8. **Post-Publication**
9. **Journal Contact Details**

#### 1. SUBMISSION

Authors should kindly note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

Once the submission materials have been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online via the [journal online editorial system](#).

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

[Return to Guideline Sections](#)

#### 2. AIMS AND SCOPE

*Microscopy Research and Technique (MRT)* publishes articles on all aspects of advanced microscopy original architecture and methodologies with applications in the biological, clinical, chemical, and materials sciences. Original basic and applied research as well as technical papers dealing with the various subsets of microscopy are encouraged. *MRT* is the right form for those developing new microscopy methods or using the microscope to answer key questions in basic and applied research. *MRT* encourages the proposal of special issues and open access. *MRT* fosters the submission of educational papers. *MRT* is also the right journal for publishing selected papers from scientific conferences. It is expected that manuscripts submitted for consideration will have as main points of focus the microscopy approach and the scientific and technical value. Methods are expected to be discussed in a quantitative way considering the original aspects in microscopy. Authors are expected to employ proper statistics, present previously unpublished data, discuss whether the experiment has answered the proposed question, compare the results with those in salient published literature. The submission should conform to *MRT*'s prescribed journal format and high quality images are expected to be proposed for the cover. Submissions that only support conclusions of discovery from other research fields should be submitted to journals specializing in those fields.

### [Return to Guideline Sections](#)

## 3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

In addition to Research Articles and Review Articles, *Microscopy Research and Technique* is accepting submissions for its rapid publication format, "Letters" and "Primers in Microscopy".

- ♦ *Research Articles*, requires Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion sections. The literature review should be succinct. There are no restrictions on the number of pages or figures.
- ♦ *Review Articles* in which a specific field is reviewed through an exhaustive literature survey. An abstract is required. A Materials and Methods section and a Results section are not required. There are no restrictions on the number of pages or figures. Review articles are usually invited, but submitted review articles will be considered.
- ♦ *Letters* will be placed at the front of each issue and will be reserved for important results and breakthroughs in any area of microscopy that need to be published rapidly. These short papers, no longer than 3 typeset pages, will use the same structure as the longer original research articles. Letters should be sent directly to an associate editor in your field to facilitate its review within a week. Authors submitting letters deemed unsuited for the Letters section may be invited to submit a longer original research article.
- ♦ *Primers in Microscopy* are short review papers containing basics related to a specific topic, for example key components for microscopy architectures, sample preparation for localization methods, entry level concepts about super resolution. Primers are thought for master thesis and PhD students and for orienting new post docs in research groups.
- ♦ *Notables in Microscopy*, commentary article type.

All manuscripts, whether invited or regular submissions, are peer reviewed. Articles intended for Special Issues should be designated as such during the submission process.

### [Return to Guideline Sections](#)

## 4. PREPARING THE SUBMISSION

Free Format submission

*Microscopy Research & Technique* now offers **Free Format submission** for a simplified and streamlined submission process.

Before you submit, you will need:

- ♦ Your manuscript: this should be an editable file including text, figures, and tables, or separate files – whichever you prefer. All required sections should be contained in your manuscript, including

abstract, introduction, methods, results, and conclusions. Figures and tables should have legends. Figures should be uploaded in the highest resolution possible. References may be submitted in any style or format, as long as it is consistent throughout the manuscript. Supporting information should be submitted in separate files. If the manuscript, figures or tables are difficult for you to read, they will also be difficult for the editors and reviewers, and the editorial office will send it back to you for revision. Your manuscript may also be sent back to you for revision if the quality of English language is poor.

- ♦ An ORCID ID, freely available at <https://orcid.org>. (*Why is this important? Your article, if accepted and published, will be attached to your ORCID profile. Institutions and funders are increasingly requiring authors to have ORCID IDs.*)
- ♦ The title page of the manuscript, including:
  - Your co-author details, including affiliation and email address. (*Why is this important? We need to keep all co-authors informed of the outcome of the peer review process.*)
  - Statements relating to our ethics and integrity policies, which may include any of the following (*Why are these important? We need to uphold rigorous ethical standards for the research we consider for publication*):
    - data availability statement
    - funding statement
    - conflict of interest disclosure
    - ethics approval statement
    - patient consent statement
    - permission to reproduce material from other sources
    - clinical trial registration

To submit, login at <https://mc.manuscriptcentral.com/mrt> and create a new submission. Follow the submission steps as required and submit the manuscript.

#### Main Text File

The text file should be presented in the following order:

- i. **A short informative title that contains the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's [best practice SEO tips](#));**
- ii. **A short running title of less than 40 characters;**
- iii. **The full names of the authors;**
- iv. **The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;**
- v. **Abstract and keywords;**
- vi. **Research Highlights and Graphical Abstract;**
- vii. **Main Text;**
- viii. **Acknowledgements;**
- ix. **References;**
- x. **Tables (each table complete with title and footnotes);**
- xi. **Figure Legends;**
- xii. **Appendices (if relevant).**

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

#### Authorship

Please refer to the journal's authorship policy the [Editorial Policies and Ethical Considerations](#) section for details on eligibility for author listing.

#### Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should

also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

## Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the section 'Conflict of Interest' in the [Editorial Policies and Ethical Considerations](#) section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

## Abstract

Please provide an abstract of 250 words or fewer containing the major keywords summarizing the article.

## Keywords

Please provide three to five keywords.

## Research Highlights

Research Highlights are the most important findings and/or conclusions of the article (or review), stated concisely. Research Highlights will be displayed online immediately below the article's title (they will not appear in the printed version of the paper). Main Points should consist of 2 to 3 short sentences and should not exceed 250 characters (including spaces). These are required for all papers published in the journal, and must be submitted at the time of the manuscript submission in ScholarOne.

## Graphical Abstract

The graphical abstract provides readers with a visual representation of the conclusions and an efficient way to appreciate the key finding and main message of the work. This feature is part of the online article format and will appear in the online Table of Contents of each issue of the journal but will not appear in the printed version of the paper. Please upload an illustration describing the context and significance of the findings for the broader journal readership to attract the attention of non-specialists. The image should be a single image not containing multiple panels. It is meant to represent one key aspect of the results. The selected image must be a figure or part of a figure that is included in the paper. To prepare the image, select an image or graphic that is easy to read and as much as possible devoid of cluttering items, conveying clear, non-speculative, visual information about the biological context of the findings. Labels, while useful, must be kept to a minimum. The image should be provided in one of the following height and width configurations: 400 x 300 pixel, 300 x 400 pixel, or 400 x 400 pixel, and at a maximal resolution of 72 dpi. Please use Arial or Helvetica font with a size of 10–12 points; preferred file types are EPS and TIFF. The Graphical Abstract is mandatory for all papers published in the journal. When uploading, please designate the image as Graphical Abstract Image in ScholarOne Manuscripts.

## Main Text

- The journal uses US spelling; however, authors may submit using either option, as spelling of accepted papers is converted during the production process.
- Articles may range from approximately 2,500 to 6,000 words.

## *Materials and Methods*

If a method or tool is introduced in the study, including software, questionnaires, and scales, the author should state the license that is available under and any requirement for permission for use. If an existing method or tool is used in the research, the authors are responsible for checking the license and obtaining the permission. If permission was required, a statement confirming permission should be included in the Materials and Methods section.

## *References*

As of 2017, the references of the journal should be prepared according to the [Publication Manual of the American Psychological Association](#) (APA) (6th edition). This means in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). Use of et al. is determined by the number of authors and

whether it is the first time a reference has been cited in the paper. Specifically, articles with one or two authors include all names in every in-text citation; articles with three, four, or five authors include all names in the first in-text citation but are abbreviated to the first author name plus et al. upon subsequent citations; and articles with six or more authors are abbreviated to the first author name plus et al. for all in-text citations.

The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper. Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page 1, and a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the [APA FAQ](#).

References are to be arranged alphabetically in the following style: Author's name (or names), year of publication, complete article title, abbreviated journal title, volume, and inclusive pages as follows:

#### *Journal*

Senior, B., & Swailes, S. (2007). Inside management teams: Developing a teamwork survey instrument. *British Journal of Management*, 18, 138–153. doi:10.1111/j.1467-8551.2006.00507.x

Al-Amoudi, A. (2003). Cryo-electron microscopy of vitreous sections of biological materials. *Microscopy and Microanalysis*, 9, 372–373.

Briscoe, R. (in press). Egocentric spatial representation in action and perception. *Philosophy and Phenomenological Research*. Retrieved from <http://cogprints.org/5780/1/ECSRAP.F07.pdf>

Sillick, T. J., & Schutte, N. S. (2006). Emotional intelligence and self-esteem mediate between perceived early parental love and adult happiness. *E-Journal of Applied Psychology*, 2(2), 38–48. Retrieved from <http://ojs.lib.swin.edu.au/index.php/ejap>

#### *Book*

Alexie, S. (1992). *The business of fancy dancing: Stories and poems*. Brooklyn, NY: Hang Loose Press. *Edited Book*

Gilbert, D. G., McClernon, J. F., Rabinovich, N. E., Sugai, C., Plath, L. C., Asgaard, G., ... Botros, N. (1983). Situational crime prevention: Its theoretical basis and practical scope. In M. Tonry & N.

Morris (Eds.), *Crime and justice: An annual review of research* (Vol. 4, pp. 225–256). Chicago, IL: University of Chicago Press.

American Psychiatric Association. (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (4th ed.). Washington, DC: Author. Analysis. In: Receptor Localization. Ariano MA, editor. Wiley-Liss, New York, pp 75-90.

#### *Paper Presentation*

Weiss, A., & McGarrell, E. F. (1996, November). *The impact of increased traffic enforcement on crime*. Paper presented at the annual meeting of the American Society of Criminology, Chicago, IL. Symposium Muellbauer, J. (2007, September). Housing, credit, and consumer expenditure. In S. C. Ludvigson (Chair), *Housing and consumer behavior*. Symposium conducted at the meeting of the Federal Reserve Bank of Kansas City, Jackson Hole, WY.

#### *Conference paper abstract retrieved online*

Liu, S. (2005, May). *Defending against business crises with the help of intelligent agent based early warning solutions*. Paper presented at the Seventh International Conference on Enterprise Information Systems, Miami, FL. Abstract retrieved from [http://www.iceis.org/iceis2005/abstracts\\_2005.htm](http://www.iceis.org/iceis2005/abstracts_2005.htm)

#### *Proceedings published in book form*

Katz, I., Gabayan, K., & Aghajan, H. (2007). A multi-touch surface using multiple cameras. In J. Blanc-Talon, W. Philips, D. Popescu, & P. Scheunders (Eds.), *Lecture Notes in Computer Science: Vol. 4678. Advanced*

*Concepts for Intelligent Vision Systems* (pp. 97–108). Berlin, Germany: Springer-Verlag. doi:10.1007/978-3-540-74607-2



## *Thesis/Dissertation*

Schnittker, J. (2004). *Education and the changing shape of the income gradient in health*(Unpublished doctoral dissertation or master's thesis). Name of Institution, Location.

## *Report*

Muthen, L. K., & Muthen, B. O. (2004). *Child care and child development*(Report No. xxx). Los Angeles, CA: Publisher.

## *Patent*

Smith I. M. (2011). U. S. *Patent No. 235,445*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

## *Magazine*

Mathews, J., Berrett, D., & Brillman, D. (2005, May 16). Other winning equations. *Newsweek*, 145(20), 58–59.

Clay, R. (2008, June). Science vs. ideology: Psychologists fight back about the misuse of research. *Monitor on Psychology*, 39(6). Retrieved from <http://www.apa.org/monitor/>

## *Newspaper*

Schwartz, J. (1993, September 30). Obesity affects economic, social status. *The Washington Post*, pp. A 1, A4.

Brody, J. E. (2007, December 11). Mental reserves keep brain agile. *The New York Times*. Retrieved from <http://www.nytimes.com>

## **Tables**

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive

– the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All

abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and \*, \*\*, \*\*\* should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be

identified in the headings.

## **Figure Legends**

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

## **Figures**

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted. [Click here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post- acceptance figure requirements.

**Color Figures.** Figures submitted in color are reproduced in color online as well as in print free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g., graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white.

Additional Files

## **Appendices**

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

## **Supporting Information**

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

[Click here](#) for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

## General Style Points

The following points provide general advice on formatting and style.

- **Abbreviations:** In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially, use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.
- **Units of measurement:** Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the [Bureau International des Poids et Mesures \(BIPM\) website](#) for more information about SI units.
- **Numbers:** numbers under 10 are spelt out, except for: measurements with a unit (8mmol/l); age (6 weeks old), or lists with other numbers (11 dogs, 9 cats, 4 gerbils).
- **Trade Names:** Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name and the name and location of the manufacturer in parentheses.

## Wiley Author Resources

*Manuscript Preparation Tips:* Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available [here](#). In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

## Article Preparation Support

[Wiley Editing Services](#) offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

## [Return to Guideline Sections](#)

# 5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

## Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to journal readership. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is [available here](#).

## Data Sharing and Data Accessibility

This journal expects data sharing. Review [Wiley's Data Sharing policy](#) where you will be able to see and select the data availability statement that is right for your submission.

## Human Studies and Subjects

For manuscripts reporting medical studies that involve human participants, a statement identifying the ethics committee that approved the study and confirmation that the study conforms to recognized standards is required, for example: [Declaration of Helsinki](#); [US Federal Policy for the Protection of Human Subjects](#); or [European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice](#). It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

Patient anonymity should be preserved. Photographs need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized (or an eye bar should be used). Images and information from individual participants will only be published where the authors have obtained the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher; however, in signing



the author license to publish, authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a **standard patient consent form** available for use.

### Animal Studies

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, as well as the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. Authors are encouraged to adhere to animal research reporting standards, for example the **ARRIVE guidelines** for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals:

- **US authors should cite compliance with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.**
- **UK authors should conform to UK legislation under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations (SI 2012/3039).**
- **European authors outside the UK should conform to Directive 2010/63/EU.**

### Clinical Trial Registration

The journal requires that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Authors are asked to include the name of the trial register and the clinical trial registration number at the end of the abstract. If the trial is not registered, or was registered retrospectively, the reasons for this should be explained.

### Research Reporting Guidelines

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. Authors are encouraged to adhere to recognized research reporting standards. The EQUATOR Network collects more than 370 reporting guidelines for many study types, including for:

- ♦ Randomised trials: CONSORT
- ♦ Observational studies: STROBE
- ♦ Systematic reviews: PRISMA
- ♦ Case reports: CARE
- ♦ Qualitative research: SRQR
- ♦ Diagnostic / prognostic studies: STARD
- ♦ Quality improvement studies: SQUIRE
- ♦ Economic evaluations: CHEERS
- ♦ Animal pre-clinical studies: ARRIVE
- ♦ Study protocols: SPIRIT
- ♦ Clinical practice guidelines: AGREE

We also encourage authors to refer to and follow guidelines from: Future of

Research Communications and e-Scholarship (FORCE11)

National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines

The Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues

Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities (MIBBI) website

FAIRsharing website

### Species Names

Upon its first use in the title, abstract, and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species, and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific

names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, only the scientific name should be used.

### Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see [varnomen.hgvs.org](http://varnomen.hgvs.org), where examples of acceptable nomenclature are provided.

### Sequence Data

**Nucleotide sequence data** can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL, or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL, and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'. Addresses are as follows:

- DNA Data Bank of Japan (DDBJ): [www.ddbj.nig.ac.jp](http://www.ddbj.nig.ac.jp)
- EMBL Nucleotide Archive: [ebi.ac.uk/ena](http://ebi.ac.uk/ena)
- GenBank: [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)

Proteins sequence data should be submitted to either of the following repositories: Protein

- Information Resource (PIR): [pir.georgetown.edu](http://pir.georgetown.edu)
- SWISS-PROT: [expasy.ch/sprot/sprot-top](http://expasy.ch/sprot/sprot-top)

### Structural Data

For papers describing structural data, atomic coordinates and the associated experimental data should be deposited in the appropriate databank (see below). **Please note that the data in databanks must be released, at the latest, upon publication of the article.** We trust in the cooperation of our authors to

ensure that atomic coordinates and experimental data are released on time.

- **Organic and organometallic compounds:** Crystallographic data should not be sent as Supporting Information, but should be deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) at [ccdc.cam.ac.uk/services/structure%5Fdeposit](http://ccdc.cam.ac.uk/services/structure%5Fdeposit).
- **Inorganic compounds:** Fachinformationszentrum Karlsruhe (FIZ; [fiz-karlsruhe.de](http://fiz-karlsruhe.de)).
- **Proteins and nucleic acids:** Protein Data Bank ([rcsb.org/pdb](http://rcsb.org/pdb)). NMR
- spectroscopy data: BioMagResBank ([bmrw.wisc.edu](http://bmrw.wisc.edu)).

### Conflict of Interest

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

### Funding

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

## Authorship

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

- 1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; and**
- 2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and**
- 3. Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and**
- 4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.**

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

**Additional Authorship Options.** Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship, a footnote should be added to the author listing, e.g. ‘X and Y should be considered joint first author’ or ‘X and Y should be considered joint senior author.’

## Publication Ethics

This journal is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Note this journal uses iThenticate’s CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley’s Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors [here](#). Wiley’s Publication Ethics Guidelines can be found [here](#).

## ORCID

As part of the journal’s commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. [Find more information here.](#)

[Return to the Guideline Sections](#)

## 6. AUTHOR LICENSING

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to [Author Services](#), where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the [Copyright FAQs](#).

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License (CC-BY) OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License (CC-BY-NC) OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) OAA

General information regarding licensing and copyright is available on the [Wiley Author Services](#) and the

[Wiley Open Access](#) websites.

Note to NIH, The Wellcome Trust and the Research Councils UK Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley will post the accepted version of contributions authored by NIH grant- holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. Please click [here](#) for further information. If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust or the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with The Wellcome Trust and Research Councils UK requirements.

#### Self-Archiving Definitions and Policies

Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please click [here](#) for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

[\*\*\*Return to Guideline Sections\*\*\*](#)

### 7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

#### Accepted Articles

All accepted manuscripts are subject to editing. Authors have final approval of changes prior to publication.

#### Proofs

Once the paper is typeset, the author will receive an email notification with full instructions on how to provide proof corrections.

Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process – authors should check proofs carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt of first proof.

[\*\*\*Return to Guideline Sections\*\*\*](#)

### 8. POST PUBLICATION

#### Access and sharing

When the article is published online:

- **The author receives an email alert (if requested).**
- **The link to the published article can be shared through social media.**
- **The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).**
- **The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.**

Print copies of the article can now be ordered (instructions are sent at proofing stage or email

[\*\*chris.jones@sheridan.com\*\*](mailto:chris.jones@sheridan.com).

#### Promoting the Article

[\*\*Wiley Editing Services\*\*](#) offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

#### Measuring the Impact of an Article

Wiley also helps authors measure the impact of their research through specialist

partnerships with **Kudos** and **Altmetric**. ***Return to Guideline Sections***

## **9. JOURNAL CONTACT DETAILS**

For queries about submissions, please contact

Editor: Alberto Diaspro, Istituto Italiano di Tecnologia,

[MRT.diaspro@iit.it](mailto:MRT.diaspro@iit.it) Editorial Office: [JEMT@wiley.com](mailto:JEMT@wiley.com)

**Journal Production: [JEMTprod@wiley.com](mailto:JEMTprod@wiley.com)**



## 8. ANEXO B - ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO

Tavares, C. P., Sousa, I. C., **Gomes, M. N.**, Miró, V., Virkel, G., Lifschitz, A., & Costa-Junior, L. M. (2022). Combination of cypermethrin and thymol for control of *Rhipicephalus microplus*: Efficacy evaluation and description of an action mechanism. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(1), 101874.

Sousa, I. C., Figueredo, W. K., Tavares, C. P., **Gomes, M. N.**, Klafke, G. M., Silva, A. C., & Costa-Junior, L. M. (2022). Development and validation of software that quantifies the larval mortality of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cattle tick. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(3), 101930.

Tavares, C. P., Sabadin, G. A., Sousa, I. C., **Gomes, M. N.**, Soares, A. M., Monteiro, C. M., ... & Costa-Junior, L. M. (2022). Effects of carvacrol and thymol on the antioxidant and detoxifying enzymes of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(3), 101929.

Vale, T. L. D., Sousa, I. C., Tavares, C. P., Silva, N. C., Luz, H. R., **Gomes, M. N.**, ... & Costa-Junior, L. M. (2021). Práticas realizadas por veterinários para controle de helmintos gastrintestinais e ectoparasitos de cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 30(4).