

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

---

AÇÃO DOS ÉSTERES DO ÁCIDO RICINOLÉICO DO ÓLEO DE MAMONA NAS  
GLÂNDULAS SALIVARES E NOS OVÁRIOS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus*  
*sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE). ANÁLISE HISTOLÓGICA.

**André Arnosti**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**JULHO/2011**

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

---

AÇÃO DOS ÉSTERES DO ÁCIDO RICINOLÉICO DO ÓLEO DE MAMONA NAS  
GLÂNDULAS SALIVARES E NOS OVÁRIOS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus*  
*sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE). ANÁLISE HISTOLÓGICA.



Doutorando: André Arnosti  
Orientadora: Profa Dra. Maria Izabel Camargo Mathias  
Co-orientadora: Dra. Karim Christina Scopinho Furquim

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, José Carlos Arnosti e Maria Vergínia Nalin Arnosti.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, pelas vitórias alcançadas. Aos meus pais, **José Carlos Arnosti** e **Maria Vergínia Nalin Arnosti**, pelo apoio incondicional.

Agradeço a minha orientadora **Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias** pela oportunidade, confiança e ajuda sempre na hora certa. A minha amiga de longa data e Co-orientadora **Dra. Karim Christina Scopinho Furquim**, por confiar e “abrir as portas” para minha volta ao meio acadêmico.

A todos os membros e colegas de trabalho do grupo BCSTM – (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) da UNESP de Rio Claro, pelo aprendizado e convivência, em especial a **Doutoranda e Médica Veterinária Paula Desjardins Brienza**, que sempre esteve presente desde o início dos trabalhos que deram origem a esta tese.

Aos professores do Departamento de Biologia da UNESP Rio Claro, assim como todo o corpo técnico e funcionários, em especial: **Gerson, Mônica, Lucila, Cris, Neusa, Nega** e **Sandra**.

Finalmente, agradeço pela confiança e aprendizado adquirido com os meus colegas de pós-graduação, durante o período em que fui eleito para representá-los no conselho do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), em especial a **Bióloga e Mestranda Larissa Rosa Nogarol**, sempre companheira, tanto nos bons, quanto nos momentos difíceis do doutorado.

## Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	7
1. Introdução.....	9
2. Objetivos.....	17
3. Material e Métodos.....	19
3.1. Material.....	20
3.1.1. Preparação e Fornecimento da Ração.....	21
3.2. Métodos.....	21
3.2.1. Microscopia de luz.....	22
3.2.1.1Histologia.....	22
4. Resultados.....	23
4.1 Capítulo 1: <b>Effects of <i>Ricinus communis</i> oil esters on salivary glands of <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae).</b> André Arnosti, Paula Desjardins Brienza, Karim Christina Scopinho Furquim, Gilberto Orivaldo Chierice, Salvador Claro Neto, Gervásio Henrique Bechara, Bruno Rodrigues Sampieri e Maria Izabel Camargo-Mathias.	25
4.2 Capítulo 2: <b>Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of <i>Ricinus communis</i> on the vitellogenesis of <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks.</b> André Arnosti, Paula Desjardins Brienza, Karim Christina Scopinho Furquim, Gilberto Orivaldo Chierice, Gervásio Henrique Bechara, Izabela Braggião Calligaris e Maria Izabel Camargo-Mathias.	33
4.3 Capítulo 3: <b>Artigo de divulgação:Componente do óleo de mamona sinaliza ser alternativa viável para o controle de carrapatos.</b> André Arnosti e Maria Izabel Camargo-Mathias.	41
5. Discussão Geral.....	43
6. Conclusões.....	49
7. Referências Bibliográficas.....	51



## Resumo

O presente trabalho traz informações que mostram a interferência dos ésteres do ácido ricinoléico extraídos do óleo de mamona (*Ricinus communis*), no ciclo secretor das glândulas salivares e na vitelogênese de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, agindo diretamente nos processos de alimentação e de reprodução, respectivamente. Para a realização deste estudo, coelhos hospedeiros infestados com carrapatos, foram alimentados com ração comercial comum (controle-**GC**) e com ração enriquecida com os ésteres em diferentes concentrações (tratamento-**GT**). As glândulas salivares sofreram danos, e tiveram o citoplasma das células acinares alterado, trazendo prejuízos ao seu funcionamento, além desta substância ter acelerado a degeneração do órgão como um todo. Os ésteres interferiram na atividade de secreção celular alterando a composição da glicoproteína salivar, especialmente nas células glandulares dos **ácinos II**. O efeito dos ésteres na vitelogênese foi observado nos ovócitos dos carrapatos do grupo tratamento (**GT**), os quais apresentaram células germinativas com alterações citoplasmáticas, inibição do desenvolvimento dos **ovócitos I e II** para os estágios avançados (**IV e V**), além da interferência na maturação dos ovócitos **V**. Além disso, nas ampolas dos ovários dos indivíduos tratados, espermatozóides não foram observados no seu interior confirmando a ação dos ésteres no processo de reprodução. Ficou demonstrado também que os danos causados pelos ésteres nas células das glândulas salivares e dos ovários desses ectoparasitas, aumentaram na mesma proporção que houve aumento das concentrações do produto, provocando intensa degeneração dos órgãos.

**Palavras-chave:** carrapatos; *Rhipicephalus sanguineus*; ésteres; óleo de mamona; *Ricinus communis*; acaricida; ovários; glândulas salivares.





## Abstract

The present study brings information which shows the interference of ricinoleic acid esters extracted from castor oil (*Ricinus communis*) on the secretory cycle of *Rhipicephalus sanguineus* female ticks' salivary glands and vitellogenesis, acting directly on the feeding and reproduction processes respectively. To perform this study, host rabbits were infested with ticks, fed with regular commercial rabbit food (control-**CG**) and with food enriched with ester in different concentrations (treatment-**TG**). The salivary glands were damaged and had the cytoplasm of acinar cells altered, impairing their functioning, and the toxic substance also accelerated the degeneration of the organ as a whole. The esters interfered in the cellular secretion activity altering the composition of salivary glycoproteins, especially in the glandular cells of **acini II**. The effect of the esters in the vitellogenesis was observed in the oocytes of ticks belonging to the treatment group (**TG**), whose germinative cells presented cytoplasmic alterations, inhibition of the development of **oocytes I** and **II** for advanced stages (**IV** and **V**) and interference in the maturation of oocytes **V**. In addition, spermatozoa were not observed in the interior of the ovaries ampoules, confirming the acaricidal potential of the esters. It was also demonstrated that the damages caused by esters in the salivary glands cells and ovary cells of these ectoparasites increased in the same proportion of the increase in the concentrations of the toxic product, causing intense degeneration of the organs.

**Key-words:** ticks; *Rhipicephalus sanguineus*; esters; castor oil; *Ricinus communis*; acaricide; ovaries; salivary glands.



## 1.Introdução

Os carrapatos são ectoparasitas cosmopolitas distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (RIBEIRO et al., 1996). Seu sucesso biológico deve-se principalmente devido: a) ao seu pequeno tamanho corpóreo, o que lhes permite a sobrevivência em diversos micro-habitats (RUPPERT et al., 2005); b) à capacidade de viver fora de um hospedeiro por longos períodos de tempo, resistindo às adversidades alimentares e ambientais (WALKER, 2000); c) à profunda fixação do hipostômio, o que dificulta sua remoção do hospedeiro, permitindo assim sua dispersão; d) à adaptação à diferentes espécies de hospedeiros; e) a resistência às adversidades climáticas devido à grande esclerotização do corpo e f) aos poucos inimigos naturais (HARWOOD; JAMES, 1979).

Os carrapatos apresentam grande importância médico veterinária, pois durante seu processo de alimentação estes ectoparasitas transmitem doenças tanto para diferentes grupos de animais quanto para os seres humanos. Dentre elas estão àquelas causadas por protozoários, vírus, rickettsias e espiroquetídios, que provocam dermatoses e outras infecções (REY, 1973). Quanto aos carrapatos da espécie *R. sanguineus*, sua importância está relacionada à grande perda de sangue do hospedeiro, decorrente do processo de alimentação (parasitismo) destes animais, e a transmissão de alguns patógenos como *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* em cães e *Rhickettsia conori* (causadora da febre botonosa do Mediterrâneo) em humanos (WALKER et al., 2000).

Para que ocorra sucesso no processo de alimentação dos carrapatos, as glândulas salivares são órgãos fundamentais, pois apresentam grande diversidade de funções, como a produção de substâncias necessárias à fixação e à alimentação dos mesmos (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985; GILL; WALKER, 1987). Segundo Sonenshine (1991), a saliva seria uma mistura complexa que atuaria numa variedade de funções nos períodos de parasitismo e de não parasitismo: a) aumentaria a circulação do hospedeiro na região da lesão de fixação do carrapato, por meio da secreção de agentes vasoativos (FAWCETT et al., 1986; SAUER et al., 2000); b) introduziria anticoagulantes que possibilitariam que o sangue do

hospedeiro permanecesse fluido (RIBEIRO et al., 1985; FAWCETT et al., 1986; SAUER et al., 2000); c) inibiria o processo inflamatório no hospedeiro (RIBEIRO et al., 1985; FAWCETT et al., 1986; SAUER et al., 2000); d) imunossuprimiria o hospedeiro e possibilitaria aos carrapatos a fixação ao hospedeiro sem que este último desenvolvesse rejeição (RIBEIRO et al., 1985; WIKEL, 1999; SAUER et al., 2000); e) fixaria o carrapato à pele do hospedeiro por meio da secreção do cemento para formação do cone (FAWCETT et al., 1986); f) excretaria o excesso de água e de íons provenientes da alimentação (sangue) (SAUER et al., 2000); g) secretaria solução higroscópica, a qual depositar-se-ia na região bucal e absorveria a água atmosférica, hidratando o ectoparasita nos períodos de não parasitismo (SAUER et al., 2000; BOWMAN; SAUER, 2004); h) produziria secreção que lubrificaria o espermatóforo durante sua transferência na cópula (FELDMAN-MUHSAM et al., 1970 apud FAWCETT et al., 1986); i) liberaria toxinas que causariam paralisia no hospedeiro (FAWCETT et al., 1986); e j) veicularia agentes patogênicos ao hospedeiro (FAWCETT et al., 1986; WIKEL, 1999; SAUER et al., 2000; BOWMAN; SAUER, 2004).

As glândulas salivares dos carrapatos são órgão que ocorrem aos pares, (SONENSHINE, 1991), e se estendem antero-lateralmente na porção ventral do corpo, desembocando na cavidade oral (WALKER et al., 1985; SCHUMAKER; SERRA-FREIRE, 1991; OLIVIERI; SERRA-FREIRE, 1992), sendo desprovidas de reservatório para armazenagem da secreção. Morfologicamente são formadas por uma porção secretora e outra excretora (FURQUIM, 2007). A secretora é composta por diferentes tipos de ácinos, que nas fêmeas são classificados como dos tipos I, II e III. (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985; FAWCETT et al., 1986; GILL; WALKER, 1987; SONENSHINE, 1991; OLIVIERI; SERRA-FREIRE, 1992) e nos machos, além destes, são ainda encontrados os do tipo IV (FURQUIM, 2007).

A porção excretora é composta por um sistema de dutos ramificados e histologicamente semelhantes, onde o principal ou excretor comum, é longo e central, de maior calibre, que conduz a secreção até a cavidade oral do carrapato. Deste partem os intermediários ou secundários (calibre menor), que se subdividem ao longo do comprimento da glândula em pequenos dutos acinares que coletam,

diretamente do ácino, a secreção neles produzida pelas suas células (WALKER et al, 1985; FAWCETT et al, 1986; NUNES et al., 2005).

Os ácinos glandulares distribuem-se de forma regular ao longo do sistema de dutos. Os do tipo I estão ligados à porção anterior e mediana do duto excretor. Os II, conectados aos dutos intermediários, distribuem-se nas regiões anterior e mediana da glândula. Os III estão ligados à extremidade das ramificações dos dutos intermediários na região mediana-periférica da glândula (OLIVIERI; SERRA-FREIRE, 1992).

Os ácinos das glândulas salivares de carrapatos além da classificação em tipos, são também classificados, segundo sua função, como agranulares e granulares, onde os primeiros estão envolvidos com o balanço hídrico do animal. Os granulares, além de participarem nos processos de alimentação (OLIVIERI; SERRA-FREIRE, 1992), estão também envolvidos na osmorregulação do carrapato na fase de grande consumo de sangue (FAWCETT et al., 1986; SONENSHINE, 1991).

De acordo com a literatura o ácino do tipo I, (agranular), é responsável pela eliminação do excesso d'água proveniente do sangue durante a alimentação, além de secretar, em períodos de não parasitismo, solução higroscópica (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985). Este tipo de ácino é composto por uma célula **central** (grande), rodeada por várias **periféricas** (menores) (BINNINGTON, 1978; FAWCETT et al., 1986; WALKER et al., 1985; GILL; WALKER, 1987; OLIVIERI; SERRA-FREIRE, 1992).

O do tipo II, (granular), é constituído por diferentes tipos de células secretoras. Em *Boophilus microplus* pelas células **a**, **b**, **c1**, **c2**, **c3** e **c4** (BINNINGTON, 1978) e em fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* pelas **a**, **b**, **c1**, **c2**, **c3**, **c4**, **c5** e **c6** (FURQUIM, 2007). Sabe-se que as **a** estão envolvidas com a secreção do cemento para construção do cone de fixação (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985; FAWCETT et al., 1986; GILL; WALKER, 1987; FURQUIM, 2007), e as **b** e **c** com as várias funções que têm sido atribuídas à saliva na modulação da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985; FURQUIM, 2007).

O do tipo III, (também granular), é formado por três tipos de células, **d**, **e** e **f** (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985; GILL; WALKER, 1987; FURQUIM, 2007). As células **d** e **e** secretam componentes do cimento durante a fixação (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985; GILL; WALKER, 1987; FURQUIM, 2007). As células **f** têm duas funções: secretora e osmorreguladora, esta última desempenhada juntamente com as células epiteliais abuminais (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985; COONS; LAMOREAUX, 1986; GILL; WALKER, 1987; FURQUIM, 2007).

As glândulas salivares, como qualquer outro órgão secretor, apresentam um ciclo de secreção bem definido, marcado por uma fase de síntese e liberação da secreção, seguida posteriormente da degeneração do órgão (FURQUIM, 2007). Este ciclo secretor é determinado pelo estado fisiológico do carrapato, a saber: jejum, em alimentação (semi-ingurgitado) e alimentado (completamente ingurgitado).

Durante a alimentação, o tecido glandular sofre rápida transformação estrutural e funcional (FURQUIM, 2007). Os ácinos do tipo I sofrem apenas mudanças no tamanho. Os do tipo II além de terem o tamanho aumentado têm maior síntese de secreção, sendo portanto, os ácinos dominantes na produção de secreção no final do estágio alimentar (WALKER et al., 1985). Nos do tipo III as células **d**, **e** e **f**, passam de cúbicas para escamosas, as células **f** eliminam os grânulos de secreção e observa-se maior dilatação do lúmen ácinar. Estas mudanças ocorrem quando os ácinos III passam a desempenhar a função osmorreguladora, na fase de grande consumo de sangue (FURQUIM, 2007).

Nos carrapatos em jejum as glândulas salivares se encontram em fase pré-secretora (FURQUIM, 2007). A fixação desses animais ao hospedeiro é o estímulo para que elas iniciem seu desenvolvimento, que se completa apenas quando o carrapato inicia a alimentação (WALKER et al., 1985). Após o final da alimentação e desprendimento do ectoparasita do hospedeiro, as glândulas gradualmente diminuem a capacidade secretora até o início da oviposição, quando o órgão já estará completamente degenerado, restando somente o sistema de dutos (SONENSHINE, 1991).

O processo de alimentação dos carrapatos possibilita o desenvolvimento ovariano, por fornecer elementos para que o processo de vitelogênese ocorra (OLIVEIRA, 2006). Embora existam algumas diferenças morfológicas e histológicas no sistema reprodutor dos carrapatos quando consideradas as famílias Argasidae e Ixodidae e até mesmo dentro dos Ixodidae (OLIVEIRA et al., 2005; SAITO et al., 2005), os carrapatos apresentam o sistema reprodutor feminino composto basicamente de um ovário em forma de U localizado na região posterior do corpo, um par de ovidutos, útero e vagina (SONENSHINE, 1991).

O ovário dos carrapatos possui parede formada por pequenas células epiteliais com núcleos arredondados ou achatados e que delimitam um lúmen estreito. Desta parede epitelial partem os pedicelos, estruturas também celulares que conectam cada ovócito nos diferentes estágios de desenvolvimento à parede do ovário. (NUNES et al., 2005; SAITO et al., 2005; NUNES et al., 2006 a, b; DENARDI et al., 2006, 2007; OLIVEIRA et al., 2006, 2007 a, b; RICARDO et al., 2007). Após a fecundação o ovário aumenta consideravelmente de tamanho, devido à presença de ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento (REY, 1973) e só após o desprendimento das fêmeas de seus hospedeiros é que tem início a oviposição (RUPPERT et al., 2005).

Nos carrapatos o ovário é do tipo panoístico, ou seja, não apresenta células nutridoras (e nem foliculares), como já demonstrado por Saito et al. (2005) e Oliveira et al. (2006) para as espécies *R. (Boophilus) microplus* e *Amblyomma triste*, respectivamente.

O estudo realizado por Ricardo et al. (2007) com fêmeas de carrapatos *A. triste*, demonstrou que as células do pedicelo além de terem a função de prender os ovócitos à parede do ovário, também participam do fornecimento de elementos que contribuem com a formação do vitelo e com o conseqüente crescimento do ovócito, desempenhando, portanto, a mesma função que as células nutridoras teriam nos ovários meroísticos.

A vitelogênese é o processo de síntese e incorporação de proteínas, carboidratos e lipídios pelos ovócitos, durante o seu desenvolvimento. Estes elementos constituintes do vitelo, ou a) são sintetizados endógenamente pelo

próprio ovócito ou b) o são exógenamente pelas células do pedicelo e do corpo gorduroso, para depois serem transportados, no segundo caso, via hemolinfa para o interior dos ovócitos por meio de processos endocíticos (WYATT, 1991).

Os carrapatos causam muitos prejuízos econômicos e assim muitas investigações vem sendo realizadas com o intuito de se buscar métodos de controle mais eficientes para estes ectoparasitas. O controle químico é o mais utilizado, porém apresenta pontos desfavoráveis, como custo elevado além do seu uso ser indiscriminado causando indução dos carrapatos a resistência (BAHIENSE et al. 2006; KROBER, 2007).

Outra forma de controle desses ectoparasitas é a aplicação de vacinas nos hospedeiros. Estas tem sido obtidas por meio de estudos de biologia molecular e de imunologia o que auxilia na identificação de novos antígenos, principalmente oriundos dos aparelhos digestório e reprodutor, gerando resposta imune no hospedeiro e, portanto, habilitando este método a ter satisfatória eficiência de controle (TELLAM et al., 1992; WILLADSEN et al., 1997).

Estudos recentes tem revelado que os ésteres derivados do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*), poderiam ser uma forma eficiente para controlar microrganismos e ectoparasitas (OLIVEIRA, 2005) e alguns resultados, têm demonstrado que eles atuam na hidrólise de sacarídeos e na dissolução de substâncias de natureza lipídica nos diferentes sistemas biológicos (OLIVEIRA, 2005).

Leonardo et al. (2001), Ferreira et al. (2002) e Mandelbaum et al. (2003) em seus estudos obtiveram resultados que comprovaram a capacidade antimicrobiana destes ésteres, os quais agiram na parede celular (constituída por polissacarídeos) das bactérias hidrolisando-a e facilitando, desta forma, a sua eliminação.

Chierice (informação pessoal), em teste piloto realizado em parceria com veterinários de empresa responsável pelo desenvolvimento e comercialização de suplemento alimentar de uso veterinário, observou que gado tratado com sal enriquecido com ésteres do ácido ricinoléico apresentou taxa de elevada queda dos carrapatos infestantes, pelo fato dos mesmos não conseguirem ingurgitar por completo, sugerindo que os ésteres estariam interferindo no processo de



alimentação dos carrapatos. Além disso, o mesmo pesquisadore também verificou no gado tratado com estes ésteres a ocorrência de menor infestação por mosca do chifre, bem como um aumento no peso e na produção de leite por estes indivíduos.



## 2.Objetivos

A partir das informações até agora disponíveis e, buscando agregar outras novas que confirmem a eficiência dos ésteres sintetizados a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*), no controle de carrapatos com o mínimo de impacto ambiental, o presente trabalho analisou o efeito deste composto (por meio de estudo histológico) nos ovários e nas glândulas salivares de fêmeas completamente ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*.

---

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 3 grupos de animais: grupo controle (**CG**), grupo tratamento I (**T1**) e grupo tratamento II (**T2**), cada qual contendo 5 coelhos New Zealand White virgens de infestação.

**Grupo Controle (CG):** Os 5 hospedeiros deste grupo foram alimentados com ração comercial (única fonte de alimento) e infestados com 25 casais de carrapatos *R. sanguineus* /coelho.

**Grupo Tratamento 1 (T1):** Os 5 hospedeiros deste grupo foram alimentados com ração enriquecida com éster sintetizado a partir do ácido ricinoleico do óleo de mamona, na proporção de 1g de éster (estabilizado em NaCl)/kg de ração comercial, por um período de 10 dias, como única fonte de alimento. O início desta alimentação enriquecida com o éster ocorreu no dia em que 25 casais de carrapatos *R. sanguineus* /coelho foram depositados nos hospedeiros.

**Grupo Tratamento 2 (T2):** Os 5 hospedeiros deste grupo foram alimentados com ração enriquecida com éster sintetizado a partir do ácido ricinoleico do óleo de mamona, na proporção de 5g de éster (estabilizado em NaCl)/kg de ração comercial, por um período de 10 dias, como única fonte de alimento. O início desta alimentação enriquecida com o éster ocorreu no dia em que 25 casais de *R. sanguineus*, adultos e em jejum/coelho foram depositados nos hospedeiros.

Todo o procedimento de deposição dos carrapatos nos hospedeiros deu-se segundo protocolo descrito por Bechara et al. (1995), onde um círculo de borracha fina de 9 cm de diâmetro foi cortado e revestido com tecido de algodão (ficou em contato com a pele do hospedeiro). Em seguida um círculo de 3.5 cm de diâmetro foi retirado do centro do círculo de 9 cm de diâmetro. Na borda deste foi fixado com cola plástica um tubo plástico de 2 cm de altura, que foi vedado internamente também com a mesma cola e externamente com esparadrapo. Esse tubo plástico recebeu uma tampa com pequenos orifícios para que os carrapatos fossem supridos com ar.

Após a deposição dos casais de *R. sanguineus* realizou-se a primeira observação (após 8 horas - tempo necessário para a acomodação dos parasitas), e a partir daí as seguintes deram-se a cada 3 horas para acompanhar a alimentação das fêmeas.

### 3.1.1 Preparação e Fornecimento da Ração

Para a realização dos experimentos os coelhos do grupo controle (**GC**), receberam ração comercial. Já os coelhos do grupo de tratamento (**T1** e **T2**), receberam ração que primeiramente foi triturada e homogeneamente misturada (de acordo com **T1** e **T2**) com o éster do óleo de mamona estabilizada em NaCl, fornecido pelo prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice do Instituto de Química da USP de São Carlos/SP. Na seqüência a mistura foi repeletizada em equipamento adequado nas dependências do laboratório localizado no CEPTA/ICMBIO na cidade de Pirassununga (SP). A ração de ambos os tratamentos foi armazenada adequadamente, em ambiente seco e ventilado em sala alocada no Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP) e foi administrada aos hospedeiros, *ad libitum*.

Todos os procedimentos do manejo da alimentação, infestação, observação e coletas dos carrapatos foram realizados em sala alocada no Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP).

## 3.2. Métodos

Nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, SP, fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* completamente ingurgitadas foram coletadas e anestesiadas por meio de choque térmico e, as suas glândulas salivares e ovários foram retirados em solução salina (7.5 g de NaCl + 2.38 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2.72 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1000 mL de água destilada).

### 3.2.1. Microscopia de Luz

#### 3.2.1.1. Histologia

As glândulas salivares e os ovários foram fixados em formalina neutra tamponada 10% (pH 7- 7.4) e acetona, na proporção de 9:1, durante 1 hora e 30 minutos, a 4° C. Então foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%), banhos de 15 minutos cada, transferidos para resina de embebição, incluídos e seccionados. A embebição e a inclusão foram efetuadas em resina Leica. Os cortes, com espessura de 3 µm, foram recolhidos em lâminas de vidro e processados segundo a Técnica da Hematoxilina de Harris-Eosina Aquosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), onde os cortes foram reidratados em água destilada por 1 minuto e corados, por 10 minutos, em hematoxilina e lavados em água. Na seqüência, foram corados com eosina por 10 minutos, novamente lavados e as lâminas foram secas. A montagem final deu-se em bálsamo do Canadá com posterior observação ao microscópio de luz.





#### 4. Resultados

Os resultados desta tese estão sendo apresentados sob a forma de três capítulos, onde os dois primeiros compreendem artigos publicados em periódicos especializados e o terceiro compreende um artigo de divulgação:

##### Artigo científico 1:

**ARNOSTI, A.;** Brienza, P. D.; Furquim, K. C. S.; Chierice, G. O.; Neto, S. C.; Bechara, G. H.; Sampieri, B. R.; Camargo-Mathias, M. I.. Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 127, p. 569-574, 2011.

##### Artigo científico 2:

**ARNOSTI, A.;** Brienza, P. D.; Furquim, K. C. S.; Chierice, G. O.; Bechara, G. H.; Calligaris, I. B.; Camargo-Mathias, M. I.. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 127, p. 575-580, 2011.

##### Artigo de divulgação:

**ARNOSTI, A.;** Camargo-Mathias, M. I..Componente do óleo de mamona sinaliza ser alternativa viável para o controle de carrapatos. *Jornal do Engenheiro Agrônomo*, São Paulo, v.258, p.13, 2011.

**Capítulo 1:**

**ARNOSTI, A.;** Brienza, P. D.; Furquim, K. C. S.; Chierice, G. O.; Neto, S. C.; Bechara, G. H.; Sampieri, B. R.; Camargo-Mathias, M. I.. Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 127, p. 569-574, 2011.

## Resumo

O presente estudo mostrou a interferência dos ésteres extraídos do óleo de mamona, no ciclo secretor das glândulas salivares de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, o que conseqüentemente causou prejuízos no seu processo de alimentação. Coelhos hospedeiros infestados com carrapatos foram alimentados com ração comercial contendo diferentes concentrações de ésteres de *Ricinus communis*. As glândulas salivares sofreram danos, tais como alterações no citoplasma das células acinares, prejudicando o seu funcionamento, além de acelerar a degeneração do órgão como um todo. Verificou-se que os ésteres interferiram na atividade de secreção celular, especialmente nas células dos ácinos II. Também foi demonstrado que os danos causados pelos ésteres nas células das glândulas salivares desses ectoparasitas aumentaram na mesma proporção do aumento das concentrações do produto, provocando degeneração mais pronunciada.

**Palavras-chave:** carrapatos; *Rhipicephalus sanguineus*; ésteres; óleo de mamona; *Ricinus communis*; acaricida; glândulas salivares.



Contents lists available at ScienceDirect

## Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)

## Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)

André Arnosti<sup>a</sup>, Paula Desjardins Brienza<sup>a</sup>, Karim Christina Scopinho Furquim<sup>a</sup>, Gilberto Orivaldo Chierice<sup>b</sup>, Salvador Claro Neto<sup>b</sup>, Gervásio Henrique Bechara<sup>c</sup>, Bruno Rodrigues Sampieri<sup>a</sup>, Maria Izabel Camargo-Mathias<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Av. 24 A, nº 1515, Cx. Postal 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, USP, Av. Trabalhador São Carlense, 400 PQ, Arnold Schmidt, CEP 13566-590, São Carlos, SP, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 25 January 2010

Received in revised form 10 August 2010

Accepted 13 October 2010

Available online 9 November 2010

## Keywords:

*Ricinus communis**Rhipicephalus sanguineus*

Salivary gland

Esters

Glandular secretion

Tick control

## ABSTRACT

This study showed the interference of esters extracted from *Ricinus communis* in the secretory cycle of salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks, which consequently caused collateral effects on their feeding process. Ticks attached on hosts which were fed with commercial feed containing different concentrations of *R. communis* oil esters suffered damages such as cytoplasmic changes in their salivary glands, notably in the acinar cells, impairing the functioning of the acini and accelerating the organs degeneration as a whole. It was found that esters interfered with the activity of cellular secretion by changing the glycoprotein of salivary composition especially in acini II cells. It was also shown that the damages caused by esters in the salivary glands cells of these ectoparasites increased in higher concentrations of the product and degenerative glandular changes were more pronounced.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Among Arthropoda, ticks have a significant importance since these ectoparasites are vectors of disease, being found in tropical and subtropical regions of the planet (Sonenshine, 1991; Ribeiro et al., 1996). *Rhipicephalus sanguineus* ticks are cosmopolitan and heteroxenic, parasitizing mammals, birds and reptiles (Flechtmann, 1973; Labruna, 2004).

According to literature, the success of these ectoparasites is also supported by the physiology of their salivary glands (Furquim et al., submitted paper), organs that play key roles such as the production of substances required for host fixation and parasite feeding (Binnington, 1978; Walker et al., 1985; Gill and Walker, 1987). Furthermore, during the non-parasitic period they secrete a hygroscopic solution which is deposited in the oral region of the animal in order to absorb water from the air (Sauer et al., 2000; Bowman and Sauer, 2004).

Today, controlling ticks has become a challenge to researchers around the world, who seek a sustainable way to do it. Synthetic acaricides have been widely used; however, the high cost, the hazardous environmental effects and the indiscriminate use of these

products which has selected resistant strains of ticks make their use a concern, mainly because human beings are the indirect target (Furlong, 1993).

Many studies have been carried out to find alternative methods to control ectoparasites in order to minimize the hazardous effects caused by conventional chemical control. Some examples are the biologic control using entomopathogenic fungi and others which use plant extracts such as *Azadirachta indica* (neem) plants (Saxena, 1989; Bahiense et al., 2006; Denardi et al., submitted paper; Arnosti et al., 2011).

According to preliminary studies by Arnosti et al. (2011) the use of esters of ricinoleic acid of *Ricinus communis* oil is suggesting an alternative control approach for this tick species, which could minimize the impact on the environment and prevent the poisoning of non-target animals and human beings.

Furthermore, studies by Leonardo et al. (2001), Ferreira et al. (2002), and Mandelbaum (2003) also showed the antimicrobial ability of these esters which, according to the authors, would act in the cell walls of bacteria, hydrolyzing them and facilitating the elimination of these microorganisms.

The present study was carried out to analyze the effect of oil esters of ricinoleic acid from *R. communis* on the secretory cycle of the salivary glands of the *R. sanguineus* ticks in an attempt to find an alternative way to control these ectoparasites, once the

\* Corresponding author. Fax: +55 19 35340009.

E-mail address: micm@rc.unesp.br (M.I. Camargo-Mathias).

impossibility to produce sufficient saliva would be a limiting factor in the success of their feeding process, as well as for the entire biologic success of the ectoparasite.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bioassays

For this study three groups of animals were used: control group (CG), treatment group 1 and treatment group 2, each of them containing five New Zealand White rabbits, never infested before.

**Control group (CG):** The five hosts of this group were fed exclusively with commercial feed and infested with 25 couples of *R. sanguineus* ticks, adults and unfed/rabbit.

**Treatment group 1 (T1):** The five hosts of this group were fed exclusively with ester-enriched feed synthesized from ricinoleic castor oil, in the proportion of 1 g of ester (stabilized in NaCl)/kg of commercial feed for a period of 10 days. The ester-enriched feeding started on the day when the 25 couples of *R. sanguineus*, adults and unfed/rabbit were deposited on the hosts.

**Treatment group 2 (T2):** The five hosts of this groups were fed exclusively with ester-enriched feed synthesized from ricinoleic castor oil, in the proportion of 5 g of ester (stabilized in NaCl)/kg of commercial feed for a period of 10 days. The ester-enriched feeding started on the day when the 25 couples of *R. sanguineus*, adults and unfed/rabbit were deposited on the hosts.

The whole procedure of deposition of ticks on the hosts was done according to the methodology proposed by Bechara et al. (1995).

### 2.2. Histology

Immediately after the natural detachment (complete engorgement) the female ticks were collected from the rabbit hosts and their salivary glands were removed and fixed in formalin 10% and acetone P.A. (9:1) for 1 h and 30 min at 4 °C. The material was then dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70%, 80%, 90% and 95%), (baths of 15 min each), transferred to Leica Historesin, embedded, included and finally sectioned. The sections, 3 µm thick, were collected on glass slides and stained with Harris hematoxylin and aqueous eosin (Junqueira and Junqueira, 1983). Finally the material was mounted in Canada balsam and then observed and photographed in a Motic BA 300 Light Microscope.

## 3. Results

### 3.1. Control group (CG)

The salivary glands of engorged females from the CG presented morphology and acini cell types according to the description by Furquim et al. (submitted paper), where:

#### 3.1.1. Acini I

They were found intact and with dilated lumen. The central and peripheral cells were intact, as well as their nuclei (Fig. 1A).

#### 3.1.2. Acini II

These were already in process of degeneration (inherent to the feeding process) and presented loss of cell contact, small cytoplasmic vacuoles and pyknotic nuclei. Cell types **a** and **c3** were found (Fig. 1B–D).

#### 3.1.3. Acini III

In these acini, degenerative features (inherent to the feeding process) such as a loss of cell contact, cytoplasmic vacuolation

and pyknotic nuclei were observed (Fig. 1C). Some of these acini had a reduced lumen (Fig. 1C) and others showed a dilated one (Fig. 1C and E). Type **d** cells could be identified (Fig. 1C).

#### 3.1.4. Indeterminate acini

Acini with very strongly evident degenerative characteristics (inherent to the feeding process), were found and these characteristics made it difficult to identify them because they were totally vacuolated and the cells were disorganized (Fig. 1F).

In addition to the acini in different stages of degeneration, apoptotic bodies could be also observed (Fig. 1D and F).

### 3.2. Treatment group 1 (T1)

#### 3.2.1. Acini I

These acini showed the same characteristics found in individuals from the CG, central and peripheral cells were intact (Fig. 2A and B).

#### 3.2.2. Acini II

They presented more significant degenerative signs in comparison to CG (Fig. 2D). Their cells showed loss of cell contact and nuclear changes (pyknosis) (Fig. 2E).

Cells **a** and **c3** were found. (Fig. 2C–E).

#### 3.2.3. Acini III

Some type III acini showed the same characteristics of the CG, however there were also acini III which were in a more advanced stage of degeneration in comparison to the individuals from the CG (Fig. 2E–G).

The acini III undergoing advanced degeneration presented smaller lumen diameter than those of individuals from the CG. Their cells showed cytoplasmic disorganization with the presence of large vacuoles (Fig. 2E and F).

Type **d** cells were also found (Fig. 2E–G).

#### 3.2.4. Indeterminate acini

Some acini were in a process of pronounced degeneration, which made their identification difficult. Therefore, they were here called indeterminate acini. The cells of these acini could or could not contain secretory granules and showed intense cytoplasmic vacuolation as well as loss of cell contact (Fig. 2H–J), and in some cases, they were in the process of fragmentation (Fig. 2K), resulting in the apoptotic bodies formation (Fig. 2J), which occurred here in numbers far greater than observed in individuals from the CG.

### 3.3. Treatment group II (T2)

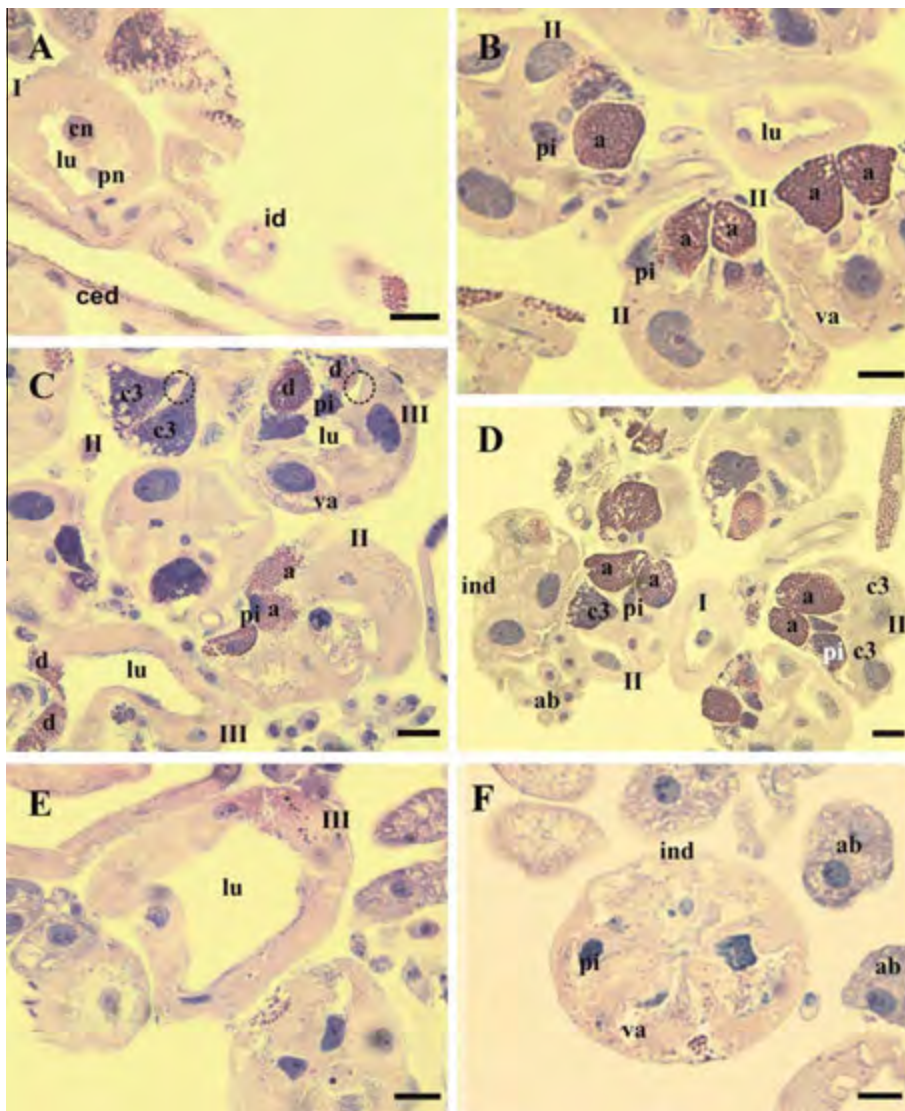
#### 3.3.1. Acini I

Type I acini were observed in three different morphological conditions: (a) either with a very similar morphology to those found in the CG or intact (Fig. 3A); (b) others with a reduced lumen diameter (Fig. 3B) and (c) those which were already in process of degeneration (Fig. 3C).

#### 3.3.2. Acini II

The few type II acini found here were much more degenerated and disorganized when compared to those found in the CG and T 1. These acini had intense cytoplasmic vacuolation, cell disruption (lysis) and most of them were already in the process of fragmentation, including the release of apoptotic bodies (Fig. 3H).

Only few **a** and **c3** cells were found (Fig. 3C and H).



**Fig. 1.** Histological sections of salivary glands of engorged ticks females *Rhipicephalus sanguineus* (control group) stained with HE. I = acini I; II = acini II; III = acini III; ind = Indeterminate acini; a = a cell; c3 = c3 cell; d = d cell; ab = apoptotic body; ced = common excretory duct; id = intermediate duct; lu = lumen; va = vacuole; dashed circle = loss of cell contact; pi = pyknotic nucleus; cn = central cell nucleus; pn = peripheral cell nucleus. Bar: A–H = 20  $\mu$ m.

### 3.3.3. Acini III

Some of these acini also presented little fragmentation and showed signs of degeneration similar to those of the T 1 group (Fig. 3D).

### 3.3.4. Indeterminate acini

They were present in greater number (Fig. 3D–G) than those present in individuals from CG. Some of them had intense cytoplasmic vacuolation (Fig. 3D–F). Moreover, many apoptotic bodies were present, in significantly greater number than those found in individuals of the previously described groups.

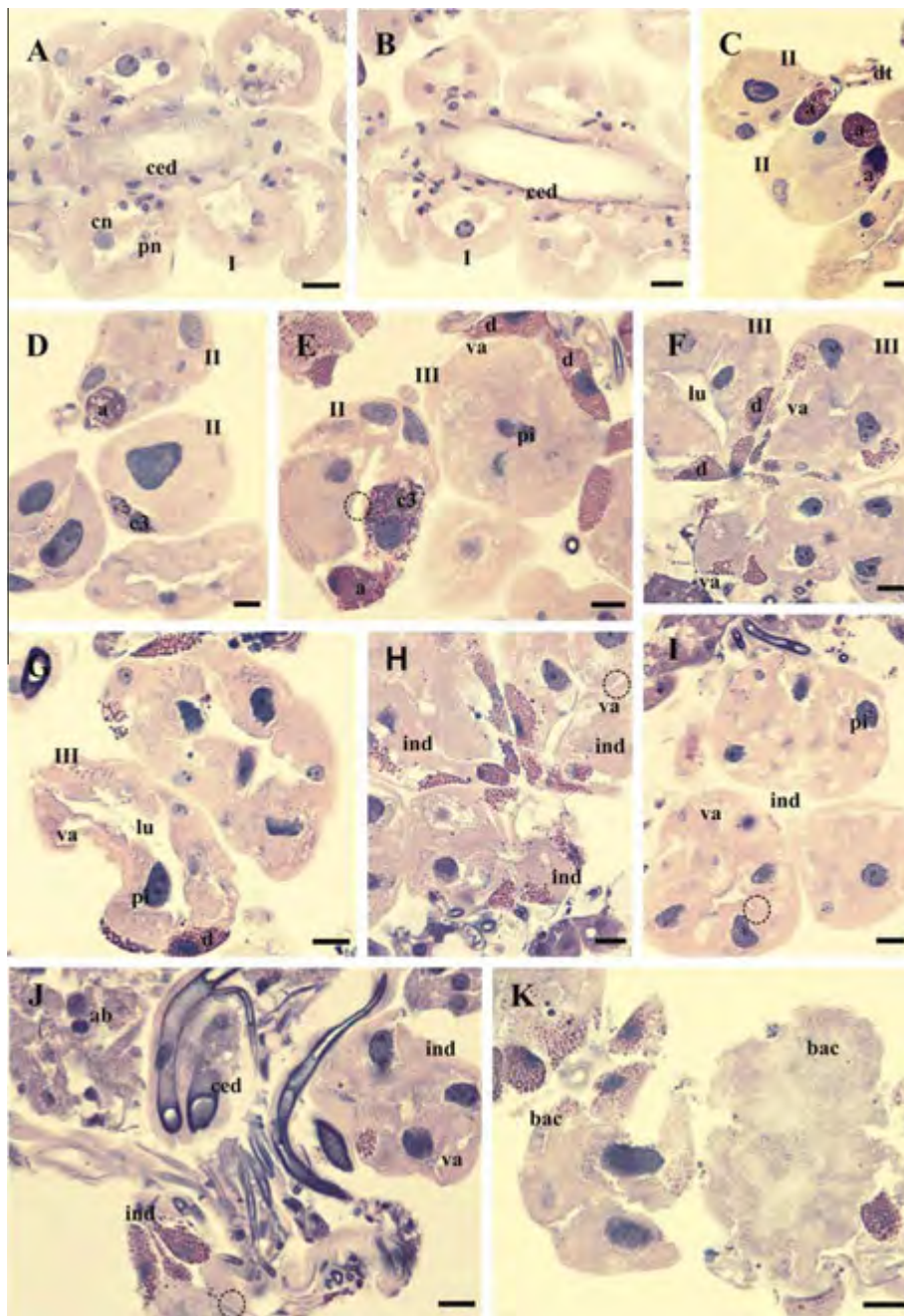
Several apoptotic bodies were also found (Fig. 3I).

## 4. Discussion

This study is the first to introduce information about the morphological interference caused by the ester obtained from ricinoleic acid from the oil of *R. communis* in the salivary glands of *R. sanguineus* female ticks.

The present study showed that these esters, which were provided through food (feed + ester) for the hosts (rabbits) had acted on the ticks' salivary glands, enhancing and accelerating their degenerative process, that would otherwise occur slowly. It was also shown that the damage caused by esters in glandular cells was proportional to the concentration of the product, in other words at higher concentration (T2), degenerative changes were much more intense, according to data obtained by Arnosti et al. (2011) when assessing the action of these esters in the ovaries of females from the same tick species.

The data obtained from the control group (CG) individuals, when compared to those reported by Furquim et al. (2008), made it clear that the action of these esters (test groups 1 and 2) accelerated the process of glandular degeneration, once acini I have remained intact, and only types II and III were in degenerating process. The individuals from the CG revealed that the acini type I only showed signs of degeneration in those females after three days of fully engorgement (Furquim et al., 2008), or when they had already dropped off the host and the oviposition process had started.



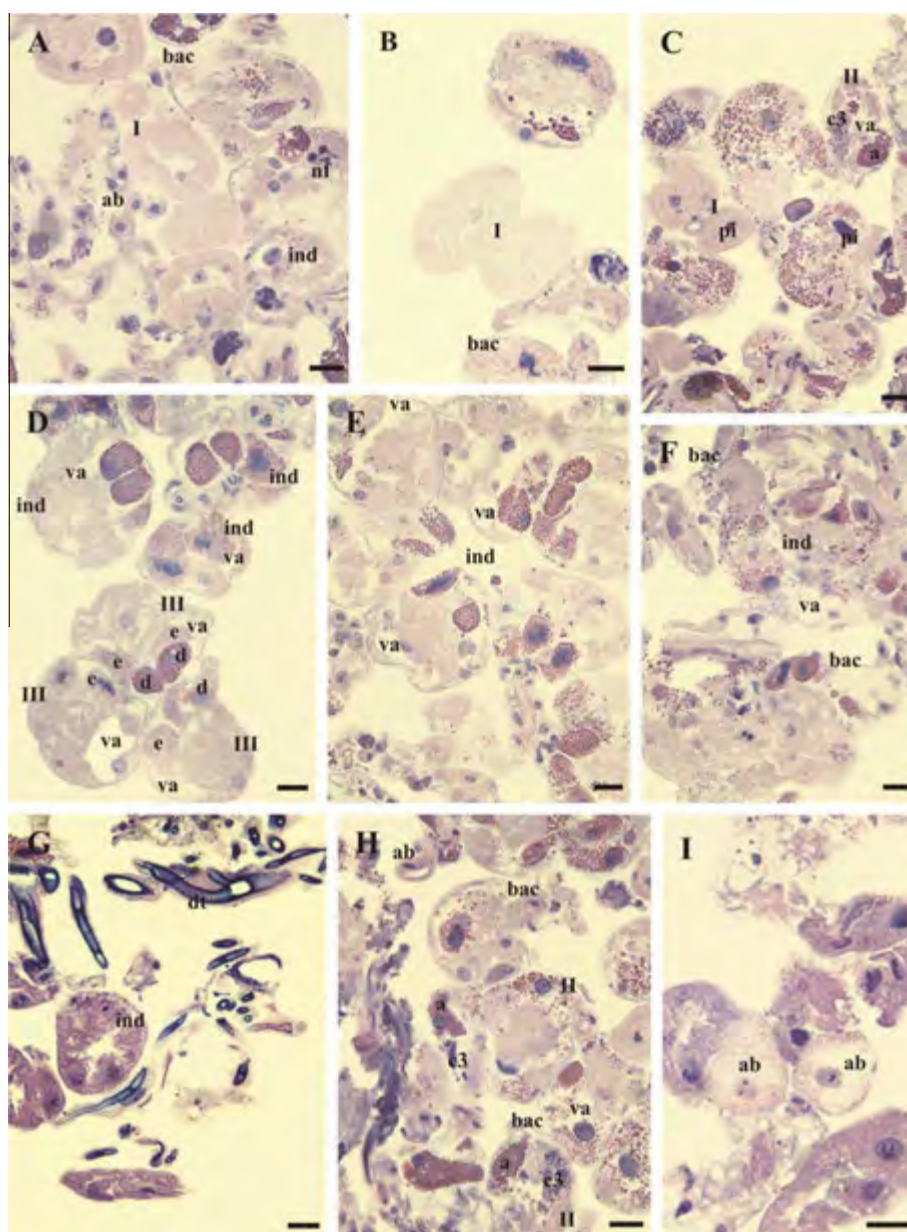
**Fig. 2.** Histological sections of salivary glands of engorged tick females *Rhipicephalus sanguineus* ticks (T1) stained with HE. I = acini I; II = acini II; III = acini III; **ind** = Indeterminate acini; **a** = cell a; **c3** = c3 cell; **d** = d cell; **bac** = broken acini; **dt** = acinar duct. Bar: A–H = 20  $\mu$ m.

The results until now presented showed that, unlike conventional methods of chemical synthetic control (Davey et al. (1998), Friesen and Kaufman (2003), and Freitas et al. (2005), which kills ticks by neurotoxic action, different concentrations of ester of *R. communis* oil did not cause the death of the ticks, but interfered in two interdependent systems, which are of paramount importance to these ectoparasites (by inducing premature degeneration of the salivary glands), and also acting in the reproductive process. Thus, the action of esters on the salivary glands makes the ticks' feeding process deficient causing the absence of some components in the hemolymph and consequently impairing the vitellogenic process of the oocytes.

Literature has shown that the degeneration of the salivary glands of ticks provides an asynchronous pattern, where the acini

III are the first affected and acini I the last ones to degenerate (Nunes et al., 2006; Furquim et al., 2008). This study shows that esters have the ability to modify this pattern of degeneration, since it was observed that type II acini would be most affected during the process. This probably occurred because these acini II would be responsible for producing most of the compounds in the glycoprotein saliva of female ticks, synthesized mainly in cells **b**, **c1–c3** and **c5–c6** (Furquim et al., submitted paper), unlike the acini I which would not have a secretory function, and III, which main secretory product would be lipoproteic (cells **d** and **e**) (Binnington, 1978; Walker et al., 1985; Furquim et al., submitted paper).

This study also showed that, considering that one of the main properties of esters of the oil of *R. communis* would be to solubilize sugars (Leonardo et al., 2001; Ferreira et al., 2002; Mandel-



**Fig. 3.** Histological sections of the salivary glands of engorged tick females *Rhipicephalus sanguineus* ticks (T2) stained with HE. I = acini I; II = acini II; III = acini III; ind = Indeterminate acini; a = a cell; c3 = c3 cell; d = d cell; e = e cell; nf = nucleus fragment. Bar: A–H = 20  $\mu$ m.

baum, 2003) these esters were present in females of *R. sanguineus* acting on those reserves, causing a reduction in the amount of raw material (carbohydrates) which would be vital for the synthesis of glycoprotein salivary secretions. A similar phenomenon was reported by Furquim et al. (2003) hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* subjected to different feeding with an artificial diet which caused the premature degeneration of the glands due to cell death.

In general, the literature has shown that the degeneration of female *R. sanguineus* salivary glands occurs through an atypical apoptosis, where there is an intense action of acid phosphatase mainly at the end of the degenerative process, degrading the small amount of cytoplasm that remained in the cells and causing the consequent formation of large vacuoles (Furquim et al., 2008). Data here obtained, however, showed that while these esters affected the glandular degenerative process, accelerating and changing the asynchronous pattern of degeneration, the cells were still able

to maintain the pattern of atypical apoptotic death, since was observed cells with pyknotic nuclei, loss of contact, cytoplasmic vacuolation, as well as the presence of apoptotic bodies, changes that characterize this type of cell death.

Thus, considering that the damage caused by ticks in their hosts and that environmental damage caused by conventional control methods are very aggressive, this study indicated that ester from the oil of *R. communis* could be an alternative method of controlling dog ticks, as they interfered with the secretory activity of the salivary glands, vital organs for the survival and perpetuation of this species of ectoparasites, accelerating its degeneration, and indirectly causing changes in their physiology.

The direct changes which occurred in the salivary glands of the ticks *R. sanguineus* subjected to the esters action led to indirect ones affecting the ectoparasites ovaries as well, where the deficiency in the process of feeding caused incomplete development of the oocytes.



## Acknowledgments

This research has been supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) Grant n°07/59020-0, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) where M.I. Camargo-Mathias and G.H. Bechara are financially supported through research fellowships. The authors thank Gerson Mello Souza for the technical support. Part of this work has been facilitated through the Integrated Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-3) supported by the European Union under contract number 510561-INCO.

## References

- Arnosti, A., Brienza, P.D., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., Calligaris, I.B., Camargo-Mathias, M.I., 2011. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. *Experimental Parasitology* 127, 575–580.
- Bahiense, T.C., Fernandes, E.K.K., Bittencourt, V.R.E.P., 2006. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Veterinary Parasitology* 141, 319–324.
- Bechara, G.H., Szabó, M.P.J., Ferreira, B.R., Garcia, M.V., 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 4, 61–66.
- Binnington, K.C., 1978. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. *International Journal of Parasitology* 8, 97–115.
- Bowman, A.S., Sauer, J.R., 2004. Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology* 129, S67–S81.
- Davey, R.B., Ahrens, E.H., George, J.E., Hunter, J.S., Jeannin, P., 1998. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Veterinary Parasitology* 74, 261–276.
- Ferreira, C.M., Rosa, O.P.S., Torres, S.A., Ferreira, F.B.A., Bernardinelli, N., 2002. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Brazilian Dental Journal* 13, 118–122.
- Flechtmann, C.H.W., 1973. Ácaros de importância médico-veterinária. Livraria Nobel S.A., São Paulo.
- Freitas, D.R.J., Pohl, P.C., Vaz, I.S., 2005. Characterization of acaricide resistance in *Boophilus microplus*. *Acta Scientiae Veterinariae* 33, 109–117.
- Friesen, K.J., Kaufman, W.R., 2003. Cypermethrin inhibits eggs development in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 76, 25–35.
- Furlong, J., 1993. Controle do carrapato dos bovinos na Região Sudeste do Brasil. Bolm Téc.8 Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2008. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). *Experimental Parasitology* 119, 152–163.
- Furquim, K.C.S., Camargo-Mathias, M.I., Silva De Moraes, R.L.M., 2003. Morphological modifications induced by an artificial diet on the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* (Hym., Apidae) during their degenerative process. *Sociobiology* 43, 279–291.
- Gill, H.S., Walker, A.R., 1987. The salivary glands of *Hyalomma anatolicum anatolicum*: nature of salivary gland components and their role in tick attachment and feeding. *International Journal of Parasitology* 18, 83–93.
- Junqueira, L.C.U., Junqueira, L.M.M.S., 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo, Santos.
- Labruna, B.M., 2004. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 13, 123–124.
- Leonardo, M.R., Silva, L.A.B., Tanomaru Filho, M., Bonifacio, K.C., Ito, I.Y., 2001. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *Journal of Endodontics* 27, 717–719.
- Mandelbaum, M.H.S., 2003. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 78, 525–542.
- Nunes, E.T., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2006. Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae) tick female during feeding. *Veterinary Parasitology* 140, 114–123.
- Ribeiro, A.L., Faccini, J.L.H., Daemon, E., 1996. Estudo das variações morfológicas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) no Brasil. *Revista da Universidade Rural Ciência da Vida* 18, 25–33.
- Sauer, J.R., Essenberg, R.C., Bowman, A.S., 2000. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *Journal of Insect Physiology* 46, 1069–1078.
- Saxena, R.C., 1989. Insecticides from neem. In: Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Morand, P. (Eds.), *Insecticides of Plant Origin*. American Chemical Society, pp. 110–129.
- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York.
- Walker, A., Fletcher, Gill, J.D.H.S., 1985. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. *International Journal of Parasitology* 15, 81–100.

## Capítulo 2:

**ARNOSTI, A.**; Brienza, P. D.; Furquim, K. C. S.; Chierice, G. O.; Bechara, G. H.; Calligaris, I. B.; Camargo-Mathias, M. I.. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 127, p. 575-580, 2011.

## Resumo

O presente estudo analisou os efeitos dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) sobre a vitelogênese de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. Para tanto, coelhos hospedeiros infestados com estes carrapatos foram alimentados com ração comercial para coelho enriquecida com ésteres. Os ovócitos de carrapatos do grupo tratamento (**GT**) apresentaram-se com alterações citoplasmáticas, demonstrando que houve a inibição do desenvolvimento dos ovócitos **I** e **II** para os estágios avançados (**IV** e **V**), além dos ésteres também terem interferido na completa maturação dos ovócitos **V**. Além disso, espermatozoides não foram observados no interior das ampolas (região proximal do sistema reprodutor feminino), confirmando o potencial acaricida dos ésteres de ácido ricinoléico.

**Palavras-chave:** carrapatos; *Rhipicephalus sanguineus*; ésteres; óleo de mamona; *Ricinus communis*; acaricida; vitelogênese.



## Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks

André Arnosti<sup>a</sup>, Paula Desjardins Brienza<sup>a</sup>, Karim Christina Scopinho Furquim<sup>c</sup>, Gilberto Orivaldo Chierice<sup>b</sup>, Gervásio Henrique Bechara<sup>c</sup>, Izabela Braggião Calligaris<sup>a</sup>, Maria Izabel Camargo-Mathias<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Av. 24 A, nº 1515, Cx. Postal 199, CEP: 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, USP, Av. Trabalhador São Carlense, 400 PQ, Arnoldschmidt, CEP: 13566-590 São Carlos, SP, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n, CEP: 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 October 2009

Received in revised form 23 August 2010

Accepted 13 October 2010

Available online 9 November 2010

#### Keywords:

*Rhipicephalus sanguineus*

Vitellogenesis

Ricinoleic acid esters

Tick

*Ricinus communis*

Oocytes

### ABSTRACT

This study examines the effects of ricinoleic acid esters from *Ricinus communis* castor oil on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* ticks attached to hosts that were fed with commercial rabbit food containing these esters. The oocytes of ticks from the treatment group (TG) showed cytoplasmic changes that inhibited the development of oocytes I and II to the advanced stages (IV and V) in addition to preventing the maturation of oocytes V, resulting in small ones. In addition, sperm was not observed in ampoules. Our findings confirm the acaricide potential of ricinoleic acid esters.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Ticks have become important subjects of study in different fields of knowledge, as they are ectoparasites in biological chains. They are important vectors of many microorganisms that attack several species of animals, including human (Dantas-Torres et al., 2006).

Currently, *Rhipicephalus sanguineus* is probably the most disseminated tick in the world, due to its wide distribution and reproductive habits. It is an ectoparasite that feeds on warm-blooded animals, having dogs as its main host, but may also infest cattle, buffalo, camels, horses, goats, sheep, reptiles, bats and a variety of birds (Prette et al., 2005; Oliveira et al., 2009).

Ticks control is currently done through the use of acaricides containing chemical components (active ingredients) that despite being effective on ectoparasites also have side effects to their hosts and negative impacts to the environment (Olivo et al., 2008). In addition, studies conducted by researchers from the BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) group have already demonstrated that veterinary products used to control

ticks are sometimes sold in much higher doses than those actually required to eliminate these ectoparasites (Roma et al., 2009).

According to Gromboni et al. (2007), the use of chemicals to control ticks in cattle usually generates hundreds of gallons of residues, which are often discarded indiscriminately, leading to water and soil contamination. Typically these applications use approximately 4–5 L of solution for each adult animal and produce a high volume of exceeding solution (Gromboni et al., 2007).

In addition to causing environmental pollution the indiscriminate use selects resistant animals, making the search for alternatives to chemicals urgent. Plant compounds have been shown to be an important alternative for the control of these ectoparasites (Olivo et al., 2008).

Ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*) have been shown to efficiently control micro and ectoparasites. Recent studies on the use of non-polluting plant esters have shown that they act in the hydrolysis of saccharides and the dissolution of lipids in different biological systems (Leonardo et al., 2001; Ferreira et al., 2002; Mandelbaum et al., 2003).

Another important factor concerning the control of ticks is the mode of the action of these natural or alternative molecules in their bodies, aiming to decrease not only the parasite load of the host but also the free life forms of the parasite.

\* Corresponding author. Fax: +55 19 35340009.

E-mail address: micm@rc.unesp.br (M.I. Camargo-Mathias).

Nonetheless, the effects of these substances as alternative methods to control ticks and the effects on their reproductive system (ovaries, oocytes and ampoules) have not yet been clarified. In this sense, the present study had the objective to describe the action of ricinoleic acid esters from *R. communis* on oocytes, ampoule, and vitellogenesis of *R. sanguineus* ticks.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bioassays

In this study, three groups of five naive rabbits each were infested with a total of 375 couples of *R. sanguineus* ticks (25 couples of ticks/rabbit). The hosts of the control group (CG) were fed with commercial rabbit food. Rabbits from the treatment group (TG) were fed with rabbit food with two concentrations of ricinoleic acid esters from castor oil stabilized with NaCl added in it for 10 days. The concentrations used were 1 g of ricinoleic acid esters per kilogram of rabbit food in the treatment group I (T1) and 5 g of ricinoleic acid esters per kilogram of rabbit food in the treatment group II (T2).

### 2.2. Histology

The ovaries of the engorged females were removed after anesthesia by thermal shock in the refrigerator and were fixed in a solution of 10% formalin and acetone P.A. (9:1) for 1 h and 30 min at 4 °C. The material was then dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70%, 80%, 90% and 95%), for 15 min each, and transferred to Leica resin, included and sectioned at a thickness of 3 µm. Sections were placed on glass slides and processed for aqueous hematoxylin–eosin staining (Junqueira and Junqueira, 1983). The sections were rehydrated in distilled water for 1 min, stained for 10 min with hematoxylin, and rinsed with water. Subsequently, the sections were stained with eosin for 10 min, rinsed again, and the glass slides were allowed to dry. Slides were mounted in Canada balsam and observed and photographed with a light microscope Motic BA 300.

## 3. Results

### 3.1. Control group (CG)

The morphohistology of the ovaries of *R. sanguineus* has already been described by Oliveira et al. (2005). According to these authors, the oocytes are classified into five stages (I–V), which were used in the present study as a reference for the control group (CG).

#### 3.1.1. Oocytes I

Small elliptical cells with a clear germinal vesicle and very evident nucleoli occupying most of the homogeneous nuclei (Fig. 1A and B).

#### 3.1.2. Oocytes II

Larger cells in comparison to oocytes I, elliptical, and with germinal vesicle in the center. A fine homogeneous granulated material is observed in the cytoplasm (Fig. 1A and C).

#### 3.1.3. Oocytes III

Larger rounded or elliptical shaped cells in comparison to oocytes I and II. The germinal vesicle occupies the oocyte's pole facing the pedicel (Fig. 1D). The plasma membrane is thicker than those observed in other stages, with characteristics resembling the chorion. The cytoplasm is filled with yolk granules of various sizes,

with the smaller ones occupying the central region and the larger ones, the oocyte periphery (Fig. 1A and E).

#### 3.1.4. Oocytes IV

Round-shaped cells – larger in comparison to oocytes I, II, and III. The germinal vesicle is no longer observed due to the presence of the yolk granules. The chorion is almost completely deposited (Fig. 1F).

#### 3.1.5. Oocytes V

The oocytes are larger, as they reach the final developmental stage. The germinal vesicle is no longer observed; yolk granules occupy the cytoplasm; the chorion is thick and completely deposited (Fig. 1G).

#### 3.1.6. Ampoule

The ampoule of individuals from the control group was intact and contained large amounts of sperm stored in the lumen resulting from epithelial cells arrangement; they are secretory and present round nuclei (Fig. 1H).

### 3.2. Treatment group I (TG I) (1 g ester/kg rabbit food)

Clear structural changes are observed in the oocytes of ticks from treated rabbits, as described below.

#### 3.2.1. Oocytes I

The oocytes I present highly vacuolated cytoplasm mainly in the peripheral region of the cell or around the germinal vesicle, resulting in the loss of its round shape (Fig. 2A and B).

In some cases, the nucleoli of the germinal vesicles become disorganized with the presence of apparent vacuoles. The chromatin in the germinal vesicle is dispersed and uncondensed (Fig. 2C).

#### 3.2.2. Oocytes II

The pole of these oocytes, which is in contact with the pedicel, is similar to that observed in oocytes I, but vacuolation is more evident and vacuoles are larger than those observed in the previous stage. In the cytoplasm of vitellogenic oocytes, fine granules are observed, especially among the large vacuoles (Fig. 2C).

The morphology of the germinal vesicle remains the same as that observed in the previous stage. The oocytes in this stage are losing their original shape (Fig. 2C).

#### 3.2.3. Oocytes III

At this developmental stage, the action of esters in the ovary is evident. Oocytes completely lose their original shape. Despite the presence of vacuoles in the cytoplasm, vitellogenesis does not seem to have been completely impaired, as many yolk granules are still distributed throughout the cell (Fig. 2D).

The germinal vesicle is deformed and its nucleoli are disorganized resembling a ring (a morphological sign of degeneration).

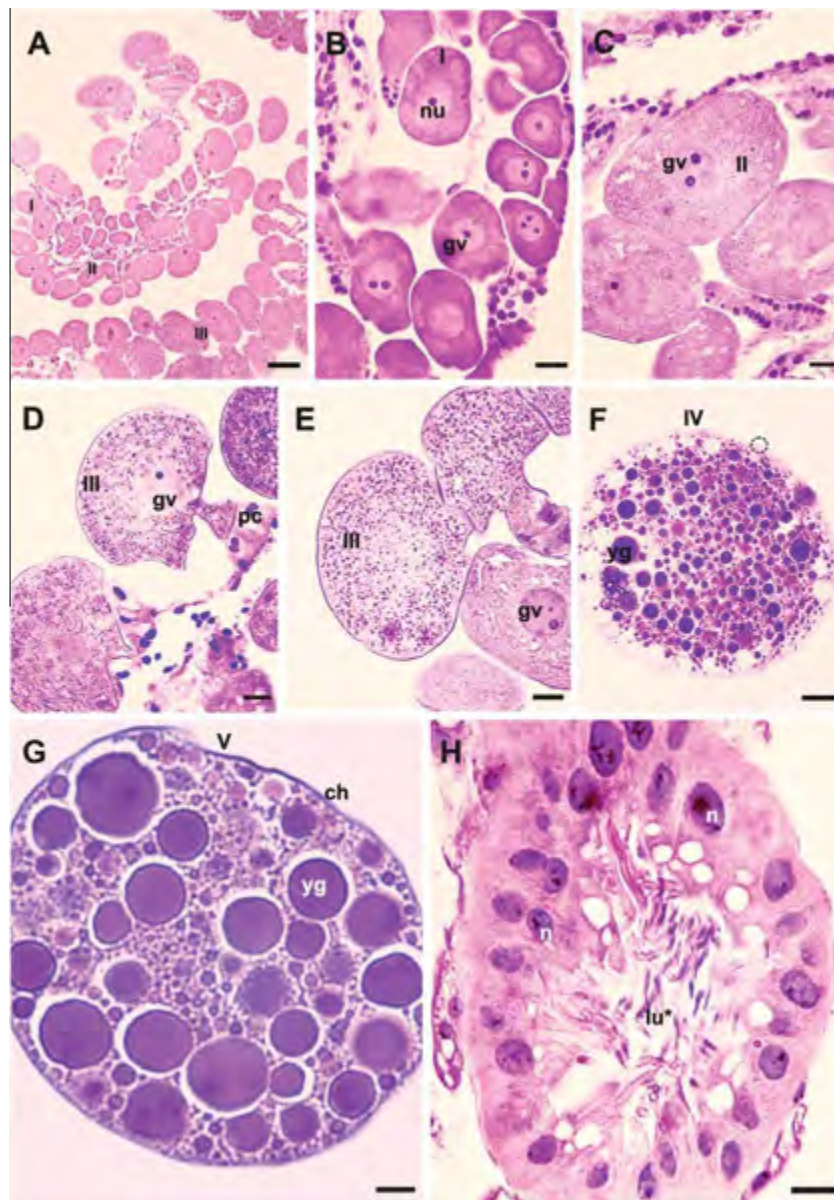
The chorion, which begins to be deposited during this stage, is synthesized, but due to the effects of ricinoleic acid esters, it is discontinuous around the oocyte (Fig. 2D).

#### 3.2.4. Oocytes IV

Despite the presence of cytoplasmic vacuolation, oocytes IV of treatment group I ticks are less affected by ricinoleic acid esters, except for their protective membranes. The chorion is thinner and the boundaries of oocytes are wrinkled. The germinal vesicle is no longer observed (Fig. 2E and F).

#### 3.2.5. Oocytes V

Few oocytes V are found in TG1 ticks. Those observed have vacuoles in their cytoplasm, and very large yolk granules, which



**Fig. 1.** Histological sections of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* females stained with HE. Control group: (A) oocytes in various stages of maturation; (B) oocyte I (I); (C) oocyte II (II); (D, E) oocyte III (III); (F) oocyte IV (IV); (G) oocytes V (V); (H) ampoule. ch = chorion; gv = germinal vesicle; lu\* = sperm in the lumen; n = ampoule cell nuclei; nu = nucleoli; yg = yolk granules; pc = pedicel and dashed circle = chorion almost completely deposited. Bars: A = 100  $\mu$ m; B–H = 20  $\mu$ m.

are probably the result of the fusion of several smaller ones, due to lysis and yolk disorganization. The chorion is not deposited all around the oocyte and is thinner than that observed in the control group (Fig. 2G).

### 3.2.6. Ampoule

The ampoule of ticks from treatment group I shows less damage caused by ricinoleic acid esters.

The epithelial cell lining of the ampoule is very disorganized, and secretion is not found in their cytoplasm or in their lumen. Spermatozoan and secretion are absent (Fig. 2H).

### 3.3. Treatment group II (TG II) (5 g ester/kg rabbit food)

Oocytes of TG II ticks show the most prominent structural changes, as observed in Fig. 3A–H.

The histological organization of the ovary (wall ovary and the pedicel cells) loses its original characteristics (Fig. 3A and B).

#### 3.3.1. Oocytes I

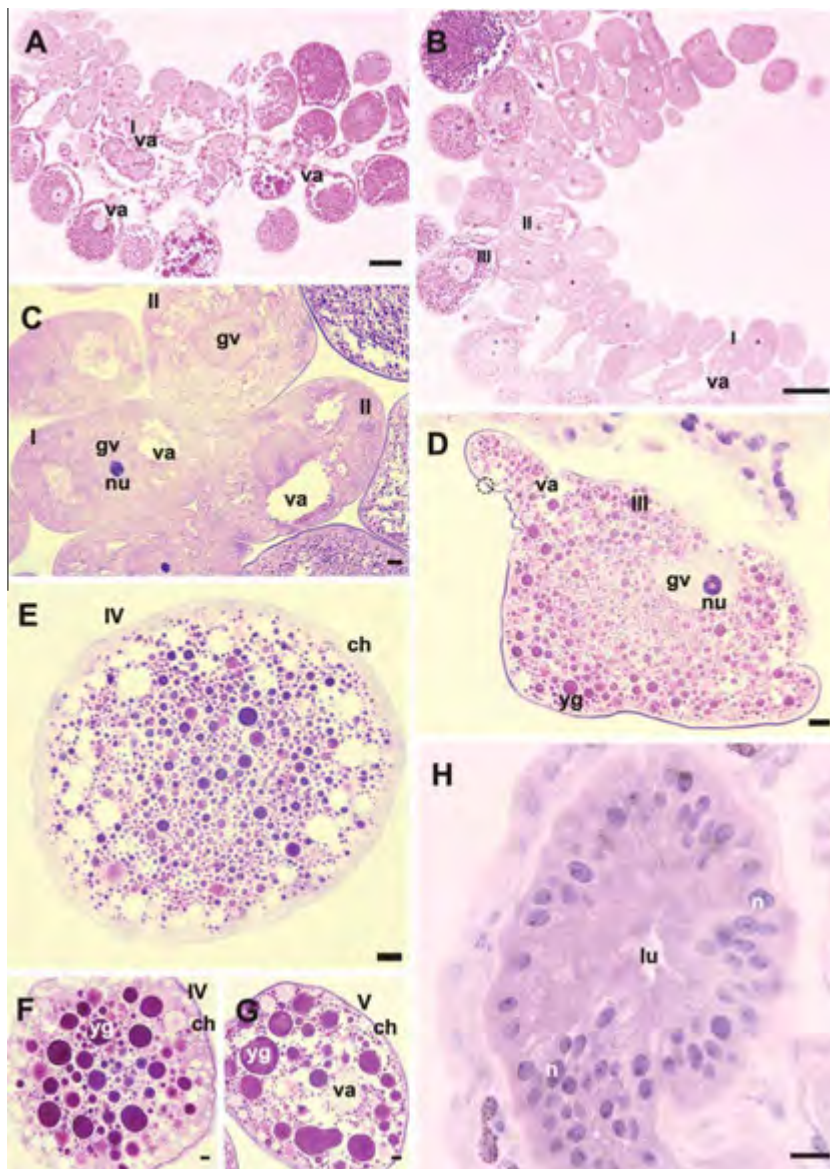
The oocytes I are significantly smaller and with little vacuolation. The germinal vesicle is completely disorganized with nucleolar fragmentation (Fig. 3C).

#### 3.3.2. Oocytes II

Oocytes II exhibit prominent vacuolation when compared to those from treatment group I. Some of them do not have an internal structural organization and the germinal vesicle is apparently degenerated (Fig. 3D).

#### 3.3.3. Oocytes III

These oocytes are the most affected by ricinoleic acid esters. In addition to losing their original form (Fig. 3D and E), over 30% of



**Fig. 2.** Histological sections of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* females stained with HE. Treatment group I (1 g ester/kg rabbit food): (A, B) oocytes in various stages of maturation; (C) oocytes I (I) and II (II); (D) oocyte III (III); (E, F) oocyte IV (IV); (G) oocyte V (V); (H) ampoule. ch = chorion; gv = germinal vesicle; va = vacuoles; lu = lumen; n = ampoule cell nuclei; yg = yolk granules; nu = nucleoli and dashed circle = chorium almost completely deposited. Bars: A, B = 100  $\mu$ m; C–H = 20  $\mu$ m.

the cytoplasm is occupied by vacuoles. Yolk granules, although present, are much smaller than those of other groups (control and treatment group II). The germinal vesicle is no longer observed.

#### 3.3.4. Oocytes IV

Like oocytes III, oocytes IV are significantly affected. Large vacuolated areas are still observed and the oocyte is completely irregular. The germinal vesicle is no longer observed (Fig. 3F).

#### 3.3.5. Oocytes V

Only a few oocytes are found in stage V. The ones that remain are smaller than those from other analyzed groups, with extensive vacuolation and smaller yolk granules (Fig. 3G).

#### 3.3.6. Ampoule

Like the ovary, the ampoule is also affected by ricinoleic acid esters.

In this group disorganization of the epithelium is observed, the cells are vacuolated and lysed, and secretion and spermatozoa are not observed in the lumen (Fig. 3H).

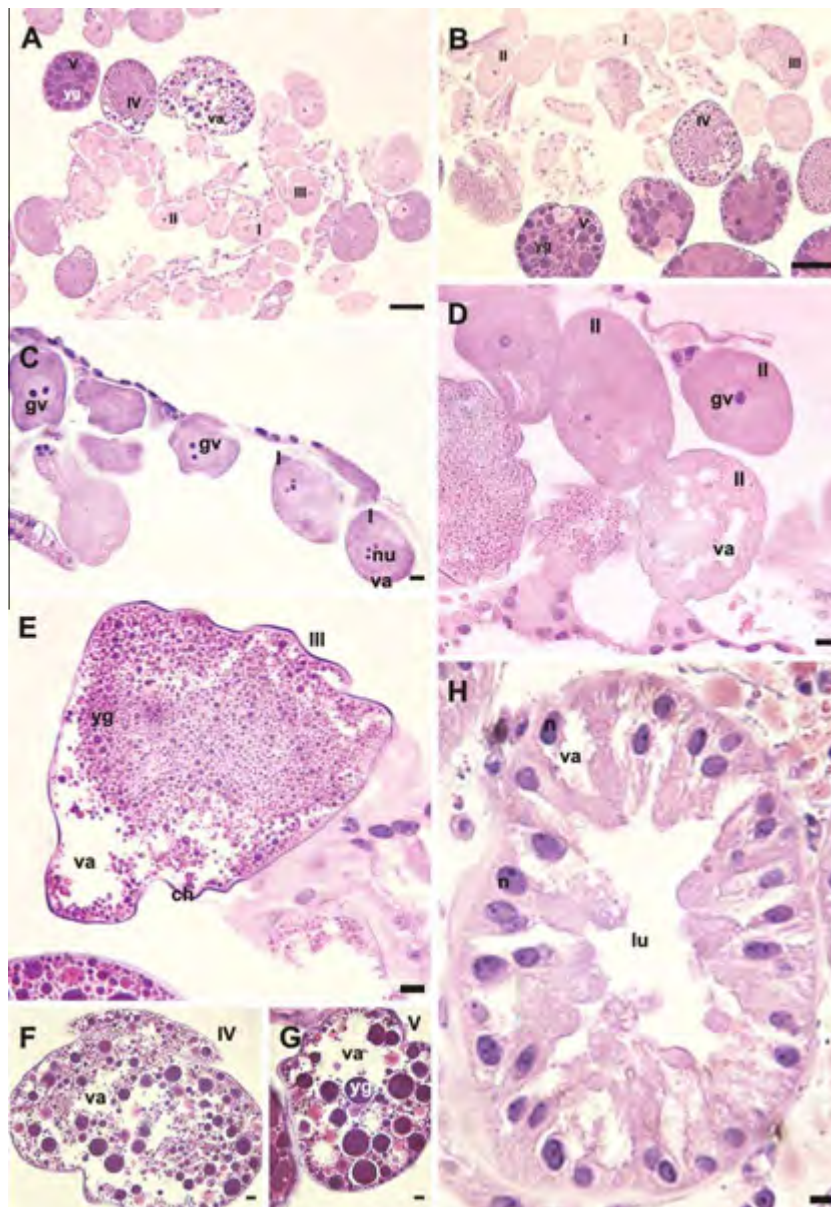
## 4. Discussion

The present findings revealed that plant compounds could be an alternative tick control method with similar benefits to chemical acaricides, but causing less damage to organisms in general.

The consumption of castor oil esters by rabbits hosting the dog tick *R. sanguineus* significantly affected the vitellogenesis of the female, by making the oocytes non-viable and/or causing their death, and thus preventing new offspring from developing.

The vitellogenesis of *R. sanguineus* has already been described in detail by Oliveira et al. (2005) and these data were used here to compare the effects of esters from *R. communis* on the ovaries of treated ticks.

The results showed a significant effect of esters on tick oocytes of treatment group II (5 g ester/kg ration) in early stages



**Fig. 3.** Histological sections of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* females stained with HE. Treatment group II (5 g ester/kg rabbit food): (A, B) oocytes in various stages of maturation; (C) oocyte I (I); (D) oocytes II (II) and III (III); (E) oocyte III (III); (F) oocyte IV (IV); (G) oocyte V (V); (H) ampoule. ch = chorion; gv = germinal vesicle; va = vacuoles; lu = lumen; n = ampoule cell nuclei; yg = yolk granules and nu = nucleoli. Bars: A, B = 100  $\mu$ m; C–H = 20  $\mu$ m.

of development (I and II), by reducing their size and inhibiting both the synthesis (endogenous process) and uptake of vitellogenic elements (exogenous process), such as lipids, proteins and carbohydrates and/or complex elements that make up part of the yolk and provide nutrients for the embryo. The predominance of immature oocytes in relation to mature ones (control group) was remarkable in this treatment, thus confirming the effectiveness of esters.

Another indication of the strong action of esters was the massive amounts of vacuoles in the cytoplasm of oocytes of treated ticks, regardless of the developmental stage.

Vacuolation in general is known to reflect the physiology of the cell. In this study, the altered cell physiology reflected by the vacuolation probably resulted from the toxic effects of ricinoleic acid esters. Vacuolation is an attempt of the cell to isolate the toxic compound or even portions of the cytoplasm damaged by the action of the compound, so that the cell can still perform its metabolic processes. Many of the vacuoles could also contain, in

addition to the toxic waste, debris or even entire organelles unable to perform their functions. This has already been reported in other studies, including those conducted by the BCSTM group, on fipronil, the active ingredient of Frontline (Oliveira et al., 2008, 2009), and permethrin, the active ingredient of Advantage Max 3-Bayer (Roma et al., 2009). Both of these chemical acaricides affect the ovaries of *R. sanguineus* ticks.

In this study, oocytes in the developmental stages III, IV and V were also significantly affected by ricinoleic acid esters. At these stages, normally developing cells are large and as vitellogenesis advances, lipids, proteins and polysaccharides or their complexes can be found in yolk granules. In oocytes of individuals exposed to ricinoleic acid esters, this was not observed. The germinal cells were very deformed with many vacuoles and large damages. The deposition of the chorion, the protective membrane of the oocytes of arthropods in general (Chapman, 1998), was also affected.

A significant change in the deposition of the chorion certainly affects the optimization of the protective barrier of the oocyte.



Despite having a morphology that allows the oxygenation of the embryo (micropores), the chorion has a structure capable of protecting these cells from various adverse situations, when they are exposed to the environment, such as desiccation, predation, and changes in humidity and temperature (Hinton, 1981; Oliveira et al., 2005). Thus, in the case of the individuals examined in this study, the disruption of this protective membrane would expose oocytes to the hemolymph and allow toxic compounds to penetrate into the oocyte. This caused an increase in vacuoles, yolk granules lost their round shape, became very irregular and began to lyse, leading to major changes in the cytoplasm of oocytes, compared with those of the control group. These changes were also observed when aqueous extracts of “neem” (*Azadirachta indica*) plant were used to control ticks, as obtained by Denardi et al. (personal communication).

These findings indicate that castor oil esters made oocytes non-viable, thus preventing them from reaching advanced stages of development. This was confirmed by the presence of very few oocytes in stage V in the ovaries of the exposed individuals, in relation to those of the control group.

In addition to interfering with the vitellogenesis of *R. sanguineus* ticks, castor oil esters also affected other cells of the female reproductive system. This was clearly observed in the ampoules of ovaries. Epithelial cells of ampoules were disorganized and exhibited vacuoles and the lumen did not contain secretions and spermatozoa (the latter is transferred from the male to the female during mating), unlike that observed in the females of the control group.

The present study is the first to examine the effects of ricinoleic acid esters from castor oil on tick vitellogenesis.

This work showed the effectiveness of these esters resulting in the following changes: (a) vacuolation in oocytes and other cells of the female reproductive system, (b) interference in the synthesis and uptake of vitellogenic elements (lipids, proteins and carbohydrates), (c) interference in the deposition rate of the chorion in the oocytes, as well as in its constitution, (d) resulting in a significant increase in the number of oocytes in the immature stages (I and II) failing to advance to the next stages of vitellogenesis and (e) a significant decrease in oocytes in the final stages of maturation. These results indicate that castor oil esters may be in the future an alternative method to tick control.

## Acknowledgments

This study was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESP (Fundação

de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) Grant No. 05/59208-3. M.I. Camargo-Mathias and G.H. Bechara are financially supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) research fellowships. The authors thank Gerson Mello Souza for technical support. Part of this work has been facilitated through the Integrated Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-3) supported by the European Union under Contract No. 510561-INCO.

## References

- Chapman, R.F., 1998. The Insects: Structure and Function. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dantas-Torres, F., Figueredo, L.A., Brandao-Filho, S.P., 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 64–67.
- Ferreira, C.M., Rosa, O.P.S., Torres, S.A., Ferreira, F.B.A., Bernardinelli, N., 2002. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Brazilian Dental Journal* 13, 118–122.
- Gromboni, C.F., Ferreira, A.G., Yassuto Kamogawa, M., Araújo Nogueira, A.R., 2007. Avaliação da reação foto-fenton na decomposição de resíduos de carrapaticidas. *Química Nova* 30, 264–267.
- Hinton, H.E., 1981. *Biology of Insect Eggs*. Pergamon Press, Oxford.
- Junqueira, L.C.U., Junqueira, L.M.M.S., 1983. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. Livraria Editora Santos, São Paulo.
- Leonardo, M.R., Silva, L.A.B., Tanomaru Filho, M., Bonifacio, K.C., Ito, I.Y., 2001. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *Journal of Endodontics* 27, 717–719.
- Mandelbaum, S.H., Santos, E.P., Mandelbaum, M.H.S., 2003. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 78, 525–542.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Nunes, E.T., Camargo-Mathias, M.I., 2005. Morphological characterization of ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology* 110, 146–156.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2008. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2459–2465.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Marin Morales, M.A., Camargo-Mathias, M.I., 2009. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Ultrastructural evaluation of ovary cells*. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1255–1264.
- Olivo, C.J., Madruga de Carvalho, N., Sousa da Silva, J.H., Flores Vogel, F., Massariol, P., Meinerz, G., Agnolin, C., Farias Morel, A., Volnei Viau, L., 2008. Óleo de citronela no controle de carrapatos de bovinos. *Ciência Rural* 38, 406–410.
- Prette, N., Monteiro, A.C., Garcia, M.V., Soares, V.E., 2005. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. *Ciência Rural* 35, 855–861.
- Roma, G.C., Oliveira, R.P., Pizano, M.A., Camargo-Mathias, M.I., 2009. Determination of LC50 of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology* 123, 269–272.

**Capítulo 3:**

**ARNOSTI, A.;** Camargo-Mathias, M. I..Componente do óleo de mamona sinaliza ser alternativa viável para o controle de carrapatos. *Jornal do Engenheiro Agrônomo*, São Paulo, v.258, p.13, 2011.

## Componente do óleo de mamona sinaliza ser alternativa viável para o controle de carrapatos

André Arnosti e Dra. Maria Izabel Camargo Mathias



Os carrapatos sejam no ambiente rural ou no urbano tem sido um grande problema para a sociedade. Para os criadores de gado leiteiro e, principalmente, para os de carne e de couro esses ectoparasitas causam enormes prejuízos. Já nos ambientes urbanos as infestações nos cães domésticos, além de comuns contaminam o ambiente domiciliar, por meio da transmissão de patologias ao homem.

O desafio de controlar esses artrópodes há muito tem sido objeto de estudos de grandes universidades, bem como de instituições de pesquisa do mundo todo, e o resultado tem sido a produção de acaricidas (químicos sintéticos) que são hoje em dia largamente utilizados. Contudo, danos colaterais tem sido relatados como contaminação ambiental, efeitos residuais na carne e no leite e a seleção de novas gerações de carrapatos que são pouco afetadas pela aplicação dos acaricidas.

O controle alternativo dos carrapatos fazendo uso de bio-compostos sinaliza, em longo prazo, ser uma saída interessante para os problemas até agora encontrados, dentre os quais, estão a resistência aos acaricidas, danos que são causados aos organismos não alvo, e ao meio ambiente.

Das inúmeras espécies vegetais até agora estudadas, para futuramente serem utilizadas no controle eficaz dos carrapatos, inclui-se recentemente a planta da mamona (*Ricinus communis*) a qual, nos últimos anos surgiu como uma grande promessa, visto que os seus componentes, como o óleo dela extraído, já é amplamente conhecido (produção de biodiesel), graças ao trabalho de pesquisadores da Embrapa. Além disso, essa planta tem fornecido princípios ativos que tem possibilitado a fabricação de próteses, que além de serem utilizadas no país, tem sido largamente exportadas para o mundo, trazendo divisas monetárias para o Brasil e, mostrando a competência dos nossos pesquisadores no que se refere ao lançamento de novas tecnologias.

Recentemente uma nova aplicação para os componentes da mamona surgiu, a partir de estudos desenvolvidos pelo BCSTM (Brazilian Center of Studies on Ticks Morphology) sediada na UNESP de Rio Claro e, coordenada pela Profa. Dra. Maria Izabel Camargo

Mathias, na tentativa de oferecer uma alternativa para o controle de carrapatos. Esses estudos tem sido realizados em parceria com o Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice (Instituto de Química da USP de São Carlos), o qual tem fornecido os ésteres obtidos por ele, a partir do óleo da mamona. Os primeiros resultados em laboratório foram animadores e resultaram na publicação dos resultados em revistas internacionais, comprovando em laboratório o efeito deste componente do óleo da mamona sobre o sistema reprodutor dos carrapatos, bem como agindo no seu sistema salivar impedindo assim, seu completo desenvolvimento.

O caminho para que esta nova descoberta chegue até aos criadores na forma de um produto comercial para utilização em campo, ainda é longo, mas os estudos já sinalizam a possibilidade do surgimento de uma nova alternativa para o combate deste ectoparasita.

É importante lembrar ao leitor que o controle de carrapatos, seja via acaricida químico convencional ou alternativo (produtos naturais) por si só nunca irá resolver o problema "de vez", sendo que a melhor forma de manter esses ectoparasitas sobre controle é ainda o correto manejo da propriedade.

André Arnosti é Engenheiro Agrônomo e Doutorando em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) da UNESP Rio Claro - arnosti@rc.unesp.br.  
Dra. Maria Izabel Camargo Mathias é Professora Titular do Departamento de Biologia da UNESP Rio Claro - micm@rc.unesp.br





## 5. Discussão Geral

O presente estudo é o primeiro a trazer os dados científicos sobre a ação dos ésteres obtidos a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) sobre a morfofisiologia das glândulas salivares e dos ovários de fêmeas completamente ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*.

Este estudo mostrou que os ésteres fornecidos (via alimentação) aos hospedeiros (coelhos) agiram de forma acentuada, nas glândulas salivares dos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, acelerando o processo degenerativo deste órgão. Além disso, ficou ser demonstrado que os danos provocados nas células glandulares foram proporcionais à concentração utilizada do produto, ou seja, na concentração mais alta (**T2**) as alterações degenerativas foram muito mais intensas, tais como aceleração e mudança do padrão assincrônico no processo de degeneração natural das glândulas salivares, bem como intensa vacuolização e interferência na deposição do cório nos ovócitos.

A literatura coloca que a degeneração natural das glândulas salivares de carrapatos apresenta um padrão assincrônico, onde os ácinos III são aqueles primeiro afetados e os I os últimos (NUNES et al., 2005; FURQUIM et al., 2008). Ao contrário, os dados aqui obtidos demonstraram que os ésteres modificam este padrão de degeneração, uma vez que os ácinos do tipo II foram os mais afetados ao longo do processo, provavelmente devido aos mesmos serem os responsáveis pela produção da maior parte dos compostos glicoprotéicos da saliva das fêmeas dos carrapatos, sendo produzidos principalmente nas células **b**, **c1-c3** e **c5** e **c6** (FURQUIM et al., 2009), diferentemente dos ácinos I, que não teriam função secretora, e dos III, cujo principal produto secretado seria de natureza lipóprotéica (células **d** e **e**) (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985; FURQUIM, et al., 2009).

Neste sentido, considerando os dados acima apresentados e que uma das principais propriedades dos ésteres do óleo de *R. communis* seria a de solubilizar os açúcares (LEONARDO et al. 2001, FERREIRA et al. 2002 e MANDELBAUM et al. 2003) pode-se aqui inferir que esta substância estaria agindo sobre as reservas presentes no corpo das fêmeas de *R. sanguineus*, provocando redução na quantidade de matéria-prima (monissacarídeos) que seria imprescindível para a

síntese da secreção salivar. Fato semelhante foi demonstrado por Furquim et al. (2003) em glândulas salivares de abelhas *Apis mellifera* submetidas à alimentação diferenciada com dieta artificial (açúcares), o que provocou a degeneração precoce das glândulas hipofaríngeas devido a morte das células, além de ter modificado a natureza da secreção que passou de glicoprotéica para polissacarídica.

A literatura em geral tem demonstrado que em fêmeas de *R. sanguineus* as glândulas salivares degeneram por meio de apoptose atípica, onde verifica-se intensa ação da fosfatase ácida no final do processo degenerativo, degradando o pouco citoplasma que resta nas células, e provocando conseqüentemente a formação de extensos vacúolos (FURQUIM et al., 2008). Os dados aqui obtidos, no entanto demonstraram que embora os ésteres tenham afetado o processo degenerativo glandular, acelerando-o, e também mudando o padrão de degeneração (ou seja os ácinos II foram os primeiros a sofrer degeneração), as células ainda assim mantiveram o padrão de morte apoptótica atípica, isso dito em função de terem sido comumente observadas células com núcleos picnóticos, apresentando perda de contato entre uma e outra, vacuolização citoplasmática, bem como presença de corpos apoptóticos, alterações estas que caracterizaram a ocorrência de tal tipo de morte celular.

Os ésteres aqui estudados além de terem agido nas glândulas salivares, também mostraram clara influência no desenvolvimento dos ovócitos dos carrapatos desta mesma espécie. Os dados obtidos demonstraram que esse composto agiria significativamente sobre a vitelogênese, alterando a morfologia e/ou levando estas células à morte, impedindo desta forma que novos indivíduos viessem a se desenvolver.

Os resultados ainda revelaram de que forma os ésteres agiram nos ovócitos quando nos diferentes estágios de desenvolvimento onde aqueles I e II, tiveram seus tamanhos reduzidos quando submetidos aos ésteres no **T2** (5g ester/kg de ração), o que implicou na inibição dos processos tanto de síntese (processo endógeno) quanto da incorporação (processo exógeno) dos elementos vitelogênicos (lipídeos, proteínas e carboidratos) e/ou a formação de complexos entre os elementos, que fariam parte do vitelo e que seriam a fonte de energia para o desenvolvimento do embrião. Dessa forma, o predomínio de ovócitos imaturos em relação aqueles maduros (**GC**) foi marcante no tratamento, confirmando a eficácia

dos ésteres. Outro fato que mostrou a significativa ação dos ésteres foi a presença massiva de vacúolos no citoplasma dos ovócitos, independente do estágio de desenvolvimento dos mesmos.

Sabe-se que as características morfológicas das células são reflexos da sua fisiologia. No presente estudo verificou-se elevada vacuolização nas células germinativas femininas e das glândulas salivares, indicam que sua fisiologia foi alterada devido à ação dos ésteres. Estudos anteriores com acaricidas sintéticos demonstraram que a vacuolização seria uma forma da célula tentar isolar o produto tóxico, ou mesmo isolar porções do citoplasma por ele modificadas, para que esta ainda conseguisse realizar seus processos metabólicos. Muitos dos vacúolos, poderiam ainda conter, além dos resíduos de composto tóxico, restos ou mesmo organelas inteiras que estivessem inaptas de realizar suas funções, dados esses que já foram obtidos e publicados em outros trabalhos também realizados por outros pesquisadores do grupo BCSTM – Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (ROMA et al. 2009; OLIVEIRA et al. 2008, 2009), e que avaliaram a ação da permetrina (ingrediente ativo do Advantage Max 3-Bayer) e do fipronil (ingrediente ativo do Frontline), ambos acaricidas sintéticos, sobre os ovários de carrapatos *R. sanguineus*.

Durante o desenvolvimento deste estudo ficou claro que os ésteres agiram de forma efetiva principalmente nos ovócitos III, IV e V. Os mesmos, no processo de vitelogênese normal, apresentar-se-iam como células grandes e com a vitelogênese já bastante adiantada, visto que todos os componentes (lipídicos, protéicos e polissacarídicos) ou ainda, complexos destes, já seriam evidenciados sob a forma de grânulos de vitelo. Nos ovócitos dos indivíduos expostos aos ésteres, essa situação não ocorreu. As células germinativas nesse caso apresentaram-se completamente deformadas, com muitos vacúolos citoplasmáticos e com prejuízo inclusive no processo de deposição do cório, membrana envoltória e protetora dos ovócitos dos Arthropoda em geral (CHAPMAN, 1998). A significativa alteração na deposição do cório, no caso em questão, certamente afetou a otimização desta barreira de proteção do ovócito. O cório, tem constituição morfológica que permite a oxigenação do embrião (microporos), estando apto a proteger essas células de situações adversas no ambiente tais como: dessecação, predação, mudanças de umidade e de temperatura (HINTON, 1981; OLIVEIRA et al. 2005). No caso dos

indivíduos em questão, em face dessa desestruturação do cório, os ovócitos ainda no ovário ficariam mais expostos ao contato com a hemolinfa do carrapato que, nos indivíduos tratados, teria a substância tóxica na circulação, e que conseguiria então penetrar nos ovócitos com mais facilidade, causando um aumento da vacuolização citoplasmática, bem como alterações na forma e na composição dos grânulos de vitelo. Os grânulos de vitelo, por sua vez perderiam suas características morfológicas, e de arredondados passariam a ficar completamente irregulares, bem como sofreriam processos de lise, alterações estas que somadas inviabilizariam o seu desenvolvimento. Assim os resultados aqui obtidos foram contrários aqueles obtidos nos indivíduos do grupo controle, no entanto, corroboraram aqueles obtidos por Denardi et al., (2010) que utilizaram extratos aquosos de “neem” para o controle de carrapatos.

Ficou claro no presente estudo que além dos ésteres interferirem na vitelogênese e no ciclo secretor das glândulas salivares das fêmeas de carrapatos *R. sanguineus*, eles também atuaram em células de outro órgão do sistema reprodutor feminino, ou seja, a ampola região proximal dos ovários. Nesta observou-se a presença de células epiteliais vacuolizadas e desorganizadas, bem como ampolas com lúmen vazio, sem secreções e sem os espermatozoides (estes últimos transferidos do macho para a fêmea por ocasião da cópula), ao contrário do observado nos indivíduos do **GC**.

Diferentemente dos métodos convencionais de controle com produtos químicos sintéticos (DAVEY et al., 1998; FRIESEN et al., 2003; FREITAS et al., 2005), que matam os carrapatos agindo neurotóxicamente, ficou aqui demonstrado pela primeira vez que as diferentes concentrações dos ésteres obtidos a partir do óleo de *R. communis* (**T1**-1g de éster/kg de ração e **T2**-5g/de éster/kg de ração), sinalizaram para uma forma de controle diferenciada, através da interferência desta em dois órgãos interdependentes e de suma importância para a sobrevivência e reprodução dos carrapatos: as glândulas salivares (por meio da indução precoce da degeneração), e os ovários (agindo, direta ou indiretamente, nestes, uma vez que o insucesso da alimentação acarretaram na deficiência de produção e de incorporação de componentes necessários para o desenvolvimento dos ovócitos).

Desta forma, o presente trabalho demonstrou, pela primeira vez que a utilização deste produto de origem vegetal poderá ser outra forma de controle de



carrapatos, a qual deverá trazer benefícios semelhantes aqueles obtidos com a utilização de acaricidas sintéticos, porém com menores prejuízos aos organismos não alvos, bem como ao meio ambiente.

---

**CONCLUSÕES**

## 6. Conclusões

- 1- As maiores concentrações do éster do ácido ricinoléico extraídas de *Ricinus communis* adicionadas à ração comercial dos coelhos hospedeiros no grupo tratamento (**GT**), foram as que causaram os maiores efeitos nas glândulas salivares, e nos ovários de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*.
- 2- Os ésteres obtidos a partir do óleo extraído de *Ricinus communis* interferiram na morfologia e conseqüentemente na fisiologia (processo de alimentação e de vitelogênese) das glândulas salivares e dos ovários, de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, respectivamente.
- 3- Nas glândulas salivares os ésteres aceleraram o processo de degeneração das células acinares.
- 4- Nos ovários os ésteres interferiram no desenvolvimento dos ovócitos em estágios iniciais (**I e II**) inibindo a maioria deles de chegar a maturação (estágio V).
- 5- As fêmeas dos Grupos Tratamento (**T1**) e (**T2**) apresentaram menor número de ovócitos no estágio V, e estes tiveram seu tamanho reduzido, quando comparados aos daqueles do Grupo Controle (**GC**).
- 6- Os ésteres do ácido ricinoléico extraídos de *Ricinus communis* provocaram efeitos: **1)** sobre o processo de síntese da secreção produzida pela glândula salivar e **2)** sobre a vitelogênese, inibindo esse processo.

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. Referência bibliográfica

ARNOSTI, A.; BRIENZA, P. D.; FURQUIM, K. C. S.; CHIERICE, G. O.; NETO, S. C.; BECHARA, G. H.; SAMPIERI, B. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.. Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, 127: 569-574, 2011.

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

ARNOSTI, A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I..Componente do óleo de mamona sinaliza ser alternativa viável para o controle de carrapatos. **Jornal do Engenheiro Agrônomo**, São Paulo, 258, 13-13, 2011.

BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 141: 319–324, 2006.

BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.J.; FERREIRA, B.R.; GARCIA, M.V. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, 4: 61–66, 1995.

BINNINGTON, K.C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, 8: 97–115, 1978.

BOWMAN, A.S.; SAUER, J.R. Tick salivary glands: function, physiology and future. **Parasitology**, Oxford, 129: S67–S81, 2004.

CHAPMAN, R.F. **The Insects: Structure and Function**. Cambridge University Press, Cambridge, 1998.

COONS, L. B.; L'AMOREAUX, W. J. **Developmental changes in the salivary glands of male and female *Dermacentor variabilis* (Say) during feeding**. In: BOROVSKY, D.; SPIELMAN, A. (eds.). Host Regulated Developmental Mechanisms in Vector Arthropods, 2: 86-92, 1986.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A.; BRANDAO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, 39: 64–67, 2006.

DAVEY, R.B.; AHRENS, E.H.; GEORGE, J.E.; HUNTER, J.S.; JEANNIN, P. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 74: 261–276, 1998.

DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; OLIVEIRA, P.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. **Experimental Parasitology**, San Diego, 126: 462 - 470, 2010.

DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. New morphological data on fat bodies of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari:Ixodidae). **Micron**, New York, 39: 875 – 873, 2008.

DENARDI, S.E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; BECHARA, G.H. *Amblyomma cajennense* (Acari:Ixodidae): Salivary gland cells of partially engorged females ticks and the production of lipid by their mitochondria. **Experimental Parasitology**, San Diego, 113: 30 - 35, 2006.

FAWCETT, D. W.; BINNINGTON, K. C.; VOIGHT, W. R. **The cell biology of the ixodid tick salivary gland**. In: Morphology, Physiology and Behavioral Biology of

SAUER, J. R.; HAIR, J. A. **Ticks**. (ed.). Ellis Horwood Ltd, Chichester: p. 22-45, 1986.

FERREIRA, C.M.; ROSA, O.P.S.; TORRES, S.A.; FERREIRA, F.B.A.; BERNARDINELLI, N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto,13: 118–122, 2002.

FLECHTMANN, C.H.W. **Ácaros de importância médico-veterinária**. Livraria Nobel S.A., São Paulo, 1973.

FREITAS, D.R.J.; POHL, P.C.; VAZ, I.S. Characterization of acaricide resistance in *Boophilus microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, 33: 109–117, 2005.

FRIESEN, K.J.; KAUFMAN, W.R. Cypermethrin inhibits eggs development in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 76: 25–35, 2003.

FURLONG, J. **Controle do carrapato dos bovinos na Região Sudeste do Brasil**. Bolm Téc.8 Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

FURQUIM, K.C.S.; BECHARA, G.H.; CAMARGO MATHIAS, M.I. Morpho-histochemical characterization of salivary gland cells of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) at different feeding stages: description of new cell types. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, 50: 59 – 70, 2009.

FURQUIM, K.C.S.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, 119: 152–163, 2008.

FURQUIM, K.C.S. **Estudo das glândulas salivares de fêmeas e de machos de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (Acari, Ixodidae):**

**Caracterização do ciclo secretor com ênfase no processo de degeneração.**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 124p., 2007.

FURQUIM, K.C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; SILVA DE MORAES, R.L.M. Morphological modifications induced by an artificial diet on the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* (Hym., Apidae) during their degenerative process. **Sociobiology**, Califórnia, 43: 279–291, 2003.

GILL, H.S.; WALKER, A.R. The salivary glands of *Hyalomma anatolicum anatolicum*: nature of salivary gland components and their role in tick attachment and feeding. **International Journal of Parasitology**, 18: 83–93, 1987.

GROMBONI, C.F.; FERREIRA, A.G.; YASSUTO KAMOGAWA, M.; ARAÚJO NOGUEIRA, A.R. Avaliação da reação foto-fenton na decomposição de resíduos de carrapaticidas. **Química Nova**, São Paulo, 30: 264–267, 2007.

HARWOOD, R. F.; JAMES, M. T. **Entomology in human and animal health**. New York, Macmillan, 1979.

HINTON, H.E. **Biology of Insect Eggs**. Pergamon Press, Oxford, 1981.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Livraria Editora Santos, São Paulo, 1983.

KROBER, T.; GUERIN, P.M. An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. **Pest Management Science**, 63: 17 - 23, 2007.

LABRUNA, B.M. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 13: 123–124, 2004.



LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; TANOMARU FILHO, M.; BONIFACIO, K.C.; ITO, I.Y. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. **Journal of Endodontics**, 27: 717–719, 2001.

MANDELBAUM, S.H.; SANTOS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, 78: 525–542, 2003.

NUNES, E. T.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrine, 1887) (Acari: Ixodidae): acid phosphatase and ATPase activities localization in salivary glands of females during the feeding period. **Experimental Parasitology**, San Diego, 114: 109 -117, 2006a.

NUNES, E.T.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; BECHARA, G.H. Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae) tick female during feeding. **Veterinary Parasitology**, Cambridge 140: 114–123, 2006b.

NUNES E.T., G.H. BECHARA, K.C. SAITO, S.E. Denardi and M.I. Camargo-Mathias. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Micron**, New York, 36: 437–447, 2005.

OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H.; MARIN MORALES, M.A.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semiengorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, 47: 1255–1264, 2009.

OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae) tick female. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, 46: 2459–2465, 2008.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. . *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari:Ixodidae) Ovaries: An Ultrastructural analysis. **Experimental Parasitology**, San Diego, 116: 407-413, 2007a.

OLIVEIRA, P. R. ; CAMARGO-MATHIAS, M. I. ; BECHARA, G. H. Vitellogenesis in the tick *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari:Ixodidae). Role for pedicel cells. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam,143: 134-139, 2007b.

OLIVEIRA, P. R. ; CAMARGO-MATHIAS, M. I. ; BECHARA, G. H. . *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari:Ixodidae):Morphological description of the ovary and of the vitellogenesis. **Experimental Parasitology**, San Diego, 113: 179-185, 2006.

OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H.; DENARDI, S.E.; NUNES, E.T.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological characterization of ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, 110: 146–156, 2005.

OLIVEIRA, M.G.R. **Estudo da decomposição de sacarose por hidrólise utilizando uma mistura de ésteres derivados do óleo de mamona.2005. 98f.** Dissertação (Mestrado) Instituto de Química de São Carlos USP, São Carlos/SP.2005.

OLIVIERI, J.A.; SERRA-FREIRE, N.M. Structure of the salivary glands of the unfed female tick *Amblyomma cajennense* (Fabricius) (Acarina: Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 87: 167-174, 1992.

OLIVO, C.J.; MADRUGA DE CARVALHO, N.; SOUSA DA SILVA, J.H.; FLORES VOGEL, F.; MASSARIOL, P.; MEINERZ, G.; AGNOLIN, C.; FARIAS MOREL, A.; VOLNEI VIAU, L. Óleo de citronela no controle de carrapatos de bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, 38: 406–410, 2008.

PRETTE, N.; MONTEIRO, A.C.; GARCIA, M.V.; SOARES, V.E. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, 35: 855–861, 2005.

REY, L. **Parasitologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973.

RIBEIRO, A.L.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E. Estudo das variações morfológicas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) no Brasil. **Revista da Universidade Rural Ciência da Vida**, Rio de Janeiro, 18: 25–33, 1996.

RIBEIRO, J.M.C.; MAKOUL, G.T.; LEVINE, J; ROBINSON, D.K.; SPILMAN, A. Antithaemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, 161: 332-344, 1985.

RICARDO, A.J.; OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Ultrastructural detection of proteins, lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) during the vitellogenesis process. **Tissue and Cell**, Essex 39: 203 – 215, 2007.

ROMA, G.C.; OLIVEIRA, R.P.; PIZANO, M.A.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Determination of LC50 of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, 123: 269–272, 2009.

RUPPERT E. E., FOX R. S., BARNES R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7<sup>o</sup> ed. Editora Roca Ltda, 2005.

SAITO, K.C. ; BECHARA, G.H. ; NUNES, E.T. ; OLIVEIRA, P.R. ; DENARDI, S.E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 129: 299-311, 2005.

SAUER, J.R.; ESSENBERG, R.C.; BOWMAN, A.S. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, 46: 1069–1078, 2000.

SAXENA, R.C. Insecticides from neem. In: Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Morand, P. (Eds.), Inseticides of Plant Origin. **American Chemical Society**, Washington pp. 110–129, 1989.

SCHUMAKER, T. T.; SERRA-FREIRE, N. M. Histologia das glândulas salivares de adultos de *Argas (Persicargas) miniatus* (Koch, 1844) (Ixodoidea: Argasidae) em jejum, em alimentação e alimentados. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba,35: 49-72, 1991.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. 1 ed. New York: Oxford University Press, 1991. 158 p.

TELLAM. R.L.; SMITH, D.; KEMP, D.H. **Vaccination against ticks**. in: YONG W. K. ANIMAL PARASITE CONTROL USING BIOTECHNOLOGY. Boca Raton, CRC Press p.303-331, 1992.

WALKER, J.; KEIRANS, J.; HORAK, I. **The genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae)**. A Guide to the brown ticks of the world. Cambridge: Univertsiy Press, 2000. p. 1-643.

WALKER, A.; FLETCHER, J.D.; GILL, H.S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. **International Journal for Parasitology**, Oxford, 15: 81-100, 1985.

WIKEL S. K. Tick modulation of host immunity an important factor in pathogen transmission. **Journal of Parasitology**, Oxford, 29: 851–859, 1999.

WILLADSEN, P. Novel vaccines for estoparasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam,71: 209-222, 1997.

WYATT R.D. Poultry. In: Smith JE; Hendenson RS, **Mycotoxins and Animal Foods**, 1991, Boca Raton CRC Press, p. 553-605.

---

André Arnosti  
(Aluno)

---

Maria Izabel Camargo-Mathias  
(Orientadora)