



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIENCIAS DE
LA VIDA Y DE LA NATURALEZA**

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN
BIOCIENCIAS**

**EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE SINGANGLIO DE GARRAPATAS *RHIPICEPHALUS
SANGUINEUS* (ACARI: *IXODIDAE*) EN AYUNO EXPUESTAS AL ACEITE ESENCIAL
DE *TAGETES MINUTA* L.**

DAVID FERNANDO CEPEDA AGUILAR

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná
2022

**EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE SINGANGLIO DE GARRAPATAS *RHIPICEPHALUS
SANGUINEUS* (ACARI: *IXODIDAE*) EN AYUNO EXPUESTAS AL ACEITE ESENCIAL
DE *TAGETES MINUTA L.***

DAVID FERNANDO CEPEDA AGUILAR

Disertación de maestría presentada al Programa de Posgrado en Biociencias, del Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de Master en Ciencias.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Henrique Nunes

Coorientador: Prof^a. Dra. Jociani Ascari

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná
2022

DAVID FERNANDO CEPEDA AGUILAR

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE SINGANGLIO DE GARRAPATAS *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* (ACARI: *IXODIDAE*) EN AYUNO EXPUESTAS AL ACEITE ESENCIAL DE *TAGETES MINUTA L.*

Disertación de maestría presentada al Programa de Posgrado en Biociencias, del Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de Master en Ciencias.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Pablo Henrique Nunes
Orientador
UNILA

Dr. Kelvinson Fernandes Viana
Examinador
UNILA

Dr. Rafael Neodini Remedio
Examinador
UFLA

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 06 de dezembro de 2022.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

C399

Cepeda Aguilar, David Fernando.

Evaluación Histológica de singanglio de Garrapatas *Rhipicephalus Sanguineus*(Acari:Ixodidae) em ayuno expuestas al aceite esencial de *Tagetes Minuta L / Joylan Nunes Maciel*. - Foz do Iguaçu, 2022.

71 f.: il., color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu - PR, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Henrique Nunes

Coorientador: Prof^ª. Dra. Jociani Ascari

1. Acaricida. 2. Terpenos. 3. Antiparasitário. 4. ectoparasito. 5. Microscopia. I. Nunes, Prof. Dr. Pablo Henrique. II. Ascari, Prof^ª. Dra. Jociani. III. Título.

CDU 616.99:595.42

A mi mamá.

AGRADECIMIENTOS

En este tiempo transcurrido lleno de incertidumbres e inquietudes, quisiera dar mis agradecimientos a aquellas personas que de una manera u otra han contribuido a la realización del presente trabajo.

A mi papá por el apoyo brindado y a mi mamá por su importante legado, por haberme brindado la circunstancia vital; a mis hermanos por su contribución sustancial. A mis amigos, en especial a Sergio por los consejos dados.

A mi orientador el profesor Pablo Henrique Nunes por los aprendizajes, ayuda y paciencia que desde un comienzo fueron fundamentales

A la Dra Jociani Ascari cuya orientación fue de suma importancia, así mismo a Murilo Silva de Oliveira por las acertadas sugerencias y ayudas brindadas

Al personal del departamento de Biociencias de la Universidad Estadual Paulista Julio Mezquita de Filho por el espacio y la ayuda técnica. Al profesor Juan Matias Szabó por las garrapatas enviadas desde Uberlândia.

A todas aquellas personas de la Universidade Federal da Integração latino-Americana que venidos de diferentes rincones de Suramérica hicieron más enriquecedora la experiencia allá afuera.

Agradecimiento al apoyo de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana – Brasil (UNILA), por la beca DS (Programa de Demanda Social).

*“Tudo era fantasia, um sonho,
um mundo de vastas emoções e pensamentos imperfeitos.”*

Rubem Fonseca, 1988, p. 261.

*“Solo cuando se convierte en relato
el mundo al fin parece comprensible.
Mientras los vamos viviendo,
los hechos son tan agobiantes y múltiples
que no les encontramos pies ni cabeza.”*

William Ospina, 2008, p. 49.

AGUILAR, David Fernando Cepeda. 2022. **Evaluación histológica de singanglio de garrapatas adulto *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en ayuno expuestas a aceite esencial de *Tagetes minuta***. Asesores: NUNES, Pablo Henrique (asesor); ASCARI, Josciani (co-asesor). 71 h. Disertación (Maestría) - PPG-BC (Programa de Postgrado en Biociencias), UNILA (Universidad Federal de la Integración Latinoamericana), Foz do Iguaçu.

RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato linaje tropical (*Acari: Ixodidae*) se considera un problema sanitario debido a su papel como vector de diferentes enfermedades de importancia veterinaria. Cepas de garrapatas resistentes a los acaricidas sintéticos han causado dificultades en su control, además de los acaricidas sintéticos ser perjudiciales para el medio ambiente. La investigación de plantas con propiedades acaricidas y repelentes ha demostrado ser una alternativa eficaz en el control de garrapatas. El género *Tagetes* spp. destaca por su uso como control tradicional de plagas en hogares y plantaciones y también por su potencial como acaricida/insecticida en condiciones de laboratorio contra *R. sanguineus*. El primer objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferentes dosis de aceite esencial de *Tagetes minuta* (TMEO) (1,25%, 2,5%, 5%, 10% y 20%), amitraz 12,5% dosis subletal (control negativo) y Tween 20 al 2% (control positivo) sobre el sistema nervioso central (synganglio) en adultos no alimentados de *R. sanguineus* expuestos a las sustancias mencionadas mediante el método de Inmersión de Adultos (Test de Drummond). El análisis histológico del singanglio expuesto a las diferentes concentraciones de TMEO y amitraz 12,5% mostró un efecto significativo con signos de daño celular que incluían aumento de volumen, pérdida de forma y vacuolización, además de alteraciones de la cromatina como condensación, marginación y fragmentación. Los TMEO se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y detector de ionización de llama mostrando la presencia de 21 compuestos que según su estructura química se clasifican como terpenoides, entre ellos (Z)- β -ocimeno, ocimeno, (Z)-tagetona, y verbenona se encontraron en cantidades mayores.

Palabras clave: acaricida; terpenos; antiparasitario; ectoparásito; microscopia.

AGUILAR, David Fernando Cepeda. 2022. **Avaliação histológica do singanglio de carrapatos adulto *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) em jejum expostos ao óleo essencial de *Tagetes minuta***. Orientadores: NUNES, Pablo Henrique (Orientador); ASCARI, Josciani (coorientadora). 71 f. Dissertação (Mestrado) - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato linhagem tropical (*Acari: Ixodidae*) é considerado um problema de saúde devido ao seu papel como vetor de diferentes doenças de importância veterinária. As estirpes de carrapatos resistentes aos acaricidas sintéticos têm causado dificuldades em seu controle, além de acaricidas sintéticos serem prejudiciais ao meio ambiente. A pesquisa de plantas com propriedades acaricidas e repelentes provou ser uma alternativa eficaz no controle de carrapatos. O gênero *Tagetes* spp. se destaca por seu uso no controle tradicional de pragas em residências e plantações e também pelo potencial como acaricida/inseticida em condições laboratoriais contra o *R. sanguineus*. O primeiro objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito de diferentes doses de óleo essencial de *Tagetes minuta* (TMEO) (1,25%, 2,5%, 5%, 10% e 20%), amitraz 12,5% dose subletais (controle negativo) e Tween 20 ao 2% (controle positivo) no sistema nervoso central (synganglia) de adultos *R. sanguineus* em jejum expostos às substâncias mencionadas usando o teste de imersão de adulto (teste Drummond). A análise histológica da synganglia exposta às diferentes concentrações de TMEO e amitraz 12,5% mostrou um efeito significativo com sinais de danos celulares incluindo alargamento, perda de forma e vacuolização, bem como alterações cromatinosas como condensação, marginação e fragmentação. As TMEOs foram analisadas por cromatografia gasosa acopladas à espectrometria de massa e ao detector de ionização de chama mostrando a presença de 21 compostos que de acordo com sua estrutura química são classificados como terpenóides, entre eles (Z)- β -ocimeno, ocimeno, (Z)-tagetone, e verbenone foram encontrados em maiores quantidades.

Palavras-chave: acaricida; terpenos; antiparasitário; ectoparasita; microscopia.

AGUILAR, David Fernando Cepeda. 2022. **Histological evaluation of the singangly of unfeed *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks exposed to essential oil of *Tagetes minuta***. Advisors: NUNES, Pablo Henrique (advisor); ASCARI, Josciani (co-advisor). 71 p. Master's thesis (Master's degree) - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration), Foz do Iguaçu.

ABSTRACT

*The Rhipicephalus sanguineus sensu lato tropical lineage tick (Acari: Ixodidae) is considered a sanitary concern due to its role as a vector. Tick resistant strains to synthetic acaricides have caused difficulties in its control, besides synthetic acaricides are harmful to the environment and the health of other animals. The research of plants with acaricidal and repellent properties has proved to be an efficient alternative in the ticks control. The genus *Tagetes* spp. excels for its use as traditional pest control in households and plantations and also for its potential as acaricide/insecticide in laboratory conditions against *R. sanguineus*. The first aim of this research was to evaluate the effect of different doses of *Tagetes minuta* essential oil (TMEO) (1.25%, 2.5%, 5%, 10% and 20%), amitraz 12.5% sublethal dose (negative control) and Tween 20 at 2% (positive control) on the central nervous system (synganglio) in unfed *R. sanguineus* adults exposed to the mentioned substances by Immersion Adults Test methodology (Drummond Test). The histologic analysis of synganglion exposed to the different concentrations of TMEO and amitraz 12.5% showed a significant effect with signs of cell damage including volume increase, loss of shape, and vacuolization, in addition to chromatin alterations such as condensation, margination, and fragmentation. TMEO were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry and Flame Ionization Detector showing the presence of 21 compounds that according to its chemical structure are classified as terpenoids, among them (Z)- β -ocimene, ocimene, (Z)-tagetone, and verbenone were found in major quantities.*

Keywords: acaricide; terpenoids; microscopy; control; alternative.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases biológicas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> Latrielle.....	16
Figura 2. Ciclo Biológico de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	17
Figura 3. Anatomía del synganglion. Ubicación del synganglion en la garrapata (izquierda). Vista dorsal del synganglion de la garrapata y su morfología general (derecha)	18
Figura 4. Dibujo esquemático de sección del sistema nervioso central (<i>synganglion</i>) de garrapatas <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	18
Figura 5. Sección histológica de <i>synganglion</i> de hembras semi-ingurgitadas de <i>R. sanguineus</i> teñidas con hematoxilina eosina.....	19
Figura 6. Hábitat y características morfológicas de <i>Tagetes minuta</i>	23
Figura 7. Mantenimiento de ninfas de <i>R. sanguineus</i> en B.O.D.....	27
Figura 8. Obtención de aceites esenciales	28
Figura 9. Dilución de aceite esencial de <i>T. minuta</i>	30
Figura 10. Test de inmersión de garrapatas.....	31
Figura 11. Disección de garrapata <i>Rhipicephalus sanguineus</i> para extracción de <i>synganglion</i>	32
Figura 12. Sección histológica de <i>synganglion</i> de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> en ayuno teñidas con Hematoxilina eosina. Grupo 1 – control 20 al 2%.....	40
Figura 13. Sección histológica de singanglio de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> en ayuno teñidas con hematoxilina eosina. Grupo 1 – control con amitraz 12.5%.....	41
Figura 14. Sección histológica de Singanglio de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> en ayuno teñidas con hematoxilina eosina. Grupo 3 – Tratamiento con aceite esencial de <i>T. minuta</i> 1.25%.....	43
Figura 15. Sección histológica de Singanglio de <i>Rhipicephalus saguineus</i> en ayuno teñidas con Hematoxilina eosina. Grupo 4 – Tratamiento con aceite de <i>T. minuta</i> 2.5%...	44
Figura 16. Sección histológica de Singanglio de <i>Rhipicephalus saguineus</i> en ayuno teñidas con Hematoxilina eosina. Grupo 5 – Tratamiento con aceite de <i>T. minuta</i> 5%.....	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Formula, estructura molecular, clasificación y referencias de algunos compuestos terpenoides identificados en el análisis por cromatografía de gases de aceite esencial de <i>T. minuta</i>	37
Cuadro 2. Resumen de las principales alteraciones encontradas en cortes de <i>synganglion</i> de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> en ayuno expuestas a diferentes concentraciones de <i>T. minuta</i> , amitraz, Tween 20 al 2%.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diluciones de aceite esencial <i>T. minuta</i>	30
Tabla 2. Datos de material vegetal colectado y muestras de aceite esencial obtenidas de <i>Tagetes minuta</i>	33
Tabla 3. Composición de aceite esencial de flores de <i>T. minuta</i> muestra PD2.....	34
Tabla 4. Composición de aceite esencial de hojas de <i>T. minuta</i> muestra PD3 Hoja.....	34
Tabla 5. Composición de aceite esencial de hojas de <i>T. minuta</i> muestra PD6 Hoja.....	34
Tabla 6. Composición de aceite esencial de hojas de <i>T. minuta</i> muestra PD7 Hoja.....	35
Tabla 7. Composición de aceite esencial de hojas de <i>T. minuta</i> muestra PD8 Hoja.....	35
Tabla 8. Proporción relativa de cada componente de acuerdo al análisis cromatográfico.	36

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AchE	Acetilcolinesterasa
BmOAR1	<i>Boophilus microplus</i> Octopamine Receptor 1
BmOAR2	<i>Boophilus microplus</i> Octopamine Receptor 2
cAMP	Adenosin Monofosfato Cíclico
CDM	Clordimeform
CG-EM	Cromatografia Gaseosa Acoplada a Espectrometría de masas
DCDM	Dimetilclordimeform
DPMF	N2-(2,4-Dimethylphenyl)-N1-methyformamidine
DELABEN	Departamento de Laboratórios de Ensino
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sodio
OAR	Receptores de Octopamina
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
UNILA	Universidade Federal da Integração Latino Americana
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

ÍNDICE

1. INTRODUCCION.....	15
1.1. Referencial teórico.....	15
1.1.1. <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	15
1.1.2. <i>Ciclo biológico de Rhipicephalus sanguineus</i>	16
1.1.3. <i>Sistema nervioso (synganglion) de Rhipicephalus sanguineus</i>	17
1.1.4. <i>Tipos de control contra garrapatas</i>	19
1.2. Justificativa.....	23
1.3. Hipótesis.....	24
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. General.....	25
2.2. Específicos.....	25
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
3.1. Local de desarrollo del estudio.....	26
3.2. Materiales.....	26
3.2.1. <i>Obtención de garrapatas Rhipicephalus sanguineus</i>	26
3.2.2. <i>Colecta y procesamiento de Tagetes minuta</i>	27
3.2.3. <i>Análisis cromatográfico</i>	28
3.3. Métodos.....	29
3.3.1. <i>Preparación de diluciones de aceite esencial de T. minuta</i>	29
3.3.3. <i>Histología</i>	31
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Composición química de aceite esencial de Tagete minuta.....	33
4.2. Análisis histológico hematoxilina-eosina.....	38
4.2.1. <i>Grupo control Tween 20 aL 2%</i>	39
4.2.2. <i>Grupo control amitraz</i>	40
4.2.3. <i>Grupo tratamiento T. minuta 1.25 %</i>	42
4.2.4. <i>Grupo tratamiento T. minuta 2.5 %</i>	42
4.2.5 <i>Grupo tratamneto T. minuta 5%</i>	44
4.2.6. <i>Grupo tratamiento T. minuta 10% y 20%</i>	46
5. DISCUSION.....	47
6. CONSIDERACIONES FINALES.....	58
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	59
8. REFERENCIAS.....	60

1. INTRODUCCION

1.1. Referencial teórico

1.1.1. *Rhipicephalus sanguineus*

La garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Figura 1) (Acari: Ixodidae) se encuentra ampliamente distribuida al rededor del mundo siendo un parasito común del perro doméstico *Canis familiaris*, pudiendo parasitar otros huéspedes (Walker *et al.*, 2000; Dantas-Torres, 2008), inclusive se ha descrito que en fases inmaduras de *R. sanguineus* posee preferencia por otras especies (Hornok *et al.*, 2018). *R. sanguineus* es vector de diversos patógenos (e.g. *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* e *Rickettsia rickettsii*) de importancia zoonótica y veterinaria (Straube, 2011; Bechara, 2013). *R. sanguineus* ha sido objeto de estudio debido a su rol como agente transmisor de rickettsiosis en seres humanos (Salomon *et al.*, 2022), especialmente considerando la estrecha relación entre seres humanos y perros domésticos, y rol de *R. sanguineus* en el ciclo de transmisión parasitaria desde una perspectiva One Health (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

Esta especie de garrapata se identifica por la conformación hexagonal del *capitulum*, el cual está conformado por la cabeza y las partes bucales; poseen ojos y festones, no posee ornamentación en el escudo, los machos tienen placas adanales y escudos accesorios prominentes (Bowman, 2011). Dantas-Torres (2010) describe que los principales lugares de adhesión de la *R. sanguineus* en el perro son la cabeza, las orejas, la espalda, entre los dedos y el área debajo de las articulaciones justo debajo del tórax.

En cuanto a la clasificación taxonómica de *R. sanguineus* no hay un común acuerdo, algunos autores sugieren la existencia de un complejo de especies, encontrándose importantes variaciones geográficas (Levin *et al.*, 2012). Desde el punto de vista biológico *R. sanguineus* es un parasito monostrófico (todas las fases de desarrollo se alimentan en la misma especie hospedera) y heteroxeno (cada fase de vida, requiere un hospedero diferente para alimentarse) (Dantas-Torres, 2010).

A pesar de los diferentes tratamientos, del amplio uso de acaricidas, entre otros métodos de control, las garrapatas continúan su expansión (Felix *et al.*; em: Sonenshine and Roe, 2014) una situación que ha aumentado en todo el mundo debido a la influencia del cambio climático en la dinámica poblacional de estos artrópodos, generando un mayor contacto con el ser humano y otros huéspedes susceptibles, factores que resultan en un

aumento de los casos de enfermedades transmitidas por garrapatas (Cortes, 2010; Dantas-Torres, 2015).

Figura 1. Fases biológicas de *Rhipicephalus sanguineus* Latreille



Nota explicativa: En sentido horario desde abajo a la derecha: larva ingurgitada, ninfa ingurgitada, hembra y macho.

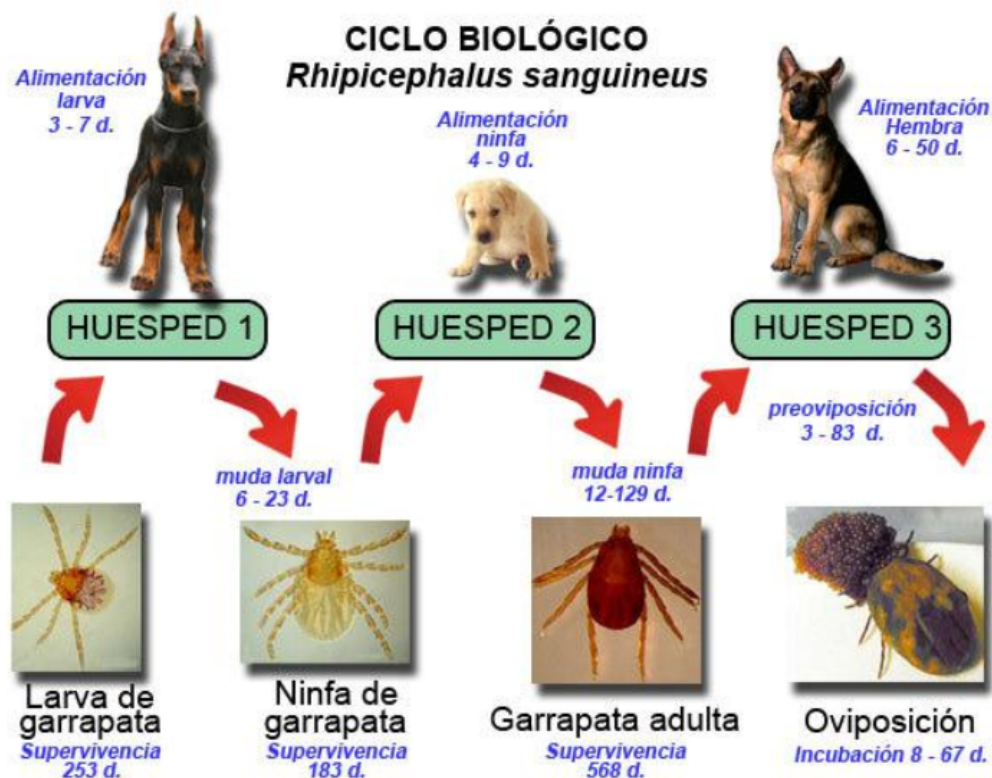
Fuente: Tian *et al.*, 2018.

1.1.2. Ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus*

El ciclo biológico de *R. sanguineus* es de tres hospederos, es decir que cada una de las fases después de alimentarse del hospedero debe abandonarlo para completar la fase en el medio ambiente (Figura 2) (Requejo, 2018). En general una larva de *R. sanguineus* puede eclosionar tras 6 o 23 días después del huevo ser depositado por la hembra e inicia la espera por un hospedero. Una vez sobre el hospedero, las larvas se alimentan entre 5 a 15 días, se desprende del hospedero y toma alrededor de 2 semanas para desarrollarse como ninfa; posteriormente una vez la ninfa consiga adherirse a otro hospedero, se alimentará entre 3 a 13 días, para luego desprenderse y en alrededor de 2 semanas se habrá convertido en adulto (Sonenshine & Roe, 2014). Una vez en fase adulta *R. sanguineus* buscara un hospedero donde se alimentará hasta quedar repleta que puede durar entre 6 a 50 días, inclusive los adultos pueden sobrevivir hasta 18 meses sin alimentarse, una vez alimentada, la garrapata adulta se desprenderá del huésped y en el caso de la hembras depositará los huevos; el ciclo de vida de *R. sanguineus* puede llegar a completarse en 63 días bajo condiciones ambientales favorables y de disponibilidad de hospedero, puede haber hasta cuatro generaciones de garrapatas por

año (Yates, 1992) . En promedio el desarrollo desde el huevo hasta la ovoposición de la hembra puede ser completado en alrededor de dos meses, pero en general puede tomar más tiempo dependiendo de la disponibilidad de hospederos o la temperatura del medio ambiente. *R. sanguineus* puede sobrevivir hasta entre tres a cinco meses en cada fase sin alimentarse (Koehler *et al.*, 2018).

Figura 2. Ciclo Biológico de *Rhipicephalus sanguineus*



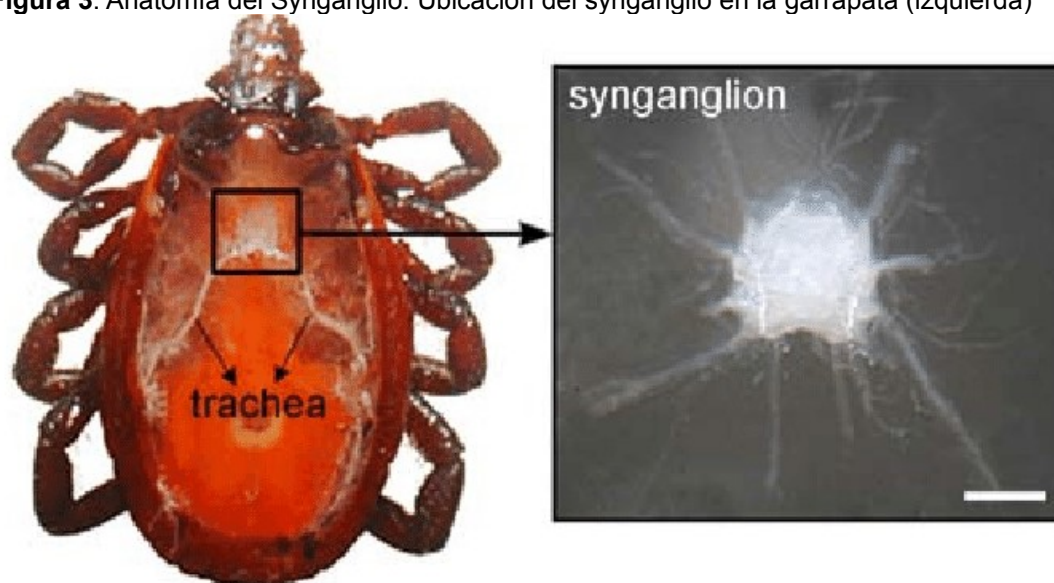
Fuente: Requejo, 2018.

1.1.3. Sistema nervioso (*synganglion*) de *Rhipicephalus sanguineus*

De acuerdo con Sonenshine (1991) y Roma y colaboradores (2012), el sistema nervioso central de *R. sanguineus* consiste en una masa fusionada de tejido nervioso denominada *synganglion*, la cual está localizada en la región ventral anterior de la garrapata (Figura 3). Según Szlendak & Oliver (1992) mas específicamente ventromedialmente en la región del idiosoma, a nivel de la 2 extremidad. Es de forma subesférica periforme, a nivel interior se encuentra dorsal al ducto genital y ventral a las glándulas salivales y el intestino de la garrapata. Esta estructura externamente no presenta segmentación, como se puede apreciar en el esquema de la figura 4, consistiendo en una estructura simple cubierta por una lámina neural o neurilema, la cual es de tipo acelular. Debajo del neurilema se encuentra el *perineurum*, el cual está

conformado por células gliales las cuales como rasgo característico presentan núcleo alargado. A nivel interno el *synganglion* se encuentra dividido en una región cortical o *córtex* la cual contiene el cuerpo o soma de las neuronas y el *neuropile*, ubicado más al interior, el cual está conformado por fibras nerviosas. Ambas regiones se encuentran separadas por el *subperineurium*, el cual está conformado por células gliales (Figura 5).

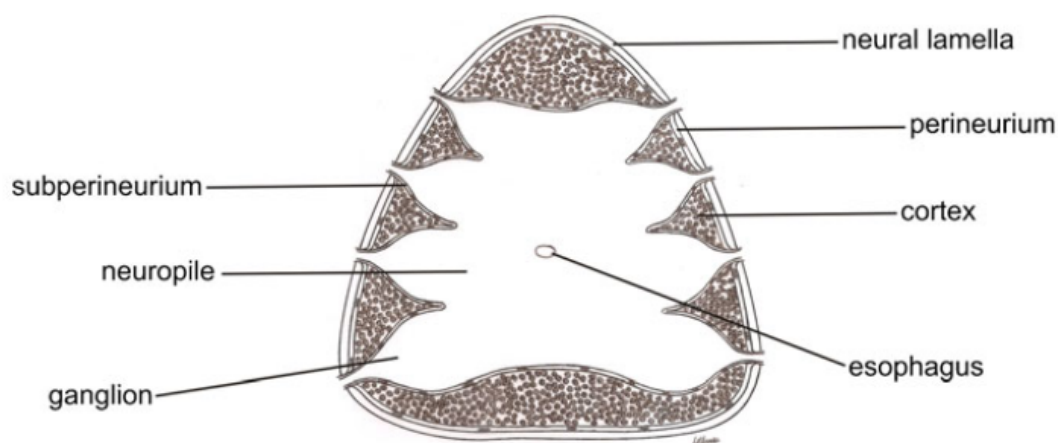
Figura 3. Anatomía del Synganglio. Ubicación del synganglio en la garrapata (izquierda)



Nota explicativa: Vista dorsal del synganglio de la garrapata y su Morfología general (derecha).

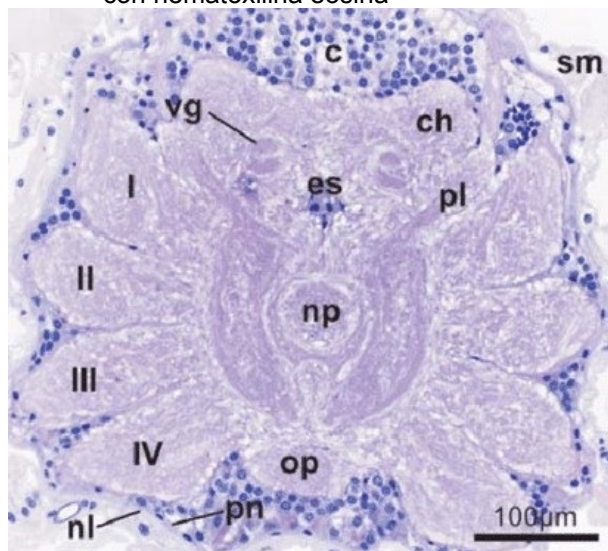
Fuente: Adaptado de ŠIMO *et al.* (2009).

Figura 4. Dibujo esquemático de sección del sistema nervioso central sistema (*synganglion*) de Garrapatas *R. sanguineus*



Fuente: Adaptado de Roma *et al.* (2012).

Figura 5. Sección histológica de *synganglion* de hembras semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* teñidas con hematoxilina eosina



Nota explicativa: Grupo control. sm, sinus membrane; ni, neural lamella; pn, perineurium; es, esofago; c, cortex; np, neuropile; ch, cheliceral ganglion; pl, palpal ganglion; vg, ventral glomeruli; I, pedal I ganglion; II, pedal II ganglion; III, pedal III ganglion; IV, pedal IV ganglion; op, opisthosomal ganglion.

Fuente: Adaptado de Roma et al. (2013).

1.1.4. Tipos de control contra garrapatas

Los esfuerzos para el control de la garrapata son difíciles debido a la complejidad de los ciclos biológicos, la enorme capacidad reproductiva y el número de huéspedes que son requeridos para completar el ciclo biológico de estos ectoparásitos. (De la Fuente *et al.*, 2015). En general el arsenal empleado para el control de la garrapata incluye el uso de productos químicos, vacunas, fitoterápicos, selección genética del huésped, control biológico; cada uno de estos métodos reporta ventajas y desventajas, siendo más eficaz su utilización cuando se usan de manera integrada en lo que se denomina como manejo integrado de plagas, el cual es considerado el enfoque ideal (Quadros *et al.*, 2020).

En el caso particular del control de garrapatas en perros, estos pueden ser tratados con una amplia gama de productos veterinarios en distintas formulaciones como *spot-on*, collares impregnados, *shampoos*, *sprays*, baños y polvos (Garris, 1991); dentro de los principales compuestos con actividad garrapaticida comprobada sobre *R. sanguineus* se encuentran *coumaphos*, *deltametrina*, *amitraz*, *cipermetrina*, *fipronil* entre otros (Bicalho *et al.*, 2001; BurrIDGE *et al.*, 2004; Reshma & Prakasan., 2020). Sin embargo, el uso prolongado e irracional de estos acaricidas es un problema serio que puede resultar en contaminación del medio ambiente y aparición de resistencia en garrapatas (Labarthe, 1994). La resistencia a acaricidas / insecticidas, definida como la selección de características hereditarias específicas en una población de artrópodos debido al contacto de una población con una sustancia química, resultando en un aumento significativo del

porcentaje de la población que sobrevivirá una dosis estándar de una misma sustancia química (Coles & Dryden., 2014), ha sido detectada en *R. sanguineus* en una amplia gama de compuestos químicos (Quadros *et al.*, 2020); la resistencia a piretroides y fipronil fue reportada en linajes de garrapatas en América del Norte (Eiden *et al.*, 2015), en México, la resistencia a *cipermetrina* y *amitraz* fue demostrada en varias poblaciones de garrapatas en la península de Yucatán (Rodríguez Vivas *et al.*, 2017). Recientemente, la resistencia a *ivermectina* en *R. sanguineus* fue documentada por primera vez (Vivas *et al.*, 2017). En Brasil, estado de *Goiânia*, se encontró resistencia a la *cipermetrina*, *deltametrina* y *coumaphos* en cepas de *R. sanguineus* (Borges *et al.*, 2007), lo que sugiere que el uso intensivo de acaricidas está generando una problemática de resistencia que va en aumento progresivamente, llevando a fallas en el control parasitario y a su vez ocasionando problemas ambientales, económicos y de salud (Guerrero *et al.*, 2014).

El control biológico se ha convirtiendo en un enfoque necesario dentro del manejo integrado de garrapatas debido entre otros aspectos a la preocupación por el medio ambiente, la salud del ser humano, mamíferos y especies beneficiosas, el incremento en el costo de productos químicos, la aparición de garrapatas resistentes a acaricidas entre otros aspectos. Por su parte diferentes organismos patógenos como bacterias, hongos y nematodos entomopatogénicos han mostrado ser eficaces en el control de diferentes especies de garrapata incluyendo *R. sanguineus*; de manera similar insectos parasitoides del orden *Hemynopteran* los cuales parasitan diferentes especies de garrapatas pueden ser una alternativa viable en el control de diferentes especies de garrapatas (Samish *et al.*, 2004).

De los métodos incluidos dentro del control biológico, el uso de hongos entomopatogénicos ha mostrado ser una herramienta altamente eficiente, fácil de usar y con resultados óptimos, diferentes especies de hongos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* y *Paecilomyces fumosoroseus* han sido estudiadas para evaluar su potencial patogénico sobre *R. sanguineus*, de estas especies citadas *M. anisopliae* y *B. bassiana* han demostrado un alto potencial patogénico (Samish *et al.*, 2001; Kirkland *et al.*, 2004).

Por otra parte, la vacunación se considera una alternativa prometedora para controlar las infestaciones por garrapatas. Diferentes investigaciones se han realizado para identificar moléculas que puedan servir como antígenos, un ejemplo es la proteína *Bm86* para el caso de *Rhipicephalus microplus* la cual confiere protección parcial en bovinos ante nuevas infestaciones. La mayoría de los esfuerzos han sido dirigidos al

diseño de vacunas contra *R. microplus*, sin embargo, también se han llevado a cabo iniciativas para el desarrollo de vacunas para inmunización de otras especies huéspedes como ovejas, camellos o animales de compañía (Rodríguez-Mallon *et al.*, 2012).

En el caso de *R. microplus*, diferentes antígenos han sido caracterizados; tales resultados dan soporte a la posibilidad de desarrollar vacunas efectivas en diferentes huéspedes contra diferentes especies de garrapatas. Sin embargo, nuevas combinaciones de antígenos son requeridas para el desarrollo de vacunas más efectivas contra infestaciones de garrapatas (De la fuente & Contreras, 2015).

En la búsqueda de alternativas eficientes que no generen impactos negativos en el medio ambiente, en la salud de seres humanos y otros hospederos, la utilización de extractos de plantas y aceites esenciales como posibles alternativas de control se considera una herramienta promisoría. Tradicionalmente el uso de plantas para el control de plagas en plantaciones y ectoparásitos en animales es una práctica común en muchas partes del mundo (Nates *et al.*, 1996; Habeeb, 2010). Diferentes investigaciones han evaluado extractos de diferentes plantas, alrededor de 200 especies de plantas con propiedades repelentes o acaricidas han sido estudiadas (Adenubi *et al.*, 2016; Quadros *et al.*, 2020). Algunas de las plantas estudiadas con resultados prometedores incluyen *Ambrosia cumanenses Kunth*, *Brugmasia arborea (L.) Larget*, *Bidens pilosa L.*, *Sambucus nigra L.*, *Nicotiana tabacum L.*, capim limão (*Cymbopogon citratus*), *Verbena officinalis L.*, *Ruta graveolens*, *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus*, *Tagetes patula*, *Tagetes minuta* (Castelblanco Sepúlveda *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2012; Pulido y Cruz, 2013; Terassina *et al.*, 2012; Santos & Voogel, 2012; Sanches Politi *et al.*, 2015; Benelli *et al.*, 2016), los extractos de estas plantas han mostrado efectos acaricidas y ovicidas sobre garrapatas de los géneros *Ixodes*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, incluyendo la especie *R. sanguineus*.

Diferentes investigaciones han tratado de establecer los efectos de algunos acaricidas y extractos de especies vegetales con potencial tóxico en los diferentes sistemas y estructuras de especies del género *Rhipicephalus spp*; Remedio y colaboradores (2014) evaluaron el efecto a nivel morfológico del aceite de la semilla de Nim (*Azadirachta indica A. Juss*) utilizando microscopia de luz, microscopio confocal de barradura a láser y microscopio electrónico de transmisión en ovocitos de hembras semi-ingurgitadas de *R. sanguineus*, observando que los componentes de las semillas de Nim interfieren directamente en el metabolismo y la morfología de los ovocitos, evidenciando señales de desorganización citoplasmática, vacuolización celular, irregularidades a nivel nuclear y nucleolar, dilatación de las crestas mitocondriales, alteración de la matriz

mitocondrial y del retículo endoplasmático rugoso. El efecto de la *permetrina* a nivel ultraestructural en ovocitos de *R. sanguineus* fue analizada con microscopia electrónica de transmisión, encontrándose vacuolización a nivel del citoplasma, ruptura da membrana citoplasmática y membranas internas de los organelos (Roma *et al.*, 2010); en otro estudio fue evaluado el aceite esencial de Andiroba (*Carapa guianensis*) y Permetrina en el sistema nervioso y reproductivo de *R. sanguineus* utilizando microscopia confocal de barradura a láser, donde fueron observados daños a nivel del *synganglion* debido a la perdida de la integridad del material genético (Roma *et al.*, 2013). *Rhipicephalus sanguineus* expuestas a extracto acuoso de hojas de Nim (*Azadirachta indica* A. JUSS) mostró alteraciones morfológicas de tipo dosis-dependiente a nivel de integumento y *synganglion* con aparición de signos de vacuolización, dilatación de uniones celulares, desorganización celular.

Pereira y colaboradores (2017) evaluaron el efecto a nivel de *synganglion* en garrapatas expuestas a diferentes concentraciones de deltametrina mostrando diferentes alteraciones directamente proporcionales al incremento de la dosis. La evaluación del extracto etanólico de *T. patula* sobre la fecundidad y embriogénesis en ovocitos de *R. sanguineus*, mediante análisis microscópico, revelo alteraciones significativas en la estructura de los ovocitos, interfiriendo directamente en la embriogénesis normal impidiendo la formación normal de larvas de *R. sanguineus* (Politi *et al.*, 2015).

Tagetes spp., es un género de plantas nativas de México y otras regiones de clima cálido y temperado del continente americano, siendo tradicionalmente asociadas al control de ectoparásitos (Nates *et al.*, 1996; Pollak- Eltz 2001). Algunas de estas plantas también han sido estudiadas de manera amplia por sus propiedades antioxidantes, en el tratamiento de la tripanosomiasis, en el control de diferentes plagas agrícolas (Baldeón, 2011; Priyanka *et al.*, 2013). Varios han sido los estudios donde se destacan las propiedades biocidas y biostáticos de extractos de *Tagetes spp* en garrapatas *R. sanguineus* y *R. microplus*, entre otras especies, mostrando resultados importantes (García *et al.*, 2012; Nchu *et al.*, 2012).

Diferentes estudios sobre composición química de aceites esenciales de especies del género *Tagetes spp* describen constituyentes volátiles, como monoterpenóides, sesquiterpenos y compuestos aromáticos, evidenciándose que diferentes especies de plantas del mismo género, presentaron diferencias marcadas en cuanto a la composición química (Martínez, 2002). Gil y colaboradores (2013) señalan que el extracto de *T. minuta* causo mortalidad *in vitro* de cerca del 52% en garrapatas *R. microplus*; por su parte da Silva y colaboradores (2016) observaron una eficacia del 100% cuando evaluaron el

aceite esencial de *T. minuta* en larvas, ninfas y adultos de *R. sanguineus*, tanto *in vitro* como *in situ*.

García y colaboradores (2012) evaluaron el efecto acaricida del aceite esencial de *T. minuta* sobre *R. sanguineus*, *R. microplus*, *Amblyomma cajennense* y *Argas miniatus*, en este estudio se verificó que el aceite esencial de *T. minuta* a una concentración del 20% era comparable al efecto de los acaricidas convencionales alcanzando un control efectivo del 95% en el test realizado. La caracterización química del aceite esencial de *T. minuta*, mostró la presencia de componentes de la familia de los terpenoides. Los autores del trabajo mencionan que el sistema octopaminérgico de la garrapata, cuyos receptores controlan y modulan funciones vitales abarcando desde el metabolismo hasta la conducta (Blenau et al., 2012), sería el local de acción de los *monoterpenos*.

Figura 6. Hábitat y características morfológicas de *Tagetes minuta*



Nota explicativa: A Hábitat, B Hojas superficie inferior, C Hojas superficie superior, D Hoja Detalle, E Flor.

Fuente: Gakuubi et al., 2016.

Como se ha indicado previamente y considerando el impacto económico, ambiental y sanitario de *R. sanguineus* además del surgimiento de cepas resistentes a varias sustancias acaricidas, se hace necesario el desarrollo de nuevos métodos de control a partir del análisis detallado del efecto de extractos vegetales sobre la morfología de las diferentes estructuras vitales de la garrapata. Esta clase de estudios contribuyen a la ampliación del acervo de conocimientos sobre el modo de acción de tales sustancias.

1.2. Justificativa

- las observaciones sobre el efecto acaricida de *T. minuta* realizadas por Da Silva y colaboradores (2016) y García y colaboradores (2012), demostraron alta eficiencia de los

aceites esenciales de esta planta en los test de inmersión de garrapatas (test de Drummond) con elevados porcentajes de mortalidad a bajas dosis en poco tiempo;

- la caracterización química del aceite esencial realizada en este último trabajo indica que la mayoría de sus componentes pertenece a la familia de los terpenoides;
- el impacto de *R. sanguineus* en la economía, el medio ambiente y la salud de mascotas, así como la aparición de cepas resistentes a varias sustancias acaricidas, se torna evidente la necesidad de desarrollar nuevas sustancias para el control de ectoparásitos, sustancias menos agresivas al medio ambiente y a las especies no albo;
- el análisis detallado del efecto de los aceites esenciales de *T. minuta* sobre la morfología de los diferentes tejidos de *R. sanguineus* ofrecerá informaciones valiosas que pueden direccionar el desarrollo de nuevas sustancias para su utilización en el control de estos ectoparásitos; e
- este estudio puede reforzar la hipótesis del posible efecto neurotóxico del aceite esencial de *T. Minuta*.

1.3. Hipótesis

El aceite esencial de *T. minuta* posee efecto a bajas concentraciones sobre el tejido nervioso (*synganglion*) de las garrapatas *R. sanguineus*.

2. OBJETIVOS

2.1. General

- evaluar el efecto de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tagetes minuta* sobre la histología del sistema nervioso (*synganglion*) de garrapatas *R. sanguineus* en ayuno.

2.2. Específicos

- determinar si existe un efecto dosis-dependiente según las diferentes concentraciones de aceite esencial de *T. minuta* a ser evaluadas sobre el sistema nervioso (*synganglion*) de garrapatas *R. sanguineus*, teniendo como base apenas las posibles alteraciones morfológicas;

- detectar la presencia de alteraciones morfológicas a nivel nuclear tales como alteraciones en el formato nuclear, en la disposición de la cromatina; alteraciones citoplasmáticas como vacuolización citoplasmática, irregularidades en el contorno celular, pérdida de adhesión celular y retracción citoplasmática en las diferentes regiones que componen el *synganglion*;

- comparar los resultados obtenidos para el aceite esencial de *T. minuta* con el efecto del amitraz sobre el sistema nervioso (*synganglion*) de la garrapata *R. sanguineus*;

- establecer la composición química del aceite esencial de *T. minuta* por medio de cromatografía gaseosa y espectrometría de masas (CG-EM) y comparar los datos disponibles en la literatura en cuanto a la incidencia de factores bióticos y abióticos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Local de desarrollo del estudio

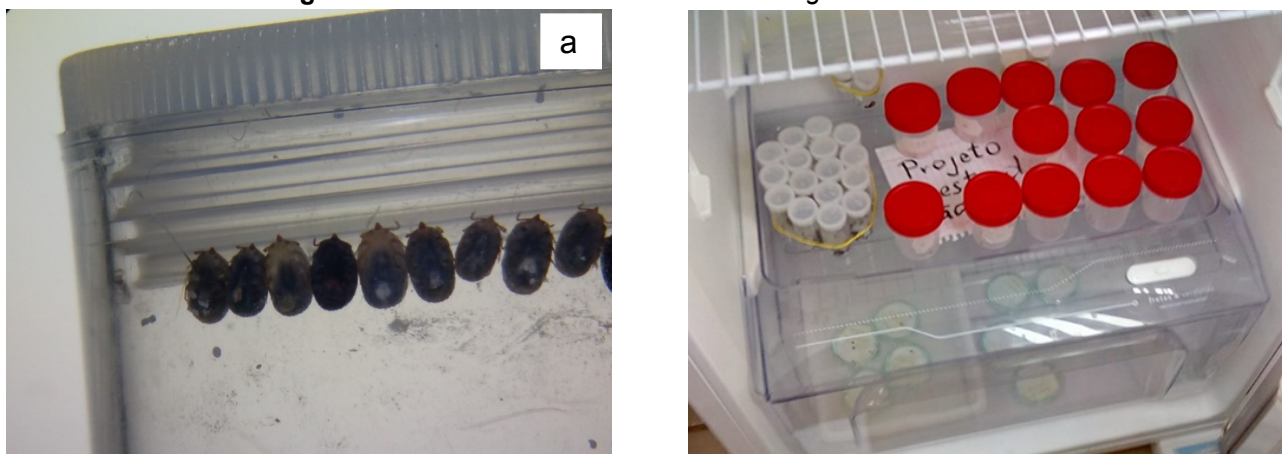
El presente trabajo fue realizado en los siguientes locales: *Laboratório de Microscopia e Biotecnologia aplicada à Saúde* localizado en el *campus Jardim Universitário de la Universidade Federal de integração Latino-americana UNILA*, sala-G003 e en el laboratorio L-008 *DELABEN*, município de *Foz do Iguaçu*, estado Paraná. La extracción de los aceites esenciales por medio de hidrodestilación se realizó en el Laboratorio de Química da *Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)*, Campus de Santa Helena, Paraná. Por su parte el análisis de la composición de los aceites esenciales extraídos fue realizada en el laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales y Sintéticos de la *Universidade de Caixas do Sul* ubicado en el município de Caixas do Sul, estado Rio Grande do Sul. Los cortes histológicos con micrótomo fueron realizados en el laboratorio de histología del departamento de Biociencias de la *Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP)* en la ciudad de Rio Claro, estado de São Paulo.

3.2. Materiales

3.2.1. Obtención de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*

Fueron utilizadas garrapatas *R. sanguineus* adultas en ayuno, las cuales fueron donadas por el profesor Matías Pablo Juan Szabó provenientes de una colonia mantenida en el laboratorio de ixodología de la *Universidade Federal de Uberlândia*, estado de Minas Gerais. Las garrapatas fueron enviadas en estado de ninfa; una vez recibidas en la ciudad de Foz do Iguaçu fueron mantenidas en cámara climatizada *Biochemical Oxygen Demand (B.O.D)* bajo condiciones controladas (25 ± 1 ° C, 80% de humedad con fotoperiodo de 12 horas) hasta completar la muda. Mientras las garrapatas estuvieron en fase de maduración se mantuvieron en la sala 8 del Departamento de Laboratorios de la UNILA.

Figura 7. Mantenimiento de ninfas de *R. sanguineus* en B.O.D.



Nota explicativa: a) Ninfas de *R. sanguineus* en fase de muda. b) Recipientes conteniendo ejemplares de *R. sanguineus* en B.O.D. Laboratorio de enseñanza, UNILA, Foz do Iguaçu.

Fuente: autoría propia.

3.2.2. Colecta y procesamiento de *Tagetes minuta*

Las hojas y tallos de *T. minuta* fueron colectadas en plantaciones de yuca (mandioca), en sectores de la zona periurbana de la ciudad de Foz do Iguaçu. Importante señalar que *T. minuta* crece de manera silvestre entre los cultivos de yuca. Una vez colectada, el material vegetal fue llevado para identificación taxonómica en el laboratorio de botánica localizado en el edificio de las aguas, Parque Tecnológico Itaipu también en el municipio de Foz do Iguaçu. La colecta fue incorporada al acervo del herbario Evaldo Buttura de la UNILA con el código EVB 2359, la imagen y datos se encuentran disponibles online en los sitios [Consulta Pública del Herbário Virtual](#) y [+speciesLink network](#). Fueron realizadas dos colectas en diferente época del año y en diferentes lugares, siendo la primera colecta realizada en el mes de agosto de 2018 en un predio rural vecino al barrio Vila “C” Nova con coordenadas Latitud 25°27’25.35”S, Longitud 54°33’40.99”O, y la segunda colecta entre los meses de marzo y abril de 2019 en una propiedad rural cercano al Ecomuseo Latitud 25°27’25.01”S, Longitud 54°35’7.06”O, ambos emplazamientos se encuentran en el municipio de Foz do Iguaçu.

Antes del proceso de extracción de los aceites esenciales, el material vegetal fue seleccionado y separado en hojas y flores, luego fue secado en estufa por cuatro días a 40 °C. Después el material seco fue enviado para ser extraído en el Laboratorio de Química de la *Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR Campus Santa Helena - PR*. La extracción de los aceites esenciales fue realizada por el método de hidrodestilación utilizando un aparato tipo *Clevenger*, durante 3 horas por cada muestra procesada. En la Tabla 1 se presenta una relación del material vegetal colectado. Al final

del proceso de extracción fueron obtenidos hidrolatos, seguidamente para separar los aceites esenciales de los hidrolatos fue utilizado éter etílico y las fases orgánicas fueron secadas con sulfato de sodio Na_2SO_4 y rotoevaporadas a presión y temperatura reducidas. Los aceites obtenidos fueron almacenados en frascos de vidrio y sellados herméticamente.

Figura 8. Obtención de aceites esenciales



Nota explicativa: a) preparación de material vegetal. b) molinda del material vegetal. c) destilación mediante arrastre en vapor con aparato tipo *Clevenger* y recolección de aceite esencial. Laboratorio de química de la Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena - PR.

Fuente: autoría propia.

3.2.3. Análisis cromatográfico

Las muestras de aceite esencial fueron enviadas para el *Laboratorio De Biotecnología De Productos Naturais e Sintéticos* de la *Universidade Caixas do Sul* para análisis Gases Acoplada a Espectrometría de Masas.

Los análisis en GC-FID fueron realizadas en un cromatógrafo *Hewlett Packard 6890 Series*, equipado con un procesador de datos *HP-Chemstation*, utilizándose una columna HP-Innowax (30 m x 320 μm i.d.) 0,50 μm de espesura de *film* (Hewlett Packard, Palo Alto, USA), temperatura de columna, 60 °C (5 min) para 240 °C a 3°C/min;

temperatura de inyector 250 °C; *split ratio* 1:20, detector de ionización de llama con temperatura de 250 °C; gas de arrastre H₂ (34 kPa), volumen inyectado 1 µL diluido en hexano (1:10).

El análisis de Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas GC/MS fue realizado en un cromatógrafo gaseoso acoplado a detector selectivo de masas *Hewlett Packard 6890/MSD5973*, equipado con *software HP Chemstation* y espectroteca *Wiley 275*. Fue utilizada una columna capilar de sílice fundida *HP-Innowax* (30 m x 250 mm) 0,50 mm espesura de filme (*Hewlett Packard, Palo Alto, USA*). El programa de temperatura utilizando fue el mismo usado en GC-FID: interface 280 °C; *split ratio* 1:20; gas de arrastre *He* (56 kPa); razón de flujo: 1,0 mL/min.; energía de ionización 70 eV; volumen inyectado 1 µL diluido en hexano (1:10).

Los constituyentes de los aceites esenciales fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con aquellos de la biblioteca *Wiley* (GC/MS) e por comparación del índice de retención lineal práctico con datos de la literatura (*Nist*). El índice de retención lineal fue calculado a través de la ecuación de Van den Dool y Krats, utilizándose una solución patrón de hidrocarburos C7 a C30.

3.3. Métodos

3.3.1. Preparación de diluciones de aceite esencial de *T. minuta*

El aceite esencial extraído de hojas de *T. minuta* se diluyó en concentraciones de 1.25%, 2.5%, 5%, 10% y 20% en *tween 20* al 2% y agua destilada, adaptando la metodología descrita por García *et al.*, (2012). Para el caso del Amitraz al 12.5%, se diluyó la mitad de la concentración recomendada en agua destilada.

Las diluciones fueron realizadas mezclando el aceite esencial el cual había sido almacenado a bajas temperaturas y protegido de la luz solar en frascos de vidrio. Fue seleccionada la muestra 7 (PD7) la cual fue extraída de hojas de *T. minuta* colectada en agosto de 2018. Se preparó una cantidad de 1 ml para cada solución a evaluar, para la solubilización del aceite fueron utilizadas micropipetas de 100 y 1000 µL para medir con precisión la cantidad de aceite esencial, *tween 20* al 2% y agua destilada necesarias para cada test. En la Tabla 1 se presenta una relación de las diferentes medidas utilizadas durante la solubilización del aceite.

Tabla 1. Diluciones de aceite esencial *T. minuta* muestra PD7

Concentracion (%)	Aceite esencial μL	Tween 20 μL	H2O destilada μL
1.25	12.5	20	967,5
2.5	25	20	955
5	50	20	930
10	100	20	880
20	200	20	780

Fuente: autoría propia.

Figura 9. Dilución de muestra de aceite esencial de *T. minuta* PD7

Nota explicativa: a) aceite esencial de *T. minuta* en contenedores herméticos utilizados para almacenamiento; b) material utilizado para preparar diluciones de *T. minuta*. Laboratorio de investigación UNILA.

Fuente: autoría propia.

Las garrapatas *R. sanguineus* fueron distribuidas en seis grupos experimentales denominados de acuerdo con la sustancia a ser evaluada y al porcentaje de dilución del extracto de *T. minuta* de la siguiente forma: Grupo I (1.25%), Grupo II (2.5%), Grupo III (5%), Grupo IV (10%) y grupo V (20%). También fueron incluidos como Grupo control negativo Tween 20 al 2% y como grupo control positivo amitraz al 12.5% (usando la mitad de la dosis). Las garrapatas fueron expuestas a diferentes concentraciones del extracto de *T. minuta* a través del test de inmersión de adultos o Test de Drummond (Drummond, 1973). Para cada ensayo fueron necesarias 10 garrapatas por grupo de tratamiento, además el experimento fue realizado en duplicata. Un total de 140 garrapatas fueron usadas en el ensayo.

Para la realización del experimento fue utilizada la metodología de Drummond (1973) que en este caso consistió en una variación de dicho test, sumergiendo cada garrapata durante 5 segundos en un tubo de microcentrifuga tipo *ependorf* con 1 mL de cada solución a evaluar. Cada garrapata fue sumergida en el tratamiento correspondiente, tras lo cual, las garrapatas eran depositadas en grupos de 10 en cajas petri previamente

rotuladas y acondicionada con papel filtro para secar el exceso de aceite esencial, de esta forma las placas de Petri conteniendo las garrapatas fueron depositadas en cámara climatizada (B.O.D) bajo condiciones controladas (25 ± 1 ° C, 80% de humedad con fotoperiodo de 12 horas), Las garrapatas fueron inspeccionadas transcurridas 12 horas después de cada tratamiento, aquellas garrapatas que no presentaban movimiento y que expuestas al CO₂ (Bocanada de aire) no reaccionaban se descartaban. Individuos que transcurridas 24 horas se encontraban vivos fueron sometidos a disección para extracción del synganglio. Los grupos de tratamiento expuestos a las concentraciones de 1.25 % y 2.5 % de aceite esencial, Tween 20 al 2% fueron disecados a partir de 24 y hasta 48 horas después de haberse expuesto a los tratamientos, en el caso del amitraz algunos individuos fueron disecados a partir de 24 horas post tratamiento y hasta transcurridas 72 horas. El grupo expuesto a la concentración de *T. minuta* al 5 % mostro un efecto más considerable por lo cual todos los individuos fueron disecados en menos de 36 horas.

Figura 10. Test de inmersión de garrapatas, modificación del Test de Drummond. Laboratorio de enseñanza UNILA



Fuente: autoría propia.

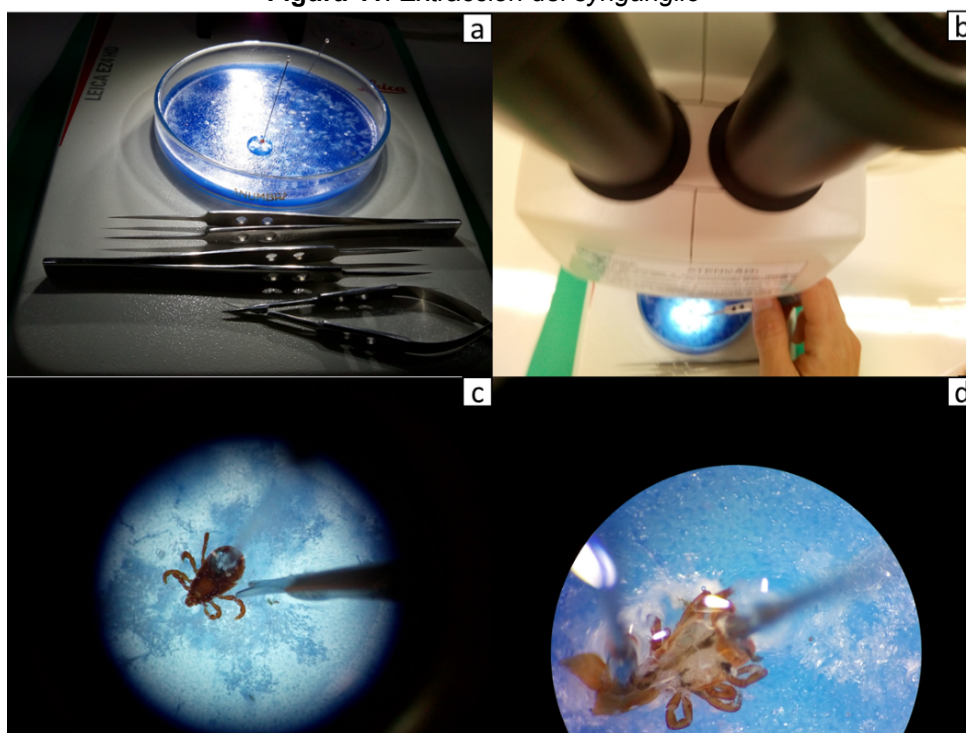
3.3.3. Histología

Las garrapatas colectadas fueron disecadas bajo estereomicroscopio *Leica EZ4* en placas de Petri conteniendo solución tampón fosfato-salino (PBS: NaCl 0.13M, Na₂HPO₄ 0.017M, KH₂PO₄ 0.02M, pH 7.2), para la remoción del *synganglion*.

Para la realización del análisis histológico, el *synganglion* fue fijado en paraformaldeído al 4% durante 48 horas. En seguida, el material fue transferido para una solución tampón de fosfato de sodio donde permaneció por 24 horas. El material fue deshidratado en series crecientes de alcohol etílico a 70%, 80%, 90% e 95% e 100% (baños de 30 minutos cada uno). Posteriormente, el material fue embebido en resina (Historesina Leica) durante 48 horas y luego incluido en moldes plásticos conteniendo resina más polimerizador por 5 días en estufa a 40°C, una vez solidificados, los bloques

de resina conteniendo las muestras de tejido fueron almacenados en recipientes plásticos con abundante gel de sílice granulada para el exceso de humedad de los bloques; posteriormente los bloques fueron llevados al laboratorio de histología del departamento de Biociencias de la *UNESP* en la ciudad de Rio Claro estado de São Paulo donde fueron seccionados en cortes con espesor de tres micrómetros los cuales fueron colocados sobre láminas de vidrio. Las láminas conteniendo las secciones fueron teñidas con hematoxilina por cinco minutos, tras lo cual fueron lavadas por cinco minutos en agua corriente, a continuación, fueron teñidas con eosina acuosa durante cinco minutos y lavadas nuevamente en agua corriente. Después fueron secadas al aire libre en soportes de madera, posteriormente las láminas fueron cubiertas con bálsamo Canadá y lamínula. A continuación, las láminas obtenidas fueron examinadas y fotografiadas en microscopio de luz *Zeiss* – modelo: *PrimoTech*, con camera *AXION Cam*.

Figura 11. Extracción del *synganglio*



Nota explicativa: a) instrumental para disección. b) estereoscopio. c) inmovilización e incisión lateral sobre el escudo de la garrapata. d) Escisión del escudo, visualización y extracción de *synganglion*. Laboratorio de Investigación Universidade Federal de Integração Latinoamericana.

Fuente: autoría propia.

4. RESULTADOS

4.1. Composición química de aceite esencial de *Tagete minuta*

Se obtuvieron 7 muestras de aceite esencial del total del material vegetal procesado, las cuales fueron remitidas al Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Caxias do Sul, para analizar su composición mediante CG/SM. La Tabla 3 refiere informaciones correspondientes al material vegetal procesado para la obtención de aceite esencial de *T. minuta* mediante la técnica de arrastre a vapor con aparato tipo *clevenger* además de informaciones sobre el peso del material vegetal, el rendimiento de cada muestra y el volumen final obtenido. Las tablas 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a los resultados del análisis cromatográfico, la composición de cada aceite esencial junto con los datos de Índice de retención lineal (LRI) calculado y el Índice de retención lineal reportado en la literatura para cada compuesto. La tabla 7 corresponde a la relación de los compuestos obtenidos de las muestras procesadas y que son organizados para ofrecer una comparación de la proporción de los diferentes compuestos mayoritarios y minoritarios obtenidos. La tabla 8 corresponde a la fórmula, estructura molecular y clasificación de los compuestos terpenoides encontrados, así como algunas referencias bibliográficas donde tales compuestos han sido evaluados como agentes insecticidas/acaricidas y repelentes.

Tabla 2. Datos de material vegetal colectado y Muestras de aceite esencial de *Tagetes minuta* obtenidas

CODIGO	PESO MATERIAL VEGETAL	PARTE VEGETAL	FECHA COLECTA	PESO MUESTRA	REDIMIEN-TO	ml (aproximado)
PD2	277,41 g	Flor	17/08/2018	1,6031 g	0,57%	3 ml
PD3	155,8 g	Hoja	17/08/2018	2,9265 g	1,87%	3,6 ml
PD6	181,73 g	Hoja	20/03/2019	1,2701 g	0,68%	1 ml
PD7	139,47 g	Hoja	03/04/2019	1,4703 g	1,05%	1ml
PD8	365,57 g	Hoja	19/03/2019	2,3839 g	0,65%	2ml

Fuente: autoría propia.

Tabla 3. Composición de aceite esencial de flores de *T. minuta* muestra PD2 Flor

Compuesto identificado	LRI calculado	LRI literatura	Porcentaje relativo (%)
<i>β-pineno</i>	1109	1110	0,21
<i>β-felandreno</i>	1121	1168	0,23
<i>Eucaliptol</i>	1206	1211	0,64
<i>(Z)-β-ocimeno</i>	1240	1235	33,05
<i>(E)-β-ocimeno</i>	1252	1250	0,32
<i>o-cimeno</i>	1313	1310	19,14
<i>Allo-ocimeno</i>	1372	1368	0,37
<i>(E)-tagetona</i>	1492	1501	0,97
<i>(Z)-tagetona</i>	1513	1517	13,24
<i>β-cubebano</i>	1530	1542	0,04
<i>(Z)-cariofileno</i>	1585	1588	1,27
<i>α-humuleno</i>	1655	1667	0,05
<i>(L)-α-terpineol</i>	1690	1690	0,11
<i>germacreno D</i>	1696	1708	0,06
<i>Verbenona</i>	1707	1720	7,24
<i>δ-cadineno</i>	1744	1764	0,06
<i>Espatulenol</i>	2104	2126	0,62

Fuente: autoría propia.

Fueron identificados un total de 17 compuestos que totalizaron 77,64% de la composición de la muestra de aceite esencial de flor de *T. minuta*.

Tabla 4. Composición de aceite esencial de hojas de *T. minuta* muestra PD3 Hoja

Compuesto identificado	LRI calculado	LRI literatura	Porcentaje relativo (%)
<i>Eucaliptol</i>	1206	1211	0,57
<i>(Z)-β-ocimeno</i>	1236	1235	6,63
<i>o-cimeno</i>	1311	1310	50,99
<i>(E)-tagetona</i>	1491	1501	0,90
<i>(Z)-tagetona</i>	1510	1517	15,69
<i>(Z)-cariofileno</i>	1583	1588	0,15
<i>germacreno-D</i>	1693	1708	0,09
<i>Verbenona</i>	1703	1720	3,39
<i>Espatulenol</i>	2103	2126	0,22

Fuente: autoría propia.

En la muestra PD3 de aceite esencial de hojas de *T. minuta* fueron identificados 9 compuestos que totalizaron el 78,62% de la composición del aceite esencial.

Tabla 5. Composición de aceite esencial de hojas de *T. minuta* muestra PD6 Hoja

Compuesto identificado	LRI calculado	LRI literatura	Porcentaje relativo (%)
<i>Eucaliptol</i>	1203	1211	0,37
<i>(Z)-β-ocimeno</i>	1233	1235	15,64
<i>o-cimeno</i>	1307	1310	34,14
<i>(E)-tagetona</i>	1487	1501	0,96
<i>(Z)-tagetona</i>	1506	1517	11,40
<i>(Z)-cariofileno</i>	1579	1588	1,80
<i>Verbenona</i>	1698	1699	6,57

<i>σ-cadineno</i>	1740	1749	0,08
<i>trans-β-ionona</i>	1917	1917	0,15
<i>óxido de cariofileno</i>	1953	1986	0,34
<i>Espatulenol</i>	2099	2126	0,37
<i>Eugenol</i>	2145	2143	0,13
<i>α-cadinol</i>	2205	2230	0,01

Fuente: autoría propia.

En la muestra PD6 correspondiente a hojas de *T. minuta* fueron identificados 13 compuestos que totalizaron un total de 71,96% de la composición de la respectiva muestra de aceite esencial.

Tabla 6. Composición de aceite esencial de hojas de *T. minuta* muestra PD7 Hoja

Compuesto identificado	LRI calculado	LRI literatura	Porcentaje relativo (%)
<i>β-pineno</i>	1118	1118	0,22
<i>Eucaliptol</i>	1203	1211	0,29
<i>(Z)-β-ocimeno</i>	1235	1235	15,66
<i>o-cimeno</i>	1311	1310	45,49
<i>(E)-tagetona</i>	1488	1501	1,02
<i>(Z)-tagetona</i>	1507	1517	11,94
<i>(Z)-cariofileno</i>	1580	1588	1,19
<i>Verbenona</i>	1700	1699	5,31
<i>σ-cadineno</i>	1742	1749	0,14
<i>trans-β-ionona</i>	1920	1917	0,07
<i>óxido de cariofileno</i>	1956	1986	0,30
<i>Espatulenol</i>	2102	2126	0,16
<i>Eugenol</i>	2148	2143	0,07

Fuente: autoría propia.

La muestra PD7 presento un total de 13 compuestos los cuales representan un total del 81,86% de la composición del aceite esencial de *T. minuta*.

Tabla 7. Composición de aceite esencial de hojas de *T. minuta* muestra PD8 Hoja

Compuesto identificado	LRI calculado	LRI literatura	Porcentaje relativo (%)
<i>Eucaliptol</i>	1203	1211	0,17
<i>(Z)-β-ocimeno</i>	1235	1235	8,56
<i>o-cimeno</i>	1311	1310	28,80
<i>(Z)-alloocimeno</i>	1369	1366	0,99
<i>(E)-tagetona</i>	1488	1501	2,04
<i>(Z)-tagetona</i>	1507	1517	9,18
<i>(Z)-cariofileno</i>	1581	1588	1,55
<i>Verbenona</i>	1699	1699	2,83
<i>σ-cadineno</i>	1742	1749	0,49
<i>trans-β-ionona</i>	1919	1917	0,33
<i>óxido de cariofileno</i>	1956	1986	0,11
<i>Espatulenol</i>	2103	2126	0,83
<i>Eugenol</i>	2149	2143	0,28
<i>α-cadinol</i>	2209	2219	0,11

Fuente: autoría propia.

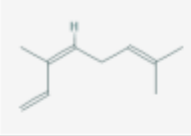
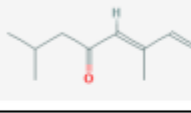
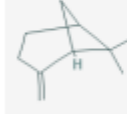
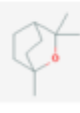
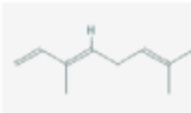
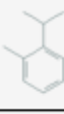
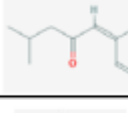
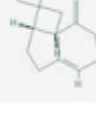
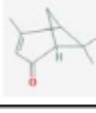
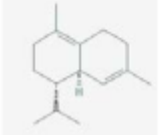
Fueron identificados 14 compuestos que totalizan 56,28% de la composición del aceite esencial.

Tabla 8. Proporción relativa de cada componente encontrado en aceite esencial de *T. minuta* de acuerdo al análisis cromatográfico

Composición	Porcentaje relativo (%)				
	PD2 / flor	PD3 / hojas	PD6 / hojas	PD7 / hojas	PD8 / hojas
<i>β-pineno</i>	0,21			0,22	
<i>β-felandreno</i>	0,23				
<i>Eucaliptol</i>	0,64	0,57	0,37	0,29	0,17
(Z)-β-ocimeno	33,05	6,63	15,64	15,66	8,56
<i>(E)-β-ocimeno</i>	0,32				
o-cimeno	19,14	50,99	34,14	45,49	28,8
<i>Allo-ocimeno</i>	0,37				0,99
<i>(E)-tagetona</i>	0,97	0,9	0,96	1,02	2,04
(Z)-tagetona	13,24	15,69	11,4	11,94	9,18
<i>β-cubebeno</i>	0,04				
<i>(Z)-cariofileno</i>	1,27	0,15	1,8	1,19	1,55
<i>α-humuleno</i>	0,05				
<i>(L)-α-terpineol</i>	0,11				
<i>germacreno D</i>	0,06	0,09			
Verbenona	7,24	3,39	6,57	5,31	2,83
<i>δ-cadineno</i>	0,06		0,08	0,14	0,49
<i>Espatulenol</i>	0,62	0,22	0,37	0,16	0,83
<i>trans-β-ionona</i>			0,15	0,07	0,33
<i>óxido de cariofileno</i>			0,34	0,3	0,11
Eugenol			0,13	0,07	0,28
<i>α-cadinol</i>			0,01		0,11


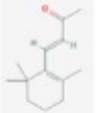

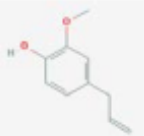
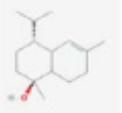
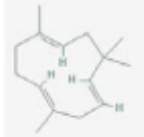
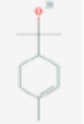
Fuente: autoría propia.

Cuadro 1. Formula, estructura molecular, clasificación y referencias de algunos compuestos terpenoides identificados en el análisis por cromatografía de gases de aceite esencial de *T. minuta*

COMPUESTO	CLASE DE COMPUESTO	ESTRUCTURA MOLECULAR	REFERENCIA*
(Z)-BETA-OCIMENE C ₁₀ H ₁₆	monoterpeno aciclico		Adekunle et al., 2017; Govindarajan & Benelli., 2016; Hùe et al., 2014; Souto et al., 2012; Ayoub et al., 2018; Ammar et al., 2020
(E)-tagetone C ₁₀ H ₁₆ O	cetona insaturada		
β -pineno C ₁₀ H ₁₆	Monoterpenoide biciclico		Souto et al., 2012; Ayoub et al., 2018; Ammar et al., 2020
Eucaliptol C ₁₀ H ₁₈ O	Monoterpenoide éter ciclico		Ayoub et al., 2018
(E)- β -ocimeno C ₁₀ H ₁₆	monoterpenoide aciclico		
o-cimeno C ₁₀ H ₁₄	monoterpenoide aromático		Ayoub et al., 2018
(Z)-tagetona C ₁₀ H ₁₆ O	cetona insaturada		
(Z)-cariofileno C ₁₅ H ₂₄	sesquiterpeno biciclico		
Verbenona C ₁₀ H ₁₄ O	Monoterpeno cetona biciclico		Hieu et al., 2012
δ -cadineno	sesquiterpenoide biciclico		Ammar et al., 2020

Fuente: autoría propia.

Cuadro 1. (Continuación) Fórmula, estructura molecular, clasificación y referencias de algunos compuestos terpenoides identificados en el análisis por cromatografía de gases de aceite esencial de *T. minuta*

Espatulenol C ₁₅ H ₂₄ O	sesquiterpenoid tricíclico		You et al., 2015;
trans-β-ionona C ₁₃ H ₂₀ O	sesquiterpenoides		
óxido de cariofileno C ₁₅ H ₂₄ O	epoxide		You et al., 2015;
Eugenol C ₁₀ H ₁₂ O ₂	metoxyfenoles		Huang et al., 2002
α-cadinol C ₁₅ H ₂₆ O	cadinane sesquiterpenoides		(Hsu et al., 2016)
α-humuleno C ₁₅ H ₂₄	sesquiterpeno monocíclico		Ayoub et al., 2018; Benelli et al., 2018
(L)-α-terpineol C ₁₀ H ₁₈ O	monoterpeno de alcohol		Hieu et al., 2012; Ammar et al., 2020

Fuente: autoría propia.

4.2. Análisis histológico hematoxilina-eosina

La evaluación histológica del *synganglion* de *R. sanguineus* reveló la presencia de importantes alteraciones en las diferentes estructuras que conforman el *synganglion*, evidenciándose un efecto más notorio a medida que se incrementó la concentración del aceite de *T. minuta*; así mismo el amitraz presentó un marcado efecto con signos evidentes de toxicidad en el *synganglion*. Es posible que las diferentes concentraciones evaluadas de *T. minuta* hayan provocado alteraciones a nivel celular de tipo reversible e irreversible, que podrían estar asociadas a la muerte de las garrapatas.

De acuerdo a como se indicó en la metodología garrapatas adultas *R. sanguineus* en estado de ayuno fueron expuestas a las diferentes concentraciones y mantenidas bajo

observación, de manera que aquellos individuos expuestos a concentraciones de Tween 20 al 2%, Amitraz 12,5%, 1,25 y 2,5 % de aceite esencial de *T. minuta* fueron diseccionadas a partir de las 24 horas y no superando las 48 horas post tratamiento; los individuos expuestos a la concentración de 5% de aceite esencial fueron disecados transcurridas 24 horas no superando las 36 horas post tratamiento debido al efecto agudo de dicha concentración. Se verifico si las garrapatas se encontraban vivas expirando aire sobre ellas y frotándolas con la punta de un pincel de manera suave, si estas permanecían inmóviles después de varios intentos, entonces se consideraban muertas, esto considerando que debido a la función del órgano de Haller las garrapatas son sensibles al dióxido de carbono (CO₂) expirado (Carr & Salgado, 2019) y que en condiciones normales las garrapatas se mueven con avidez ante la presencia de una fuente de CO₂. El tratamiento al 5% de aceite esencial de *T. minuta* causó un efecto considerable transcurridas 12 horas después del test, observándose alteraciones bastante notorias en la motricidad como letargo y ausencia de movimientos en la mayoría de las garrapatas.

En el caso de las concentraciones al 10 y 20 %, después de 12 horas de la aplicación de los test se observó que el total de las garrapatas habían muerto. Esta situación fue observada en la duplicata del test, en estos casos se descartó el análisis histológico. Para el caso del tratamiento con Amitraz el cual fue aplicado usando solo la mitad de la dosis considerando que la dosis indicada para el producto, es la dosis letal para garrapatas no resistentes al amitraz, por consiguiente, en el presente estudio fue utilizada una concentración subletal de Amitraz al 12.5%.

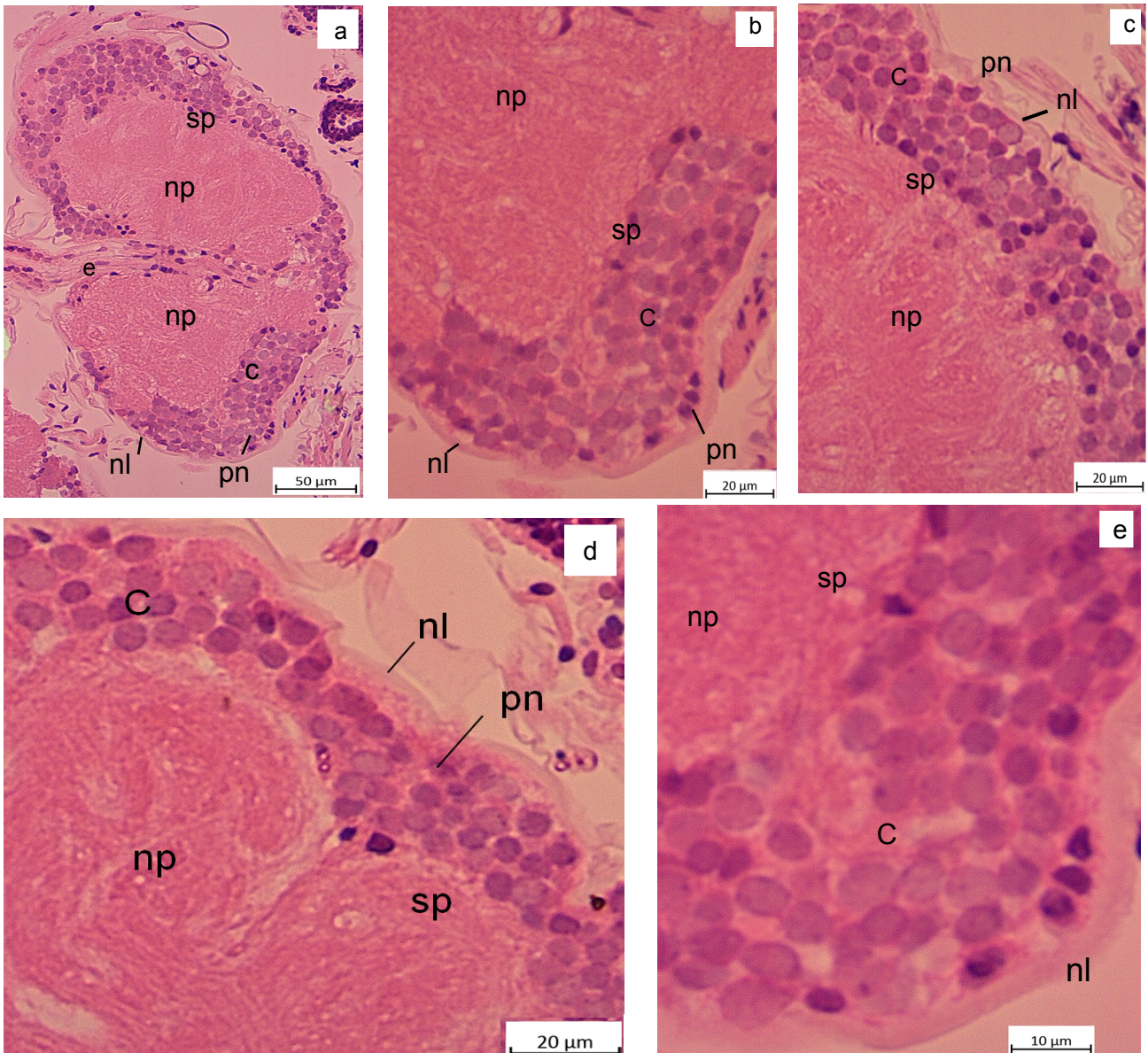
4.2.1. Grupo control Tween 20 aL 2%

Para el grupo control con Tween 20 al 2% fue posible observar la estructura normal del *synganglion* de *R. sanguineus* sin alteraciones evidentes (Figura 12 a-g). Fue posible observar la estructura del *synganglion* de acuerdo a las descripciones mencionadas en la parte introductoria.

Para este caso en particular pese a que en general la morfología de esta región se encontraba en mayor medida intacta fue posible observar algunos signos de lesión celular circunscrito a algunos cuerpos celulares los cuales evidencian leve alteración de la cromatina. En general la región cortical se encuentra bien conservada (Figura 12. e y g). El núcleo fibroso central o neuropilo conformado por el conjunto de fibras o axones de las neuronas presentes en la región cortical se encuentra bien preservado. Las dos regiones, *córtex* y *neuropilo* se encuentran subdivididas por el *subperineurium*, este a su vez está

conformado por células gliales, que para este caso se encontraron en condición íntegra, así mismo la región del neuropilo no presentó ninguna alteración evidente (Figura 12. a-e).

Figura 12. Sección histológica de Singanglio de *Rhipicephalus sanguineus* en ayuno teñidas con Hematoxilina eosina



Nota explicativa: Grupo 1 – control Tween 20 al 2%. a, b, c visión general. d, e y f visión detallada. *neurilema* (nl); *perineurium* (pn); *córtex* (c); *neuropilo* (np).

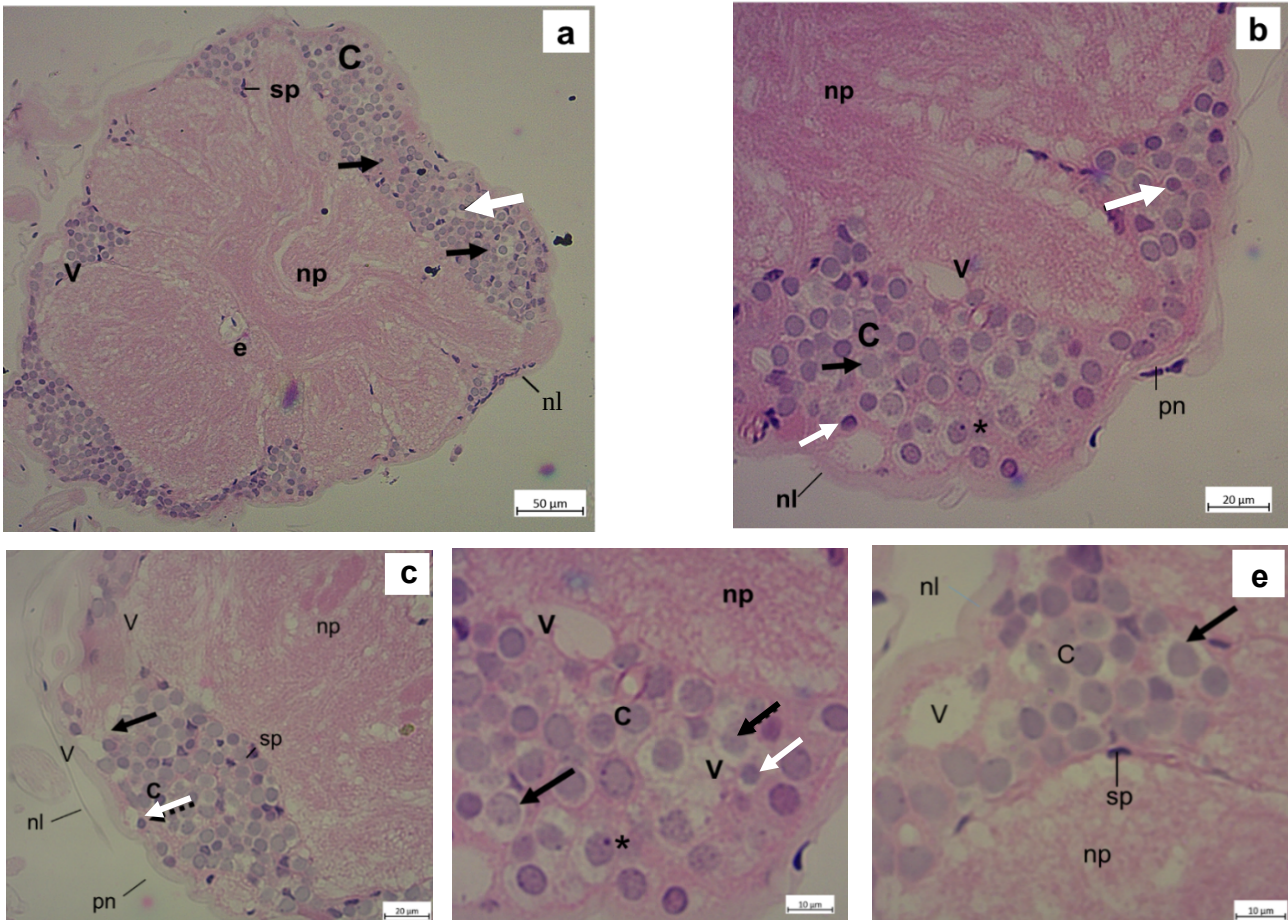
Fuente: autoría propia.

4.2.2. Grupo control amitraz

Previo a la disección del *synganglion* las garrapatas presentaron signos de descoordinación y letargo, algunas comenzaron a morir 24 horas después de la exposición al *Amitraz*. Se encontraron diferentes alteraciones en los cortes observados (Figura 13. a-e); la *lámina neural* o *neurilema* no presentó alteración alguna, pero a nivel

del *perineurium* es posible identificar algunas células con signos de *picnosis* (Figura 13. d). En la región cortical subyacente al *perineurium* se evidenciaron áreas de vacuolización donde se observa una discontinuidad entre el *perineurium* y la región cortical contigua (Figura 13. c y e). Fue posible observar cuerpos celulares con pérdida de contorno, y vacuolización en el área circundante, así como células con fragmentación o condensación de cromatina, estas alteraciones se observaron de manera difusa en la región cortical (Figura 13. a-e). A nivel del *subperineurium* contiguo al *neuropilo* se observó una importante pérdida del contorno del tejido con amplias áreas de vacuolización (Figura 13. c, d y e), así mismo se encontró una pérdida de continuidad a nivel del *neuropilo* y amplias áreas de desorganización estructural (Figura 13. a-d y e).

Figura 13. Sección histológica de *synganglion* de *R. sanguineus* en ayuno teñidas con hematoxilina eosina



Nota explicativa: Grupo 1 – control con Amitraz 12.5. a, b, c y d visión general. e y f visión detallada. *neurilema* (nl); *perineurium* (pn); *córtex* (c); *neuropilo* (np). *cariorrexis* núcleo con inicio de marginación cromática (*). Vacuolización, (v); Tumefacción celular (*flecha negra*). condensación de cromatina (*flecha blanca*).

Fuente: autoría propia.

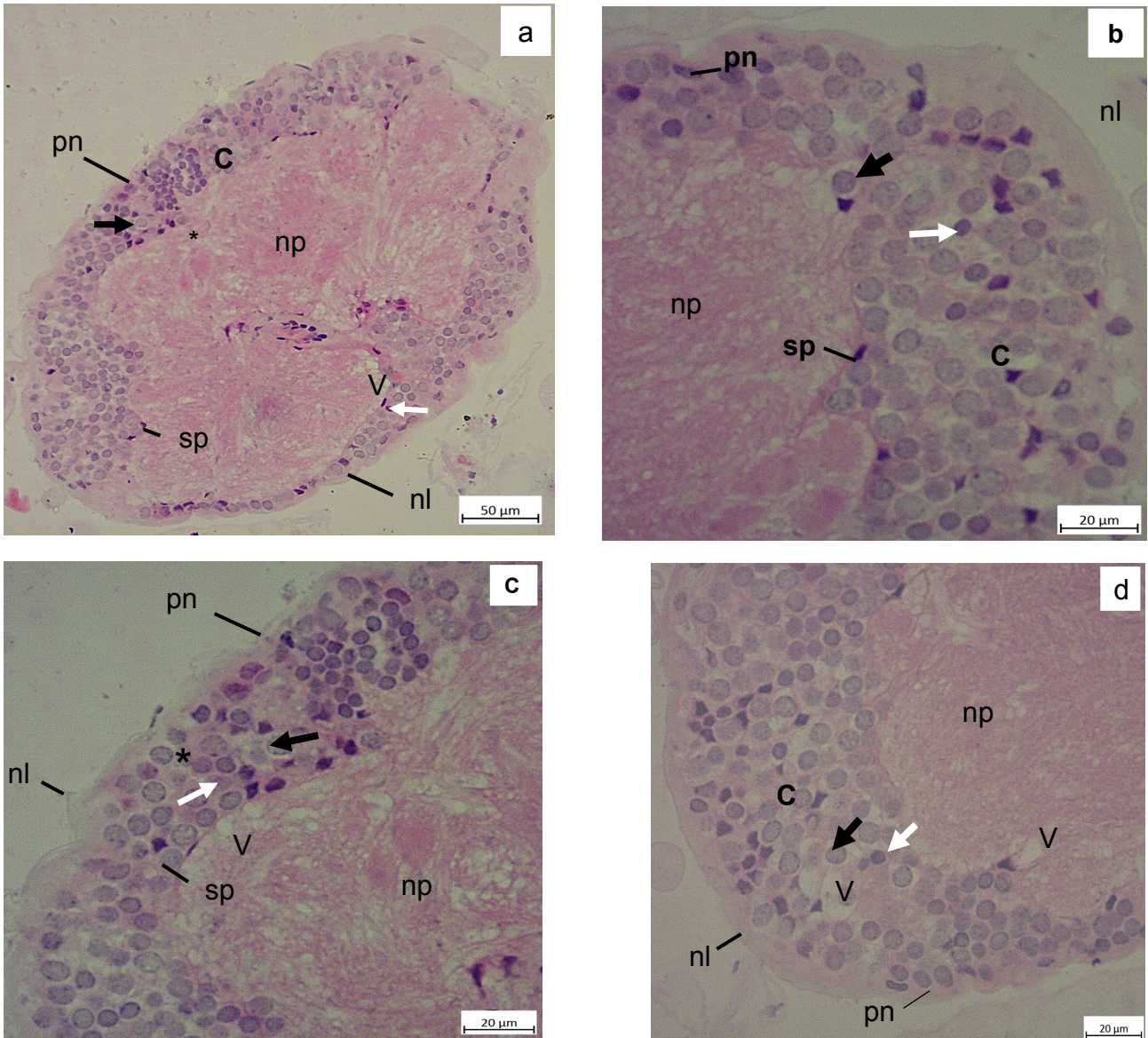
4.2.3. Grupo tratamiento *T. minuta* 1.25 %

A una concentración de 1.25% de aceite esencial de *T. minuta* fue posible observar alteraciones considerables, aunque en general el tejido conserva su estructura normal (Figura 14. a – d). El *neurilema* no presentó alteración, sin embargo, a nivel del *perineurium* se evidenció la formación de vacuolas distribuidas intermitentemente (Figura 14. c y d). En la región cortical fue posible observar la aparición de células con pérdida de contorno e incremento de volumen citoplasmático, también fue posible encontrar núcleos con alteración cromática, signos de picnosis o estadio inicial de marginación de cromatina, células con incremento de tamaño y pérdida de contorno, se observan áreas de vacuolización circunscritas a células en estado de tumefacción o degeneración hidrópica (Figura 14. c y d). En la región del *neuropilo* subyacente al *subperineurium* se observaron áreas de vacuolización, donde se evidencia una desorganización generalizada (Figura 14. a-f).

4.2.4. Grupo tratamiento *T. minuta* 2.5 %

El *neurilema* no presenta alteración evidente, aunque es posible observar ciertas corrugaciones. A nivel del *subperineurium* se evidencian áreas de vacuolización con un desprendimiento evidente de la corteza (Figura 15 a-D). Se observaron núcleos con alteración nuclear, y cuerpos celulares con incremento de volumen y pérdida de contorno; también es posible identificar células con condensación de cromatina; entre la región cortical y el *neuropilo* se observó un área de degeneración vacuolar, no obstante, la estructura general del *synganglion* aún se conserva, son evidentes signos de lesión celular similares a los observados en *synganglion* expuesto a concentraciones de 1.25%.

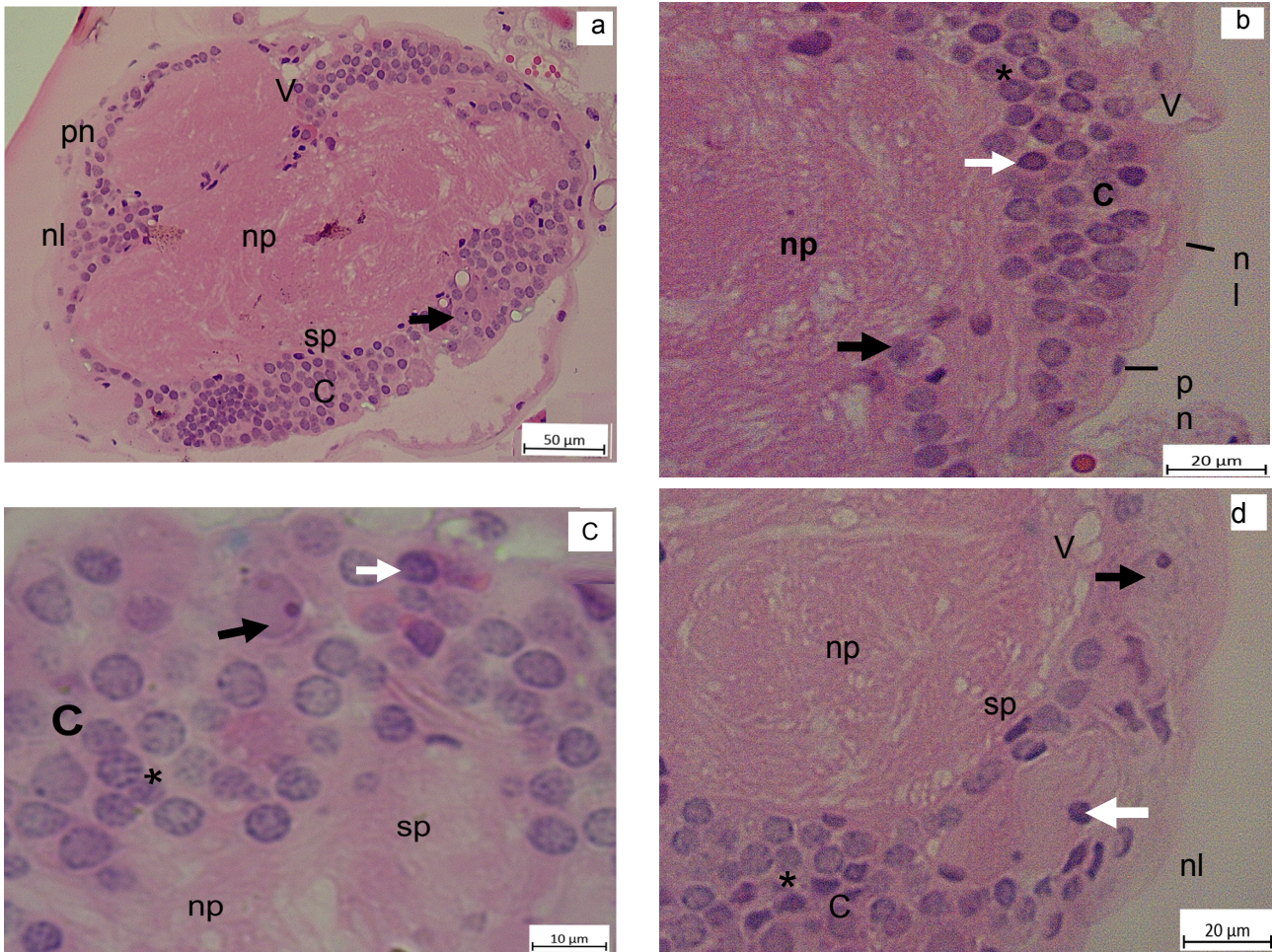
Figura 14. Sección histológica de *synganglion* de *Rhipicephalus sanguineus* en ayuno teñidas con hematoxilina eosina



Nota explicativa: Grupo 3 – Tratamiento con aceite esencial de *T. minuta* 1.25%. a visión general. b, c y d, visión detallada. *neurilema* (nl); *perineurium* (pn); *córtex* (c); *neuropilo* (np). *Cariorexix* (*) inicio de marginación de la cromatina. Tumefacción celular (flecha negra). condensación de cromatina (flecha blanca). Imágenes del autor.

Fuente: autoría propia.

Figura 15. Sección histológica de *synganglion* de *Rhipicephalus sanguineus* en ayuno teñidas con Hematoxilina eosina



Nota explicativa: Grupo 4 – Tratamiento con aceite de *T. minuta* 2.5%. a, visión general, b, c y d visión detallada. *lamella neural* (nl); *perineurium* (pn); *córtex* (c); *neuropilo* (np); *subperineurium* (sp); *cariorrexis* (*). Vacuolización (V); (flecha negra), tumefacción celular; (Flecha blanca) condensación de la cromatina.

Fuente: autoría propia.

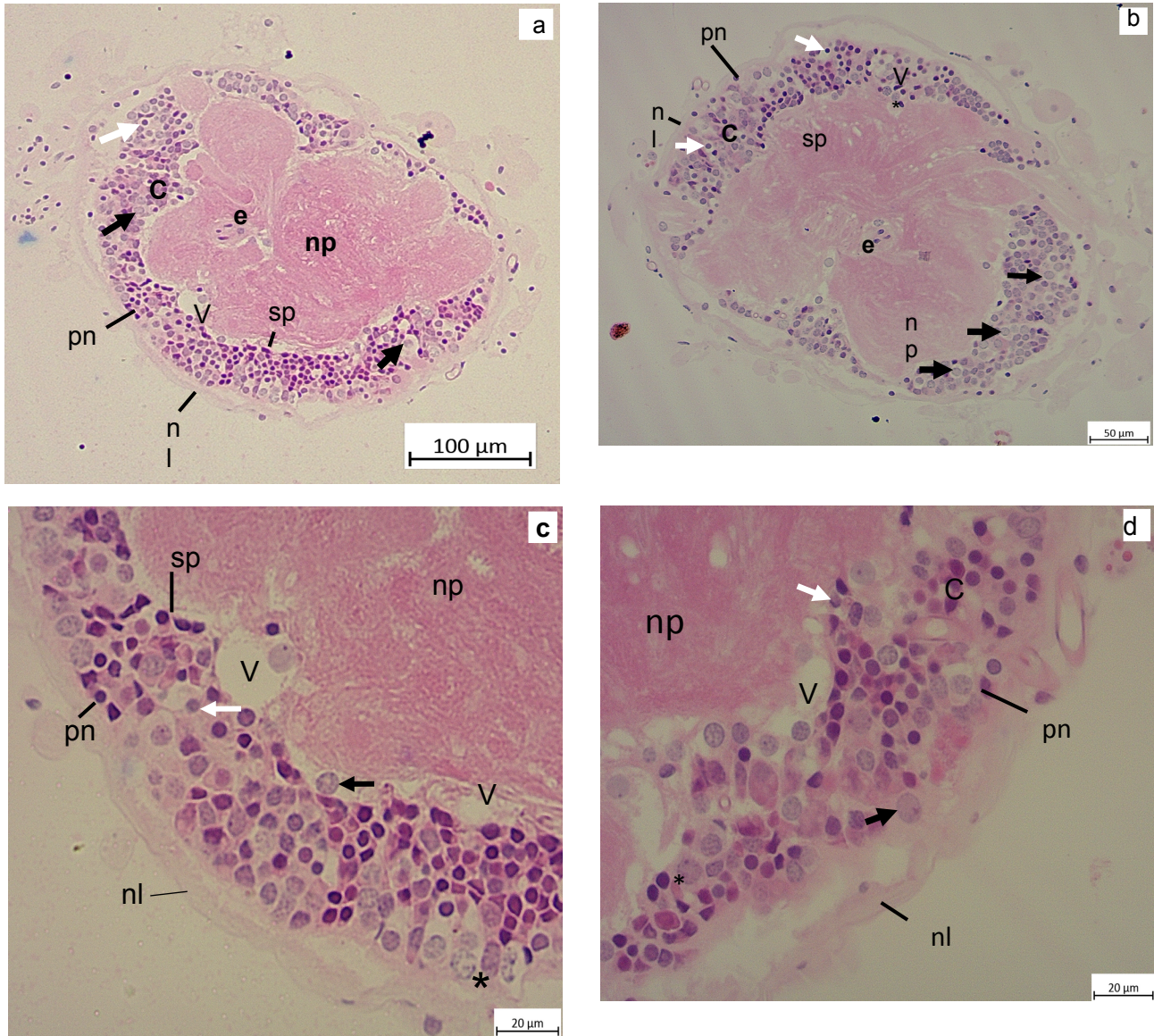
4.2.5 Grupo tratado con *T. minuta* 5%

El neurilema presentó pliegues y apariencia irregular, en algunas secciones fue posible observar el desprendimiento del *perineurium* (Figura 16 a-d); a su vez el *subperineurium* evidencia un grado considerable de desprendimiento con respecto al *córtex*, aparentemente esta lesión es una continuación del desprendimiento del neurilema.

El grado de alteración en la región cortical es considerable observándose un número importante de células con pérdida de contorno, incremento de tamaño, vacuolización, así mismo es notorio el número de células con condensación, marginación y fragmentación de la cromatina (Figura 16 c y d). Hay una alta incidencia de células con alteraciones en el borde contiguo al *perineurium* (Figura 16 c y d). De igual forma se observa a nivel del *subperineurium* células con aumento de volumen y alteración de la cromatina, así como conformación de vacuolas diseminadas entre el *subperineurium* y el

neuropilo, es evidente un grado considerable de desprendimiento de la continuidad entre el *subperineurium* y el *neuropilo*. A nivel del neuropilo se observa una marcada desorganización estructural (Figura 16 a-d).

Figura 16. Sección histológica de *Synganglion* de *Rhipicephalus sanguineus* en ayuno teñidas con ematoxilina eosina



Nota explicativa: Grupo 5 – Tratamiento con aceite de *T. minuta* 5%. a, b, c y d visión general, e y f, visión detallada. *lamella neural* (nl); *perineurium* (pn); C, *córtex* (c); *subperineurium* (sp); *neuropilo* (np). *cariorraxis*, (*), vacuolización (v) tumefacción celular (Flecha negra) condensación de cromatina (Flecha blanca).

Fuente: autoría propia.

4.2.6. Grupo tratamiento *T. minuta* 10% y 20%

Debido a que las concentraciones del aceite esencial de *T. minuta* al 10% y 20% causaron la muerte del total de las garrapatas en menos de 12 horas no fue posible realizar la extracción del *synganglion*.

Cuadro 2. Resumen de las principales alteraciones encontradas en cortes de *synganglion* de *Rhipicephalus sanguineus* en ayuno expuestas a diferentes concentraciones de *T. minuta*, amitraz, Tween 20 al 2%

Sustancia / concentración	neurilema	Perineurium	córtex	Subperineurium	neuropilo
Tween 20 2%	Intacto	Intacto	Algunos cuerpos celulares con indicios de alteración cromática	Intacto	Intacto
Amitraz (12.5%/2)	Intacto	Células con alteración cromática (picnosis)	Áreas de vacuolización en región contigua al subperineurium, células con pérdida de contorno y tumefacción, vacuolización, células con alteraciones cromáticas evidentes, condensación, fragmentación, marginación de cromatina	Regiones de vacuolización en el área contigua al neuropilo	Pérdida de continuidad con respecto al subperineurium, áreas de desorganización estructural
<i>T. minuta</i> 1.25%	Intacto	Formación de vacuolas distribuidas de manera intermitente	Cuerpos celulares con manifestaciones de alteración cromática, se observan algunos cuerpos celulares con pérdida de contorno e incremento de volumen, presencia de áreas de vacuolización contigua a células con alteración de volumen.	En la región del subperineurium contigua al neuropilo se observa la formación de una área de vacuolización	Desorganización estructural
<i>T. minuta</i> 2.5%	Intacto	Presencia de vacuolas distribuidas de manera intermitente	cuerpos celulares con incremento de volumen y condensación de cromatina, cuerpos celulares con marcada alteración de la cromatina	Áreas de vacuolización contigua al neuropilo	Desorganización estructural
<i>T. minuta</i> 5%	Pliegues y apariencia irregular	Pérdida de continuidad con respecto al neurilema	Numerosas células con pérdida de contorno e incremento del tamaño, alteraciones en cromatina (picnosis, marginación y fragmentación nuclear), áreas de vacuolización circunscritas a los cuerpos celulares con degeneración hidropica y condensación o fragmentación de la cromatina	Vacuolización diseminada en el borde que limita el córtex del subperineurium, presencia de células gliales con degeneración hidropica y formación de vacuolas alrededor	Desorganización estructural y presencia de vacuolas

Fuente: autoría propia.

5. DISCUSION

Diferentes aceites esenciales y extractos vegetales han sido estudiados con el objetivo de encontrar alternativas eficientes para el control de diferentes especies de garrapata. Hay abundante evidencia del valor potencial de los aceites esenciales como agentes de control en un amplio número de especies de ectoparásitos en particular piojos, ácaros y garrapatas. La toxicidad de estos compuestos ha sido demostrada mediante pruebas de inmersión o Test de Drummond (Drummond et al., 1973) o pruebas de contacto con superficies impregnadas, así como exposición al vapor de estos aceites esenciales, lo último sugiere que el modo de acción de los aceites esenciales podría ser de tipo neurotóxico y no de tipo mecánico al desencadenar asfixia consecuencia de la densidad del aceite esencial (Ellse & Wall., 2013). Algunos de estos trabajos han buscado determinar por medio de técnicas de microscopia el efecto de sustancias sintéticas y de origen vegetal en diferentes tejidos de *R. sanguineus* evidenciándose alteraciones morfológicas en distintas estructuras evaluadas (Matos et al., 2018; Pereira et al., 2017; Roma et al., 2010; Roma et al., 2012; Roma et al., 2013a; Roma et al., 2013b; Remedio et al., 2014; Araujo., 2012). De importante consideración, fue la contribución hecha por campesinos del departamento de Santander en el oriente colombiano quienes mencionaron sobre la utilización de plantas del genero *Tagetes* spp. como método de control tradicional de algunos ectoparásitos. Por otra parte el aceite esencial de *T. minuta* ha demostrado actividad acaricida contra diferentes especies de garrapata constituyéndose en una oportunidad para el desarrollo de nuevos acaricidas (García et al., 2012; Da Silva et al., 2016; França et al., 2017), por consiguiente, es necesario ampliar el acervo de conocimientos con respecto a los efectos tóxicos del aceite esencial de *T. minuta* sobre los diferentes tejidos de *R. sanguineus*, que puedan contribuir a ampliar el conocimiento sobre el modo de acción de tales sustancias en órganos clave para el control de ectoparásitos como pueden ser el sistema nervioso central, sistema reproductivo, respiratorio entre otros. El presente estudio analizo el efecto de tres concentraciones del aceite esencial de *T. minuta* sobre el *synganglion* de garrapatas *R. sanguineus* adultas en ayuno, así mismo como parte del diseño experimental las garrapatas se expusieron a Twen 20 al 2 %, el cual fue el medio de dilución de los aceites esenciales de *T. minuta*; conjuntamente se incluyó el amitraz como grupo control positivo debido a la similaridad del mecanismo de acción descrito para compuestos de la familia de las amidinas y el mecanismo de acción propuesto para algunos terpenoides

encontrados en el aceite esencial de diferentes plantas los cuales involucran el sistema octopaminérgico (Gross, 2014; Kostyukovsky et al., 2002 & Kita et al., 2016).

Adicionalmente fue analizada la composición del aceite esencial de *T. minuta* con el objetivo de corroborar los hallazgos reportados por otros autores y comprender mejor sus posibles efectos tóxicos. Los resultados encontrados en el análisis CG/MS muestra variaciones considerables en las 5 muestras de aceite esencial evaluadas, diferentes factores pudieron haber incidido en los resultados encontrados, algunas variaciones en la composición del aceite pueden ser debidas al tipo de material vegetal utilizado en la extracción, es decir hojas o flores. En el presente análisis el aceite esencial de flor (PD2) contiene (*E*)- β -ocimeno, *Allo-ocimeno*, β -cubebeno, α -humuleno y (*L*)- α -terpineol compuestos que no fueron encontrados en las otras muestras analizadas.

Así mismo el lugar y la fecha de recolección pudieron incidir sobre la composición de las diferentes muestras, Morais (2009) señala el efecto de factores abióticos en la composición de aceites esenciales y que en el presente caso pudieron haber dado cuenta de los resultados encontrados. La ubicación geográfica influyo de manera sutil en el tenor de los compuestos mayoritarios y minoritarios; variaciones en la composición del aceite esencial con respecto a la ubicación geográfica fueron reportas por Saheli y colaboradores (2018). A este respecto Gobbo-Neto & Lopes (2007) sugieren que diferentes son los factores que pueden influir en la composición del aceite esencial de una planta, como pueden ser hora de recolección, estacionalidad y fase de desarrollo, temperatura y radiación ultravioleta son también factores a considerar.

En términos generales se obtuvieron un total de 21 compuestos, de los cuales *Eucaliptol*, (*Z*)- β -ocimeno, *o-cimeno*, (*E*)-*tagetona*, (*Z*)-*tagetona*, (*Z*)-*cariofileno*, *Verbenona*, *Espatuleno* se encontraron presentes en las 5 muestras analizadas. Independientemente del tipo de material vegetal, sitio y fecha de colecta los compuestos mayoritarios encontrados siempre fueron (*Z*)- β -ocimeno, *o-cimeno*, (*Z*)-*tagetona*, *Verbenona*, siendo los dos primeros compuestos los que se encontraron en mayor proporción con respecto al total de los componentes. Gil y colaboradores (2000) identificaron 28 compuestos en aceite esencial de *T. minuta* de muestras recolectadas en diferentes regiones de La Argentina, encontrando *dihidrotagetona*, *alfa-felandreno*, *limoneno*, *o-cimeno*, así como isómeros de *b-ocimeno*, *tagetona* y *tagetenona*; según los mismo autores, han sido identificados diferentes grupos o “clusters” de acuerdo a la predominancia de determinados componentes, lo cual es considerado como una variación química intraespecifica también reportado en otras especies. Motazedian y colaboradores (2014) analizaron la composición del aceite esencial de *T. minuta* encontrando que *Limoneno* (13.0%), *Piperitenona* (12.2%), α -Terpi-

neol (11%), *z-ocimenona* (5.1%), *Docosane* (5.0%), *Z-Tagetona* (5.7%), *Tricosane* (4.2%), *Verbenona* (3.7%), y óxido de *Cariofileno* (3%) fueron los principales componentes encontrados. Andreotti y colaboradores (2013) encontraron como constituyentes mayoritarios de *T. minuta*, *dihidrotagetona* (54.10%) *limoneno* (6.96%), *tagetona* (6.73%) y *(E)- β -ocimeno* (5.11%) los cuales presentaron actividad acaricida contra larvas, ninfas y adultos de *R. sanguineus*. Nchu y colaboradores (2012) señalan que *cis-ocimeno* (28.50%), *beta-ocimene* (16.83%) y *3-methyl-2-(2-methyl-2-butenyl)-furan* (11.94%) fueron los compuestos mayoritarios. García y colaboradores (2012) reportaron *Limoneno* (6,96%), *B-Ocimeno* (5,11%), *Dihidrotagetona* (54,21%) y *Tagetona* (6.73%) como compuestos mayoritarios. Kaul y colaboradores (2005) evaluaron la composición del aceite esencial de frutos de *T. minuta* encontrando un total de 24 compuestos los cuales representan el 93.7% de aceite esencial analizado, en el citado estudio los compuestos mayoritarios fueron limoneno y *beta-felandreno* (4.7%), *(Z)- β -ocimeno* (36.8%), *dihidrotagetona*, *(E)- β -ocimeno* (15.5%), *(Z)-tagetona* (17.1%), *(Z)-tagetenona* (3.0%) y *(E)-tagetenona* (7.5%) evidenciándose un contraste importante con respecto al presente estudio; los autores identificaron compuestos no reportados en el presente estudio tanto en aceite esencial de flores como de hojas. Al compararse el tenor de los compuestos mayoritarios reportados en el estudio citado con los del presente trabajo es posible identificar similitudes y variaciones para el caso del compuesto *(Z)- β -ocimeno*, el porcentaje se aproxima en ambos casos, de manera similar sucede con *(Z)-tagetona*; *E- β -ocimeno* en este estudio se encuentra en cantidades reducidas; una situación similar se observa para el caso de *(E)-tagetona*. *Ocimeno* el cual está presente en cantidad considerable en nuestro estudio, no fue reportado en el trabajo citado.

Es evidente la variación cualitativa y cuantitativa en la composición del aceite esencial de *T. minuta*. Variaciones en la composición del aceite esencial de plantas de la misma especie pueden ser resultado de diferentes quimiotipos, que son a su vez resultado de variaciones biológicas relativas al efecto de factores como suelo, temperatura, condiciones climáticas, cantidad de luz entre otros (Gabuuki *et al.*, 2016). Morais (2009) refiere que, si bien la composición química de los aceites esenciales está determinada por factores genéticos, otros factores pueden dar lugar a cambios en la producción de metabolitos secundarios, en ese sentido, los metabolitos secundarios de la planta pueden ser considerados como una interface entre planta y medio ambiente, los estímulos del entorno en el que se encuentra la planta, pueden afectar las rutas metabólicas influyendo la biosíntesis de diferentes compuestos. Destacan como tales factores las interacciones planta/microorganismo, planta/insecto y planta/planta; edad y

etapa de desarrollo, factores abióticos como la luminosidad, la temperatura, la lluvia, la nutrición, además de hora y la fecha de la recolección, así como la técnica de cosecha y post-cosecha.

Según las estructuras de los compuestos detectados en el presente estudio mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, los compuestos encontrados se clasifican como terpenos, cuya estructura está conformada por unidades de isopreno, la cual consiste en hidrocarburos de 5 carbonos. Los monoterpenoides son aquellos compuestos conformados por 2 unidades de *isopreno*, es decir su estructura molecular está conformada por 10 carbonos (Tabla 8), como son el caso de los compuestos (*Z*)-*beta*-*ocimene*, (*E*)-*tagetone*, *β-pineno*, *Eucaliptol*, (*E*)-*β-ocimeno*, *o-cimeno*, (*Z*)-*tagetona*, *eugenol*, (*L*)-*α-terpineol*, que corresponden a la mayoría de los compuestos identificados, de otra parte aquellos terpenos conformados por tres unidades de isopreno o 15 unidades de carbono son denominados sesquiterpenos (Peerven, 2018) como es el caso de los compuestos (*Z*)-*cariofileno*, *δ-cadineno*, *Espatuleno*, *trans-β-ionona*, *óxido de cariofileno*. Los terpenos abarcan una gran variedad de sustancias de origen vegetal y su importancia ecológica como defensivo está bien establecida (Viegas, 2003).

Ayoub y colaboradores (2018) evaluaron la composición química de tres especies del género *Thymus* así como el efecto insecticida sobre *Sitophilus oryzae* el cual transcurridos 5 días presentó alta mortalidad, en este estudio fue posible encontrar algunos compuestos terpenoides como *β-Pineno*, *o-Cimeno*, *Eucalyptol*, *α-humuleno*, *E-β-Ocimeno*, *Germacreno D*, *óxido de cariofileno* que también fueron reportados en aceite esencial de *T. minuta*. Hieu y colaboradores (2012) evaluaron aceite esencial de *Zanthoxylum ssp* sobre la mosca de los establos *Stomoxys calcitrans*, encontrándose un potente efecto tóxico, en tal caso fue posible determinar el efecto inhibitorio de la acetilcolinesterasa *AChE* en algunos de tales compuestos. Dentro de los compuestos terpenoides que presentaron un importante efecto tóxico está la verbenona, presente también en aceite esencial de *T. minuta*; *α-terpineol* fue uno de los compuestos con efecto inhibitorio de la *AChE* y también reportado en *T. minuta*. La evaluación de fracciones del extracto oleoso de *Chamaecyparis formosensis* mostró actividad antitermitica importante; de los compuestos aislados en el aceite esencial analizado *α-cadinol* presentó un efecto considerable similar al de productos sintéticos como *fipronil* (Hsu *et al.*, 2016). En otro estudio donde se evaluó aceite esencial de *Artemisia campestris*, se encontraron compuestos como *β-pineno*, *α-pineno*, *mirceno*, *germacreno D*, (*Z*)-*β-ocimeno* este extracto presenta un perfil químico similar al encontrado en aceite esencial de *T. minuta*; los autores encontraron que el aceite esencial de *A. campestris* presentó considerable

toxicidad contra el mosquito *Culex quinquefasciatus* y moderada toxicidad contra *Musca domestica*. Similarmente, aceite esencial de *Pulicaria arábica* y *Saccocalyx satureioides* cuya composición cuenta con compuestos como *epi- α -cadinol*, *δ -cadineno*, *α -cadinol* y *germacrene D-4-ol* y *timol*, *α -terpineol*, *borneol* y *p-cimeno* respectivamente, algunos de los cuales también presentes en *T. minuta*, fueron más activos contra la polilla agrícola *Spodoptera littoralis* (Ammar *et al.*, 2020). Huang y colaboradores (2002) evaluaron el efecto de *Eugenol*, *Isoeugenol* y *metileugenol* los cuales mostraron toxicidad contra *Sitophilus zeamais* con una LD₅₀ aproximada de 30 μ g/mg. Los mismos compuestos fueron evaluados contra *Tribolium castaneum*, que en orden de potencia según la LD50 fueron *isoeugenol*>*eugenol*>*methyleugenol*, si bien el *Eugenol* se encontró en cantidades menores en *T. minuta*, la toxicidad comprobada del *Eugenol* en insectos puede haber contribuido al efecto tóxico reportado aquí. Adekunle y colaboradores (2007) confirmaron el efecto nematocida de *dihidrotagetona* y *(Z)- β -ocimeno*, compuestos que fueron aislados en aceite esencial de *T. minuta*. De los compuestos referidos por el autor solamente fue corroborada la presencia de *(Z)- β -ocimeno* en el análisis cromatográfico realizado en el presente estudio. El efecto insecticida de *(Z)- β -ocimeno* también ha sido comprobado de manera individual en seis especies de mosquito *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, y *Culex tritaeniorhynchus* (Govindarajan & Benelli., 2016). Hüe y colaboradores (2014) evaluaron el efecto acaricida de *(Z)- β -ocimeno* a una concentración del 2% sobre *R. microplus* no encontrando un efecto destacable; son necesarios otros estudios para determinar un posible efecto acaricida. Souto y colaboradores (2012) evaluaron las propiedades insecticidas de aceite esencial de *Piper spp.* en hormigas *Solenopsis saevissima* encontrando resultados promisorios. Algunos compuestos encontrados en el aceite esencial de *Piper spp.* se encontraron en *T. minuta* como *(Z)- β -ocimeno*, *β -pineno* y *eugenol*, sin embargo los autores atribuyen las propiedades insecticidas a otros compuestos mayoritarios no encontrados en *T. minuta*.

Si bien la toxicidad y repelencia de aceites esenciales de plantas y sus componentes terpenoides han sido reconocidas, el mecanismo de acción de tales componentes aún no ha sido comprendido completamente, especialmente en garrapatas (Gross *et al.*, 2017). Aunque poco es sabido sobre el mecanismo de acción individual de cada compuesto, la evidencia indica que el efecto de la mayoría de los compuestos difiere en su modo de acción (Viegas, 2003; Quadros *et al.*, 2020). Los monoterpenoides son un diverso grupo de compuestos cuyo modo de acción puede no estar representado por un único mecanismo (Grodnitzky & Coats, 2002). Según Pavela & Benelli (2016), un

mecanismo de acción común se basa en la capacidad de los componentes de los aceites esenciales para degradar la pared celular y la membrana citoplasmática de bacterias y hongos, conllevando a lisis y pérdida de contenido intracelular, también ha sido informado el incremento de la absorción del fosforo inorgánico y la pérdida de K^+ intracelular lo cual puede causar alteraciones estructurales en la membrana plasmática, tales cambios superficiales son suficientes para inducir el proceso de muerte celular; los mismos autores señalan que en términos generales los mecanismos de acción más comunes de los aceites esenciales son la inhibición de la citocromo P450, ligación a receptores *GABA*, inhibición del sistema colinérgico y modulación del sistema octopaminérgico. Cardoso y colaboradores (2020) señala que la inhibición de la acetilcolinesterasa puede ser el mecanismo principal asociado al efecto de algunos terpenoides sobre *R. microplus*. De otra parte, Ali y colaboradores (2014) reportaron el efecto citotóxico de aceite esencial de *T. minuta* sobre células de tumor mamario línea *MCF-7*, el cual mostro actividad citotóxica moderada, los autores plantean que un posible efecto sinérgico entre los diferentes compuestos encontrados en el aceite esencial debe ser considerado para explicar este efecto citotóxico. Por su parte Palazzo y colaboradores (2009) señala que β -Ocimene, (*E*)-cariofileno y germacrane *D* presentan actividad citotóxica in vitro sobre células de tumor mamario línea MDA-MB-231.

De acuerdo con Gross y colaboradores (2014) la mixtura de los diferentes componentes presentes en un aceite esencial podría acoplarse de manera competitiva a receptores de octopamina y tiramina asociados a proteínas G; otro modo de acción propuesto es la inhibición de la enzima monooxidasa derivando en un efecto neurotóxico asociado al incremento de adenosin monofosfato cíclico (*cAMP*); Yussefi y colaboradores (2019) mencionan también la posibilidad de que exista un efecto sinérgico. Sin embargo, otros podrían ser los mecanismos de acción involucrados en el efecto tóxico de componentes de *T. minuta*, como el evidenciado para el caso de timol y carvacrol los cuales interactúan inhibiendo la acetilcolinesterasa en *R. microplus* (Cardoso *et al.*, 2020). Por tanto, el repertorio de mecanismos de acción posibles para la amplia gama de componentes de *T. minuta* puede ser igualmente variado. Kostyukovsky y colaboradores (2002) evaluaron la actividad de dos constituyentes aislados de aceites esenciales, *ZP-51* Y *SEM-76*, los cuales mostraron una acción inhibitoria de la acetilcolinesterasa a dosis altas, sugiriendo que la acetilcolinesterasa no es el principal sitio de acción de tales componentes, estos a su vez causaron un incremento significativo de los niveles de *cAMP*, tales incrementos se asemejan a los inducidos por octopamina planteando la posibilidad de que estos componentes puedan actuar a nivel de receptores

octopaminérgicos. Los resultados obtenidos por Enan (2001) refuerzan la hipótesis del efecto neurotóxico de compuestos terpenoides a nivel del sistema octopaminérgico, en el citado caso se evaluó el efecto de tres componentes terpenoides eugenol, α -terpineol y alcohol de cinamilo sobre *Periplaneta americana*, de acuerdo a los datos obtenidos en cuanto a frecuencia cardíaca y producción de *cAMP* y al bloqueo de la actividad de los receptores de la octopamina sugieren que estos receptores pueden ser considerados como un objetivo primario para los componentes evaluados. La naturaleza hidrofóbica de los aceites esenciales, los cuales podrían ejercer de manera simultánea un efecto mecánico en el parasito bien obstruyendo el área de los espiráculos conllevado a muerte por estrés hídrico o sofocación como sugiere Burgess (2009) podría ser considerado otro mecanismo de acción involucrado en las lesiones observadas en el presente estudio, si se considera que la consecuente hipoxia es uno de los mecanismos desencadenantes del proceso de muerte celular.

Los hallazgos histológicos reportados aquí sugieren un efecto dosis dependiente de *synganglion* expuesto a las diferentes concentraciones de *T. minuta*, cortes de *synganglion* de individuos del grupo control no mostraron alteraciones considerables, correspondiendo con la estructura normal del *synganglion* de *R. sanguineus* descrita por Roma y colaboradores (2012) así como por otros autores que confirmaron hallazgos similares Pereira *et al.*, 2017; Matos *et al.*, 2018). Sin embargo, para el caso del grupo tratado con amitraz a dosis subletales y diferentes diluciones de aceite esencial de *T. minuta*, el *synganglion* mostro alteraciones graduales en su morfología, principalmente en *córtex* y *neuropilo*, estas alteraciones fueron proporcionales al incremento de la concentración del aceite esencial, de forma que, a mayores concentraciones, alteraciones más severas fueron observadas. Individuos tratados con amitraz presentaron alteraciones en casi toda la integridad del *synganglion*, el neurilema se encontró intacto, no siendo el caso para el *perineurum* en donde se observó presencia de vacuolas y cuerpos celulares con alteraciones en la conformación del citoplasma, son evidentes signos de alteración nuclear como condensación, marginación y fragmentación de la cromatina, tales alteraciones a nivel nuclear sugieren lesión celular irreversible (Damjanov, 2009). Contiguamente y de forma similar en la región cortical abundan células con alteraciones evidentes como tumefacción, pérdida de contorno y vacuolización, se observan áreas de vacuolización en la matriz extracelular; alteraciones similares fueron reportadas en *synganglion* de *R. sanguineus* expuesto a diferentes concentraciones de permetrina (Roma *et al.*, 2013 permetrina). Se considera que la vacuolización en el caso de la autofagia es un mecanismo celular para eliminar sustancias tóxicas o estructuras

dañadas, si el efecto lesivo es superior a los mecanismos de detoxificación y reparación de la célula, tales sustancias o la magnitud de las alteraciones conllevaran a lesiones irreversibles y consecuente muerte celular (Roma *et al.*, 2013a; Elmore *et al.*, 2016). Se observó que amitraz causa vacuolización en citoplasma de ovocitos etapa II de *R. annulatus* (Kanapadinchareveetil *et al.*, 2019); así mismo, cultivos celulares de *Ixodes ricinus* expuestos a diferentes dosis de amitraz, permetrina y fipronil, mostraron signos de lesión celular como aumento de desechos extracelulares, pérdida de contorno celular, además de una reducción en la cantidad de células, los cuales son indicios de lesión celular; se sugiere que tales efectos tóxicos *in vitro* pueden ser debidos a estrés oxidativo el cual es un desencadenante del proceso de apoptosis (Mangia *et al.*, 2018). Individuos expuestos a amitraz mostraron áreas de desorganización estructural en neuropilo, presumiblemente debido al efecto de este compuesto en los cuerpos celulares corticales cuyas fibras nerviosas se proyectan y distribuyen en esta región; las alteraciones son más evidentes en la región subyacente al *subperineurm* observándose áreas de vacuolización probablemente debido al efecto directo del amitraz sobre esta región del *neuropilo*. Roma y colaboradores (2013) describieron un patrón de alteración similar en *neuropilo* en individuos expuestos a permetrina. Si bien el efecto del amitraz no está comprendido totalmente, es sabido que, dentro de los efectos de esta sustancia en insectos a nivel molecular se genera un incremento en los niveles de tiramina y octopamina, el amitraz es generalmente clasificado como un agonista del receptor de octopamina e inhibidor de la enzima monoamino oxidasa (Evans & Gee, 1980; Davenport *et al.*, 1985 & Kita *et al.*, 2016). Las formamidinas, como clordimeform (CDM) y amitraz, se consideran profármacos que se convierten metabólicamente en agonistas de los receptores de octopamina (OAR), dimetilclordimeform (DCDM) y N2-(2,4-Dimethylphenyl)-N1-methylformamidine (DPMF) respectivamente. Se ha observado que DPMF eleva los niveles intracelulares de Ca²⁺ en el gusano de la seda *Bombyx mori* aunque ambos amitraz y DPMF actúan potentemente en los receptores de octopamina BmOAR1 y BmOAR2 de *R. microplus*, los cuales elevan los niveles de Ca²⁺ y cAMP respectivamente (Kita *et al.*, 2016). Las alteraciones histológicas observadas en *synganglion* de *R. sanguineus* (*s.l.*) expuesto a amitraz son compatibles al tipo de lesión celular asociada a muerte celular aguda (Elmore *et al.*, 2016). El efecto agonístico del amitraz sobre receptores de octopamina genera un incremento en los niveles de calcio (Ca²⁺) y cAMP citosólicos, lo cual a su vez activa receptores acoplados a proteínas G, como es el caso de receptores octopaminérgicos (Roeder, 1999), lo cual conllevará a la producción de Inositol trifosfato (IP3), liberando Ca²⁺ del retículo endoplasmático (Blenau *et al.*, 2012).

El incremento de Ca^{2+} afecta la célula a debido a su rol predominante en la señalización celular. La lesión celular también puede ser causada directamente por Ca^{2+} el cual induce la activación de hidrolasas, las alteraciones a nivel celular inducidas por Ca^{2+} generalmente son agudas, rápidas y en algunas circunstancias irreversibles (Orrenius *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2006). Es probable que el incremento continuo de cAMP derive en la depleción de las reservas de ATP citosólicas, que a su vez pueden desencadenar el proceso de muerte celular. Se ha evidenciado que ionóforos de calcio inducen apoptosis en condiciones de suministro de ATP, pero en condiciones de agotamiento de ATP desencadenan la muerte celular por necrosis (Eguchi *et al.*, 1997), en tales circunstancias es posible que el amitraz desencadene su efecto lesivo a nivel celular mediante estos dos mecanismos, sin embargo, se requieren estudios más profundos en el área para dilucidar el posible mecanismo del amitraz en componentes celulares de *R. sanguineus*.

Los cortes histológicos de *synganglion* de individuos expuestos a 1.25% y 2.5% de aceite esencial de *T. minuta* mostraron patrones de lesión tisular similares. El *neurilema* no presento alteración evidente, por el contrario, a nivel de *perineurum* se observaron áreas de vacuolización no siendo posible identificar ninguna estructura celular, hallazgos similares fueron reportados por Roma y colaboradores (2013) en individuos expuestos a permetrina, en donde se sugiere que la vacuolización es un intento del tejido por eliminar sustancias tóxicas; por su parte Pereira y colaboradores (2017) mencionaron hallazgos similares en individuos expuesto a deltametrina. *Synganglion* de *R. sanguineus* expuesto a diferentes concentraciones de *Azaridacta indica synganglion*, mostró un patrón de lesión similar al observado en este trabajo (Remedio *et al.*, 2014). Para el presente estudio en la región cortical destacan algunas células con incremento de volumen y pérdida de contorno, condensación y marginación de la cromatina, signos evidentes de un progresivo estado de lesión celular, que a juzgar por los signos correspondería a una lesión celular reversible (Miller & Zachary, 2017); conjuntamente se evidencia un patrón de distribución irregular de la matriz extracelular en la región cortical con presencia de áreas de vacuolización, hallazgos similares son constatados en diferentes trabajos donde se evaluó el efecto de diferentes compuestos sobre *synganglion* de *R. sanguineus* (Roma *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2017; Matos *et al.*, 2018); la vacuolización citoplasmática puede ser considerada como un mecanismo celular para eliminar sustancias toxicas (Roma *et al.*, 2013). El incremento del volumen citoplasmático y vacuolización pueden sugerir alteración funcional de la membrana plasmática al verse alterada su permeabilidad por los efectos de los constituyentes del aceite esencial de *T. minuta*. Es evidente que algunas células de la región cortical se encuentran en avanzado estado de degradación, lo cual sugiere la

posibilidad de que los mecanismos de detoxificación (vacuolización) no son capaces de revertir los efectos de los compuestos tóxicos o eliminar los mismos.

R. sanguineus expuestos a concentraciones de 5% de aceite esencial de *T. minuta* presentaron alteraciones similares a las observadas en garrapatas expuestas a concentraciones de 1.25 y 2.5% del aceite esencial; sin embargo, fue posible apreciar un efecto más drástico en las regiones que conforman el *synganglion*. El neurilema se encontró intacto, pero contiguamente a nivel del *perineurum* se evidencia un desprendimiento de este con respecto al *córtex*, formándose un espacio vacío entre ambas estructuras, inclusive en algunas áreas el *perineurum* no es más visible o presenta alteraciones en su configuración normal. De acuerdo a los resultados observados, es posible que los componentes del aceite esencial de *T. minuta*, afecten la permeabilidad del neurilema permitiendo el contacto de estas sustancias con el interior del *synganglion*, en este caso el área del *perineurum* compuesto mayoritariamente por células gliales, presento importantes indicios de degradación como vacuolización, alteraciones nucleares como *picnosis*. Las células de esta región una vez en contacto con las sustancias del medio exterior pondrán en función mecanismos detoxificantes, si tales mecanismos no logran cumplir tal función, la célula entrará en un proceso de degradación irreversible que conducirá a la muerte celular y posterior degradación. Las áreas vacías observadas probablemente correspondieron a células degradadas y sus detritos luego fagocitados por células contiguas. Remedio y colaboradores (2014) menciona hallazgos similares en *synganglion* de *R. sanguineus* expuesto a aceite esencial de *Azadirachta indica*, probablemente al ser las células que conforman el *perineurum* las primeras en entrar en contacto con sustancias exógenas van a manifestar de manera más drástica sus efectos. De manera similar a lo observado con las concentraciones menores de *T. minuta* hay una notable alteración de gran número de células en la región del *córtex* con respecto a los otros tratamientos, donde es posible identificar células con diferente grado de lesión algunas con incremento de volumen o degeneración hidrópica, lo cual sugiere la ocurrencia de una lesión celular reversible producto de una falla en la bomba de Na^+ y K^+ ; conjuntamente se pueden presentar otro tipo de alteraciones bioquímicas asociadas a una eventual depleción de los niveles de ATP e incremento de Ca^{++} que ulteriormente como se evidencia en este caso puede desencadenar en alteraciones irreversibles a nivel nuclear como *picnosis*, *cariorrexis* y *cariólisis* (Miller & Zachary, 2017); de acuerdo con los hallazgos mencionados es posible sugerir que componentes del aceite esencial de *T. minuta* afectan los mecanismos homeostáticos de la célula. Remedio (2014) describe un patrón de lesión celular asociado a muerte celular por autofagia, aunque solo es posible

constatar la presencia de autofagosomas mediante técnica de microscopía electrónica de transmisión. La vacuolización celular puede ser considerada como un proceso autónomo de la célula diseñado para proteger la célula contra diferentes componentes tóxicos (Aki *et al.*, 2012), a su vez la exposición prolongada a determinados agentes tóxicos y la duración de la resultante vacuolización puede causar daños irreversibles en la célula que determinarían la muerte de la célula, en un escenario probable las vacuolas terminarían por romperse causando la ruptura de la membrana celular (Henics & Wheatley, 1999). Se observó una pérdida de continuidad entre el córtex y el *subperineurium* similar al observado en *synganglion* de garrapatas expuesto a amitraz. Ya a nivel del *neuropile* hay una considerable desorganización estructural con signos de vacuolización, sin embargo, no tan intenso como el observado en el tratamiento con amitraz o el reportado en *synganglion* de garrapatas expuestas a permetrina por Pereira y colaboradores (2017). La alteración estructural observada en el *neuropile* puede estar vinculada a las lesiones observadas a nivel del córtex, debido a que este corresponde a las fibras nerviosas provenientes de los cuerpos celulares emplazados en la región cortical.

6. CONSIDERACIONES FINALES

El aceite esencial de *T. minuta* está constituido en su mayoría por compuestos de la familia de los terpenoides, especialmente monoterpenoides y sesquiterpenoides. En el presente estudio se contabilizó un total de 21 compuestos; del total de compuestos identificados (*Z*)- β -ocimeno, *o*-cimeno, (*Z*)-tagetona y verbenona fueron los compuestos mayoritarios de las 5 muestras evaluadas, los cuales se encontraron en un rango del 49,37 al 78,4% del total del aceite esencial. Se evidenciaron variaciones en la composición del aceite esencial tanto a nivel cualitativo como cuantitativo las cuales están sujetas al influjo de diferentes factores de tipo biótico y abiótico; factores como la época, hora y lugar de recolección pudieron haber incidido de manera considerable en los resultados observados, adicionalmente el tipo de material vegetal hojas o flores, dan cuenta de variaciones importantes. 12 de los compuestos encontrados en el aceite esencial de *T. minuta*, a saber, (*Z*)-beta-ocimene, β -pineno, Eucaliptol, *o*-cimeno, Verbenona, δ -cadineno, Espatulenol, óxido de cariofileno, Eugenol, α -cadinol, (*L*)- α -terpineol han sido identificados como sustancias acaricidas/insecticidas potenciales.

Las diferentes concentraciones de aceite esencial de *T. minuta* evaluadas mostraron efectos tóxicos destacables a nivel de *synganglion*, se observaron alteraciones en la morfología de células de las regiones del *perineurium*, *córtex* y *subperineurium* tales como pérdida de contorno e incremento de volumen, así mismo fue posible observar una desorganización estructural de las fibras nerviosas que conforman el *neuropile*, probablemente consecuencia de daños a nivel de los cuerpos celulares correspondientes en la región de *córtex*; abundan áreas de vacuolización distribuidas en las diferentes regiones que conforman el *synganglion* como por ejemplo la región contigua al *perineurium*, *córtex*, *subperineurium* y *neuropile*, en general tales hallazgos se hacen más notorios a medida que se incrementaron las concentraciones de aceite esencial, la concentración del 5% de *T. minuta* mostro un patrón de lesión similar al observado para el tratamiento control con Amitraz, con respecto al control con Tween 20 al 2% no se evidencias alteraciones considerables más allá de algunas células con alteraciones cromáticas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los indicios del efecto toxico de las diferentes concentraciones de aceite esencial de *T. minuta* evaluadas en el presente estudio, son un primer bosquejo del potencial acaricida/insecticida de esta planta, desde luego son requeridos estudios más amplios con objeto de conocer de manera detallada los efectos del extracto de esta planta sobre diferentes órganos de *R. sanguineus* y otras especies de garrapata de interés comercial y sanitario. El uso de otro tipo de técnicas histológicas e histoquímicas, así como otras técnicas microscópicas permitirán establecer nuevos detalles acerca del mecanismo de acción de los componentes de esta planta en *R. sanguineus*.

Son necesario estudios detallados para determinar la dosis letal del extracto de *T. minuta* así como ensayos para establecer el efecto individual de los diferentes compuestos de *T. minuta*, son necesarios también estudios de relación cuantitativa estructura-actividad de los componentes de *T. minuta* para comprender mejor los efectos de los componentes del *T. minuta* sobre *R. sanguineus* y otros ectoparásitos, así mismo se ameritan estudios de toxicología en mamíferos para determina el margen de seguridad de los componentes del aceite esencial de *T. minuta*.

8. REFERENCIAS

ADENUBI, O. T.; *et al.*. 2016. *Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: a review*. **South African Journal of Botany**, n. 105, p. 178-193.

ADEKUNLE, O. K.; ACHARYA, R., & SINGH, B.. 2007. *Toxicity of pure compounds isolated from Tagetes minuta oil to Meloidogyne incognita*. **Australasian Plant Disease Notes**, n. 2, v. 01, p. 101.

AKI, T.; NARA, A.; UEMURA, K.. 2012. *Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances*. **Cell Biology and Toxicology**, n. 28, v. 03, p. 125-131.

AMMAR, S.; *et al.*. 2020. *Essential oils from three Algerian medicinal plants (Artemisia campestris, Pulicaria arabica and Saccocalyx satureioides) as new botanical insecticides?* **Environmental Science and Pollution Research**, n. 27, p. 26594-26604.

ANDREOTTI, R.; *et al.*. 2013. *Protective action of Tagetes minuta (Asteraceae) essential oil in the control of Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial*. **Vet Parasitol**. n. 197, v. 01-02, p. 341-345.

ALI, N. A.; *et al.*. 2014. *Composition of essential oil from Tagetes minuta and its cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities*. **Natural product communications**, n. 09, v. 02, p. 265-268.

ARAUJO, A. M.. 2012. **Alterações histológicas no intestino de fêmeas de carrapatos Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) expostas a diferentes concentrações de selamectina**. Orientadores: MATHIAS, Maria Izabel Camargo (orientador); FURQUIM, Karim Christina Scopinho (coorientador). 71 f. Dissertação (Mestrado) - PPG-CB (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas), UNESP (Universidade Estadual Paulista), Rio Claro.

ARAUJO, M. J. C.; *et al.*. 2012. *Acaricidal activity and repellency of essential oil from Piper aduncum and its components against Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology**, n. 57, v. 02, p. 139-155.

AYOUB A.; *et al.*. 2018. *Chemical composition and anti-insecticidal activity of the essential oils of Thymus of Morocco: Thymus capitates, Thymus bleicherianus and Thymus satureioides.* **Organic & Medicinal Chem IJ**, n. 03, v. 06, abr., p. 54-59.

BALDEÓN, X. R.. 2011. **Actividad insecticida de los aceites esenciales de *Tagetes minuta*, *Tagetes terniflora* y *Tagetes zipaquirensis* sobre *Premnotrypes vorax*.** 131 f. *Monografía (Graduação) - Curso de Bacharelado em Bioquímica Farmacêutica, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.*

BLENAU, W; RADEMACHER, E & BAUMANN, A.. 2012. *Plant essential oils and formamidines as insecticides/acaricides: what are the molecular targets?*. **Apidologie, Springer Verlag**, n. 43, v. 03, p. 334-347.

BORGES FERREIRA, M. L; *et al.*. 2007. Resistência acaricida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. **Rev. Patol. Trop.**, n. 36, v. 01, jan./abr., p. 87-95.

BECHARA, G. H.. 2013. Introdução. In: CAMARGO, M. I.. 2013. **Guia básico de morfologia de carrapatos Ixodídeos.** São Paulo: UNESP. p. 09-24.

BENELLI, G.; *et al.*. 2018. *Insecticidal activity of camphene, zerumbone and α -humulene from *Cheilocostus speciosus* rhizome essential oil against the Old-World bollworm, *Helicoverpa armigera*.* **Ecotoxicology and environmental safety**, n. 148, p. 781-786.

BENELLI, G.; *et al.*. 2016. *Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases?* **Parasitology Research**, n. 115, v. 07, p. 2545-2560.

BICALHO, K. A; *et al.*. 2001. *In vitro evaluation of the effects of some acaricides on life stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae).* **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 05, oct., p. 548-552.

BOWMAN, D. D; *et al.*. 2011. **Parasitologia para Veterinarios.** Barcelona, España: Elsevier. p. 54-55.

- BURGESS, I. F.. 2009. *The mode of action of dimeticone 4% lotion against head lice, Pediculus capitis*. **BMC Pharmacology**, n. 09, v. 01, p. 03.
- BURRIDGE, M. J.; SIMMONS, L. A.; ALLEN, S. A.. 2003. *Efficacy of acaricides for control of four tick species of agricultural and public health significance in the United States*. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, n. 20, v. 04, out., p. 207-219.
- CASTELBLANCO. S. L.; SANABRIA, O. J.; CRUZ, A.; RODRÍGUEZ, C. E.. 2013. Reporte preliminar del efecto ixodicida de extractos de algunas plantas sobre garrapatas *Boophilus microplus*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, n. 18, v. 01, p. 118-130.
- CARDOSO, A. DOS S.; et al.. 2020. *Terpenes on Rhipicephalus (Boophilus) microplus: acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition*. **Veterinary Parasitology**, n. 280, v. 109090.
- CARR, A. L & SALGADO V. L.. 2019. *Ticks home in on body heat: a new understanding of Haller's organ and repellent action*. **Plos One**, n. 14, v. 08, p. e0221659.
- COLES, T. B.; DRYDEN, M. W.. 2014. *Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats*. **Parasites & Vectors**, n. 07, v. 08.
- CORTÉS, J. A.. 2010. Cambios en la distribución y abundancia de las garrapatas y su relación con el calentamiento global. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, n. 57, ene./abr..
- DA SILVA, E.; et al.. 2016. *Efficacy of Tagetes minuta (Asteraceae) essential oil against Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) on infested dogs and in vitro*. **Experimental & Applied Acarology**, n. 70, v. 04, p. 483-489.
- DANTAS-TORRES, F.. 2008. *The brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control*. **Veterinary Parasitology**, n. 152, v. 03-04, p. 173-185.
- DANTAS-TORRES F.. 2010. *Biology and ecology of the brown dog tick Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, 03, v. 26.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D.. 2012. *Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective*. **Trends in Parasitology**, n. 28, v. 10, p. 437-446.

DAMJANOV, I.. 2009. *Cell pathology*. en *Damjanov, In.: DAMJANOV, I.. 2009. Pathology secrets*. 3. ed.. Philadelphia, United States of America: Mosby Elsevier, p. 07-18.

DAVENPORT, A. P; MORTON, D. B.; EVANS, P. D.. 1985. *The action of formamidines on octopamine receptor in the locust*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n. 24, p. 45-52.

DE LA FUENTE, J.; CONTRERAS, M.. 2015. *Tick vaccines: current status and future directions*. **Expert Review of Vaccines**, n. 14, v. 10, p. 1367-1376.

DONG, Z.; et al.. 2006. *Calcium in cell injury and death*. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, n. 01, v. 01, p. 405-434.

DRUMMOND, R.; et al.. 1973. *Boophilus annulatus and B. microplus: Laboratory Tests of Insecticides*. **Journal of economic entomology**, fev., n. 66, v. 01, p. 130-133.

EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y.. 1997. *Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis*. **Cancer research**, n. 57, v. 10, p. 1835-1840.

EIDEN, L. A; et al.. 2015. *Detection of Permethrin Resistance and Fipronil Tolerance in Rhipicephalus sanguineus (Acari ixodidae) in the United States*. **Journal of Medical Entomology**. n. 52. p. 429-436.

ELLSE, L.; WALL, R.. 2013. *The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review*. **Medical and Veterinary Entomology**, n. 28, v. 03, p. 233-243.

ELMORE, S. A., et al.. 2016. *Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group*. **Toxicologic pathology**, n. 44, v. 02, p. 173-188.

ENAN, E.. 2001. *Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, n. 130, v. 03, p. 325-337.

EVANS, P. D.; GEE, J. D.; 1980. Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. **Nature**, n. 287, v. 5777, p. 60-62.

GUERRERO. F.D; *et al.*. 2014. *Acaricide Reserch and development, resistance, and resistance monitoring*. In: SONENSHINE, E. S.; ROE, R. M.. 2014. **Biology of Ticks**. New York: **Oxford University Press**, v. 02. p. 353-381.

FONTANETTI C. S.; *et al.*. 2010. *Microscopy as a tool in toxicological evaluations*. **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**, p.1001-1007.

FRANÇA, N.. *et al.*. 2017. Atividade *in vitro* de óleo essencial de tagetes minuta em carrapatos bovinos *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. In: **Anais da Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão**. Araquari (SC): IFC.

GAKUUBI, M; *et al.*. 2016. *Bioactive properties of Tagetes minuta L. (Asteraceae) essential oils: a review*. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**. n. 27. p. 27-36.

GARCIA, M. V.; *et al.*. 2012.. *Chemical identification of Tagetes minuta Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n. 21, v. 04, p. 405-411.

GARRIS, G. I.. 1991. *Control of Ticks*. *Veterinary Clinics of North America*. **Small Animal Practice**, n. 21, v. 01, p. 173-183.

GIL, A.; GHERSA, C.M & LEICACH, S.. 2000. *Essential oil yield and composition of Tagetes minuta accessions from Argentina*. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 3, v. 28, p. 261-274.

GIL, J. F.; *et al.*. 2013. **Efectos garrapaticidas de algunos aceites**. Disponible em: <https://citarea.cita-aragon.es/citarea/bitstream/10532/2356/1/2013_209.pdf>.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, n. 30, v. 02, p. 374-381.

GOVINDARAJAN, M.; BENELLI, G.. 2016. *Artemisia absinthium*-borne compounds as novel larvicides: effectiveness against six mosquito vectors and acute toxicity on non-target aquatic organisms. **Parasitology Research**, n. 115, v. 12, p. 4649-4661.

GRODNITZKY, J. A.; COATS, J. R.. 2002. QSAR evaluation of monoterpenoids' insecticidal activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, n. 50, v. 16, p. 4576-4580.

GROSS, A. D.. 2014. **Botanical pesticides: identification of a molecular target and mode of action studies**. Orientadores: COATS, J. R.; KIMBER, Michael J.. 160 f. Dissertação (Mestrado) - PPG-F (Programa de Pós-Graduação em Filosofia), IASTATE (Iowa State University), Ames, Iowa, EUA.

GROSS, A. D.. 2017. *Interaction of plant essential oil terpenoids with the southern cattle tick tyramine receptor: a potential biopesticide target*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 263, feb., p. 01-06.

HABEEB, S. M.. 2010. *Ethno-Veterinary and Medical knowledge of crude plant extracts and its methods of application (Traditional and Modern) for Tick Control*. Department of parasitology and animal disease. Veterinary research division, National Reserch Center, Giza, Egypt. **World Applied Sciences Journal**, n. 09, v. 11, pp.1047-1054.

HENICS, T.; WHEATLEY, D. N.. 1999. *Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features*. **Biology of the Cell**, n. 91, v. 07, p. 485-498.

HIEU, T. T.; KIM, S. I.; AHN, Y. J.. 2012. *Toxicity of Zanthoxylum piperitum and zanthoxylum armatum oil constituents and related compounds to stomoxys calcitrans (Diptera muscidae)*. **Journal of Medical Entomology**, n. 49, v. 05), p. 1084-1091.

HORNOK, S.; 2018. *Infestation of Rhipicephalus sanguineus sensu lato on cats in Malta*. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, n. 09, v. 05, p. 1120-1124.

HÜE, T.; et al.. 2014. Acaricidal activity of five essential oils of *Ocimum* species on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Parasitology Research**, n. 114, v. 01, p. 91-99.

HUANG, Y.; *et al.*. 2002. *Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of Sitophilus zeamais Motsch. (Coleoptera curculionidae) and Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera tenebrionidae).* **Journal of Stored Products Research**, n. 38, v. 05), p. 403-412.

HSU, C. Y; LIN, C. Y & CHANG, S. T.. 2016. *Antitermitic activities of wood essential oil and its constituents from Chamaecyparis formosensis.* **Wood Science and Technology**, n. 50, v. 04, p. 663-676.

IDROGO, N. G. R.. 2018. **Prevalencia de ehrlichiosis canina en la clínica veterinaria Pet's Park - la Victoria, septiembre de 2016 a septiembre de 2017.** Orientadores: ZAPATEL, J. E. R.. 73 f. Monografía (Graduação) – Curso de Bacharelado em Medicina Veterinária, UNPRG (Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo), Lambayeque, Peru.

JIMENEZ, G. M.; 2002. **Identificación de Compuestos Activos de dos Especies de Tagetes (Compositae) con Toxicidad para Larvas de Aedes aegypti L..** Orientadores: CARDENAS, Azucena Oranday. 60 f. Dissertação (Mestrado) - PPG-EM (Programa de Pós-Graduação em Entomologia Médica), UANL (Universidad Autónoma de Nuevo León), San Nicolas de los Garza, México.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S.. 1983. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia.** 1. ed. São Paulo: Santos, p. 123.

KANAPADINCHAREVEETIL, S.; *et al.*. 2019. *Molecular, histological and ultrastructural characterization of cytotoxic effects of amitraz on the ovaries of engorged females of Rhipicephalus (Boophilus) annulatus.* **Exp Parasitol.** n. 204.

KAUL, P. N.. 2005. *Essential oil composition of Tagetes minuta L. Fruits.* **Journal of Essential Oil Research**, n. 17, v. 02, p. 184-185.

KIRKLAND, B. H.; WESTWOOD, G. S.; KEYHANI, N. O.. 2004. *Pathogenicity of entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae to Ixodidae tick species Dermacentor variabilis, Rhipicephalus sanguineus, and Ixodes scapularis.* **Journal of medical entomology**, n. 41, v. 04, p. 705-711.

KITA, T., *et al.*. 2016. Amitraz and its metabolite differentially activate α - and β -adrenergic-like octopamine receptors: Amitraz actions on octopamine receptors. **Pest Management Science**, n. 73.

KNOWLES, C. O.; ROULSTON, W. J.. 1973. Toxicity to *Boophilus microplus* of formamidine acaricides and related compounds, and modification of toxicity by certain insecticide synergists. **Journal of economic entomology**, n. 66, v. 06, p. 1245-1251.

KOEHLER, P. G; OI, F. M & CHASKOPOULOU, A.. 2018. **Ticks (Family Ixodidae)**. Gainesville, Flórida, EUA: University of Florida.

KOSTYUKOVSKY, M.; *et al.*. 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. **Pest management science**, n. 58. p. 1101-1106.

LABARTHE, N. V.. 1994. Controle Biológico da População de Carrapatos: revisão e reflexões. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, n. 10, v. 01, p. 47-52, jan./mar..

LEVIN, M. L.; *et al.*. 2012. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, n. 58, v. 01, p. 51-68.

MANGIA, C.; *et al.*. 2018. Exposure to amitraz, fipronil and permethrin affects cell viability and ABC transporter gene expression in an *Ixodes ricinus* cell line. **Parasites & vectors**, n. 11, v. 01, p. 437.

MATOS, R.S; *et al.*. 2018. 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**, n. 10, v. 02, fev., p. 314-320.

MILLER, M. A.; ZACHARY, J. F.. 2017. Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**, p. 02-43. n. e19.

MOTAZEDIAN, N.; 2014. Insecticidal activity of five medicinal plant essential oils against the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*. **JCP**, n. 03, v. 02, p. 137-146.

MORAIS, L. A. S.. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, n. 27, p. S4050-S4063.

NCHU, F., MAGANO, S. R.; ELOFF, J. N.. 2012. *In vitro anti-tick properties of the essential oil of Tagetes minuta L. (Asteraceae) on Hyalomma rufipes (Acari: Ixodidae).* **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, n. 79, v. 01, n. 358.

NATES, B.; CERÓN, P.; HERNÁNDEZ.. 1996. **Las Plantas y el Territorio Clasificación, usos y concepciones en los Andes Colombianos.** Colombia: Popayán.

ORRENIUS, S.; NICOTERA, P.; ZHIVOTOVSKY, B.. 2011. *Cell death mechanisms and their implications in toxicology.* **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, n. 119, v. 01, p. 03-19.

PAVELA, R.; BENELLI, G.. 2016. *Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints.* **Trends in Plant Science**, n. 21, v. 12, p. 1000-1007.

PEARSE, A. G. E.. 1985. **Histochemistry: theoretical and applied.** 4^a. ed. London: Churchill, 530 p..

PEREIRA, M. C.; *et al.*. 2017. *Detrimental effect of deltamethrin on the central nervous system (synganglion) of Rhipicephalus sanguineus ticks.* **Exp. Appl. Acarol.**, n. 71, v. 02, p. 159-169.

POLLAK-ELTZ, A.. 2001. **La medicina tradicional venezolana.** Caracas, Venezuela: UCAB (Universidad Católica Andrés Bello), 108 p..

PRIYANKA, D.; SHALINI, T.; VERMA, N.. 2013. *A brief study on marigold (Tagetes species): a review.* **International Research Journal of Pharmacy**, n. 41, jan..

PULIDO, N. & CRUZ, A.. 2013. Eficacia de los extractos hidroalcohólicos de dos plantas sobre garrapatas adultas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, n. 14, v. 01, p. 91-97.

QUADROS, D. G.; *et al.*. 2020. *Plant-derived natural compounds for tick pest control in livestock and wildlife: pragmatism or utopia?*. **Insects**, n. 11, v. 08, p. e490.

REMEDIO, R. N.; *et al.*. 2015. *Morphological effects of neem (Azadirachta indica A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged Rhipicephalus sanguineus ticks (Acari: Ixodidae)*. **Parasitol Res.**, fev., n. 114, v. 02, p. 431-444.

RESHMA, K. R.; PRAKASAN, K.. 2020. *Synthetic acaricides as a promising tool in tick control program-the present scenario*. **Entomology and Applied Science Letters**, n. 02, v. 07.

ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; CAMARGO, M. I.. 2010. *Permethrin-induced ultrastructural changes in oocytes of Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, n. 03, v. 01. p. 113-123.

ROMA, G.; *et al.*. 2012. *Synganglion histology in different stages of Rhipicephalus sanguineus ticks (Acari: Ixodidae)*. **Parasitology research**, n. 110, v. 10, p. 2455-2463.

ROMA, G. C.; *et al.*. 2013a. *Morphological and cytochemical changes in synganglion of Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks from exposure of andiroba oil (Carapa guianensis)*. **Microscopy research and technique**, n. 76, v. 10.

ROMA, G. C.; *et al.*. 2013b. *Neurotoxic action of permethrin in Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks: morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system*, **Veterinary Parasitology**, n. 03-04, v. 196.

RODRIGUEZ, R. I.; *et al.*. 2017a. *First documentation of ivermectin resistance in Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae)*. **Veterinary Parasitology**, v. 233, p. 09-13.

RODRÍGUEZ-MALLON, A.; *et al.*. 2012. *A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, Rhipicephalus sanguineus*. **Vaccine**, n. 30, v. 10, p. 1782-1789.

PALAZZO, M. C; *et al.*. 2009. *Chemical compositions and biological activities of leaf essential oils of six species of Annonaceae from Monteverde, Costa Rica*. **Records of Natural Products**, n. 03, p. 153-160.

RODRIGUEZ, R. I.; et al.. 2017. *First report of amitraz and cypermethrin resistance in Rhipicephalus sanguineus sensu lato infesting dogs in México. Med. Vet. Entomol*, n. 31, p. 72–77.

ROEDER, T.. 1999. *Octopamine in invertebrates. Prog. Neurobiol.*, n. 59, v. 05, p. 533-561.

POLITI, F. A. S.; et al.. 2015. *Action of ethanolic extract from aerial parts of Tagetes patula L. (Asteraceae) on hatchability and embryogenesis of Rhipicephalus sanguineus eggs (Acari: Ixodidae). Industrial Crops and Products*, n. 67, p. 55-61.

SANTOS, F. C. C.; VOGEL, F. S. F. 2012. *Avaliação in vitro da ação do óleo essencial de capim limão (Cymbopogon citratus) sobre o carrapato bovino Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 14, n. 4, p. 712-716.

SALEHI, B.; et al.. 2018. *J Tagetes spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. Molecules (Basel, Switzerland)*, n. 23, v. 11, 2847.

SALOMON, J.; 2022. *Brown dog tick (Rhipicephalus sanguineus sensu lato) infection with endosymbiont and human pathogenic rickettsia spp., in Northeastern México. International Journal of Environmental Research and Public Health*, n. 19, v. 10, p. 6249. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/ijerph19106249>>. Acesso em: 01 nov. 2022.

SAMISH, M.; et al.. 2001. *Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae). The Journal of Parasitology*, n. 87, v. 06, p. 1355-1359.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I.. 2004. *Biological control of ticks. Parasitology*, n. 129, p. 389-403.

ŠIMO, L.; et al.. 2009. *Identification of a complex peptidergic neuroendocrine network in the hard tick, Rhipicephalus appendiculatus. Cell and Tissue Research*, n. 335, v. 03, p. 639-655.

SOUTO, R. N. P.; HARADA, A. Y.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.. 2012. *Insecticidal activity of piper essential oils from the Amazon against the fire ant Solenopsis saevissima (smith) (Hymenoptera: Formicidae)*. **Neotropical entomology**, n. 41, v. 06, p. 510-517.

STRAUBE, J.. 2011. *The brown dog tick dogs' ubiquitous enemy*. **BAYER**, n. 08, mayo. Disponible en: <<https://campaign.elanco.com/en-us/resources/print-resources/digest-articles>>. Acceso en: 20 maio. 2019.

TERASSANI, E.; et al.. 2012. Efeito do extrato de *Azadirachta indica* em carrapatos (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, n. 02, v. 15, supl. 01, p. 197-200.

TIAN, Y.; et al.. 2018. **Common name:** brown dog tick **scientific name:** *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Arachnida: Acari: Ixodidae). Gainesville, Florida, USA: University of Florida.

DA SILVA, E. M.; et al.. 2016. *Efficacy of Tagetes minuta (Asteraceae) essential oil against Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) on infested dogs and in vitro*. **Experimental & Applied Acarology**, n. 70, v. 04, p. 483-489.

VIEGAS JUNIOR, C.. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quím. Nova**, n. 3, v. 26, p. 390-400, mayo.

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G.. 2000. **The Genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world**. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press, 384 p..

YATES, J.; 2020. **Knowledge master home: Brown dog tick**. Honolulu, Hawaii, USA: University of Hawaii. Disponível em: <<http://www.extento.hawaii.edu/kbase/urban/site/brdgtick.htm#REFERENCES>>. Acceso en: 10 feb. 2021.

YOUSSEFI, M. R.; et al.. 2019. *Efficacy of two monoterpenoids, carvacrol and thymol, and their combinations against eggs and larvae of the west nile vector culex pipiens*. **Molecules**, n. 24, v. 10, p. 1867.