

---

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

---

**BRUNO RODRIGUES SAMPIERI**

**AÇÃO DOS ÉSTERES DO ÁCIDO RICINOLÉICO DO ÓLEO DE MAMONA  
(*Ricinus communis*) SOBRE AS CÉLULAS DOS OVÁRIOS DE *Rhipicephalus  
sanguineus* (ACARI: IXODIDAE): DINÂMICA DA VITELOGÊNESE.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias

Co-orientador: Dr. Pablo Henrique Nunes

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

**Fevereiro  
2012**

---

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

---

BRUNO RODRIGUES SAMPIERI

AÇÃO DOS ÉSTERES DO ÁCIDO RICINOLÉICO DO ÓLEO DE MAMONA  
(*Ricinus communis*) SOBRE AS CÉLULAS DOS OVÁRIOS DE *Rhipicephalus*  
*sanguineus* (ACARI: IXODIDAE): DINÂMICA DA VITELOGÊNESE.



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

**Comissão Examinadora**

Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias

Profa. Dra. Solange Aparecida Rossini de Oliveira

Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice

**Rio Claro, 24 de Fevereiro de 2012**

## **Dedicatória**

À minha filha Joana e à minha esposa Bianca.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço muito aos meus pais, **Alfredo** e **Cida**, pelo apoio incondicional desde sempre e por permitirem que eu encontrasse meu caminho. Ao meu irmão **Adriano** pelas trocas de experiências.

À minha esposa **Bianca** pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência e à minha filha **Joana** pelo amor sincero e pelos sorrisos revigorantes ao fim de cada semana quando eu retornava para casa. Ao meu sogro **Nelson** e a minha sogra **Lia**, por cuidarem das minhas meninas enquanto eu estava ausente.

Agradeço imensamente à minha orientadora **Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias** por me abrir as portas do meio acadêmico, pela confiança e pela paciência. Ao meu co-orientador **Dr. Pablo Henrique Nunes** por toda a contribuição na elaboração deste trabalho.

Ao meu grande amigo **Arnosti**, por tudo.

Aos meus amigos de república **Andrea**, **Adriano** e **Franco**, pela amizade e aprendizado que me ofereceram sem cobrar algo em troca.

A todos os amigos de Pós-graduação, pelos bate-papos e momentos agradáveis.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia, em especial aos técnicos **Gerson**, **Mônika** e **Antônio** e às funcionárias **Neusa**, **Nega** e **Lucila**.

À **FAPESP** pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro que permitiram a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a **Deus** por permitir que tudo isso fosse possível e por iluminar meu caminho nesta estrada tortuosa e acidentada que é a vida.

## Sumário

1. Resumo.....	7
2. Introdução.....	9
3. Objetivos.....	14
4. Material e Métodos.....	16
5. Resultados.....	21
5.1. Capítulo 1 - A protocol for preparation of rabbit food with added ricinoleic acid esters from <i>Ricinus communis</i> castor oil for controlling <i>Rhipicephalus sanguineus</i> tick infestation under experimental conditions. SAMPIERI, B. R., Brienza, P. D., Araújo, A. M., Arnosti, A., Nunes, P. H., Furquim, K. C. S., Cantelmo, O. A., Camargo-Mathias, M. I.....	24
5.2. Capítulo 2 - Action of esters of ricinoleic acid from castor oil ( <i>Ricinus communis</i> ) on the yolk components of oocytes of <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ticks (Latreille, 1806) (ACARI: IXODIDAE). SAMPIERI, B. R., Arnosti, A., Furquim, K. C. S., Chierice, G. O., Bechara, G. H., Carvalho, P. L. P. F., Nunes, P. H., Camargo-Mathias, M. I.....	38
5.3. Capítulo 3 - Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged <i>Rhipicephalus sanguineus</i> female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil ( <i>Ricinus communis</i> ). SAMPIERI, B. R., Arnosti, A., Nunes, P. H., Furquim, K. C. S., Chierice, G. O., Camargo-Mathias, M. I.....	65
5.4. Capítulo 4 - Os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona ( <i>Ricinus communis</i> ): perspectivas de uso como acaricida demonstrada pelas alterações ultraestruturais das células germinativas de fêmeas de carrapatos	

*Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). SAMPIERI, B. R., Chierice, G. O.,  
Furquim, K. C. S., Nunes, P. H., Camargo-Mathias, M. I.....75

**6. Discussão Geral.....98**

**7. Conclusões.....101**

**8. Referências.....103**

*Resumo e Abstract*

---

## 1. Resumo

Os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* são popularmente conhecidos como carrapatos do cão, por ser este, seu hospedeiro mais freqüente, podendo, no entanto, também ser encontrados em outros mamíferos, inclusive no homem. O controle químico de carrapatos tem sido amplamente utilizado, porém com altos custos e apresentando pontos negativos como a incidência de indivíduos resistentes, além dos impactos ambientais. Devido a isso, muitos estudos têm buscado novas formas de aumentar a eficiência do seu controle e ao mesmo tempo de reduzir a contaminação ambiental. Formas de controle químico natural, como a utilização de ésteres sintetizados a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) têm merecido especial atenção, uma vez que os resultados da sua eficácia têm sido comprovados. Além disso, este método pode reduzir os custos do controle, uma vez que seus compostos podem ser fornecidos para os hospedeiros via alimentação não havendo necessidade de manejo. A forma de ação exata deste método no combate dos carrapatos ainda não está totalmente esclarecida e sendo assim, o presente estudo visou identificar nas células germinativas dos ovários de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* a forma de ação dos ésteres sintetizados a partir do ácido ricinoléico, por meio da aplicação de técnicas histológicas e de microscopia eletrônica de transmissão. Para tanto, coelhos virgens de infestação foram divididos em dois grupos: grupos controle (**GC1 e GC2**) e grupos tratamento (**GT1 e GT2**), que foram alimentados respectivamente com ração comum + sal (NaCl) sem adição de ésteres e com ração comum + sal enriquecido com ésteres do óleo de mamona. Cada coelho foi infestado com 30 casais de carrapatos *R. sanguineus*. Dos hospedeiros de ambos os grupos foram coletadas 15 fêmeas com 4 dias de alimentação (semi-ingurgitadas) e 15 fêmeas com 6 a 7 dias de alimentação (completamente-ingurgitadas) das quais foram retirados os ovários para análise das alterações celulares decorrentes da ação dos ésteres nestes órgãos. Os resultados obtidos a partir das análises histoquímicas e ultraestruturais demonstraram que os ésteres do óleo de mamona atuaram na dinâmica da vitelogênese, influenciando na síntese/incorporação dos elementos pré-vitelínicos, bem como sobre os processos de síntese no interior das células germinativas. Desta forma, os ésteres do óleo de mamona se mostram promissores no controle de carrapatos.

**Palavras-chave:** Carrapatos. *Rhipicephalus sanguineus*. Controle. Ovários. Ovócitos. Ésteres. *Ricinus communis*.



## 1.1 Abstract

The tick *Rhipicephalus sanguineus* are popularly known as the brown dog ticks, because those are the most frequently host of this ectoparasite, but may also be found in other mammals, including humans. The chemical control of ticks has been widely used, however with high costs and showing negative points such as the incidence of resistant individuals, as well as environmental impacts. However, many studies have sought new ways to increase the efficiency of its control and at the same time reduce the environmental contamination. Natural chemical control, such as the use of synthesized esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*) have deserved special attention, since the results of its effectiveness has been proven. In addition, this method can reduce the costs of control, since its compounds can be supplied for the hosts via feed. The exact form of action of this method in the combat of ticks is not yet fully clarified and therefore, this study aimed to identify in the germ cells of the ovaries of *R. sanguineus* female ticks the action form of esters of ricinoleic acid onwards, through the application of histological techniques and transmission electron microscopy. To this end, rabbits never infested before were divided into two groups: control groups (**GC1** and **GC2**) and treatment groups (**GT1** and **GT2**), that were fed respectively with common salt (NaCl) ration without addition of esters and with common ration salt enriched with esters of castor oil. Each rabbit was infested with 30 *R. sanguineus* ticks couples. The hosts of both groups were collected 15 females with 4 days of feeding (semi-ingurgitadas) and 15 females with 6 to 7 days of feeding (fully-engorged) of which the ovaries were removed for analysis of cellular changes resulting from the action of esters in these organs. The results obtained from the histochemical and ultrastructural analyses have shown that the esters of castor oil served on the dynamics of vitelogenesis in incorporation of the vitelinic elements, as well as on the processes of synthesis within the germ cells. In this way, the esters of castor oil are promising as controlling *R. sanguineus* ticks.

**Key-Words:** Ticks. *Rhipicephalus sanguineus*. Control. Ovaries. Oocytes. Esters. *Ricinus communis*.



## 2. Introdução

Dentre os artrópodes, os carrapatos constituem um dos mais importantes grupos dos pontos de vista médico e veterinário, uma vez que provocam lesões no hospedeiro que podem ser diretas causadas pela hematofagia e pela transmissão de patógenos. Desta forma, os carrapatos são vetores de doenças, sendo as principais delas arboviroses, rickettsioses, espiroquetoses e protozoonoses (KAUFMAN, 1989). O comportamento hematófago destes ectoparasitas compromete de maneira geral o desenvolvimento do hospedeiro pela espoliação causada em seus tecidos de revestimento, o que abre caminho para infecções secundárias causadas por microorganismos, bem como causando nestes, paralisia pela ação tóxica da secreção salivar. Estes problemas de ordem médica e veterinária refletem diretamente na saúde pública de regiões endêmicas e na produção comercial de produtos de origem animal, tais como o leite, o couro e a carne (WALL; SHEARER, 1997).

Os carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* são popularmente conhecidos como carrapatos do cão sendo encontrados em regiões tropicais e subtropicais (REY, 1973; WALKER, 1994). Atualmente sua presença tem sido frequente em áreas urbanas e peridomiciliares, visto que seu principal hospedeiro, o cão, é um animal doméstico comum em residências, contudo mesmo tendo este como seu hospedeiro preferencial, esta espécie pode ser encontrada parasitando outros mamíferos, inclusive o homem (DANTAS-TORRES, 2010).

Os representantes da família Ixodidae apresentam três formas parasitárias em seu ciclo de vida: larva, ninfa e adulto, sendo a forma adulta a única que apresenta dimorfismo sexual. Em cada um dos estágios os carrapatos sobem nos hospedeiros para se alimentar, processo que leva de 3 a 15 dias dependendo do estágio em que se encontra sendo o sangue do hospedeiro seu principal alimento, porém podendo a linfa e restos tissulares da epiderme lesados por meio de enzimas proteolíticas da saliva do carrapato serem também ingeridos (LABRUNA, 2004; ANDERSON; MAGNARELI, 2008). Após completarem a alimentação, as larvas e ninfas ingurgitadas se desprendem do hospedeiro e descem ao solo para realizar a ecdise (muda). As fêmeas adultas ao completarem o ingurgitamento, já fertilizadas pelos machos, também se desprendem do hospedeiro para realizar a oviposição no solo do ambiente (1000 a 3000 ovos) (LABRUNA, 2004).

## 2.1 Morfologia dos Ovários de Carrapatos

Segundo dados da literatura, embora existam algumas diferenças morfológicas e histológicas no sistema reprodutor feminino dos carrapatos quando consideradas as famílias Argasidae e Ixodidae e até mesmo dentro dos Ixodidae (OLIVEIRA et. al., 2006; SAITO et. al., 2005), estes ectoparasitas apresentam-no formado basicamente por 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 de células epiteliais com núcleos arredondados ou achatados e que delimitam um lúmen estreito da estrutura. 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 voluntário das fêmeas, de seus hospedeiros tem início a oviposição (no solo) (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), Oliveira et. al. (2006) e Oliveira et. al. (2009) para as espécies *R. (Boophilus) microplus*, *Amblyomma triste* e *R. sanguineus* respectivamente.

Por outro lado, estudos realizados por Ricardo et. al. (2007) com fêmeas de carrapatos *A. triste*, demonstraram que as células do pedicelo além da função de prender os ovócitos à parede do ovário, teriam também participação no fornecimento de elementos que contribuiriam 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 nos artrópodes é o processo de síntese e/ou incorporação de proteínas, carboidratos e lipídios pelos ovócitos durante o seu desenvolvimento. Estes elementos constituintes do vitelo nos carrapatos 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).

## **2.2 Controle de Carrapatos**

Os carrapatos causam muitos prejuízos econômicos ao homem e seu sucesso biológico está diretamente ligado ao perfeito funcionamento de seu sistema reprodutor, principalmente o feminino. Assim muitas investigações estão sendo realizadas com o intuito de se buscar métodos de controle que sejam mais eficientes. O controle via químicos sintéticos é atualmente o mais utilizado, porém apresenta pontos desfavoráveis, como custo elevado além do uso indiscriminado estar induzindo os ao surgimento de indivíduo resistentes (BAHIENSE et. al. 2006; KROBER, 2007).

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

Atualmente, a busca por acaricidas ou que atuem no controle de carrapatos, que apresentem baixo custo e ao mesmo tempo alta eficiência tem sido latente e derivados de produtos de origem vegetal mostram-se promissores, como é o caso dos extratos vegetais de membros da família Asteraceae (RIBEIRO, et. al. 2008) testados no controle de carrapatos e de insetos, bem como a utilização de partes aéreas trituradas de plantas da família Meliaceae (BORGES, et. al. 2005; DENARDI, et. al. 2010).

Os ésteres derivados do ácido ricinoléico do óleo de mamona têm também sido considerados como forma promissora e eficiente de controle de microrganismos e de ectoparasitas, pois resultados recentes de outros estudos que os utilizaram, demonstraram sua participação na hidrólise de polissacarídeos nos diferentes sistemas biológicos (OLIVEIRA, 2005). Leonardo et. al. (2001), Ferreira et. al. (2002) e Mandelbaum et. al. (2003) comprovaram a capacidade antimicrobiana destes ésteres, que agiram na parede celular (polissacarídica) de bactérias hidrolisando-a, facilitando, desta forma, a eliminação destes microrganismos.

Testes pilotos realizados em parceria com veterinários de empresa responsável pelo desenvolvimento e comercialização de suplemento alimentar de uso veterinário,

observaram que o gado tratado com sal enriquecido com ésteres do ácido ricinoléico provocou significativa queda dos carrapatos que infestavam bois no campo, pois os mesmos não conseguindo completar seu ciclo alimentar se desprendiam precocemente dos hospedeiros. Estas informações sugeriram que estes ésteres estariam interferindo no processo de alimentação dos carrapatos. Além disso, os mesmos pesquisadores também verificaram no gado tratado com ésteres a ocorrência de menor infestação por moscas dos chifres, bem como aumento no peso e na produção de leite por estes indivíduos (CHIERICE, informação pessoal).

Por outro lado, resultados morfológicos prévios apresentados por Arnosti et al. (2011 a, b) demonstraram os efeitos severos dos ésteres sobre as glândulas salivares e sobre os ovários de carrapatos *R. sanguineus*, onde estes atuaram sobre o ciclo secretor das glândulas o que acarretou na inibição do processo alimentar, bem como alterou a maturação dos ovócitos.

Desta forma, as informações até agora obtidas com os testes preliminares fazendo uso destes ésteres estariam sinalizando que estas substâncias agiriam (direta ou indiretamente) nos ovários dos carrapatos, atuando também sobre a síntese de ecdisteróides, substâncias que controlariam o período de atividade das glândulas salivares e dos ovários, além de comprometerem a ultraestrutura das células destes órgãos, danificando principalmente as suas estruturas membranosas.

*Objetivos*

---

### 3. Objetivos

A partir do exposto e buscando agregar informações que possibilitem o aumento da eficiência do controle de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com o mínimo de impacto ambiental, o presente trabalho teve como objetivos:

a) disponibilizar os ésteres sintetizados a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) como potencial produto no controle de carrapatos e aditivo alimentar em dieta animal;

b) confirmar a ação direta e/ou indireta dos ésteres sobre as células dos ovários de *R. sanguineus*, inicialmente já detectada em estudo prévio com microscopia de luz (ARNOSTI et. al., 2011), bem como analisar a forma de ação destas substâncias sobre os elementos do vitelo e sobre o processo de maturação dos ovócitos fazendo uso de técnicas histoquímicas e de microscopia eletrônica de transmissão.



## *Material e Métodos*

---

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Material

Para a realização deste trabalho, foram utilizadas fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* com quatro dias de alimentação e fêmeas completamente ingurgitadas com seis a sete dias de alimentação. Para tanto, indivíduos em jejum obtidos a partir de colônia mantida em condições controladas (28° C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em estufa BOD no Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP) foram utilizados para infestação em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*, New Zealand White), segundo metodologia descrita por Bechara et. al. (1995).

Para a infestação, casais de carrapatos *R. sanguineus* (30 para cada hospedeiro) foram depositados em quatro grupos de coelhos (hospedeiros) virgens de infestação, sendo dois grupos controle (**GC**) e dois grupos tratamento (**GT**). Os grupos controle (**GC1 e GC2**) com dez coelhos cada receberam como alimento ração para coelhos previamente adicionada de sal (NaCl) e os grupos tratamento (**GT1 e GT2**) igualmente com dez coelhos cada receberam ração enriquecida com ésteres sintetizados a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona incorporados ao sal (NaCl), na concentração de 5g/Kg de ração. Os coelhos dos subgrupos **GC1** e **GT1** receberam a alimentação por sete dias antes do início da infestação, enquanto que os **GC2** e **GT2** foram alimentados concomitantemente com a infestação.

Após oito horas da infestação dos hospedeiros pelos casais de *R. sanguineus* foi realizada a primeira observação (tempo necessário para a acomodação dos ectoparasitas); as observações seguintes ocorreram a cada três horas para acompanhamento do processo de alimentação das fêmeas, bem como para determinar seu tempo de duração.

Todos os procedimentos de 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). Depois disso, nas dependências do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia da UNESP *campus* de Rio Claro (SP), as fêmeas de *R. sanguineus* coletadas foram

anestesiadas por choque térmico e então, os 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) para a aplicação das técnicas de microscopia eletrônica.

## **4.2 Métodos**

### **A. Produção da Ração**

Para veiculação dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona via alimentação aos hospedeiros, o mesmo foi incorporado em NaCl para compor a ração fornecida aos coelhos, conforme protocolo descrito por Sampieri et. al. (trabalho submetido).

### **B. Histoquímica**

Imediatamente após o desprendimento voluntário das fêmeas ingurgitadas do hospedeiro, as mesmas foram coletadas, anestesiadas por choque térmico em geladeira, dissecadas e tiveram seus ovários retirados e fixados conforme cada técnica aplicada. Em seguida o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) em banhos de 15 minutos cada, foi embebido em historesina Leica “overnight” para depois ser emblocado no mesmo tipo de resina. Os blocos foram seccionados com 3µm de espessura e as secções colocadas em lâminas de vidro para aplicação das técnicas histoquímicas.

### **Técnica de Baker para detecção de lipídios totais (Baker, 1946).**

Para realização deste procedimento, os ovários foram fixados em formol cálcio por duas horas, desidratados em emblocados para posterior secção. As lâminas contendo as secções permaneceram por 18 horas em bicromato de cálcio. Após serem lavadas em água destilada, permaneceram durante 5 horas em solução de hemateína. Logo após, ocorreu a última lavagem com água destilada. Após a secagem, as lâminas foram montadas com glicerina gelica e recobertas com lamínula. A foto documentação foi

realizada em fotomicroscópio Motic BA 300 no mesmo dia em que a técnica foi finalizada para evitar a descoloração.

**Técnica de coloração com azul de bromofenol para detecção de proteínas (segundo Pearse, 1985).**

Para aplicação desta técnica, os ovários foram fixados em paraformaldeído 4% por duas horas. Após os procedimentos de desidratação e polimerização em resina, os blocos foram seccionados e as lâminas contendo as secções histológicas foram coradas com azul de bromofenol por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, foram lavadas com ácido acético 0.5% por 5 minutos e com água corrente por 15 minutos para logo após serem imersas rapidamente em álcool butílico terciário e deixadas para secagem a temperatura ambiente para posterior montagem com Bálsamo do Canadá. Após a aplicação da técnica as secções histológicas foram fotografadas em fotomicroscópio Motic BA 300.

**Técnica de coloração simultânea de polissacarídeos ácidos e neutros pela reação azul de Alcian / PAS (Periodic Acid Schiff) (McManus, 1946; Junqueira & Junqueira, 1983).**

Os ovários foram fixados em Bouin aquoso por 12 horas e em seguida aplicou-se os procedimentos para obtenção dos blocos de resina. As secções histológicas obtidas foram reidratadas por 1 minuto em água destilada. Corou-se então com azul de Alcian 1% em ácido acético 3% por 30 minutos e lavou-se em água destilada. Os cortes então foram transferidos para solução de ácido periódico 1% por 5 minutos e na seqüência foram lavados por 10 minutos em água destilada. Após 15 minutos no reagente de Schiff, lavou-se novamente por 7 minutos em água corrente. Depois de secas as lâminas foram montadas em Bálsamo do Canadá para serem posteriormente observadas e fotografadas em fotomicroscópio Motic BA 300.

**C. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Os ovários, depois de retirados foram fragmentados e fixados em glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2) durante duas horas. Foram então

realizadas duas lavagens em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2), com duração de 15 minutos cada, e a pós-fixação foi feita em tetróxido de ósmio a 1% em solução tampão de cacodilato de sódio 0.1M, durante duas horas no escuro e à temperatura ambiente. Posteriormente, o material passou por mais duas lavagens de 15 minutos cada em solução tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2), sendo, posteriormente, contrastado em acetato de uranila 2% com acetona 10%, por quatro horas no escuro.

A desidratação foi realizada em série crescente de acetona 50, 70, 90, 95% e 100% duas vezes, com duração de cinco minutos cada. Logo após, o material permaneceu em mistura de acetona e resina na proporção de 1:1 por 12 horas. O material foi incluído em resina pura com catalisador e colocado em estufa à 60°C por 24 horas. Depois da polimerização, os blocos foram seccionados em ultramicrótomo Sorvall-Porter Blum MT2-B. Os cortes semifinos foram corados com Azur II (1%) e Azul de Metileno (1%). As secções ultrafinas foram coletadas em grades de cobre e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos, respectivamente. O material foi observado e fotografado em Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILIPS CM 100.

*Resultados*

---

## 5. Resultados

Os resultados obtidos no presente trabalho estão sendo apresentados na forma de capítulos que compreendem artigos científicos, já publicados ou submetidos em revistas internacionais especializadas na área. Desta forma esta dissertação está composta por quatro capítulos, sendo:

### Capítulo 1:

**Situação:** Submetido

**Autores:** SAMPIERI, B.R.; Brienza, P.D.; Araujo, A.M.; Arnosti, A.; Nunes, P.H.; Furquim, K.C.S.; Cantelmo, O.A.; Camargo-Mathias, M.I.

**Título:** A protocol for preparation of rabbit food with added ricinoleic acid esters from *Ricinus communis* castor oil for controlling *Rhipicephalus sanguineus* tick infestation under experimental conditions.

**Periódico:** International Journal of Acarology.

### Capítulo 2:

**Situação:** Submetido

**Autores:** SAMPIERI, B. R., Arnosti, A., Furquim, K. C. S., Chierice, G. O., Bechara, G. H., Carvalho, P. L. P. F., Nunes, P. H., Camargo-Mathias, M. I.

**Título:** Action of esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*) on the yolk components of oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Latreille, 1806) (ACARI: IXODIDAE).

**Periódico:** Veterinary Parasitology.

**Capítulo 3:**

**Situação:** Publicado

**Autores:** SAMPIERI, B.R.; Arnosti, A.; Nunes, P.H.; Furquim, K.C.S.; Chierice, G.O.; Camargo-Mathias, M.I.

**Título:** Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*).

**Periódico:** Microscopy Research and Technique.

**Capítulo 4:**

**Situação:** Em fase de tradução.

**Autores:** SAMPIERI, B. R., Chierice, G. O., Furquim, K. C. S., Nunes, P. H., Camargo Mathias, M. I.

**Título:** Os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*): perspectivas de uso como acaricida demonstrada pelas alterações ultraestruturais das células germinativas de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae).

**Periódico:** BMC Cell Biology.





**A PROTOCOL FOR PREPARATION OF RABBIT FOOD WITH  
ADDED RICINOLEIC ACID ESTERS FROM *Ricinus communis*  
CASTOR OIL FOR CONTROLLING *Rhipicephalus sanguineus*  
TICK INFESTATION UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS**

**Bruno R. Sampieri<sup>1</sup>, Paula D. Brienza<sup>1</sup>, Andrea M. Araujo<sup>1</sup>, André Arnosti<sup>1</sup>, Pablo  
H. Nunes<sup>1</sup>, Karim C.S. Furquim<sup>1</sup>, Osmar A. Cantelmo<sup>1</sup>, Maria I. Camargo-  
Mathias\*<sup>1</sup>**

1. *UNESP, Av. 24 A, nº 1515, Bela Vista, Zip Code 13506-900, Rio Claro, S.P., Brazil.*

Corresponding author: micm@rc.unesp.br

**Resumo**

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* é um artrópodo ectoparasita de grande importância médico-veterinária por ser vetor de diversos agentes patogênicos aos seus hospedeiros, inclusive ao homem. Atualmente, muitas pesquisas relacionadas ao controle, tanto químico quanto biológico dessa praga urbana têm sido desenvolvidas. Tendo em vista o avanço nesta área, o presente trabalho traz a descrição do processo de produção de ração com adição de ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona como um método de controle de carrapatos, de modo a apresentar um produto inédito e um método eficaz contra estes ectoparasitas.

**Palavras chave:** Controle; Carrapatos; *Ricinus communis*; *Rhipicephalus sanguineus*; Ésteres.

**ABSTRACT** - The *Rhipicephalus sanguineus* tick is an arthropod ectoparasite of medical and veterinary significance because it is a potential vector of various pathogens to the hosts, which include humans. Extensive research has been conducted on chemical and biological methods to control this urban pest. Considering the advances in this area, this report presents a procedure for the production of a ration containing ricinoleic acid esters from castor oil. This ration provides a new method of tick control and is presented as a new product and a potential acaricide.

**Key Words:** Control; Ticks; *Ricinus communis*; *Rhipicephalus sanguineus*; Ester

## INTRODUCTION

Currently, ticks are the most important vectors of pathogens in the phylum Arthropoda. They transmit bacteria, protozoa, viruses, and helminths to domestic animals and humans, and, therefore, are of great medical and veterinary importance (Dantas-Torres, 2010).

The *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick is a cosmopolitan ectoparasite, which is becoming more common in the domiciliary and peridomiciliary environmental areas; the domestic dog (*Canis familiaris*), living in urban areas, is the most common host. *R. sanguineus* can also parasitize other hosts, including humans, thereby giving it zoonotic potential (Paz et al., 2008, Dantas-Torres, 2010).

Because of the potential impact of ectoparasites on the host and public health in general, a number of studies on effective control of ectoparasites have been conducted. Currently, ectoparasite management relies mainly on chemical control; however, because of significant environmental impact and development of resistance to synthetic acaricides, the search for natural products has intensified (Clemente et al., 2007, Olivo et al., 2007).

Recent studies by the Brazilian Center for Studies on Tick Morphology (BCSTM) research group have demonstrated effective use of phytotherapeutic products in tick control. Previous studies have focused on the use of neem extracts (*Azadirachta indica*) (Denardi et al., 2010) and ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*); the latter was added to rabbit food (Arnosti et al., 2011a, 2011b). The mechanism of action may involve inhibition of vitellogenesis and alteration of the salivary gland secretory cycle of *R. sanguineus* (Arnosti et al., 2011a, b)

This protocol for production of a ration supplemented with ricinoleic acid esters from castor oil was devised in order to contribute to the development of alternative methods of *R. sanguineus* tick control, which do not cause environmental damage or affect non-target organisms. Arnosti et al. (2011a, 2011b) reported that this ration, administered to rabbits with experimental tick infestation, was effective in tick control.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Production of ration** - The procedures were carried out at the Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBIO) in Pirassununga, SP, Brazil. The procedure described includes all steps from grinding the commercial ration to repelleting after addition of ricinoleic acid esters. The procedure for obtain the esters was developed by the Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros (GQATP) at the Instituto de Química da USP, São Carlos, SP, Brazil.

**Weight gain of rabbits** - Twelve New Zeland White rabbits were used for evaluation of feed consumption and rabbits' weight gain. Therefor, six rabbits formed the control group (**CG**), wich received the ration added with NaCl only. The other six rabbits received the ration added with ricinoleic acid esters as the treatment group (**GT**). Both groups received the special feeding for 30 days and all animals used in this experiment were weighed before and after receiving the special ration. Weight data were collected and organized into a table, then de differences between the groups (**GC** e **GT**) were calculated in ANOVA.

## RESULTS

Commercial rabbit food (Nutriara®; Super Criador Coelhus) was used, and the composition is detailed in Table 1. The steps involved in producing the ration with added ricinoleic acid esters are described below.

**Ration grinding** - Ration grinding was performed by placing 25 kg of commercial rabbit food (Nutriara®) in a Nogueira TN-8 crusher, which resulted in approximately 20 kg of bran, as losses occurred during milling (Fig. 1A).

**Addition of ricinoleic acid esters from castor oil to the bran (milled feed)** - Ricinoleic acid esters from castor oil were previously mixed with NaCl (table salt) to facilitate administration of this product in the food. This procedure was performed by Professor Dr. Gilberto Orivaldo Chierice of the Instituto de Química, USP, São Carlos, who generously supplied the esters for this study.

One hundred grams of bran was added to 100 g of ester mixture (1:1) and manually homogenized in a mortar (mixture A) (Fig. 1B).

**Homogenization** - This mixture (200 g) was added to 400 g of bran (600 g, mixture B), which was transferred to a Hobart Planetary Mixer for incorporation of the esters.

Next, 600 g of this mixture (mixture B) was blended with 19.5 kg of pure bran in the Hobart Planetary Mixer for 10 minutes to completely homogenize the esters in the ration (mixture C) (Fig. 1C).

**Hydration of bran and ester mixture C** - During the process of homogenization in the mixer, 2 L of water was added in increments to the 20,1 kg mixture C, thereby yielding  $\pm 23\%$  humidity, which is ideal for pelleting (Fig. 1D).

**Ration pelleting** - Five kilogram portions of mixture C were placed in a California Pellet Mill and pelleted at temperatures ranging from 70°C to 85°C, which is not deleterious to ration constituents (Fig. 1E).

**Drying of pelleted ration** - This step was performed at the Laboratório de Nutrição e Saúde Animal de Peixes - AquaNutri, Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal at Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu (FMVZ), SP, Brazil.

The pellets were spread out in metal trays having a capacity of 4 kg each, which were then placed in glasshouses having air circulation and replacement (ma037 MARCONI) for a period of 24 hours. This step yielded 14% water as per the original ration composition, which facilitated drying and compression and satisfied the nutritional needs of the rabbits used as experimental hosts.

The pellets were dried in an oven at the same laboratory and cooled by placing the trays on a masonry bench for 2 hours. This yielded a ration at room temperature, which was packaged in 1-kg portions in PVC plastic bags.

The bags containing the ration with added esters were stored in a vertical freezer at  $\pm 18^\circ\text{C}$ , at the Laboratório de Histologia, Departamento de Biologia, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil. The ration was used within the maximum storage period of 90 days. The steps involved in the preparation of rabbit food with added ricinoleic acid esters from castor oil are illustrated in Figure 1, and our protocol describes the step-by-step



process that was used to incorporate ricinoleic acid esters from castor oil in a commercial diet.

Six rabbits were fed this diet and other six were fed with ration added with salt only. Both groups were accommodated in the laboratory for thirty days receiving the feed. Rabbits from both groups ate normally, 250g of ration/day on average. The differences in weight gain between animals were not significant ( $P=0,30891$ ).

## DISCUSSION

A previous study by Arnosti et al. (2011a, 2011b) demonstrated the acaricidal efficacy of ricinoleic acid esters from castor oil, which inhibited vitellogenesis and altered the feeding activity of the ticks. The esters were administered with food to treat rabbits infested with ticks under experimental conditions.

The administration of an acaricide via feeding is uncommon and presents some impediments, as the rejection of the modified food by the animal hosts. However, the results showed that the rabbits ate normally and had a regular weight gain, which probably indicates that the ration quality was not altered after the addition of esters.

The direct effect of esters on the feeding cycle of ticks *R. sanguineus* becomes evident when analyzing the morphology of their salivary glands treated with esters added to the diet of rabbits hosts. The salivary glands have an essential role in the feeding success of ticks (Furquim et al., 2008) and present a process of natural degeneration according to food cycle is complete. This degenerative process is accelerated by the action of esters as demonstrated by Arnosti et al. (2011a).

The effects caused by the esters on oocytes from treated *R. sanguineus* females are likely to interfere with the dynamics of *R. sanguineus* populations by causing a

reduction in the number of viable offspring in subsequent generations. Studies by Arnosti et al. (2011b) and Sampieri et al. (2011) gathered morphological and ultrastructural data that signaled the possibility of developing an effective control method against ticks and will be important to the endemic population control of these ectoparasites.

## **CONCLUSION**

Because of the acaricidal efficacy of ricinoleic acid esters from castor oil, this protocol was developed to provide an alternative method for the sustainable management and control of ticks, and to share information that may assist the scientific community involved in future studies.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This research has been supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) Grant nº 2009/12387-1 and Grant nº 2009/54125-3, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) where M.I. Camargo-Mathias are financially supported through research fellowships. The authors thank Professor Dr. Gilberto Orivaldo Chierice, Professor Dr. Salvador Claro Neto and BSc. Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho for the technical support.

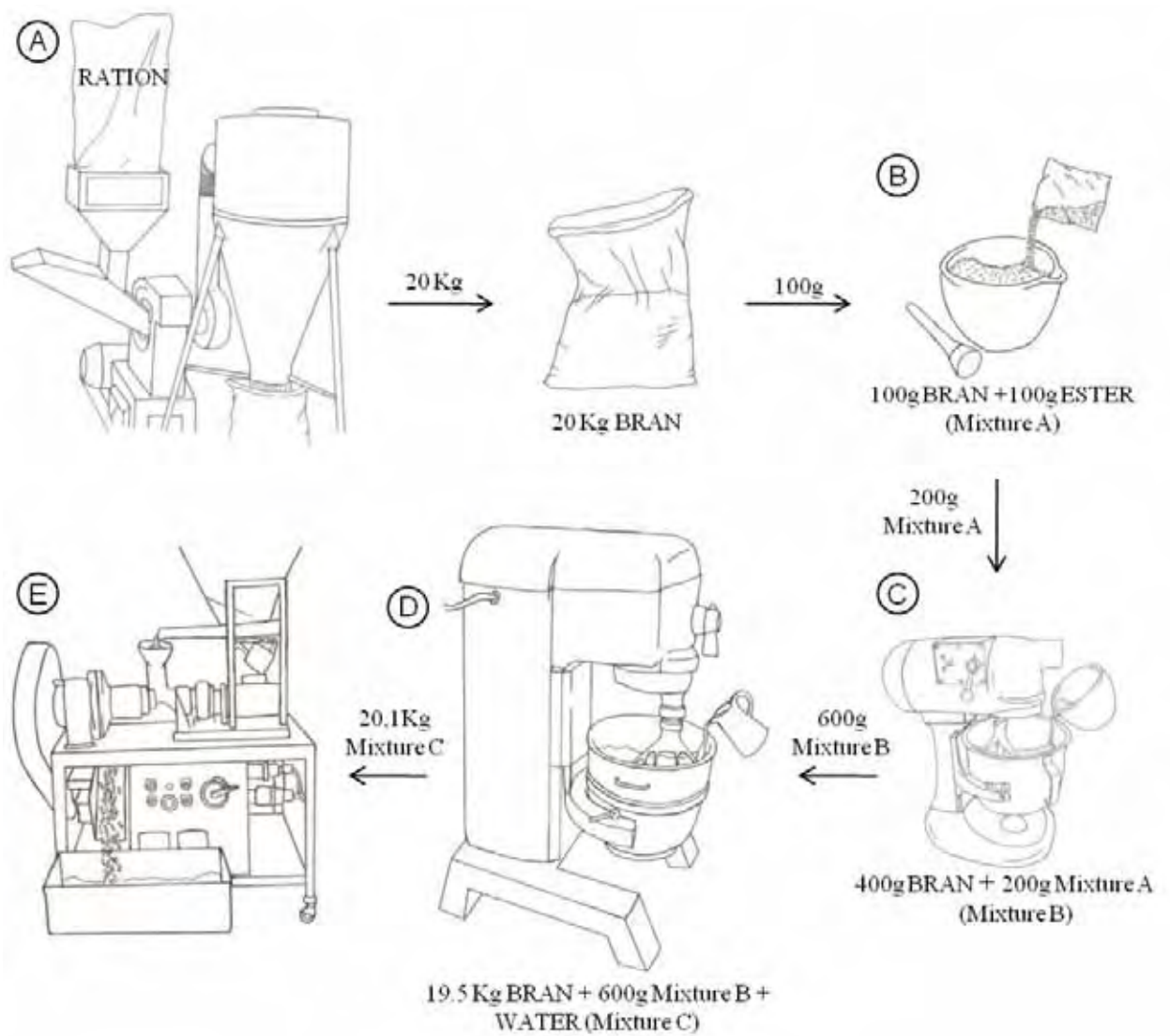
## **REFERENCES**

- Arnosti, A., P. D. Brienza, K. C. S. Furquim, G. O. Chierice, S. C. Neto, G. H. Bechara, B. R. Sampieri and M. I. Camargo-Mathias. 2011. Effects of *Ricinus*

- communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Exp. Parasit. 127, 569–574.
- Arnosti, A., P. D. Brienza, K. C. S. Furquim, G. O. Chierice, G. H. Bechara, I. B. Calligaris and M. I. Camargo-Mathias. 2011. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. Exp. Parasit. 127, 575–580.
- Clemente, M. A., F. T. Gomes, A. C. B. S. Scotton, M. S. Goldner, E. S. Dos Reis and M. N. de Almeida. 2007. Avaliação do Potencial de Plantas Medicinais no Controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Rev. Bras. de Biociências. 5, 516–518.
- Dantas-Torres, F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Para. & Vect. 3, doi:10.1186/1756-3305-3-26.
- Denardi, S. E., G. H. Bechara, P. R. Oliveira and M. I. Camargo-Mathias. 2010. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. Exp. Parasit. 126, 462–470.
- Furquim, K. C. S., G. H. Bechara and M. I. Camargo-Mathias, M.I., 2008. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). Exp. Parasit. 119, 152-163.
- Olivo, C. J., N. Madruga de Carvalho, J. H. S. da Silva, F. F. Vogel, P. Massario, G. Meinerz, C. Agnolin, A. F. Morel and L. V. Viau. 2008. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. Ciência Rural. 38, 406–410.
- Paz, G. F., R. C. Leite, P. R. de Oliveira. 2008. Controle de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) no canil da Escola de Veterinária da

UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Rev. Bras. de Parasit. Vet. 17, 41–44.

Figure 1



Steps involved in the preparation of rabbit food with added ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*).

## Table

**Table 1 - Nutriara® Super Criador Coelhus**

<i>Product indication:</i>
Diet for growing rabbits and adults reared under semi- intensive sistem.
<i>Products' basic composition</i>
Corn grain, corn gluten meal 60% Meat and Bone Meal, Dried Yeast Beer, Wheat bran, flour byproducts Hail, limestone, sodium chloride and Vitamin Mineral Primix.
<i>Possible replacements</i>
Corn Bran, Sorghum Integral, rice, rice bran, com gluten meal 21%, Corn Germ Meal, Soybean Meal, Alfalfa Meal, Kaolin and dicalcium phosphate.
<i>Levels of assurance</i>
Crude Protein (minimum) 14.00%. Ethereal extract (minimum) 1.50%, ash (max.) 13.00% Fibrous Matter (max) 20.00% Calcium (maximum) 2.50% Phosphorus (minimum) 0.50% Moisture (maximum) 12.00%.
<i>Enrichment per kg of product:</i>
3000.00 IU Vitamin A, Vitamin D3 5000.00 IU, Vitamin E 5.00, 0.50 mg, Vitamin K, Vitamin B12 10.00 mcg, Vitamin B6 1.00 mg, Vitamin B2 3.00 mg, Pantothenic Acid 9.80mg, 15.00 mg Nicotinic Acid, Folic Acid 0.30 mg, Cobalt 1.00 mg, 43.00 mg Manganese, Copper 0.32 mg, Iodine 0.30 mg, 0.30 mg Selenium, Zinc 0.80 mg, 60.00 mg zinc, iron 40.00 mg, Antioxidant 100.00 mg.
<i>How to use</i>
Administer free access to growing animals and adults.

Registered label Under the Ministry of Agriculture. N. 05 223 00 053.

Commercial rabbit food composition (Nutriara®; Super Criador Coelhus).

*Capítulo 2*

---

**Action of esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*) on the yolk components of oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Latreille, 1806) (ACARI: IXODIDAE).**

Bruno Rodrigues Sampieri<sup>1</sup>, André Arnosti<sup>1</sup>, Karim Christina Scopinho Furquim<sup>1</sup>, Gilberto Orivaldo Chierice<sup>1</sup>, Gervásio Henrique Bechara<sup>1</sup>, Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho<sup>1</sup>, Pablo Henrique Nunes<sup>1</sup>, Maria Izabel Camargo-Mathias<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>UNESP, Av. 24<sup>a</sup>, 1515, CP 199, Rio Claro – SP, ZipCode 13506-900, Brazil.

\*Corresponding author: Tel.: +55-19-35264135, Fax: +55-19-35340009.

E-mail address: micm@rc.unesp.br.



**Resumo**

Os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* são ectoparasitas hematófagos e tem como seu principal hospedeiro o cão doméstico, estando assim presentes em áreas urbanas e intimamente relacionados com o homem. Eventualmente carrapatos desta espécie podem parasitar o homem e desta forma tornam-se um vetor potencial de doenças infecciosas. Assim, a busca por métodos de controle deste tipo de praga têm sido foco de estudo de muitos grupos de pesquisadores pelo mundo. Produtos de origem vegetal mostram-se, atualmente, fortes candidatos a exercerem esta função, pois apresentam baixos níveis de toxicidade aos hospedeiros e baixa geração de resíduos ao ambiente. O presente estudo testou a ação dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (como um produto acaricida) sobre o sistema reprodutor feminino de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, mais especificamente sobre o seu processo de vitelogênese. Os resultados mostraram alterações no processo de deposição dos elementos do vitelo de uma forma geral, provocando alterações sobre aqueles de origem polissacarídica e sobre os glicoprotéicos o que conseqüentemente causou modificações na síntese final do vitelo, comprometendo o desenvolvimento do futuro embrião.

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

**Abstract**

*Rhipicephalus sanguineus* ticks are bloodsucking ectoparasites, and the domestic dog is its main host, being thus present in urban areas and closely related to man. Eventually, ticks of this species parasitize humans and can thus become a potential vector of infectious diseases. Thus, the search for methods to control this type of pest has been the focus of many research groups worldwide. Natural products are currently strong candidates to play this role, since they have low levels of toxicity to the host and low generation of waste to the environment. This study tested the action of esters of ricinoleic acid from castor oil (as an acaricide) on the reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* female ticks, more specifically on their process of vitellogenesis. The results showed changes in the deposition process of the yolk components in general, causing changes on elements of polysaccharide origin and on glycoprotein compounds which in turn cause changes in the final yolk synthesis, compromising the development of the future embryo.

**Keywords:** *Rhipicephalus sanguineus*; vitellogenesis, control, esters, castor oil; *Ricinus communis*.

## Introduction

Ticks of the Ixodidae family are bloodsucking ectoparasite arthropods of wide geographical distribution and with high potential for disease transmission to animals, including man (SONENSHINE, 1991; WALKER, 1994). *Rhipicephalus sanguineus* ticks, in addition to being one of the main problems faced by owners of kennels, has received attention in the domestic and peridomestic environment of people who live with the main urban host of this ectoparasite, the domestic dog (PAZ et al. 2008).

Currently, sintetic acaricides are the main way to control ixodidae, however, the emergence of individuals resistant to these products has been reported. The induced selection of *R. sanguineus* individuals resistant to arsenic, organophosphate, carbamate and organochlorine acaricides have been reported in several countries since the decade of 70 (NOLAN, 1985). In Brazil, the first studies of chemical control of *R. sanguineus* emerged only in the mid-90s, as well as the first report on the selection of ticks resistant to acaricides and insecticides (FERNANDES et al., 2000).

In this sense, the application of biological control using entomopathogenic fungi (GARCIA et al., 2005) and natural compounds (ARNOSTI et al., 2011 a,b; DENARDI et al. 2010) has intensified in order to minimize the effect of the selection of resistant individuals, offering alternatives to control them with low impact on the environment and non-target organisms.

The study with esters of ricinoleic acid from castor oil began with Leonardo et al. (2001) and Mandelbaum et al. (2003), who have proven their antimicrobial activity. Later, Messetti at al. (2010) investigated the practical applications of these esters as biocide in the control of *Leuconostoc mesenteroides*, bacteria of great importance in sugar and alcohol industries.

More recently, the results of morphological studies developed by researchers at BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) revealed to be promising the use of esters of ricinoleic acid from castor oil to control *R. sanguineus* ticks, since this compound acts by modifying the morphophysiology of ovaries and salivary glands of ticks, preventing two important processes of these ectoparasites from succeeding which are, feeding and reproduction (ARNOSTI et al., 2011a,b).

Thus, the aim of this study was to characterize the way of action of esters of ricinoleic acid from castor oil (*R. communis*) on the vitellogenesis of *R. sanguineus* ticks through the application of histochemical techniques, showing which alterations they caused in the deposition process of vitellogenic elements (lipids, proteins and carbohydrates) in oocytes.

## **Material and Methods**

### **Bioassays**

To carry out this study, two groups were established: control group (**CG**) and treatment group (**TG**). Five host rabbits (New Zealand White) that had never been infested before were used as hosts in each group.

**Control Group (CG):** The five animals in this group were fed with commercial diet for rabbits previously added of NaCl at concentration of 5 g NaCl / kg of ration and each host was infested with 25 pairs of *R. sanguineus*.

**Treatment Group (TG):** The five animals in this group were fed with commercial diet for rabbits previously added of esters from castor oil stabilized in NaCl at concentration of 5g of esters / kg of ration and each host was infested with 25 pairs of *R. sanguineus*.

The feeding was offered to hosts on the same day that ticks were deposited on them, according to methodology proposed by Bechara et al. (1995).

Procedures performed in this study were approved by the ethics committee Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) Protocol 006/2009.

### **Histochemistry**

After complete engorgement of *R. sanguineus* females and their volunteer detachment from the host, the ticks were anesthetized by thermal shock in refrigerator, dissected and had their ovaries removed. The organ was fixed according to the techniques applied, and then dehydrated in increasing ethanol concentrations (70, 80, 90 and 95%) for 15 min in each. After dehydration, the material was soaked in historesin, Leica, for 24 hours, embedded and sectioned at 3  $\mu\text{m}$  thick to be collected on glass slides and subsequent application of staining techniques.

### **Staining with Baker technique to detect total lipids (Baker, 1946)**

The ovaries were fixed in Calcium Formaldehyde for two hours after the removal of ovaries from ticks. After collection on glass slides, they remained for 18 hours in calcium dichromate, being subsequently washed in distilled water. Following, the slides remained for five hours in a hematein solution. Soon after, the last wash in distilled water was conducted. After drying, the slides were mounted with glycerin and coated with coverslip. The photo documentation was performed in Motic BA 300 photomicroscope on the same day that the technique has been completed to prevent discoloration.

### **Staining with bromophenol blue to detect proteins (according to Pearse, 1985)**

The material was fixed in 4% paraformaldehyde for two hours and the slides containing the histological sections were stained with bromophenol blue for 2 hours at room temperature. After this period, they were washed with 0.5% acetic acid for 5 minutes and with running water for 15 minutes after being quickly immersed in tertiary butyl alcohol and left to dry at room temperature for subsequent mounting in Canada balsam. After application of the technique, the histological sections were photographed in Motic BA 300 photomicroscope.

**Technique of simultaneous staining of acid and neutral polysaccharides by the Alcian blue / PAS (Periodic Acid Schiff) reaction (McManus, 1946; Junqueira & Junqueira, 1983)**

Initially, the material was fixed in aqueous Bouin for 12 hours and the histological sections were rehydrated for 1 minute in distilled water. The material was then stained with 1% Alcian blue in 3% acetic acid for 30 minutes and washed in distilled water. The sections were then transferred to 1% periodic acid solution for 5 minutes and washed for 10 minutes in distilled water. After 15 minutes in Schiff reagent, the material was washed again for 7 minutes in running water. After drying, the slides were mounted in Canada balsam to be later observed and photographed in Motic BA 300 photomicroscope.

## **Results**

### **Detection of Lipids**

The histological sections showing an overview of the ovaries demonstrated the presence of larger amount of oocytes in more advanced development stages in **CG**

individuals (Fig. 1A) when compared to **TG** individuals (Fig. 1G). However, there is stronger positive staining for lipids in oocytes I of the **TG** (Fig. 1H) than in those of the **CG** (Fig. 1B).

In oocytes II of **CG** individuals (Fig. 1C), the cytoplasm shows little positive lipid staining, while **TG** individuals show moderately positive cytoplasmic staining. The beginning of negative cytoplasm vacuolization through technique in oocyte II of **TG** individuals could be observed (Fig. 1I).

In oocytes III of **TG** individuals, positive staining for lipids is intense (Fig. 1D). In the **CG**, the oocytes are negative to this test. The cytoplasm of oocytes of **TG** individuals has large areas of cytoplasmic vacuolization negative to this test (Fig. 1J).

Oocytes IV of both groups exhibit granules stained for lipids. In **CG** individuals, positive lipid granules are homogeneously distributed throughout the cytoplasm (Fig. 1E) and in **TG** individuals, there is preference for their location in the central regions of the cytoplasm (Fig. 1K).

In oocytes V of **CG** individuals, the lipid yolk is homogeneously distributed (Fig. 1F) and strongly positive to the technique applied (Fig. 1L). Large vacuoles negative to the test and chorion disruption are shown in oocytes V of individuals treated with esters (Fig. 1L).

### **Detection of Proteins**

In histological sections showing the overview of the ovary of **CG** individuals, there is a prevalence of oocytes in more advanced development stages rich in protein granules when compared to **TG** (Fig. 2A and G).

Oocytes I of **CG** individuals have cytoplasm and germinal vesicle negative or weakly positive to the test applied, while oocytes of **TG** individuals have weakly

positive fine granules, as well as small vacuoles negative to the test irregularly distributed throughout the cytoplasm (Fig. 2B and H).

In oocytes II of **CG** individuals, the protein granules are small and some are strongly marked and homogeneously distributed throughout the cytoplasm (Fig. 2C). In the **TG**, the small granules are weakly positive and are concentrated on the central region of the oocyte (Fig. 2I).

In oocytes III, both in the **CG** (Fig. 2D) and in the **TG** (Fig. 2J), there are small granules, strongly positive and homogeneously distributed throughout the cytoplasm; however, in the **TG**, there are vacuolated regions in the cytoplasm, which have no protein content. In the case of **CG** individuals (Fig. 2D and E), protein granules have greater size than those observed in **TG** individuals (Fig. 2J). The germinal vesicle stains more strongly in the **TG** (Fig. 2J) where the nucleolus is more compact.

Oocytes IV exhibit strongly positive granules in both groups, whereas in **CG**, the largest granules occur preferentially at the periphery of oocytes (Fig. 2E) and in the **TG**, the cytoplasm of oocytes shows smaller granules (Fig. 2K). In the **TG**, the cytoplasm of oocytes IV are permeated by large vacuolization and the germinal vesicle can still be observed although weakly positive to the test (Fig. 2K).

Oocytes V of **CG** and **TG** individuals have large vitellin protein granules strongly positive and homogeneously distributed throughout the cytoplasm (Fig. 2F and L). However, **TG** individuals clearly show the presence of extensive vacuolization between protein granules (Fig. 2L).

### **Detection of Polysaccharides**

The histochemical test for the detection of polysaccharides in the ovaries of *R. sanguineus* females exposed to esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus*



*communis*) showed significant differences when compared to results obtained in the **CG**. Figure 3F (**TG**) shows that in the treated ovaries, in addition to inhibiting the development of oocytes which are attached along the ovary wall, there is reduced staining for polysaccharides, which does not occur in the **CG** (Fig. . 3A), where oocytes, even those in early development stages, have already shown strong PAS staining.

When oocytes II are observed in detail, it is clear that **TG** individuals show strong and intense positive PAS staining, which is observed in the **CG** and not observed in the **TG** (Fig. 3B and G).

In oocytes III and IV of **CG** individuals, there is a progression of positive PAS staining from stage III to IV, where in the latter, positive and various sizes granules take almost the entire cytoplasm (Fig. 3C and D). In the case of treated individuals, in addition to the deformation of the oocyte, smaller-size positive granules sparsely distributed throughout the cytoplasm are observed in oocytes III (Fig. 3H). Unlike the **CG** and according to the same pattern of oocytes III, oocytes IV of this group have smaller size and are more scattered, and show the presence of many cytoplasmic vacuoles in the midst of the vitelline granulation (Fig. 3I).

Oocytes V of **CG** individuals have strong PAS positive staining throughout the cytoplasm (as well as pedicel cells). In addition, yolk granules have large dimensions (Fig. 3E).

In treated oocytes, the grain size decreases and they are permeated by large areas of vacuolated cytoplasm. Unlike what was observed in **CG** individuals, pedicel cells are negative to the PAS test (Fig. 3J).

The summary of histological results is shown in Table 1.

## Discussion

The present study provides further information on action of esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*) on the oocyte and on the process of vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* ticks, showing changes that this substance causes in the synthesis and deposition of lipid, protein and polysaccharide elements. The accumulation of these elements in the oocyte during the vitellogenesis of many animal species occurs for their further use during embryonic development (CAMARGO-MATHIAS et al., 1998). In arthropods in general, these elements are deposited in the oocyte in the form of yolk granules in a deposition sequence where lipids are the first to be deposited, followed by proteins and polysaccharides (RAMAMURTY, 1968).

Specifically in ticks, previous works have reported that the yolk of the oocytes of these individuals would be formed only by lipids and proteins (BALASHOV, 1983). However, more recent studies have demonstrated the presence of other elements such as polysaccharides (RICARDO et al., 2007), which is also confirmed in this study.

The search for acaricides that cause less environmental impact and less damage to non-target organisms has intensified in the last decade. Thus, the use of esters of ricinoleic acid from castor oil has shown to be a potentially interesting alternative for this purpose. Previous studies carried out by Arnosti et al. (2011th, b) have already demonstrated the action of this substance on the reproductive process of *R. sanguineus* ticks, acting on oocytes in the early development stages (I and II), which showed smaller size due to the impaired synthesis and incorporation of vitelline elements, making these cells unviable due to the action of the toxic product.

The quality of the oocyte growth in arthropods is measured by the amount of proteins, lipids and carbohydrates incorporated during the formation of yolk granules. Despite controversies about the way of acquisition (endogenous or exogenous) of lipid components deposited inside the cytoplasm, its presence is related to important functions such as reserve for the future embryo and structuring of the oocyte chorion (CAMARGO-MATHIAS et al. 1998).

In the present study, lipid components were more evident among **TG** individuals in oocytes of all stages when compared to **CG** individuals. The authors suggest that as occurred with protein components, there is an indirect effect of the action of esters on the synthesis of lipids. Ticks would be using lipids of oocytes as the main source of energy to compensate for the reduction or absence of carbohydrates that had their synthesis affected by the ester, explaining the increased presence of lipids in the cytoplasm of oocytes of **TG** individuals demonstrated by the strong staining through the technique applied.

In the process of vitellogenesis in ticks, in addition to the participation of the oocyte in the synthesis of components, there is also the participation of other cells and structures. According to Oliveira et al. (2007), pedicel cells also play an important role in the vitellogenesis of ticks, synthesizing and transferring different substances into the oocyte. The present study found the occurrence of extensive vacuolated areas often located in the oocyte region that makes direct contact with the pedicel cell, suggesting that the toxic agent circulating in the hemolymph would reach the oocyte via pedicel cells.

Similar results were obtained by Roma et al. (2011) for ticks exposed to permethrin and by Denardi et al. (2010 a, b) studying the effect of aqueous extract of “neem” leaves on the vitellogenesis of ticks. Thus, the part of the oocyte in direct

contact with the pedicel cells would be the first region to receive the toxic agent and therefore the first to suffer from its action.

According to Oliveira et al. (2005), the protein components of the yolk are only deposited in the form of granules in the oocytes of *R. sanguineus* ticks in the most advanced development stages (VI and V). However, it could be observed that in oocytes I, II III, there is positive staining for proteins ranging from weakly to moderately positive, with the exception of oocytes I of **CG** individuals, which are negative to the technique used. It is known that the main protein present in the yolk of oocytes is vitellin, which originates from the conversion of vitellogenin into these cells, being initially synthesized in the intestine and little in the fat body of these animals.

This conversion of vitellogenin into vitellin probably occurs due to the action of enzymes, as well as other processes that require large energy expenditures. Therefore, similarly to the proteins that compose the yolk, these enzymes would also be positively stained for the technique used.

Thus, positive staining for proteins in oocytes I of **TG** individuals suggests a more intense participation of these proteins in the physiology of oocytes, unlike what was observed in **CG** individuals, in an attempt to neutralize the toxic component arising from esters, thus preserving the cell that would give rise to the future individual.

According to Oliveira et al. (2007), the collection and synthesis of protein components in the process of vitellogenesis are carried out by endogenous and exogenous processes. Oocytes IV of **TG** individuals show smaller protein granules irregularly distributed in the periphery of the oocyte, while in **CG** individuals, granules are larger and spherical, suggesting the interference of esters in the mechanism of absorption and deposition of protein yolk components. Oocytes V of **TG** individuals showed vacuolated areas that permeate large protein granules, and oocytes V of **CG**

individuals showed protein granules of smaller size and lipid droplets, which shows an attempt to isolate the toxic compound from yolk granules already deposited.

Vitellin, the main protein yolk component, is a glycolipoprotein molecule. Individuals treated with esters from castor oil showed smaller protein granules in oocytes V when compared to the **CG**, demonstrating the action of esters on biomolecules due to the hydrolysis and fragmentation of glycoproteins (vitellin).

The data previously shown by Arnosti et al. (2011th, b) are in agreement with this study, which demonstrated that *R. sanguineus* females treated with esters would have inhibited yolk synthesis and / or incorporation. In the case of polysaccharide components in oocytes at stage II of **TG** individuals, this inhibition was clear. According to Ricardo et al. (2007), the absorption or production of carbohydrates would start in oocytes II, having pedicel cells and hemolymph as exogenous sources. In the present study, the results observed for oocytes II of **TG** individuals indicated that esters of ricinoleic acid from castor oil had an action on the hydrolysis of polysaccharides, which led to a delay in the synthesis and / or incorporation of carbohydrates observed in **TG** individuals.

In contrast, for oocytes at stage IV of development, it was observed that **TG** individuals showed higher positive carbohydrate staining than **CG** individuals. In ticks, oocytes at stages IV and V of development were at the end of the process of vitellogenesis, which is when the deposition of carbohydrates is performed on a larger scale (Ricardo et al., 2007). The data suggest that the greater positivity for carbohydrates in oocytes IV of individuals exposed to esters is due to an increase in production of these elements, since the presence of esters leads to a greater lysis of polysaccharide granules, which must be compensated with a higher production.

According to Messeti et al. (2010), in studies conducted with esters from castor oil, the authors also demonstrated the biocide action of this product on *Leuconostoc mesenteroides*, where esters acted in the hydrolysis of polysaccharides present on the cell wall of this type of microorganism. In this sense, it was possible to confirm the action of esters on carbohydrates incorporated into oocytes during the vitellogenesis of ticks, either those intended for the vitelline granules for use of the embryo, or polysaccharides for the formation of the chorion or sugars that compose the complex glycoprotein molecules present in the oocytes of *R. sanguineus* ticks.

## **Conclusion**

Therefore, esters acted on the vitellogenesis of *R. sanguineus* ticks, with increased vacuolization in the oocyte, including those at the final stage (V), when the oocyte seems to be in total cytoplasmic disarrangement, ending up with the chorium disruption.

These new data open up a new range of possibilities for further studies aimed at the embryonic development of eggs from individuals treated with esters, if it occurs at all, since the changes observed in the process of vitellogenesis will certainly influence the development of the new individual. Thus, esters of ricinoleic acid from castor oil become a product with high potential for environmental control of *R. sanguineus* ticks.

## **Acknowledgments**

This research has been supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) Grant nº 2009/12387-1 and Grant nº 2009/54125-3, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) where M.I.

Camargo-Mathias are financially supported through research fellowships. The authors thank Professor Dr. Salvador Claro Neto for the technical support.

## References

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). *Exp. Parasit.* 127, 569–574, 2011.

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. *Exp. Parasit.* 127, 575–580, 2011.

BAKER, J.R. 1946. The histochemical recognition of lipine. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 87: 441-470.

BALASHOV, Y.S., 1983. The female reproductive system. In: An atlas of ixodid tick ultrastructure. Balashov, Y.S. (Ed.). Entomological Society of America, Russian, p. 98-128.

BECHARA, G. H.; SZABO, 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.

CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FONTANETTI, C. S. Histochemical Studies of *Rhinocricus Padbergi* Verhoeff Ovaries (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae). *Cytobios*, v. 94, 169-184, 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. Exp. Parasit. 126, 462–470, 2010.

FERNANDES, F.F., FREITAS, E.P., SILVA, J.R., SILVA, O.R. & SILVA, I.G. Toxic effects and in vitro inefficacy of deltamethrin on larvae of *Rhipicephalus sanguineus* from Goiania, Goias, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.34, 159-165, 2000.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J.; PRETTE, N.; BECHARA, G.H. Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. Braz. J. Microbiol., v.36, 368-372, 2005.

MANDELBAUM, S. H.; SANTOS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte II. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 78, n. 5, 525-542, 2003.

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, v. 27, n. 12, 717-719, 2001.

MESSETTI, M. A., SANTOS, A. M.; ANGELIS, D. F. CHIERICE, G. O.; NETO, S. C. Estudo dos derivados do óleo de *Ricinus communis* L. (Mamona) como agente biocida e redutor da viscosidade produzida por *Leuconostoc mesenteroides* em indústrias sucroalcooleiras. Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo, v.77, n.2, 301-308, 2010.

NOLAN, J. Resistance mechanisms to chemical products in arthropods parasites of veterinarian importance. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 18, n. 2, 155-166, 1985.

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 Chem Toxic, 47:1255–1264, 2009.

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, v. 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, v. 113, p. 179-185, 2006.

PAZ, G. F.; LABRUNA, M.B.; LEITE, R. C. 2008. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de cães artificialmente infestados. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 17: 139-144.

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

ROMA, G. C.; FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fully engorged females: I. Direct or indirect action of the acaricide in germ cells? Exp. Appl. Acarol, 53:287-299, 2011.

SAMPIERI, B. R. ARNOSTI, A. NUNES, P. H., FURQUIM, K. C. S., CHIERICE, G. O., CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructural changes in the ovary cells os engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks trated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*). Microscopy Research and Technique, DOI: 10.1002/jemt.21112, 2011.

SONENSHINE, D. E. The female reproductive system. In: SONENSHINE, D. E. (Ed.). *Biology of ticks*. New York: Oxford University Press, 1991, p. 280-304.

WALKER, A. **Arthropods of domestic animals. A guide to preliminary identification**. London: Chapman & Hall, 1994, p. 5-60.

## TABLES

**Table 1** – Summary of results from the application of histochemical tests for detection of lipids, proteins and polysaccharides in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* in the control group (CG) and treatment group (TG) with esters from castor oil.

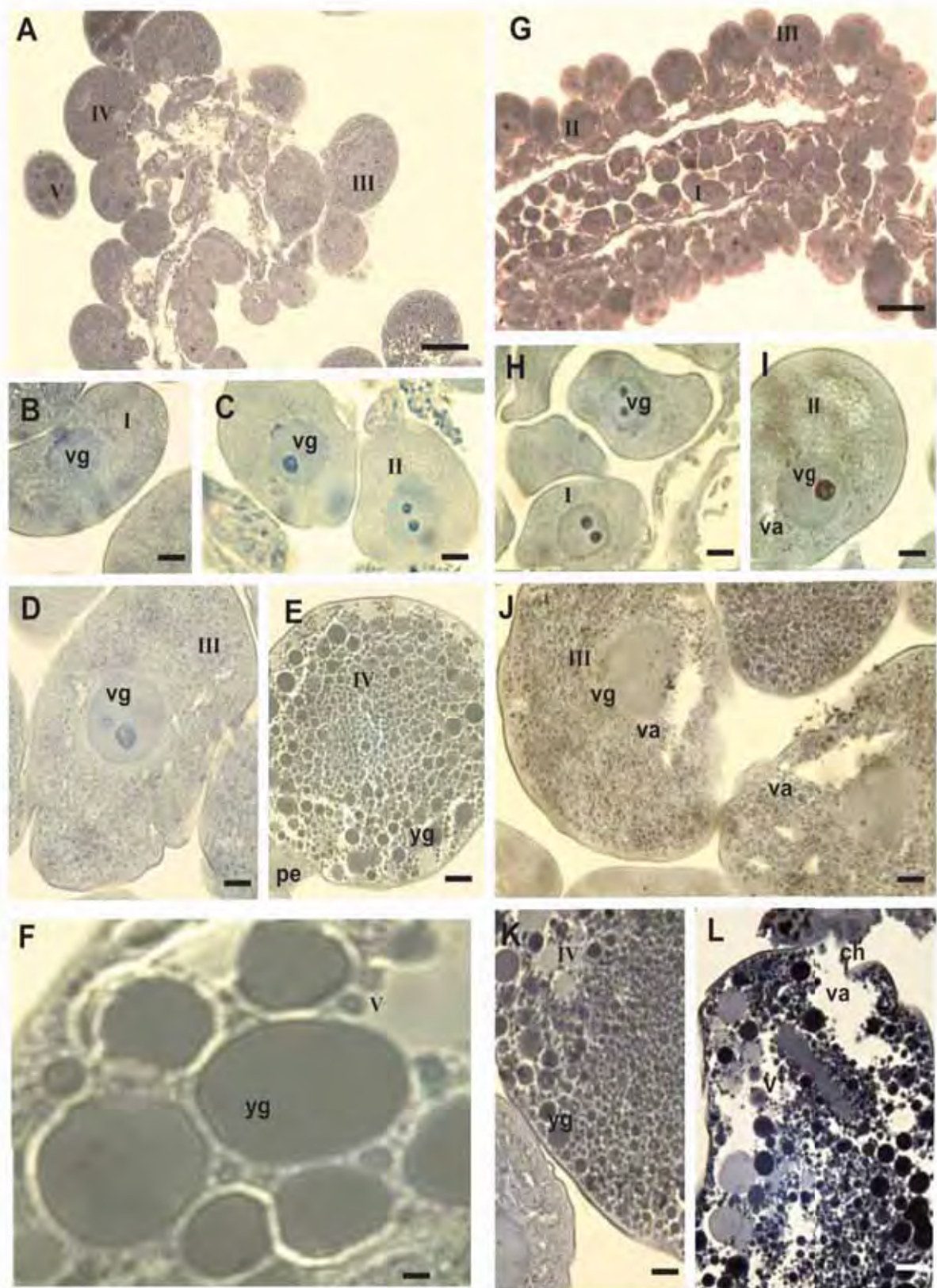
<i>Histochemical tests</i>	<b>Oocyte I</b>		<b>Oocyte II</b>		<b>Oocyte III</b>		<b>Oocyte IV</b>		<b>Oocyte V</b>	
	<b>CG</b>	<b>TG</b>	<b>CG</b>	<b>TG</b>	<b>CG</b>	<b>TG</b>	<b>CG</b>	<b>TG</b>	<b>CG</b>	<b>TG</b>
<b>Backer (Lipids)</b>	+	+	-	+	+	++	++	+++	+++	+++
<b>Bromofenol Blue (Proteins)</b>	-	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
<b>PAS/Alcian Blue (Polysaccharides)</b>	+	-	++	-	++	+	+++	++	+++	+++

(-) negative; (+) weakly positive; (++) medium positive; (+++) strongly positive.

## FIGURES

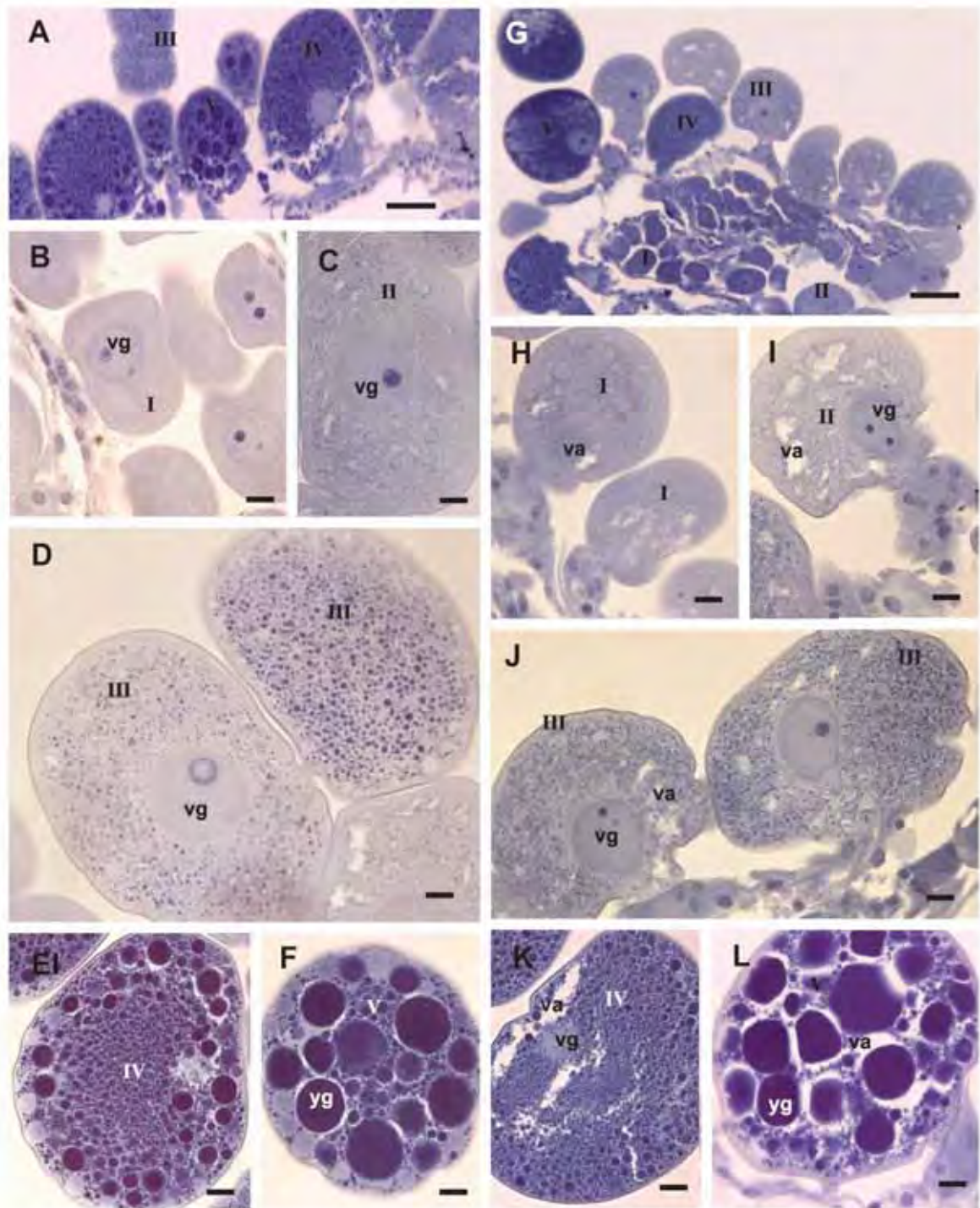
**Figure 1** - Photomicrograph of sections of ovaries of engorged *R. sanguineus* females of **CG** (**A-F**) and **TG** (**G-L**) individuals stained with PAS / Alcian blue to identify total polysaccharides. (**A-B**) Overview of the ovary with oocytes at different development stages and detail of oocyte II of **CG** individuals, (**C-F**). Detail of oocytes at stages III, IV and V of development of **CG** individuals; (**G-I**) Overview of the ovary of **TG** individuals with many immature and mature oocytes already showing cytoplasm with vacuoles, with detail of oocyte II weakly stained by the technique used, (**J-L**) Detail of oocytes III, IV and V of **TG** individuals showing changed morphology and compromised vitellogenesis. **Ch** = chorion; **Pc** = pedicel cell; **Va** = vacuole, **Gv** = germinal vesicle; **Yg** = yolk granules.

Fig. 1



**Figure 2** - Photomicrograph of sections of ovaries of engorged *R. sanguineus* females of **CG** (**A-F**) and **TG** (**G-L**) individuals stained with bromophenol blue to identify proteins. (**A-C**) Overview of the ovary with oocytes I and II of **CG** individuals, (**D-F**) Details of oocytes III, IV and V of **CG** individuals; (**G-I**) Overview of the ovary of **TG** individuals showing vacuolation at more mature stages, with oocytes I and II weakly stained and with the presence of vacuoles, (**J-L**) Details of oocytes III, IV and V moderately and strongly stained, but with lower grain size and presence of large vacuoles of **TG**. **Pc** = pedicel cell; **Va** = vacuole, **Gv** = germinal vesicle; **Yg** = yolk granules.

Fig. 2



**Figure 3** - Photomicrograph of sections of ovaries of engorged *R. sanguineus* females of **CG** (**A-E**) and **TG** (**F-J**) individuals stained with the Baker technique (1946) to identify total lipids. (**A-C**) Overview of the ovary with oocytes at different development stages and detail of oocytes I and II of **CG** individuals; (**D-E**) Detail of oocytes III, IV and V of **CG** individuals; (**F-H**) Overview of the ovary of **TG** individuals with several immature and mature oocytes, already showing cytoplasm with vacuoles, with the detail of oocytes I and II weakly stained by the technique used; (**I-J**) Detail of oocytes III, IV and V of **TG** individuals showing changed morphology and compromised vitellogenesis, moderately and strongly stained, but with smaller vitelline granules and cytoplasm with vacuoles. **Ch** = chorion; **Pc** = pedicel cell; **Va** = vacuole, **Gv** = germinal vesicle; **Yg** = yolk granules.





*Capítulo 3*

---

## Resumo

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) é uma espécie amplamente distribuída e adaptada ao meio urbano, tendo o cão como o seu principal hospedeiro, sendo também conhecido por ser vetor e reservatório de doenças causadas por bactérias. Atualmente os acaricidas de origem química sintética têm sido utilizados em larga escala e de maneira indiscriminada, levando ao desenvolvimento de resistência a estes produtos por parte dos carrapatos, além de causar danos ao meio ambiente, o que torna necessária a busca de outras formas de controle destes ectoparasitas. Casais de *R. sanguineus* foram infestados artificialmente em coelhos hospedeiros New Zeland White os quais foram divididos em quatro grupos de tratamento: Controle (**GC1** e **GC2**) e Tratamento (**GT1** e **GT2**). Os hospedeiros dos **GT1** e **GT2** receberam ração com adição de ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona na concentração de 5g/Kg de ração durante sete e 15 dias, respectivamente. Os hospedeiros do **GC1** e **GC2** receberam ração adicionada de NaCl na concentração de 5g/Kg de ração, pelos mesmos períodos que os **GT**. As fêmeas dos carrapatos depois de coletadas tiveram seus ovários retirados para análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão. Os resultados obtidos demonstraram a ocorrência de alterações ultraestruturais nas células somáticas e germinativas dos ovários das fêmeas submetidas ao tratamento com os ésteres, principalmente com relação à deposição do cório, membrana protetora do ovócito, bem como no processo de transporte de material vitelogênico via hemolinfa e via células do pedicelo. Observou-se também redução no tamanho e quantidade dos grânulos de vitelo no interior dos ovócitos, que em sua maioria, são de origem glicoprotéica, além de alterações na morfologia das mitocôndrias que mostraram-se menos eletrondensas e com cristas mais desorganizadas do que aquelas dos indivíduos dos **GC1** e **GC2**. Desta forma, o presente estudo demonstrou a ação dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona sobre o sistema reprodutor feminino de *R. sanguineus* (vitelogênese), sinalizando a perspectiva de uma forma de controle deste ectoparasita e minimizando a ação nociva sobre os organismos não alvo e mesmo sobre o ambiente.

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus*; ticks; control; ricinoleic acid esters.

# Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*)

BRUNO RODRIGUES SAMPIERI,<sup>1</sup> ANDRÉ ARNOSTI,<sup>1</sup> PABLO HENRIQUE NUNES,<sup>1</sup>  
KARIM CHRISTINA SCOPINHO FURQUIM,<sup>2</sup> GILBERTO ORIVALDO CHIERICE,<sup>3</sup> AND  
MARIA IZABEL CAMARGO MATHIAS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Unesp, Av. 24 A, n° 1515, CEP 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n, CEP 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

<sup>3</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

**KEY WORDS** *Rhipicephalus sanguineus*; ticks; ultrastructure; ricinoleic acid esters

**ABSTRACT** *Rhipicephalus sanguineus* is a widely distributed tick species that has adapted to the urban environment, and the dog is its main host. This species is also known as a vector and reservoir of diseases caused by bacteria, protozoa, and viruses. Currently, acaricides of synthetic chemical origin have been widely and indiscriminately used, leading to the development of resistance to these products by ticks and causing damage to the environment. Thus, these issues have made it necessary to seek other forms of controlling these ectoparasites. *R. sanguineus* was artificially infested in host New Zealand White rabbits, which were divided into four treatment groups: control (CG1 and CG2) and treatment (TG1 and TG2) groups. TG1 and TG2 hosts were provided with feed supplemented with esters of ricinoleic acid from castor oil at a concentration of 5 g/kg of feed for 7 and 15 days. Afterward, the ovaries of the female ticks were removed for analysis by transmission electron microscopy. The results showed ultrastructural changes in the somatic and germ cells of ovaries from TG1 and TG2 females, particularly with respect to chorion deposition, a protective membrane of the oocyte, as well as in the transport process of vitellogenic materials via the hemolymph and pedicel cells. Moreover, the mitochondria were less electron-dense and had cristae that were more disorganized than the mitochondria from CG1 and CG2 individuals. Thus, this study demonstrated the action of esters on the ovaries of *R. sanguineus*, signaling the prospect of a way to control this ectoparasite without affecting nontarget organisms or the environment. *Microsc. Res. Tech.* 00:000–000, 2011. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

## INTRODUCTION

Ticks are obligatory blood-sucking ectoparasites, especially of mammals, but are also found in reptiles, birds, and amphibians, and are distributed in various regions of the globe (Sonenshine, 1991). Currently, these arthropods have great medical and veterinary importance since they are responsible for the transmission of various pathogens including bacteria, protozoa, and viruses (Dantas-Torres, 2010).

The dog tick *Rhipicephalus sanguineus* is a species of the Ixodidae family and is most widely distributed and adapted to urban areas in tropical and subtropical regions, particularly because its main host is the domestic dog (Dantas-Torres, 2010). Although this species of tick preferentially feed on dogs, studies have shown that it can also parasitize camels, buffalo, cattle, poultry, and even humans (Walker, 1994).

The ovary of *R. sanguineus*, as described by Oliveira et al. (2005), does not possess nurse or follicle cells and is classified as the panoistic type. This vital organ for the reproduction of the species is composed of epithelial cells that (a) form the ovary wall and (b) make up the pedicel, a structure fixing the oocytes to the ovary wall. In the case of ticks, the epithelial cells carry the same

function as nurse cells in meroistic ovaries of insects by sending yolk precursor elements to the germ cells (oocytes).

In ticks, the oocytes are distributed along the ovary wall and undergo five developmental stages (I to V), with V as the most advanced stage. In addition, the oocytes enter the final stages of maturation only after the complete engorgement of the female, which takes approximately 7 days in *R. sanguineus*. Ten to fifteen days after the females have voluntarily released from their host, they oviposit the mature oocytes into the environment (Flechtmann, 1975; Oliveira et al., 2005).

The control of tick populations has been accomplished by using synthetic acaricides, many of which have considerable efficiency; however, their indiscrimi-

\*Correspondence to: Maria Izabel Camargo Mathias, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Unesp, Av. 24 A, n° 1515, CEP 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil. E-mail: micm@rc.unesp.br

Received 15 September 2011; accepted in revised form 5 October 2011

Contract grant sponsor: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo); Contract grant number: 2009/12387-1; Contract grant sponsor: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); Contract grant number: 2009/54125-3.

DOI 10.1002/jemt.21112

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

nate use has led to resistance in the populations of different studied tick species and is also causing environmental contamination and the intoxication of nontarget organisms (Clemente et al., 2007; Furlong, 1993; Olivo et al., 2008).

Currently, in the search for alternative methods of tick control, a number of studies have been focused on characterizing acaricides of plant origin, such as those obtained from the leaf extracts of "Neem" (*Azadirachta indica* A. Juss.) (Denardi et al., 2010), as well as extracts from other plants of the Asteraceae family (Ribeiro et al., 2008). More recent studies have shown that derivatives of castor oil (*Ricinus communis*), especially an ricinoleic acid ester of this oil, when incorporated into animal feed, can drastically interfere in the physiology of the salivary glands and ovaries of *R. sanguineus* ticks that feed on these animals, offering an effective contribution to the reduction of tick populations in the environment (Arnosti et al., 2011a,b).

In this study, we provide ultrastructural data that confirms that ricinoleic acid esters from castor oil incorporated into the feed of the hosts have a number of effects on the ovary cells of engorged females of *R. sanguineus*. Our results support the use of an acaricide that is efficient and economically viable for controlling tick populations and has reduced effects on nontarget organisms and the environment.

## MATERIALS AND METHODS

### Bioassays

Six hundred couples of *R. sanguineus* ticks (300 males and 300 females) were divided into four study groups. Each group received 150 couples that were placed in five New Zealand White rabbit hosts (30 couples/rabbit). Two groups (CG1 and CG2) were used as control groups, while two groups (TG1 and TG2) were used as the treatment groups. The effects of castor oil esters were tested in the treatment groups in accordance with the protocol established by Arnosti et al. (2011a,b).

For exposing the ticks to ricinoleic acid esters in the host, they were infused in NaCl (table salt) and added to commercial rabbit feed (Nutriara<sup>®</sup>) by grinding the ration and mixing the esters to the bran (result of the grinding). After that, the mixture of bran + esters was pelletized (California Pellet Mill) and the pellets were dried at an appropriated glasshouse. NaCl lacking the ricinoleic acid esters was added to the feed of the control group (CG1 and CG2) rabbits by the same procedures described before.

The esters of ricinoleic acid from castor oil were kindly provided by Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice from the Department of Chemistry and Molecular Physics, Institute of Chemistry of USP from São Carlos, SP, Brazil.

Procedures performed in this study were approved by the ethics committee Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) Protocol 006/2009.

### Study Groups

**Control Groups.** Ten female host rabbits (New Zealand White) were segregated into two subgroups, control group 1 (CG1) and control group 2 (CG2) (five hosts each). Animals from both subgroups were fed with commercial rabbit feed supplemented with NaCl (table salt) (5 g of salt/kg of feed).

Control Group 1 (CG1): the rabbits were fed the feed + NaCl for 7 days prior to infestation with 30 pairs of *R. sanguineus* (the ticks were maintained in a fasting state prior to the infestation). The rabbit diet was maintained until the female ticks completed their engorgement, which took approximately 14 days.

Control Group 2 (CG2): the rabbits were fed with the same feed as CG1; however, the diet started concomitantly with the infestation of 30 pairs of *R. sanguineus* and was maintained until the complete engorgement of female ticks, which took about 7 days.

**Treatment Groups.** A commercial feed for rabbits was supplemented with NaCl containing esters synthesized from castor oil (*R. communis*); the ricinoleic acid present in the feed at a concentration of 5 g of ester/kg of feed. The feed was offered to the rabbits in the treatment groups. The animals in the treatment group were divided into two subgroups, treatment group 1 (TG1) and 2 (TG2). Five rabbits were in each group.

Treatment Group 1 (TG1): the rabbits were treated with feed + esters for 7 days prior to infestation with 30 pairs of unfed *R. sanguineus*. The hosts' diet was maintained until the complete engorgement of the female ticks.

Treatment Group 2 (TG2): the rabbits in this group received the same diet as TG1; however, the diet started with the infestation of 30 pairs of *R. sanguineus* and was maintained until complete engorgement of females.

After 7 days of feeding, the females voluntarily released themselves from their hosts. The female ticks were collected and immediately anesthetized by heat shock (in a refrigerator) and dissected. The ovaries were removed in saline solution (NaCl 0.13 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.017 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 M, pH 7.2) and fixed in accordance with the protocol for transmission electron microscopy (TEM).

### TEM

Samples from the engorged females ovaries of *R. sanguineus* were fixed in 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 2 h. Two 15-min washes were then performed with the same buffer to remove the fixative solution. Afterward, the samples were placed in 1% osmium tetroxide in a 0.1 M sodium cacodylate buffer for 2 h in the dark at room temperature. The material underwent two more washes of 15 min each in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) and subsequently contrasted in 2% uranyl acetate with 10% acetone for 4 h in the dark.

Dehydration was carried out in an increasing acetone series of 50, 70, 90, 95, and 100%, with each step lasting 5 min each. Next, the material was placed in a mixture of acetone and resin (Epon-Araldite) in a 1:1 ratio for 12 h. The material was embedded in pure resin containing catalyst and placed in an oven at 60°C for 24 h. After polymerization, the blocks were sectioned using a Sorvall-Porter Blum MT2-B microtome. The semi-fine sections were stained with azur II (1%) and methylene blue (1%). Ultra-thin sections were collected on copper grids and contrasted with uranyl acetate and lead citrate for 45 and 10 min, respectively. The material was observed and photographed in a Philips CM 100 transmission electron microscope.

## RESULTS

The results from TEM analysis showed ultrastructural changes in the ovary cells of engorged *R. sanguineus* females that had fed on hosts that had received feed enriched with the ricinoleic acid esters.

### Control Groups

An ultrastructural study of the germ cells in *R. sanguineus* females has been previously done by Oliveira et al. (2009). The results obtained from the females of the CG1 and CG2 control subgroups were the same as those in their study (Fig. 1). Therefore, they will not be described here again and will be used as reference for comparison with the results obtained in the treatment subgroups (TG1 and TG2).

### Treatment Group 1 (TG1)

Compared to CG1 oocytes, TG1 oocytes were typically altered in form, ranging in shape from round to irregular and displayed a plasma membrane with invaginations (Fig. 2A). In addition, the chorion of the mature oocytes tended to be thicker than that in control oocytes and a microvilli with morphology changed (Figs. 2B–2D).

The oocyte cytoplasm shelters the yolk granules, which are of a protein and lipid nature. In the TG1 oocyte, the location of the yolk granules was limited to the central area of the cytoplasm leaving a “track” of agranular cytoplasm near the periphery of the oocyte (Figs. 2A–2C). Moreover, in contrast to the CG oocytes, few organelles (e.g., mitochondria) were found in the TG1 ones. Further, the mitochondria from the TG1 oocytes were less electron dense in nature than control mitochondria and had cristae that were somewhat disorganized (Fig. 2G) or completely changed in morphology (Figs. 2I–2K).

The germinal vesicle (nucleus) in the TG1 oocytes showed alterations in its shape and an apparent thickening of the nuclear envelope where small invaginations were observed. The nucleolus was heterogeneous in nature, with electron-dense areas permeated by electron-lucid spaces (Figs. 2E and 2F).

For pedicel cells, the interdigitated structures that hold the oocytes to the ovaries wall were not only much greater in number but also smaller (and shorter) size than those observed in the CG1 and CG2 control groups (Fig. 2H).

The region of contact between the oocytes and pedicel cells possess folds that host a large number of mitochondria. In TG1 females, the mitochondria had an elongated shape relative to control ones. Moreover, the cristae were fewer in number, less dense, and less electron dense than those found in CG1 and CG2 mitochondria. In addition, small granules of material more electron dense than the cell cytoplasm were observed in the mitochondria from the TG1 treatment group (Fig. 2G).

### Treatment Group 2 (TG2)

In TG2 females, the cell walls of the ovary were irregular in shape and possessed few electron-dense mitochondria. The nucleus of these cells had an irregular aspect and contained heterogeneous content; a nucleolus could not be defined (Fig. 3O).

The oocytes from this treatment group were very irregular shape compared to those from TG1 and displayed pronounced invaginations. Further, the microvilli in the plasma membrane were severely disorganized. The chorion was also thickened (Figs. 3A–3C).

In contrast to the TG1 oocytes, the cytoplasm of these cells were filled with yolk granules; however, they were smaller than those of TG1 (Figs. 3E–3J). In the peripheral region of the oocytes, a number of autophagic vacuoles were present (Figs. 3D and 3H). Moreover, the mitochondria were irregular in shape and had low electron density. The mitochondrial cristae were disorganized, and electron-dense granules were observed in the space delimited by the internal membrane (Figs. 3D and 3H).

In the TG2 oocytes, the envelopes of the germinal vesicle were severely folded. The nucleolus was completely disorganized, with random electron-lucid and electron-dense areas, as compared to TG1 (Fig. 3K).

The number of interdigitations in the TG2 pedicel cells was comparable to those of CG1 and CG2; however, the membrane units were further apart relative to those of the control group. A strongly electron dense, finely granular material was found at the point of contact between the oocytes and pedicel cells (Fig. 3L). Further, large vacuoles were observed in the pedicel cells from TG2. These vacuoles contained membrane-bound microbodies that varied in electron density (Fig. 3I).

In the small spaces between the interdigitations that connect the pedicel cells, a strongly electron-dense material was observed. At higher magnification, the material was found to be small, membrane-bound vesicles with dense contents. A number of polyribosomes were seen in the cytoplasm of these cells (Figs. 3M–3P).

## DISCUSSION

This study assessed the ultrastructural effects caused by castor oil esters synthesized from ricinoleic acid in the ovaries of *R. sanguineus* females ticks. The results confirmed the potential of this plant as a product in the control of tick populations, corroborating results already published by Arnosti et al. (2011a,b), who demonstrated the inhibitory action of these esters on vitellogenesis in this tick species.

The *R. sanguineus* females in all experimental groups had their ovaries removed once the engorgement process was completed, so that several mature oocytes should have been present or at stages IV and V. However, for the treatment groups, the low presence of cells at these stages indicated the effectiveness of the esters on oocyte vitellogenesis and maturation. In essence, these compounds prevented these cells from developing into viable individuals, corroborating the histological data of Arnosti et al. (2011b).

At the same time, mature oocytes were not observed in large quantities, few oocytes at stage I were in the females from the treatment groups, which demonstrated the product's severe action on immature oocytes. In this case, the low occurrence of oocytes at this stage probably happened because the oocytes at this stage of development have not begun the process of depositing the chorion, a protective membrane that begins to be secreted in stage III and acts as a barrier by selectively allowing certain substances into and

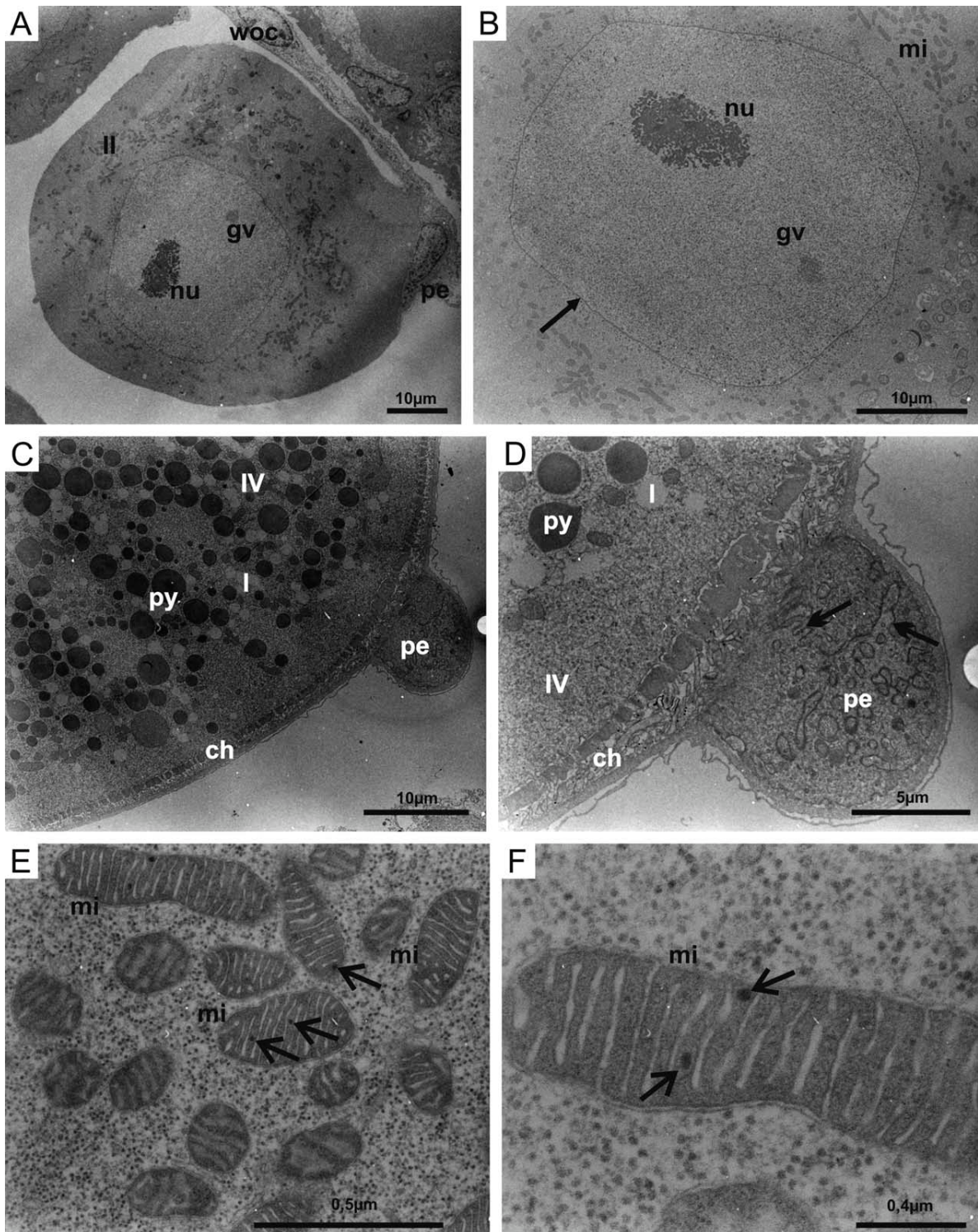


Fig. 1. Ultrastructure of oocytes of control group I (A–B) and control group II (C–F). A: Overview of regular-shaped oocyte II. B: Overview of regular-shaped nuclear envelope. C: Oocyte IV showing chorion (ch), pedicel cell (pe), and yolk granules. D: Details of chorionic

region (ch), pedicel cell (pe), and plasma membrane infolds (arrows). E–F: Detail of intact mitochondria (mi) with dense bodies (arrows). ch = chorion; cy = cytoplasm; gv = germinative vesicle; l = lipid granule; nu = nucleolus; owc = ovary wall cell; py = protein yolk.

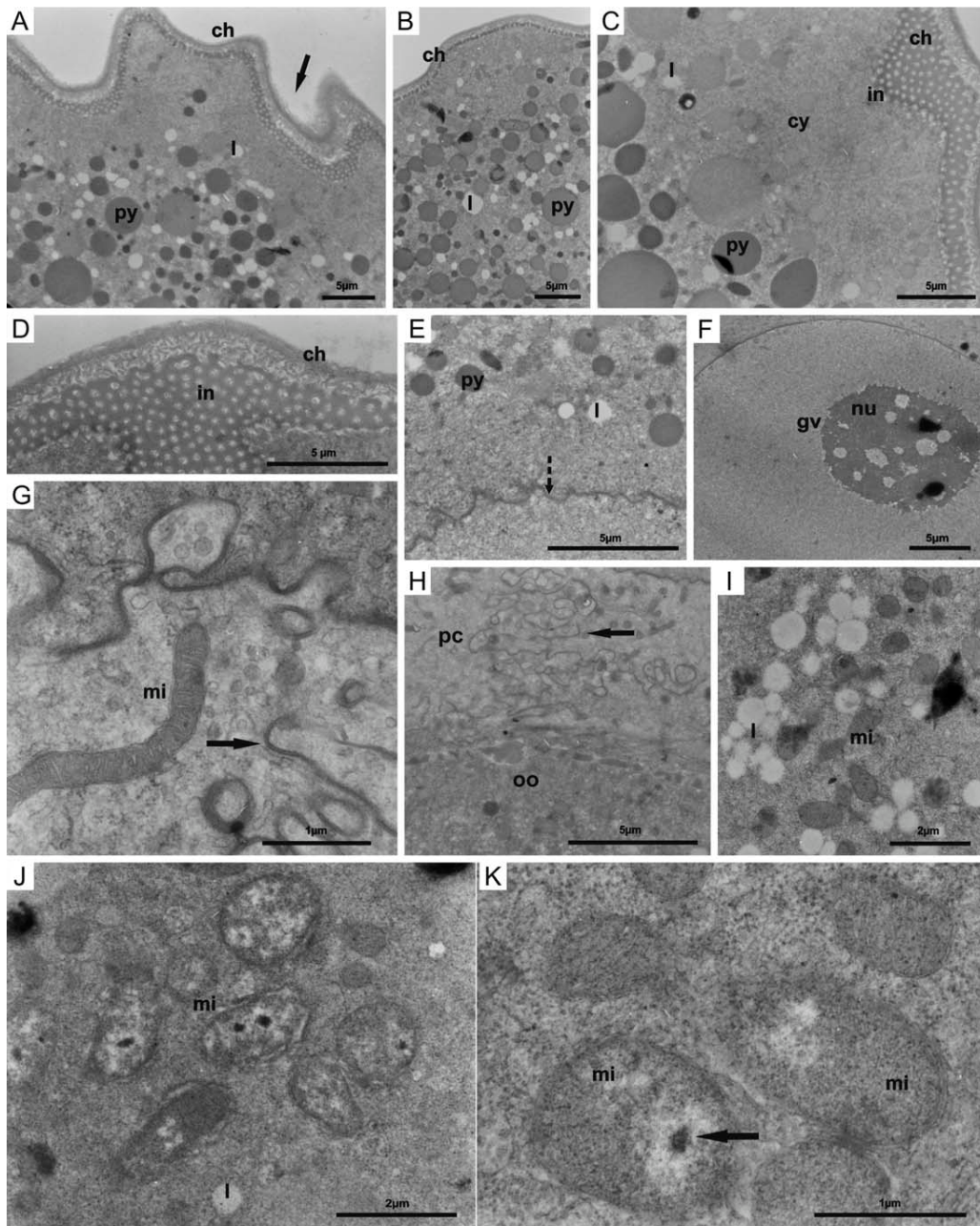


Fig. 2. Ultrastructure of peripheral region and cytoplasm of oocytes and pedicel cells of treatment group I (A-K). A-D: Periphery of oocytes III showing their irregular shape and microvilli (arrows). E-F: Germinal vesicle showing irregular shape (pointed arrow) and nucleolus (nu). G-H: Detail of contact region between pedicel cell and

an oocyte (arrow). I-K: Detail of oocyte's II cytoplasm and detail of altered mitochondria with dense body (arrow). ch = chorion; cy = cytoplasm; gv = germinal vesicle; in = invagination; l = lipidic droplets; mi = mitochondria; oo = oocyte; pc = pedicel cell; py = protein yolk.

out of the cell (Oliveira et al., 2009). Thus, as the secondary compound circulated in the hemolymph, a fluid that also bathes the oocyte, it likely penetrated into the cell via the microvilli plasma membrane and lead to developmental inhibition and sometimes cell death.

The pedicel cells can also serve as a vehicle of the ester since they are important structures in the process

of exogenous synthesis and in the transport of yolk elements into the oocyte. In ixodids, ovaries are the panoistic type, and the nurse and follicular cells are absent; however, their functions are performed by pedicel cells, which also holds oocytes to the ovary wall. The interdigitation of the pedicel cells enables communication and the passage of molecules between the pedicel cells and the oocytes. Because of



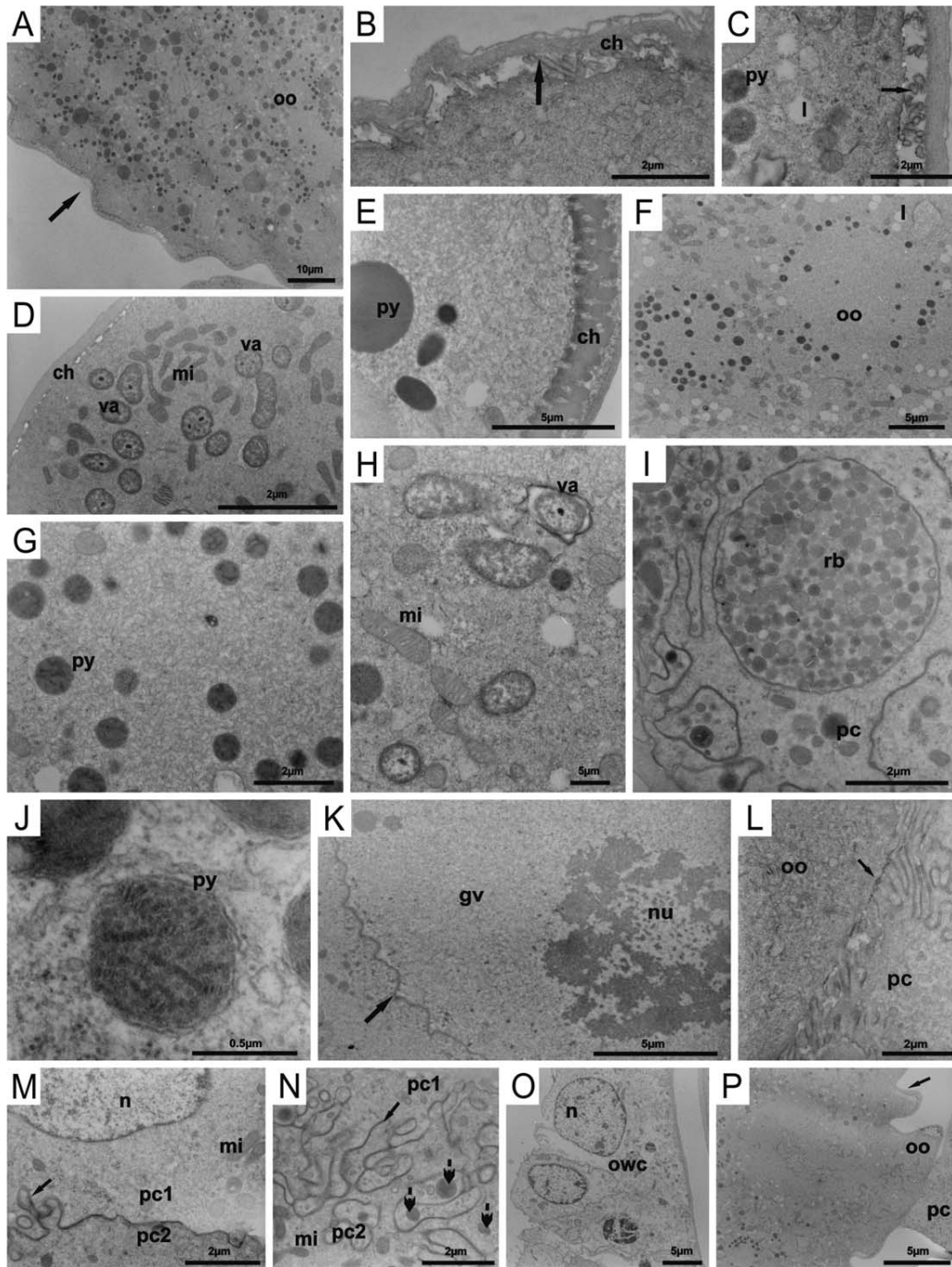


Fig. 3. Ultrastructure of peripheral region, cytoplasm, germ vesicle of oocytes, pedicel cells, and ovary wall cells from treatment group II (A–P). A: Overview of chorium region (arrow) and cytoplasm. B: Detail of irregular-shaped chorium region (ch) of oocyte III (arrow). C: Detail of chorium region and microvilli (arrow). D: Overview of chorium region and cytoplasm with vacuoles. E: Overview of oocyte III or IV with cytoplasm showing few granules. F, G: Overview and detail of yolk granules. H: Overview of cytoplasm with vacuoles (va). I: Detail of residual body (rb) in pedicel cell. J: Detail of protein yolk. K: Detail

of germinal vesicle (gv) with irregular envelope (arrows). L: Overview of oocyte's contact region (oo) with pedicel cell (pc) and membrane invagination (arrow). M–N: Overview and detail of contact region between two pedicel cells (arrows). O: Detail of ovary wall cells (owc). P: Overview of an oocyte featuring membrane invaginations and pedicel cell. ch = chorium; gv = germ vesicle 1 = lipid granule; mi = mitochondria; n = nucleus; nu = nucleolus; oo = oocyte; owc = ovary wall cell; pc = pedicel cell; pc1 = pedicel cell 1; pc2 = pedicel cell 2; py = protein yolk; rb = residual body; va = vacuole.

their exposure to the hemolymph, these cells may be collecting the toxic product and then transferring it to the interior of the oocyte. If so, it would be consistent with results obtained by Denardi et al. (2004) and Oliveira et al. (2009). In these studies, the exposure of *R. sanguineus* females to extracts of "Neem" leaves and fipronil was studied.

The presence of the toxic compound in the tick system probably affected the pedicel cells in the treatment groups (TG1 and TG2) via the interdigitation morphological changes in the pedicel cells and oocytes. Moreover, the presence of vacuoles full of electron-dense bodies in the interdigitations indicated the possible establishment of a defense mechanism for removing damaged or toxic materials (e.g., organelles, membrane residues, and the chemical compound itself) that should not remain or reach the interior of the oocyte. Our results corroborate those obtained in studies conducted by Denardi et al. (2010) when he treated female *R. sanguineus* ticks with the aqueous extract of "Neem" leaves.

The presence of vacuoles, mainly autophagic, in the oocytes from the treatment groups also showed the action of esters within the germ cells. Moreover, the presence of fewer, less electron-dense mitochondria with the disorganized cristae indicates that these vacuoles are lysing damaged organelles so that they can no longer act on the cell physiology, thus preserving the rest of the cell cytoplasm.

Yolk granules were observed in the oocytes of both the control and treatment groups. According to Sauer and Hair (1986), the protein of yolk granules are synthesized in the fat body and results first in vitellogenin, which later will be converted into vitellin, a protein found mainly in oocyte cytoplasm. This process of converting vitellogenin into vitellin demands energy, which is also provided by mitochondria, organelles widely found in the oocyte cytoplasm from CG1 and CG2 females and found at low abundance in the oocyte cytoplasm from TG1 and TG2 females. Since these organelles assaulted by the toxic agent lost the ability to perform functions related to cell physiology, the process of vitellogenesis and future embryo development appear to have been compromised.

The effects caused by the esters on germ cells from the treated groups are likely to interfere with the dynamics of *R. sanguineus* populations by causing a reduction in the number of viable offspring in subsequent generations. In this work, the morphological changes observed in the oocyte chorion of treated females were striking. The chorion represents the main barrier against the external invasion of exogenous agents or conditions, whether chemical, biological, or environmental. Once this membrane is morphologically compromised, embryo development is no longer viable because of the increased vulnerability.

According to studies by Messetti et al. (2010) esters derived from ricinoleic acid of castor oil primarily act through polysaccharide hydrolysis, degrading them into monosaccharides. Thus, the chorion may have been modified by the ricinoleic acid because of the polysaccharides (primarily of chitin) in its structure.

In this study, the oocytes at the more advanced stages of development had a thick chorion, as well as acute invaginations of the cell plasma membrane. This possible "extra" deposition of chorion components sug-

gests that the germ cells exposed to the toxic compound may have employed a protective mechanism to preserve the cytoplasmic content and the oocyte DNA against the action of this external agent. Moreover, the reduction in the size and number of microvilli found in the oocyte plasma membrane would minimize the absorption of products circulating in the hemolymph (including esters), resulting in decreased absorption at the surface of the oocyte.

Comparing the ultrastructural changes of oocytes in both treatment groups (TG1 and TG2) the greatest severity occurred in TG2, suggesting that the longer or shorter exposure period of ticks to the esters can be crucial to controlling those ectoparasites. In summary, this study gathered morphological data that signaled the possibility of developing an effective control method against ticks, adding to a growing body of work, and will be important to the endemic population control of these ectoparasites.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This research has been supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) Grant n° 2009/12387-1 and Grant n° 2009/54125-3, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) where M.I. Camargo-Mathias are financially supported through research fellowships. The authors thank Professor Dr. Gilberto Orivaldo Chierice, Professor Dr. Salvador Claro Neto and BSc. Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho for the technical support.

#### REFERENCES

- Arnosti A, Brienza PD, Furquim KCS, Chierice GO, Neto SC, Bechara GH, Sampieri BR, Camargo-Mathias MI. 2011a. Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Exp Par* 127:569–574.
- Arnosti A, Brienza PD, Furquim KCS, Chierice GO, Bechara GH, Calligaris IB, Camargo-Mathias MI. 2011b. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. *Exp Par* 127:575–580.
- Clemente MA, Gomes FT, Scotton ACBS, Goldner MS, Dos Reis ES, de Almeida MN. 2007. Avaliação do potencial de plantas medicinais no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Rev Bras de Bio* 5:516–518.
- Dantas-Torres F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Par & Vec* 3:10.1186/1756-3305-3-26.
- Denardi SE, Bechara GH, Oliveira PR, Nunes ET, Saito KC, Camargo-Mathias MI. 2004. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Vet Par* 125:379–395.
- Denardi SE, Bechara GH, Oliveira PR, Camargo-Mathias MI. 2010. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. *Exp Par* 126:462–470.
- Flechtmann CHW. 1975. *Elementos de acarologia*. São Paulo: Nobel 344 p.
- Furlong J. 1993. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. *Cad Téc da Esc de Vet UFMG* 8:49–61.
- Messetti MA, Santos AM, Angelis DF, Chierice GO, Neto SC. 2010. Estudo dos derivados do óleo de *Ricinus communis* L. (Mamona) como agente biocida e redutor da viscosidade produzida por *Leucostoc mesenteroides* em indústrias sucroalcooleiras. *Arq do Inst Bio* 77:301–308.
- Oliveira PR, Bechara GH, Denardi SE, Nunes ET, Camargo-Mathias MI. 2005. Morphological characterization of ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Exp Par* 110:146–156.
- Oliveira PR, Bechara GH, Marin Morales MA, Camargo-Mathias MI. 2009. 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 Chem Toxic* 47:1255–1264.
- Olivo CJ, Madruga de Carvalho N, da Silva JHS, Vogel FF, Massario P, Meinerz G, Agnolin C, Morel AF, Viau LV. 2008. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. *Ciência Rural* 38:406–410.
- Ribeiro VLS, Rolim V, Bordignon S, Henriques AT, Dorneles GG, Limberger RP, Poser GV. 2008. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Par Res* 102:531–535.
- Sauer JR, Hair JA. 1986. Morphology, physiology and behavioral biology of ticks. England: Ellis Horwood Limited.
- Sonenshine DE. 1991. Biology of ticks. New York: Oxford University Press.
- Walker A. 1994. Arthropods of domestic animals: A guide to preliminary identification. London: Chapman and Hall.

*Capítulo 4*

---

**OS ÉSTERES DO ÁCIDO RICINOLÉICO DO ÓLEO DE MAMONA (*Ricinus communis*): PERSPECTIVAS DE USO COMO ACARICIDA DEMONSTRADA PELAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DAS CÉLULAS GERMINATIVAS DE FÊMEAS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE).**

Sampieri, B. R.<sup>1</sup>, Furquim, K. C. S.<sup>1</sup>, Nunes, P. H.<sup>1</sup>, Camargo-Mathias, M. I.<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>UNESP, Av. 24<sup>a</sup>, 1515, CP 199, Rio Claro – SP, Zip Code 13506-900, Brazil.

\*Corresponding author.

E-MAIL: micm@rc.unesp.br

## Resumo

O controle de carrapatos tem sido realizado por meio do uso de acaricidas químicos sintéticos, que tem selecionado indivíduos resistentes nas populações destes animais, além de estarem contaminando o ambiente, bem como os organismos não-alvos. Substâncias de origem vegetal vêm sendo pesquisadas como opção aos acaricidas sintéticos, tais como óleos e extratos de folhas de eucalipto e de “neem”. Os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona têm mais recentemente se mostrado promissores na eliminação de bactérias contaminantes de fermentação etanólica agindo como um biocida eficaz. A mesma qualidade tem sido observada quando os ésteres são adicionados a alimentação fornecida a coelhos hospedeiros de carrapatos. Coelhos utilizados como hospedeiros foram infestados com casais de *R. sanguineus* que receberam o tratamento com a ração adicionada dos ésteres. Após 4 dias de alimentação, as fêmeas de carrapatos foram retiradas dos hospedeiros, dissecadas e tiveram seus ovários retirados para aplicação da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, com o objetivo de se verificar as alterações causadas pelo produto na ultraestrutura das células somáticas e germinativas deste órgão. No presente trabalho observou-se que fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* expostas aos ésteres do óleo de mamona tiveram seus ovários alterados, o que foi demonstrado por meio do uso de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão. A adição desta substância à dieta dos coelhos hospedeiros revelou quão tóxico são os ésteres para as organelas citoplasmáticas dos ovócitos e das células do pedicelo, à medida que provocaram alterações na sua morfologia e influenciaram na fisiologia e conseqüente viabilidade das células (germinativas e somáticas), confirmando assim, que os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona são substâncias promissoras no controle e combate de carrapatos *R. sanguineus*.

**Palavras-chave:** Carrapatos; *Rhipicephalus sanguineus*; Controle; Ésteres; Óleo de mamona; *Ricinus communis*.

## Introdução

Atualmente, diversos estudos vêm sendo conduzidos com carrapatos tendo como meta o desenvolvimento de novas formas de controle destes ectoparasitas, principalmente buscando substâncias que gerem o mínimo de resíduos ao ambiente e aos organismos não alvos e, que ao mesmo tempo, atuem com eficácia sobre o organismo parasita (Denardi et. al., 2010; Roma et. al., 2011).

Estudos recentes trazem dados importantes sobre a ecologia e o ciclo de vida dos carrapatos de importância médica e veterinária (Labruna, 2004; Leal et. al., 2003) com vistas ao controle destes animais, porém, pouco se tem estudado sobre a morfologia interna e sobre a fisiologia de carrapatos, o que prejudica o entendimento de seus sistemas quando o animal é exposto aos agentes acaricidas.

O grupo de pesquisa “Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM)” tem buscado modificar este panorama trazendo à luz conhecimentos sobre a morfofisiologia dos principais órgãos de espécies de carrapatos de importância médica e veterinária com o objetivo de esclarecer como e quando os acaricidas agem nos sistemas destes ectoparasitas, bem como tentando buscar informações que sejam úteis no desenvolvimento de novos produtos que possam ser usados no combate a este tipo de praga (Roma et. al., 2010).

Pesquisas com substâncias de origem vegetal com potencial pesticida sobre organismos pragas tanto agrícolas quanto urbanas tem se mostrado promissoras, apesar da falta de interesse dos principais fabricantes de pesticidas no mundo em subsidiar trabalhos com esta classe de produtos (Chagas et. al., 2002). Óleos e extratos vegetais como o óleo e os extratos de folhas de “neem” (Meliacea) apresentaram resultados animadores pois provocaram alterações morfológicas em ovários de *Rhipicephalus sanguineus* (Denardi et. al., 2010) e altas taxas de mortalidade em carrapatos *Dermacentor variabilis* (Landau et. al., 2009).

Mais recentemente, os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) surgiram como uma possibilidade, uma vez que foram obtidos resultados interessantes quando os mesmos foram utilizados como biocida em experimentos com *Leuconostoc mesenteroides* (Messetti et. al., 2010) e em testes piloto com *R. (Boophilus) microplus* (Chierice, informação pessoal).

Arnosti et. al. (2011) e Sampieri et. al. (2011) também apresentaram resultados positivos com este grupo de substâncias quando mostraram que os mesmos atuaram sobre a morfofisiologia e sobre a ultraestrutura das glândulas salivares e dos ovários de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*, com administração ao hospedeiro via alimentação.

Assim, de acordo com estas informações o presente trabalho traz à luz novos dados sobre a ação dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona sobre a ultraestrutura das células somáticas (parede do ovário e células do pedicelo) e germinativas (ovócitos) de ovários de fêmeas de *R. sanguineus* semi-ingurgitadas (4 dias de alimentação) onde foram testadas duas concentrações dos ésteres: 2g de ésteres/Kg de ração e 5g de ésteres/Kg de ração.

## **Material e Métodos**

### Bioensaios

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 240 casais de carrapatos (120 machos e 120 fêmeas) *R. sanguineus*, divididos em oito grupos. Em cada grupo foram alocados 30 casais que foram fixados em oito coelhos hospedeiros (1 coelho por grupo) New Zealand White (30 casais/coelho). Quatro grupos foram usados como controle e quatro como tratamento, sendo nestes últimos testados os efeitos dos ésteres do óleo de mamona nas concentrações de 2g/kg de ração e 5g/kg de ração, de acordo com protocolo estabelecido por Arnosti et al (2010).

Para veiculação dos ésteres do ácido ricinoléico na alimentação dos hospedeiros, os mesmos foram incorporados em NaCl e adicionados a ração fornecida aos coelhos, conforme protocolo descrito por Sampieri et al (submitted paper), o que justificou a adição de apenas NaCl na ração dos coelhos dos grupos controle (**GC**).

Os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice do Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química da USP de São Carlos, SP, Brasil.

### **Grupos de estudo**

#### *Grupo Controle (GC)*



Quatro coelhos hospedeiros foram divididos em quatro subgrupos: controle 1 (**GC1**), controle 2 (**GC2**), controle 3 (**GC3**) e controle 4 (**GC4**) sendo que para cada um foi utilizado um coelho hospedeiro. Animais dos quatro subgrupos receberam ração comercial para coelhos com adição de NaCl.

Subgrupo controle 1 (**GC1**): o hospedeiro deste grupo foi alimentado com ração + NaCl na concentração de 2g NaCl/Kg de ração, durante sete dias **antes** da infestação com os 30 casais de *R. sanguineus* (em jejum). Esta dieta foi mantida até o momento em que as fêmeas dos carrapatos foram coletadas (4 dias de alimentação).

Subgrupo Controle 2 (**GC2**): neste grupo o coelho foi alimentado com a mesma ração oferecida ao **GC1**, contudo a dieta se iniciou **concomitantemente** com a infestação com os 30 casais de *R. sanguineus* (jejum), o que foi mantido até o quarto dia de alimentação das fêmeas no hospedeiro.

Subgrupo Controle 3 (**GC3**): o hospedeiro foi alimentado com ração + NaCl na concentração de 5g NaCl/Kg de ração, durante sete dias **antes** da infestação com os 30 casais de *R. sanguineus* (em jejum). Esta dieta foi mantida até o momento em que as fêmeas dos carrapatos foram coletadas com 4 dias de alimentação.

Subgrupo Controle 4 (**GC4**): o coelho foi alimentado com a mesma ração oferecida ao **GC3**, contudo a dieta teve início **concomitantemente** a infestação com os 30 casais de *R. sanguineus* (em jejum), o que foi mantido até o quarto dia de alimentação das fêmeas no hospedeiro.

#### *Grupo Tratamento*

Aos quatro animais hospedeiros do grupo tratamento foi oferecida ração comercial para coelho com adição de ésteres sintetizados a partir ácido ricinoléico do óleo de mamona (*R. communis*) incorporados ao sal (NaCl), nas concentrações de 2g de ésteres/Kg de ração e 5g de ésteres/Kg de ração. Os animais do grupo tratamento também foram divididos em quatro subgrupos: tratamento 1 (**GT1**), tratamento 2 (**GT2**), tratamento 3 (**GT3**) e tratamento 4 (**GT4**) com 1 coelho para cada subgrupo.

Subgrupo Tratamento 1 (**GT1**): o coelho foi tratado com a ração + NaCl + ésteres, na concentração de 2g de ésteres/Kg de ração, por sete dias **antes** da infestação com 30 casais de *R. sanguineus* em jejum. Esta dieta foi mantida até o momento em que as fêmeas dos carrapatos foram coletadas com 4 dias de alimentação.

Subgrupo Tratamento 2 (**GT2**): o coelho recebeu a mesma ração do **GT1**, porém a administração da ração teve início **concomitantemente** à infestação dos 30 casais de *R. sanguineus*. Esta dieta foi mantida até o momento em que as fêmeas dos carrapatos foram coletadas com 4 dias de alimentação.

Subgrupo Tratamento 3 (**GT3**): o coelho foi tratado com a ração + NaCl + ésteres, na concentração de 5g de ésteres/Kg de ração, por sete dias **antes** da infestação com 30 casais de *R. sanguineus* em jejum. Esta dieta foi mantida até o momento em que as fêmeas dos carrapatos foram coletadas com 4 dias de alimentação.

Subgrupo Tratamento 4 (**GT4**): o coelho recebeu a mesma ração do **GT3**, porém a administração da ração teve início concomitantemente à infestação dos 30 casais de *R. sanguineus*, Esta dieta foi mantida até o momento em que as fêmeas dos carrapatos foram coletadas com 4 dias de alimentação.

Após os quatro dias de alimentação no hospedeiro, as fêmeas de *R. sanguineus* (semi-ingurgitadas) foram coletadas, imediatamente anestesiadas por choque térmico (em geladeira) e dissecadas. Os ovários foram removidos em solução salina (NaCl 0.13 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.017 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 M, pH 7.2 ) e fixados de acordo com protocolo da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Fragmentos de ovários de *R. sanguineus* foram fixados em glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2) durante 2 horas. Foram então realizadas duas lavagens no mesmo tampão com duração de 15 minutos cada, e após a fixação os mesmos foram colocados em tetróxido de ósmio a 1% em solução tampão de cacodilato de sódio 0.1M, durante 2 horas no escuro e à temperatura ambiente. Posteriormente, o material passou por mais duas lavagens (15 minutos cada) em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2), sendo, posteriormente, contrastado em acetato de uranila 2% com acetona 10%, por 4 horas no escuro.

A desidratação foi realizada em série crescente de acetona 50, 70, 90, 95% e 100% duas vezes, com duração de 5 minutos cada. Logo após, o material permaneceu em mistura de acetona e resina (Epon-Araldite) na proporção de 1:1 por 12 horas. O material foi incluído em resina pura com catalisador e colocado em estufa à 60°C por 24 horas para polimerização. Depois os blocos foram seccionados em ultramicrotomo

Sorvall–Porter Blum MT2-B. As secções semifinas foram coradas com azul II (1%) e azul de metileno (1%). As secções ultrafinas foram coletadas em grades de cobre e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos, respectivamente. O material foi observado e fotografado em Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILIPS CM 100.

## **Resultados**

Os resultados aqui obtidos mostraram as alterações ultraestruturais que ocorreram em menor grau de severidade quando comparadas as completamente ingurgitadas (Sampieri, et al., 2011).

### **Grupos Controle**

A ultraestrutura dos ovários das fêmeas de *R. sanguineus* já foi descrita por Oliveira et al. (2009). Os resultados aqui obtidos (Fig. 1 e Fig. 3) corroboram aqueles apresentados por estes autores. Os dados gerados nos grupos controle (**GC1**, **GC2**, **GC3** e **GC4**) deste trabalho não serão descritos e sim utilizados apenas como referência para comparação com os resultados expostos aos ésteres (**GT1**, **GT2**, **GT3** e **GT4**).

### **Grupo Tratamento 1 (GT1)**

Os ovócitos do **GT1** apresentam morfologia específica ainda preservada e membrana plasmática sem invaginações (Fig. 2A). O que se observa é um aparente aumento do espaço entre o contato da membrana plasmática com a lâmina basal, sendo que nesta última observa-se um processo de descolamento dos componentes (Fig. 2A e C).

O citoplasma dos ovócitos deste grupo se mostra com poucos e pequenos grânulos de vitelo, que quando presentes são na maioria das vezes de origem lipídica (estágios I e II de desenvolvimento) (Fig. 2A). Observam-se muitas mitocôndrias pouco eletrondensas e com cristas definidas e organizadas, além de vacúolos autofágicos (Fig. 2A – B).

A região de contato entre o ovócito e as células do pedicelo mostra-se sem alterações quando comparada ao **GC1**, principalmente com relação as microvilosidades do ovócito que apresentam morfologia inalterada (Fig. 2C – E)

As células que compõem o pedicelo não mostram alterações morfológicas aparentes, porém o citoplasma destas células apresenta vacúolos autofágicos (Fig. 2C), muitos corpos multivesiculares e grânulos protéicos pré-vitelínicos (Fig. 2F).

### **Grupo Tratamento 2 (GT2)**

A morfologia dos ovócitos deste grupo mostra-se ligeiramente alterada quando comparada ao **GT1** e ao **GC2** onde a membrana plasmática apresenta pequenas invaginações, sendo que em alguns pontos ao longo da periferia do ovócito observa-se perda de contato entre a membrana plasmática e lâmina basal (Fig. 2G).

O citoplasma destes ovócitos apresenta grande número de mitocôndrias com morfologia variando de elíptica a alongada, sendo que algumas já se mostram menos eletrondensas que as observadas no grupo tratamento anterior e no **GC2**, embora suas cristas se mostrem ainda preservadas (Fig. 2M). Observam-se poucos grânulos vitelínicos de origem lipídica (Fig. 2H – I). Vacúolos autofágicos, bem como figuras mielínicas estão distribuídos na periferia do citoplasma do ovócito (Fig. 2L). Ainda no citoplasma dos ovócitos, Golgi em grande atividade aparece em meio a um grande número de vesículas que provavelmente estão em trânsito por suas cisternas (Fig. 2J – K). Polissomos e corpos multivesiculares também são vistos no citoplasma destes ovócitos (Fig. 2L – M).

A vesícula germinal (núcleo) apresenta envoltório com pequenas invaginações e o nucléolo não é observado (Fig. 2I).

A região de contato entre os ovócitos e as células do pedicelo apresenta-se alterada, pois as microvilosidades estão em menor número e desorganizadas quando comparadas com o **GT1** e com o **GC2** (Fig. 2G – H).

As células do pedicelo não apresentam alterações morfológicas significativas, sendo que sua membrana está preservada, o citoplasma abriga algumas mitocôndrias também preservadas e o núcleo apresenta forma variando entre esférica e elíptica com heterocromatina densa e eucromatina frouxa como no **GC2** (Fig. 2G – H).

### **Grupo Tratamento 3 (GT3)**

Os ovócitos deste grupo apresentam morfologia semelhante aos do **GT2**, com membrana com poucas invaginações e com forma entre esférica e elíptica (Fig. 4A – B).

O citoplasma mostra grande número de mitocôndrias com eletrondensidade menor que nos grupos anteriores, bem como com poucas cristas e aparentemente envolvidas com a síntese de lipídio (Fig. 4H). Poucos grânulos vitelínicos de origem lipídica (Fig. 4F-G) são observados, além de vacúolos autofágicos e corpos multivesiculares em maior número que nos **GT1** e **GT2**, bem como quando comparados com os **GC** (Fig. 4B, E – F).

A região de contato entre o ovócito e as células do pedicelo apresenta modificações como microvilosidades em número reduzido e morfologia alterada (Fig. 4D). A lâmina basal que envolve o pedicelo e o ovócito deste grupo apresenta superfície irregular e em alguns pontos observa-se rompimento dos seus componentes (Fig. 4D).

As células do pedicelo mostram morfologia íntegra, semelhante às observadas nos **GC**, porém já é possível observar vacúolos citoplasmáticos, bem como vacúolos autofágicos e diversas mitocôndrias (Fig. 4A – B). O núcleo destas células apresenta hetero e eucromatina (Fig. 4A – B).

#### **Grupo Tratamento 4 (GT4)**

Os ovócitos deste grupo já mostram alterações morfológicas mais acentuadas, com pequenas invaginações na membrana plasmática além da perda de contato em algumas áreas entre a membrana plasmática e a lâmina basal (Fig. 4I).

O citoplasma mostra grande número de mitocôndrias pouco eletrondensas e com cristas desorganizadas, além de maior número de vacúolos autofágicos que nos grupos anteriores (Fig. J - K). Observa-se também vesículas oriundas do Golgi bem como corpos multivesiculares (4J – K; N – P).

As microvilosidades presentes na região de contato entre o ovócito e as células de pedicelo estão em número reduzido e severamente desorganizadas quando comparadas àquelas dos indivíduos dos tratamentos anteriores e mesmo com as dos grupos controle (Fig.4M).

As células do pedicelo apresentam interdigitações mais evidentes que nos tratamentos anteriores, mas sua morfologia de modo geral não foi alterada (Fig. 4P). O

citoplasma destas células encontra-se com muitas mitocôndrias de formas e tamanhos diversos, porém pouco eletrondensas e com cristas pouco aparentes além de desorganizadas, bem como alguns vacúolos autofágicos, corpos multivesiculares, cisternas do retículo endoplasmático granular e vesículas lisossomais (Fig. 4M; N – Q).

### **Discussão**

Os dados obtidos no presente trabalho corroboraram e complementaram aqueles apresentados por Arnosti et. al. (2011) e Sampieri et. al. (2011) quando também estudaram fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e demonstraram as primeiras alterações causadas pelos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona no processo de vitelogenese e na ultraestrutura das células somáticas e germinativas dos ovários desta espécie.

No presente estudo as alterações observadas na ultraestrutura dos ovários das fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* sinalizaram que, de modo geral, os ésteres agiram de maneira tóxica, porém, em menor grau quando comparado com os resultados obtidos a partir das fêmeas ingurgitadas, nestas últimas quando os ovócitos já estavam em estágios mais avançados de desenvolvimento e com o cório em processo final de deposição (Sampieri et. al., 2011).

Nos indivíduos do **GT** que receberam alimentação com 2g de ésteres/Kg de ração observou-se ação mais sutil sobre as células dos ovários, embora com a presença de sinais de toxicidade do produto, tais como a presença de vacúolos autofágicos e locais com alterações na membrana plasmática, as quais ocorreram em menor grau quando comparadas com os resultados obtidos nos **GT** que receberam os ésteres na concentração de 5g de ésteres/Kg de ração, corroborando dados de Arnosti, et. al. (2011)

Neste estudo foram observadas diferentes alterações nos ovários dos dois grupos de tratamentos. No grupo **GT2** a morfologia das microvilosidades localizadas na região de contato entre o ovócito e as células do pedicelo se mostraram mais desorganizadas e em menor número que no **GT1**, confirmando que a administração dos ésteres quando fornecida antecipadamente aos hospedeiros e antes da infestação ocorrer, realmente faz o produto agir com mais eficiência sobre os carrapatos, corroborando Sampieri et. al. (2011) quando estudaram as fêmeas ingurgitadas desta mesma espécie.

Da mesma forma, a presença de extenso Golgi no citoplasma dos ovócitos das fêmeas do **GT2**, ativos e liberando vesículas com enzimas, provavelmente de natureza hidrolítica, sugeriu a ocorrência de processos de lise intracelular. No **GT4** isso ficou mais evidente pela presença de muitos vacúolos autofágicos e muitas mitocôndrias. Ainda com relação à atividade do Golgi principalmente nos ovócitos dos indivíduos do **GT2** e do **GT4** e sabendo-se que os ésteres derivados do ácido ricinoléico do óleo de mamona possuem a propriedade química de hidrolisar polissacarídeos, pode-se inferir que esta organela com função também de sintetizar polissacarídeos, além de empacotar e endereçamento de proteínas, poderiam estar sintetizando mais ativamente novas moléculas de polissacarídeos como modo de compensar a ação lítica causada pelos ésteres sobre esta classe de molécula, além de estar mais ativa na liberação de lisossomos para a digestão de organelas danificadas pelo produto químico.

Provavelmente houve a ação direta dos ésteres sobre o material abrigado nos corpos multivesiculares presentes nos ovócitos dos indivíduos dos **GT3** e **GT4**, pois o conteúdo destas estruturas nestes grupos apresentou menor eletrondensidade que nos demais. Uma vez que seu conteúdo é de natureza glicoprotéica os ésteres teriam atuado sobre estas moléculas, hidrolisando-as.

Os resultados aqui obtidos reforçaram a ideia de que os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona atuaram sobre as organelas, mesmo quando administrados em menor concentração. As mitocôndrias dos ovócitos dos **GT2** e **GT4** foram observadas no interior de vacúolos autofágicos sugerindo que a sua reposição nos ovócitos dos carrapatos tratados tornar-se-ia mais urgente, pois as mesmas perderiam suas características morfológicas e consequentemente fisiológicas mais rapidamente.

Dados obtidos por Roma et. al. (2010) estudando fêmeas de *R. sanguineus* completamente ingurgitadas e expostas ao acaricida permetrina, mostraram que este produto agiu mais severamente em ovários de fêmeas semi-ingurgitadas do que nas fêmeas completamente ingurgitadas, onde nas primeiras os ovócitos estiveram mais suscetíveis a ação dos agentes químicos externos principalmente pela ausência do cório nos estágios mais iniciais de desenvolvimento.

O presente trabalho demonstrou que, no caso dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona o tempo de exposição ao produto foi fator determinante na ação efetiva do mesmo sobre as células do sistema reprodutor carrapato. As fêmeas completamente ingurgitadas tratadas com os ésteres na concentração de 5g/Kg de ração, segundo

Sampieri et. al. (2011) mostraram alterações mais severas nos ovócitos mais maduros, principalmente nos IV e V onde inclusive a deposição do cório já havia ocorrido e mostrou-se comprometida, sugerindo que este processo tenha sido influenciado pela ação dos ésteres os quais provavelmente atuaram hidrolisando os polissacarídeos.

Os ésteres administrados aos animais hospedeiros do **GT2** e **GT4** (receberam a ração enriquecida antes de serem infestados com os carrapatos) agiram com maior severidade sobre o sistema reprodutor dos carrapatos neles fixados. Nestes observou-se maiores modificações nos ovócitos, pois quando os mesmos iniciaram a alimentação os ésteres já estavam presentes na circulação sistêmica do hospedeiro, contrariamente do ocorrido nos grupos **GT1** e **GT3**, onde estes foram infestados no mesmo dia em que se iniciou a administração dos ésteres, o que provocou um atraso na disponibilização para o seu sangue. A disponibilidade dos ésteres no ciclo alimentar de *R. sanguineus*, que em condições experimentais dura no máximo sete dias, mostrou que estes se forem utilizados (como aditivo alimentar) no controle de carrapatos deverão ser previamente administrados aos hospedeiros.

Desta forma, o presente estudo trouxe mais dados sobre este acaricida natural que agiu diretamente sobre o sistema reprodutor feminino de carrapatos *R. sanguineus*, afetando o seu processo de vitelogênese e comprometendo o desenvolvimento do novo indivíduo. Forneceu também informações que poderão subsidiar novos estudos com essa classe de produto gerando a expectativa do desenvolvimento de substâncias que atuem efetivamente no controle das populações deste tipo de praga urbana.



## Referências

- Arnosti, A., Brienza, P. D., Furquim, K. C. S., Chierice, G. O., 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. *Exp. Par.* 127:575–580.
- Chagas, A. C. de S., Passos, W. M., Prates, H. T., Leite, R. C., Furlong, J., Fortes, I. C. P. 2002. Acaricide effect of *Eucalyptus spp* essential oils and concentrated emulsion on *Boophilus microplus*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, p. 247-243.
- Denardi, S. E., Bechara, G. H., Oliveira, P. R., Camargo-Mathias, M. I. 2010. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. *Exp Par* 126:462–470.
- Labruna, M. B. 2004. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Bras. Parasitol. Vet.*, p. 123-124.
- Landau, S. Y., Provenza, F. D., Gardner, D. R., Pfister, J. A., Knoppel, E. L., Peterson, C., Kababya, D., Needham, G. R., Villalba. 2009. Neem-tree (*Azadirachta indica* Juss.) extract as a feed additive against the American dog tick (*Dermacentor variabilis*) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitology*, 311-317.
- Leal, A. T., Freitas, D. R. J., Vaz I. S. 2003. Perspectives to control bovine tick. *Acta. Sci. Vet.*, p. 1-11.
- Messetti, M. A., Santos, A. M., Angelis, D. F., Chierice, G. O., Neto, S. C. 2010. Estudo dos derivados do óleo de *Ricinus communis* L. (Mamona) como agente biocida e redutor da viscosidade produzida por *Leuconostoc mesenteroides* em indústrias sucroalcooleiras. *Arq do Inst Bio* 77:301-308.

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). *Exp Par* 110:146–156.

Sampieri, B. R. Arnosti, A. Nunes, P. H., Furquim, K. C. S., Chierice, G. O., Camargo-Mathias, M. I. Ultrastructural changes in the ovary cells os engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks trated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*). *Microscopy Research and Technique*, DOI: 10.1002/jemt.21112, 2011.

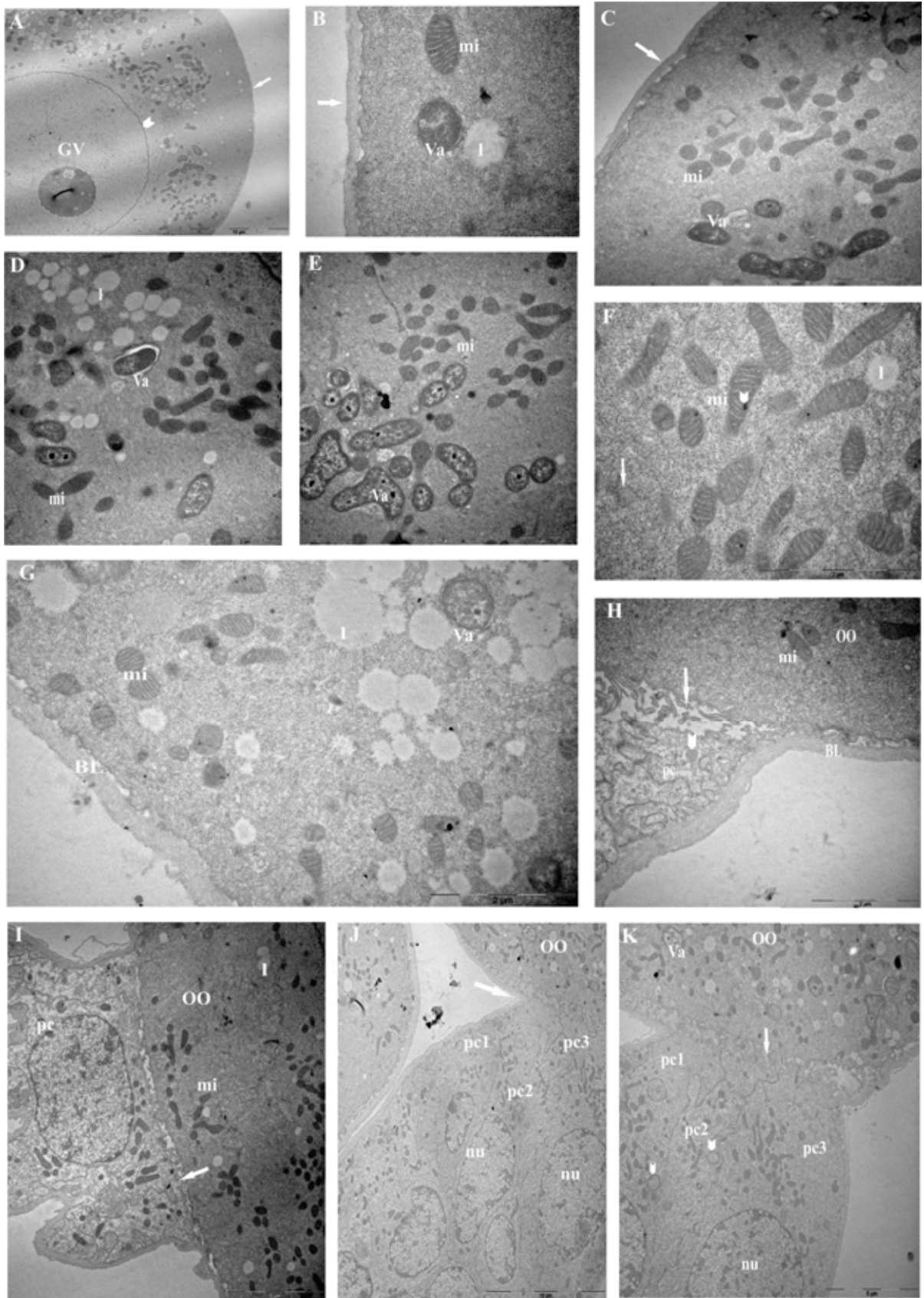
Sonenshine, D. E. 1991. *Biology of ticks*. New York: Oxford University Press.

Tauil PL. 2002.

**FIGURAS**

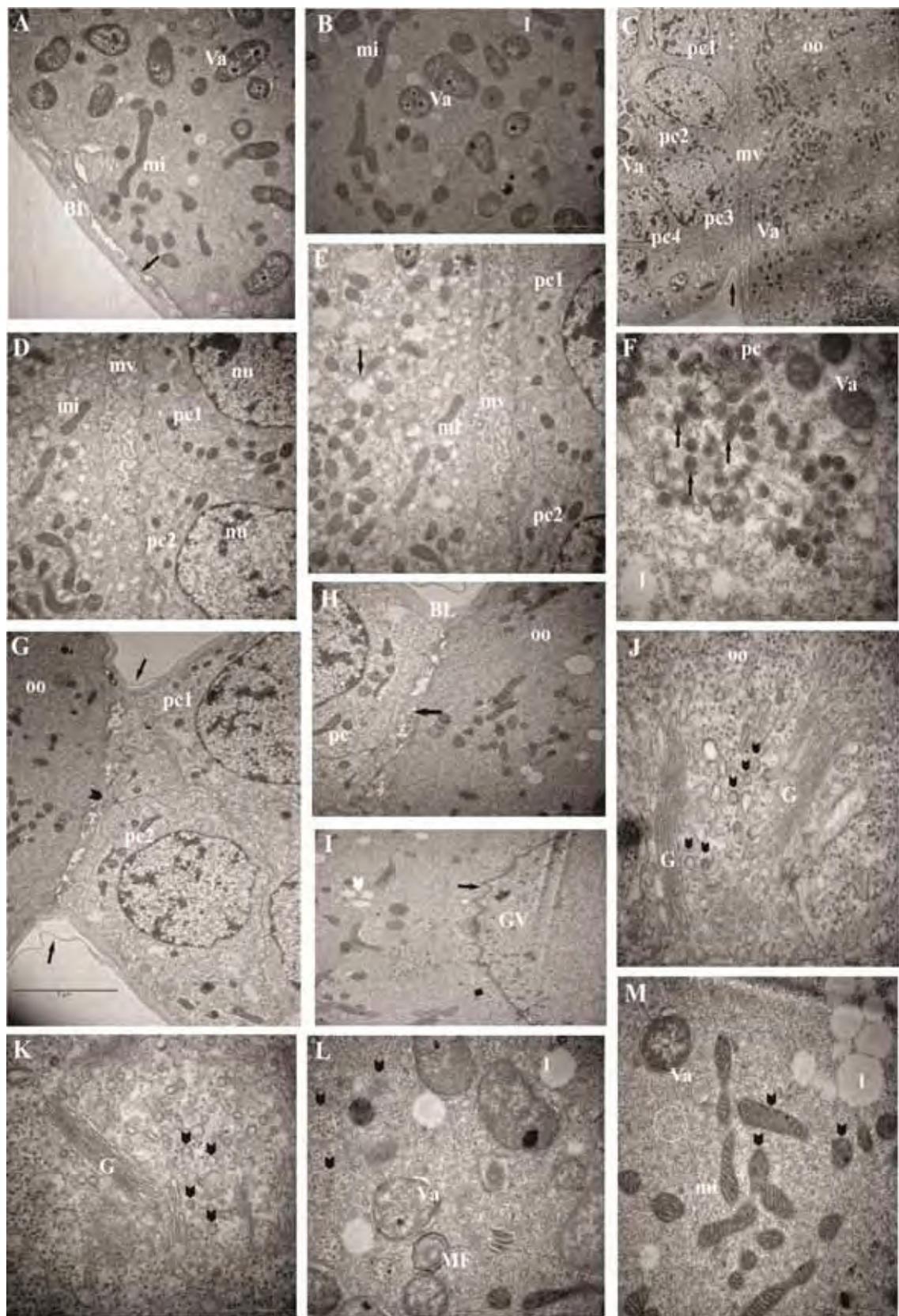
**Fig. 1** – (A-G) Vista geral e detalhes da região periférica (setas) de ovócitos II e das células do pedicelo de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* do **GC1**, onde se observa o citoplasma com poucos grânulos de vitelo e presença de organelas. (H-K) Vista geral e detalhes da região periférica de ovócitos II e das células do pedicelo de fêmeas semi-ingurgitadas de *R.sanguineus* do **GC2**, onde se observa o citoplasma também com poucos grânulos de vitelo e muitas mitocôndrias. **BL** = lâmina basal; **GV** = vesícula germinal; **l** = grânulo de lipídio; **mi** = mitocôndria; **nu** = núcleo; **oo** = ovócito; **pc** = células do pedicelo; **Va** = vacúolos autofágicos.

Fig. 1



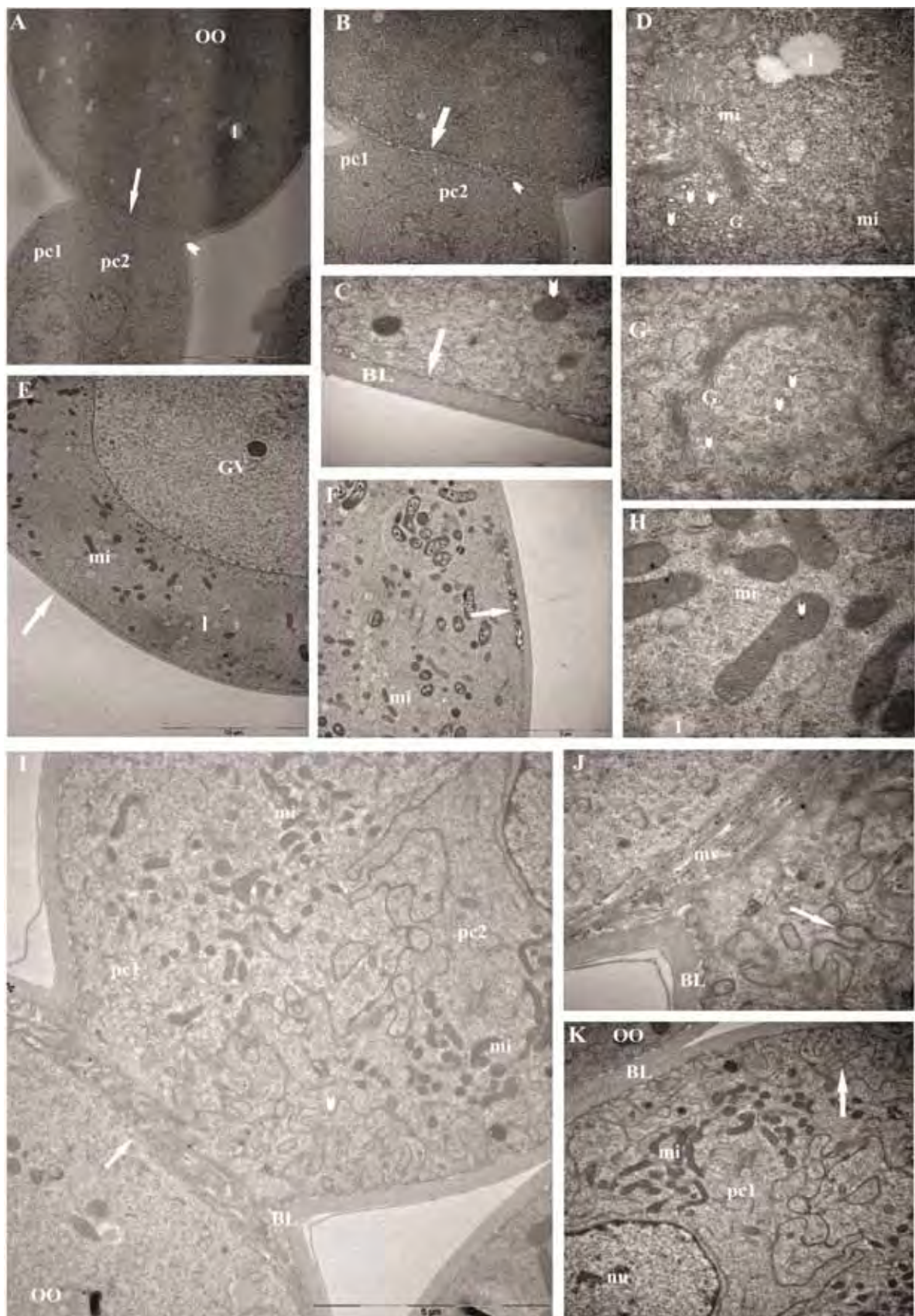
**Fig. 2** – (A-E) Vista geral e detalhes da região periférica e do citoplasma de ovócitos II de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* do **GT1**, onde se observa a presença de mitocôndrias e de vacúolos autofágicos. (F) Detalhe do citoplasma da célula do pedicelo abrigando vesículas de material pré-vitelínico (setas) do **GT1**. (G-I) Vista geral do ovócito II e das células do pedicelo de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* do **GT2**, onde são observados detalhes das microvilosidades da área de contato entre o ovócito e a célula do pedicelo (cabeça de seta) e do envoltório nuclear (seta). (J-M) Detalhes do citoplasma de ovócitos do **GT2** com larga presença de Golgi circundados por vesículas (cabeça de seta), bem como por mitocôndrias pouco eletrondensas (setas) e polissomos (circulo pontilhado). **BL** = lâmina basal; **GV** = vesícula germinal; **l** = grânulo de lipídio; **MF** = figura mielínica; **mi** = mitocôndria; **mv** = microvilosidades; **nu** = núcleo; **oo** = ovócito; **pc** = células do pedicelo; **Va** = vacúolos autofágicos.

Fig. 2



**Fig. 3** – (A-C) Vista geral do ovócito II e das células do pedicelo de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* do **GC3** mostrando detalhes das microvilosidades na região de contato entre ovócito e célula do pedicelo (seta), bem como da lâmina basal (cabeça de seta). (D) Detalhe do citoplasma do ovócito II do **GC3** com presença de Golgi e vesículas de conteúdo eletrólucido (cabeça de setas). (E-F) Vista geral do ovócito II de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* do **GC4**, mostrando detalhes da região periférica (seta) e do citoplasma onde se encontram vacúolos autofágicos (círculo). (G-H) Detalhes do citoplasma do ovócito II do **GC4** com presença de Golgi permeados por vesículas (cabeça de seta) e mitocôndrias. (I-K) Vista geral da região de contato entre ovócito II e célula de pedicelo do **GC4**, mostrando detalhes das microvilosidades e das interdigitações (seta). **BL** = lâmina basal; **GV** = vesícula germinal; **l** = grânulo de lipídio; **mi** = mitocôndria; **mv** = microvilosidades; **nu** = núcleo; **oo** = ovócito; **pc** = células do pedicelo; **Va** = vacúolos autofágicos.

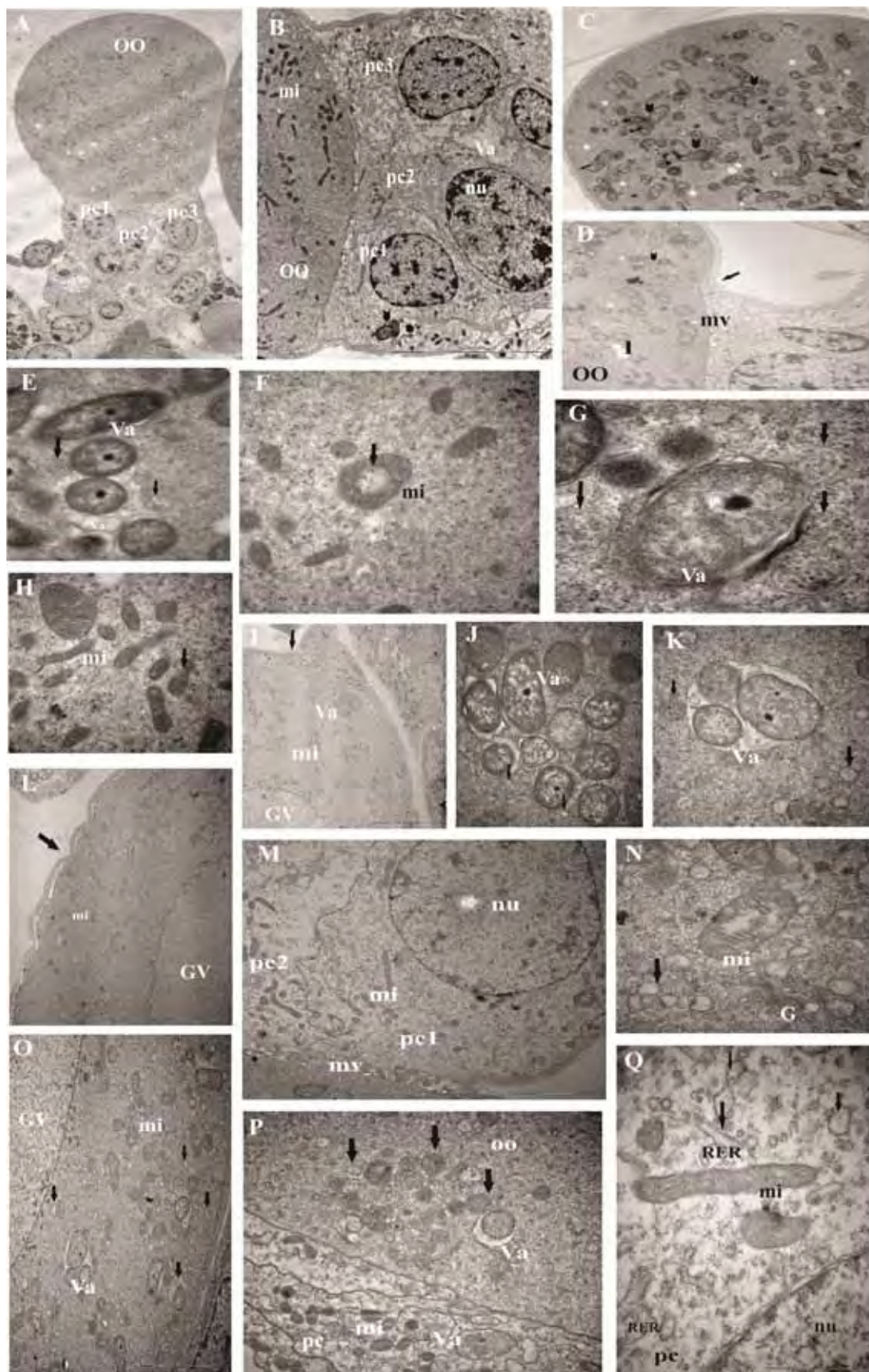
Fig. 3





**Fig. 4** – (A-E) Vista geral do ovócito II e das células do pedicelo de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* do **GT3**. Detalhes das microvilosidades da região de contato entre os ovócitos e a célula do pedicelo, lâmina basal (setas) e do citoplasma onde se observam vacúolos autofágicos (cabeça de seta). (F-H) Detalhe do citoplasma de ovócito II de indivíduos do **GT3** com presença de muitos vacúolos autofágicos, mitocôndrias de eletrondensidade variada e com gotas lipídicas (seta) e corpos multivesiculares (setas). (I-K) Vista geral de ovócito II/III e das células de pedicelo do **GT4**, com detalhe para grande presença de vacúolos autofágicos e vesículas lisossômicas (setas). (L-Q) Detalhe da periferia e do citoplasma do ovócito II ou III e de células do pedicelo do **GT4** com grande presença de vacúolos autofágicos, mitocôndrias pouco eletrondensas e muitos corpos multivesiculares (setas) além de retículo endoplasmático rugoso. **GV** = vesícula germinal; **I** = grânulo de lipídio; **mi** = mitocôndria; **nu** = núcleo; **oo** = ovócito; **pc** = células do pedicelo; **RER** = retículo endoplasmático rugoso; **Va** = vacúolos autofágicos.

Fig. 4



*Discussão Geral*

---

## 6. Discussão Geral

Atualmente, estudos voltados à biologia de artrópodos praga que apresentam grande potencial zoonótico e tendo como foco o controle das populações destes animais têm-se ampliado sensivelmente em níveis mundiais, com grande destaque para espécies de pulgas, mosquitos e carrapatos (PANELLA et. al., 2005).

Os métodos de controle de carrapatos utilizados em larga escala atualmente, principalmente contra as espécies que parasitam animais de criação e de companhia, têm sido os carrapaticidas químicos sintéticos, como por exemplo, o Frontline® (Fipronil). Estes produtos apresentam grande eficácia na eliminação dos ectoparasitas presentes no animal hospedeiro, porém causam algumas condições desfavoráveis, tais como: a) toxicidade aos organismos não alvo (hospedeiro) como demonstrado por Oliveira et. al. (2010) em testes com ratos tratados com o Fipronil; b) seleção de indivíduos resistentes quando os produtos não são aplicados corretamente nas populações de carrapatos além da contaminação do ambiente e c) ação pontual dos produtos, matando o carrapato que está parasitando o hospedeiro e sem se prever controle efetivo do ectoparásita no ambiente (CAMARGO-MATHIAS, 2011).

Assim sendo, o presente estudo trouxe novos dados sobre a ação de uma substância de origem vegetal, de baixo custo e que apresenta versatilidade em sua aplicação (MESSETI et. al., 2010) confirmando-se como promissora no controle das populações de carrapatos de importância médica e veterinária.

Neste trabalho apresentou-se a sugestão de um protocolo de utilização dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona incorporado na ração animal, com o objetivo de que essa substância atinja o carrapato via circulação sistêmica do hospedeiro. Acaricidas como a ivermectina já possuem essa via de ação contra carrapatos, visto que a hematofagia é obrigatória em todo o ciclo ontogenético destes ectoparasitas, e assim apresentando então resultados eficazes (LEAL, et. al. 2003). No entanto, o uso de uma substância de origem vegetal como aditivo alimentar buscando uma ação acaricida é uma metodologia mais recente.

A adição dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) em ração para coelhos foi aplicada pela primeira vez pelos pesquisadores do grupo BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) apresentando-se como promissora nos estudos de compostos naturais com potencial pesticida/acaricida.

Além da descrição desta metodologia, neste trabalho foi verificado que, apesar do procedimento de adição dos ésteres e do sal (NaCl) na ração dos coelhos hospedeiros estes não deixaram de consumi-la e ainda, apresentaram ganho de peso em todos os grupos de tratamento, sugerindo que a textura e palatabilidade da ração modificada não foram alteradas ao ponto dos animais não se alimentarem.

As alterações morfológicas resultantes da ação dos ésteres, via alimentação dos hospedeiros, sobre o sistema reprodutor feminino de carrapatos *R. sanguineus*, já anteriormente demonstradas por Arnosti et. al. (2011), foram aqui confirmadas e complementadas pelos resultados obtidos em níveis histoquímico e ultraestrutural, tanto nas células somáticas quanto nas germinativas dos ovários de fêmeas desta mesma espécie.

A capacidade dos ésteres em hidrolisar polissacarídeos interferiu diretamente no processo de vitelogênese das fêmeas tratadas com a substância, tendo os ésteres atuado sobre o conteúdo do vitelo de origem glicoprotéica, provavelmente hidrolisando o grupo açúcar destas moléculas, bem como sobre a síntese e deposição do cório. Além disso contribuiu aumentando a atividade enzimática da célula como tentativa de produzir outras proteínas, que não as vitelínicas, para inativar a ação tóxica da substância no meio intracelular.

Desta forma, ficou demonstrado no presente trabalho que o processo de vitelogênese foi alterado como um todo, desde os momentos iniciais da absorção/síntese do material vitelogênico até a formação completa dos grânulos de vitelo e do cório quando o ovócito atinge seu estágio maduro. Estas informações certamente irão subsidiar novos estudos sobre como os ésteres podem influenciar no desenvolvimento de ovócitos de carrapatos em momentos posteriores a fecundação, bem como sobre de que forma os futuros embriões poderão se desenvolver nestes ovos após terem contato com este produto e, se o mesmo influenciará nas diversas fases do ciclo ontogenético dos carrapatos.

Os resultados aqui obtidos confirmaram ainda que os ésteres quando administrados via alimentação aos hospedeiros são entregues aos carrapatos *R. sanguineus* através do sangue destes últimos e atingem a sua hemolinfa agindo sobre o sistema reprodutivo feminino. Esse processo aponta para uma interferência sobre o desenvolvimento dos embriões inviabilizando a formação de novos indivíduos. Esta classe de produto mostrou-se então promissora como um novo método de controle contra esta praga urbana, que são os carrapatos *R. sanguineus*.

*Conclusões*

---

## 7. Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

a) Uma via de administração efetiva dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona pode ser a oral (incorporado à ração animal). Estes, depois de consumidos e digeridos pelo hospedeiro, são liberados na corrente sanguínea do mesmo, atingindo assim o carrapato.

b) O tempo de exposição dos carrapatos aos ésteres foi fator determinante para o sucesso deste acaricida. A sua ação tóxica sobre as fêmeas ingurgitadas (seis a sete dias de alimentação) foi mais severa que nas semi-ingurgitadas (quatro dias de alimentação), bem como quando o produto foi administrado aos hospedeiros 7 dias antes da infestação (com os carrapatos), ao contrário do observado quando o produto foi oferecido aos hospedeiros concomitante a infestação.

c) Os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona interferiram na ultraestrutura dos ovócitos e no processo de vitelogênese de *Rhipicephalus sanguineus*, alterando a fisiologia destas células.

d) A ação hidrolítica de polissacarídeos pelos ésteres é inédita no controle de carrapatos e no seu uso como biocida;

e) Os ovócitos dos carrapatos dos **GT2** infestados em hospedeiros que receberam os ésteres sete dias antes, mostraram alterações morfológicas na membrana plasmática e na lâmina basal.

f) As mitocôndrias foram as organelas que mais sofreram a ação dos ésteres, apresentando desorganização das suas cristas.

g) O Golgi dos ovócitos das fêmeas semi-ingurgitadas pertencentes aos **GT2** e **GT4** apresentou maior atividade de síntese de polissacarídeos e de enzimas lisossomais, provavelmente para compensar a hidrólise dos elementos vitelínicos (origem polissacarídica) provocada pelos ésteres, bem como produzindo enzimas lisossomais para digerir as organelas afetadas pelos ésteres.

h) A síntese e manutenção dos grânulos de vitelo de natureza glicoprotéica e polissacarídica ficaram comprometidas, fato este demonstrado pelo menor tamanho e pela fragmentação destes grânulos nos ovócitos IV e V.

i) O vitelo de origem lipídica aumentou nos ovócitos dos **GT2** (acúmulo e síntese) provavelmente para compensar a lise dos demais elementos vitelínicos causada pelos ésteres.



## *Referências Bibliográficas*

---

## 8. Referências

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**, v. 127, 569–574, 2011a.

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**, Amsterdam, v. 127, 575–580, 2011b.

BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Compatibility of the fungus *Metharizium anisopole* end deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.4, n. 141, p. 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, v. 4, n. 2, p. 61-66, 1995.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Comparative results of action os natural and sintetic acaricides in reproductive and salivar systems os *Rhipicephalus sanguineus* – Searching by a sustainable ticks control.** In: Insecticides – Advances in Integrated Pest Management. (Org.) Farzana Perveen. Croatia: InTech, 2011. p. 391-410.

DANTAS-TORRRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, 3, doi:10.1186/1756-3305-3-26, 2010.

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, v. 113, p. 30-35, 2006.

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** , Oxford, DOI: JMIC 1195 1-9, 2007.

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**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 118-122, 2002.

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

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

LANDAU, S. Y.; PROVENZA, F. D.; GARDNER, D. R.; PFISTER, J. A.; KNOPPEL, E. L.; PETERSON, C.; KABABYA, D.; NEEDHAM, G. R.; VILLALBA, J. J. Neem-tree (*Azadirachta indica* Juss.) extract as a feed additive against the American dog tick (*Dermacentor variabilis*) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 311-317, 2009.

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**, Amsterdam, v. 27, n. 12, p. 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**, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003.

MESSETTI, M. A.; SANTOS, A. M.; ANGELIS, D. F.; CHIERICE, G.O.; NETO, S. C. Estudo dos derivados do óleo de *Ricinus communis* L. (Mamona) como agente biocida e redutor da viscosidade produzida por *Leuconostoc mesenteroides* em indústrias sucroalcooleiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, 77:301-308, 2010.

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, v. 114, p. 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**, Amsterdam, v. 140, p. 114-123, 2006b.

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

OLIVEIRA, P. R. ; BECHARA, G. H. ; CAMARGO-MATHIAS, M. I. . *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari:Ixodidae) Ovaries: An ultrastrucutural analysis. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 116, p. 10.1016//407-413, 2007a.

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**, 47:1255–1264, 2009.

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, v. 143, p. 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, v. 113, p. 179-185, 2006.

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

PANELLA, N. A.; DOLAN, M. C.; KARCHESY, J. J.; XIONG, Y.; PERALTA-CRUZ, J.; KASAWNEH, M.; MONTENIERI, J. A.; MAUPIN, G. O. Use of novel compounds for pest control: Insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar. **Entomological Society of America**, 42 (3): 352-358, 2005.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6 ed, 641 p., 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 Federal Rural do Rio de Janeiro - Série Ciências da Vida**, Itaguaí, v. 18, n. 1-2, p. 25-33, 1996.

RIBEIRO, V. L. S.; ROLIM, V.; BORDIGNON, S.; HENRIQUES, A. T.; DORNELES, G. G.; LIMBERGER, R. P.; POSER, G. V. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology Research**, 102:531–535, 2008.

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

RUPPERT E. E., FOX R. S., BARNES R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Editora Roca ltda, 7º ed., 1145 p., 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, v. 129, p. 299-311, 2005.

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. 1992. Boca Raton, **CRC Press** p.303-331.

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.

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

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