

YOUSMEL ALEMÁN GAINZA

Exposição de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* (*Rhipicephalus sanguineus* s.l) aos efeitos dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona e do ozônio (potenciais acaricidas): avaliação dos parâmetros bioquímicos-enzimáticos e toxicológicos.

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Rio Claro.

Supervisor(a): Profa. Dra. Maria Izabel
Camargo-Mathias

FAPESP - Nº do Processo 2021/08570-7

Rio Claro, São Paulo

2024

Exposição de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* (*Rhipicephalus sanguineus* s.l) aos efeitos dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona e do ozônio (potenciais acaricidas): avaliação dos parâmetros bioquímicos-enzimáticos e toxicológicos.

Bolsista: Dr.M.V.Z. Yousmel Alemán Gainza

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to Dr. M.V.Z. Yousmel Alemán Gainza, is shown.

Supervisora: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias, is shown.

Relatório FAPESP Final

Bolsa Nível: Pós-Doutorado

Processo FAPESP Nº: 2021/08570-7

Período: dezembro/2022 à novembro/2024

Rio Claro

Estado de São Paulo – Brasil

Agosto – 2024

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	6
1.1	O intestino de carrapatos como alvo nas pesquisas de novos bioativos para o controle.....	7
1.2	Óleo de mamona e seus derivados, como potenciais no controle de carrapatos	9
2.	OBJETIVOS	10
	Objetivo geral	10
	Objetivos específicos	10
3.	MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1	Compostos e reagentes químicos.....	11
3.2	Isolados de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (atualmente, <i>Rhipicephalus linnaei</i>).....	11
3.3	Ensaio com fêmeas adultas	11
3.3.1	TIA com os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona	11
3.4	Impacto das formulações nas enzimas intestinais das fêmeas ingurgitadas tratadas.....	12
3.4.1	Atividade da fosfatase alcalina	13
3.4.2	Atividade da fosfatase ácida	13
3.4.3	Atividade das serinoproteases.....	14
3.4.4	Determinação de proteína total e da quitina da cutícula	14
3.4.5	Análise morfológica do intestino medio.....	16
3.4.5.1	Coloração pela hematoxilina de Harris-eosina aquosa	16
3.4.6	Histoquímica	16
3.4.6.1	Técnica do Azul de Bromofenol.....	16
3.4.6.2	Técnica do PAS ácido periódico-Schiff	16
3.5	Bioensaios com larvas.....	17
3.5.1	TIL com os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona.....	17
3.6	Atividade das esterases.....	18
3.6.1	Atividade das monoxigenases.....	19
3.6.2	Atividade da Glutathione S-transferase (GST)	19
4.0	ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5.0	RESULTADOS	20
5.1	Ensaio com fêmeas ingurgitadas	20
5.2	Ensaio com larvas	31
6.0	DISCUSSÃO GERAL	34
7.0	CONCLUSÃO	37
8.0	DESCRIÇÃO DO APOIO INSTITUCIONAL RECEBIDO NO PERÍODO.....	37
9.0	LISTA DE PUBLICAÇÕES RESULTANTES DE AUXÍLIO DA BOLSA	38
10.0	OUTRAS ATIVIDADES	38
11.0	ANEXOS.....	39
12.0	REFERÊNCIAS	45

RESUMO DO PROJETO DE PESQUISA

O controle de carrapatos tem sido realizado por meio do uso indiscriminado de acaricidas. No entanto, sabe-se que o desenvolvimento de resistência a esses acaricidas pelos ectoparasitas tem aumentado, o que leva a necessidade de se realizar novas abordagens com relação ao controle parasitário. O controle de parasitas baseia-se na redução da frequência do uso de drogas sintéticas, integrado a outras medidas, como o uso de imunógenos e de fungos. Resultados de estudos tem mostrado a preferência pelo redesenho de fármacos, realizado a partir do conhecimento do mecanismo de ação dos mesmos no nível celular, subcelular e metabólico. Poucos estudos têm tido como alvo os produtos naturais, principalmente aqueles que atuam sobre o sistema digestório, interface primária na relação patógeno-vetor, e o controle microbiano, principalmente no intestino médio órgão que pode ser mediado pela atividade de hemocidinas, lisozimas e defensinas, além de inibidores de proteases, bem como do estresse oxidativo. Assim, o presente projeto vem propor a avaliação dos efeitos da exposição de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (atualmente denominado *Rhipicephalus linnaei*) aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, sobre seus parâmetros bioquímico-enzimático e toxicológico, visto ser o intestino médio a região responsável pela homeostase e pelo equilíbrio redox, além da absorção de hemoproteínas. Os ectoparasitas foram avaliados nos estágios de larva e de adulto, com foco nas enzimas de detoxificação (serinoproteases, estearases, monoxigenase, glutathione S-transferase) de xenobióticos, bem como nas alterações histofisiológicas que ocorreram no intestino médio, permitindo elucidar a dinâmica do processo bioquímico-enzimático e toxicológico.

Palavras-chave: carrapatos, *Rhipicephalus sanguineus*, ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona, ozônio, enzimas intestinais.

RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

O presente estudo avaliou a exposição de carrapatos do cão *Rhipicephalus linnaei*, aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona, potencial acaricida natural; e como atuaria sobre os parâmetros bioquímico/enzimático e toxicológico destes ectoparasitas sob a perspectiva de se buscar informações que possam ser importantes na busca por alternativas “mais limpas” para o controle dos mesmos. Os resultados demonstraram que os ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona não provocou redução na taxa de oviposição das fêmeas adultas, nem causou mortalidade nas larvas de carrapatos *R. linnaei* expostas ao bioativo. De esta maneira o bioativo avaliado não apresentou efeito tóxico sobre as diferentes fases de vida dos carrapatos. Enquanto aos resultados bioquímicos corroborou-se que o uso do bioativo como carrapaticida não é um fator risco da aparição de resistência ao acaricida, toda vez que a participação das principais enzimas digestivas em fêmeas ingurgitadas e larvas, permaneceram bem próxima dos valores obtidos nos controles negativo com água destilada. Entretanto, a utilização dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, nas concentrações de 0,78 a 6,25 mg/mL, causou alterações morfohistoquímicas no intestino médio das fêmeas ingurgitadas de *R. linnaei*. O epitélio, células digestivas não uniformes e lúmen preenchido com vesículas digestivas rompidas e grânulos de hematina foram observados no intestino médio de fêmeas expostas aos bioativos. A análise histoquímica dos intestinos médios de fêmeas de *R. linnaei* expostas aos ésteres, revelou a presença de proteínas, as quais nas células digestivas do epitélio do intestino nas concentrações de 0,78 a 6,25 mg/mL do bioativo, mostrou menores quantidades destas no seu citoplasma, provavelmente devido á maior desorganização estrutural do próprio intestino médio, o que provavelmente interferiu na produção das mesmas (principalmente na forma de enzimas digestivas) e em quantidades significativas. Os danos provocados pelos bioativos presentes nos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, sobre as células digestivas de fêmeas ingurgitadas de *R. linnaei*, interferiram na produção de novas células digestivas essenciais no processo de digestão do sangue. Futuras pesquisas podem ser desenvolvidas utilizando-se o mesmo modelo de estudo aqui relatado, mas dessa vez com fêmeas semi-ingurgitadas. Acredita-se que essa fase de vida dos carrapatos poderá mostrar com mais evidencias os efeitos dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona sobre o intestino médio dos carrapatos.

1. INTRODUÇÃO

A incidência de doenças transmitidas por carrapatos e que afetam o homem e os animais vem crescendo, à medida que aumenta a distribuição de carrapatos no globo com consequente disseminação das doenças. No caso da espécie de carrapatos que tem como hospedeiros preferenciais os cães, o aumento da transmissão fica evidente, visto que atualmente cães e gatos são até mesmo considerados como membros das famílias, convivendo no mesmo ambiente com pessoas e facilitando a dinâmica da transmissão de patógenos. Assim, a busca pelo desenvolvimento de métodos e produtos alternativos que tenham potencial para controlar as populações de carrapatos deve se tornar uma prioridade para as agências sanitárias e de saúde pública. Deve-se também considerar que a ampliação do leque de produtos que possam ser usados com segurança em rebanhos, animais selvagens e pets, reduza os impactos dos acaricidas atualmente comercializados (Kunz e Kemp, 1994; De Meneghi et al., 2016; Wanzala, 2017; Laing et al., 2018).

Estudos tem sido registados na literatura mostrando que fármacos comumente utilizados no controle de ectoparasitas tem perdido o seu potencial (driblado pelo sistema imune do carrapato) o que os impede de serem mais efetivos no controle do carrapato (Pfister e Armstrong, 2016; Klafke et al., 2017; Vilela et al., 2020), sinalizando a necessidade de, além de se ter que buscar novas bases sintéticas, também e principalmente focar na busca por métodos integrados de controle e de prevenção, reduzindo assim a transmissão de patógenos e os impactos sanitários, ecológicos e econômicos. Ressalte-se que compostos de origem botânica ou ainda oriundos de outros animais (secreções por exemplo), vem sendo investigados como novos biopesticidas, os quais sejam ainda eficientes, e que causem menos danos aos organismos não alvos (Ellse e Wall, 2014; Ntalli et al., 2019).

O carrapato do cão *R. linnaei* distribuído por todo mundo tem capacidade de infestação intensa no cão e em tempo reduzido, ampliando a possibilidade de veiculação de agentes infecciosos não só para o cão, mas também para o próprio homem. Atualmente o controle desses carrapatos vem sendo realizado com a aplicação de compostos carrapaticidas de bases sintéticas, mas à semelhança do que ocorre com outras espécies de importância econômica a resistência do *R. linnaei* a esses princípios ativos vêm sendo observadas (Coles e Dryden, 2004; Becker et al., 2019).

A habilidade dos patógenos de sobreviver no lúmen intestinal dos ectoparasitas, penetrar e se multiplicar no epitélio intestinal, antes de alcançar a hemocele (cavidade corporal) e invadir outros órgãos (glândulas salivares e ovários) já foi relatada (de la Fuente et al., 2007). Sendo assim, o intestino dos carrapatos tem de dispor de um arsenal de

mecanismos de defesa inata que seja eficiente e capaz de controlar o desenvolvimento e a multiplicação de tais agentes patogênicos (Taylor, 2006; Sonenshine e Hynes, 2008), porém ainda, preservando a microbiota intestinal, (Ha et al., 2009).

O estudo e a identificação de novas moléculas obtidas de produtos naturais vem crescendo com a necessidade de se combater ectoparasitas. Conhecer o mecanismo de ação desses bioativos nos níveis celular, subcelular e metabólico justificam-se pela possibilidade de se evitar e/ou minimizar o uso de produtos químicos sintéticos, evitando a resistência aos acaricidas e minimizando a liberação de resíduos tóxicos tanto nos produtos de origem animal que são comercializados, como no próprio ambiente.

Diante destas informações a presente proposta terá como objetivo avaliar os efeitos dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona e do ozônio, ambos sabidos ter potencial de regular a atividade de detoxificação a xenobióticos em carrapatos *R. linnaei*, rastreando quais são as principais vias metabólicas, bem como identificando se a exposição do ectoparásita a esses biocompostos, causará alterações histofisiológicas no intestino destes ectoparasitas, o que em caso positivo será uma informação valiosa na busca de novas estratégias de controle.

1.1 O intestino de carrapatos como alvo nas pesquisas de novos bioativos para o controle.

O sistema digestório dos carrapatos está dividido em intestino anterior, médio e posterior (Sonenshine, 2014), sendo que o médio é de origem endodérmica e, em carrapatos alimentados ocupa a maior parte da cavidade corporal cobrindo dorsalmente os órgãos internos (Balashov, 1972). Histologicamente, e segundo Caperucci et al. (2010), a parede dessa região está constituída por um epitélio pseudoestratificado, que apresenta dois tipos de células: a) digestivas e b) indiferenciadas ou generativas, as quais possuem no seu citoplasma gotículas lipídicas, estabelecendo entre o meio interno e do carrapato e o sangue ingerido do hospedeiro, uma barreira física além da interface hospedeiro-carrapato-patógeno, uma vez que há a expressão de importantes proteínas que atuam nos processos vitais deste artrópode e contribuem na adesão de bactérias como *Anaplasma* spp às glândulas salivares, facilitando assim a invasão de patógenos via ingestão do sangue (Oleaga et al., 2015).

A presença de diferentes tipos celulares compondo o epitélio de revestimento interno do intestino médio dos carrapatos, implica também no desempenho de diferentes funções dos mesmos, visto que as células digestivas atuarão no processo de absorção dos nutrientes, excreção e formação de resíduos digestivos, e as generativas (indiferenciadas) darão origem, quando requisitadas para se dividir, às células digestivas (Caperucci et al., 2010). Outros autores estudando ainda o intestino médio de carrapatos, postularam a existência não só de

dois, mas de seis tipos de células, a saber: digestiva, regenerativa, secretória, endócrina, indiferenciada e vitelogênica (Grandjean e Aeschlimann, 1973; Coons et al., 1986; Sonenshine e Roe, 2014).

Estudos anteriores demonstraram que em carrapatos em jejum as células do epitélio de revestimento do intestino apresentariam poucas organelas, enfatizando que o citoplasma destas seria ocupado por grânulos de glicogênio, gotículas lipídicas e corpos residuais devido ao sangue remanescente da alimentação no estágio de ninfa (Tarnowski e Coons, 1989).

Especificamente no citoplasma das células digestivas dos carrapatos podem ser observados grânulos com conteúdos variados, ou seja, desde gotículas lipídicas, até grânulos contendo carboidratos e proteínas, ou separadamente ou formando complexos glicoproteicos (Sonenshine e Roe, 2014). Os subprodutos resultantes do metabolismo desses elementos, darão origem as moléculas que serão utilizadas para suprirem a demanda energética dos ectoparasitas, mantendo ativas as vias consideradas vitais ao organismo (Moraes et al., 2012), o que nessa direção faz-se interessante a identificação das diversas enzimas que podem estar envolvidas na glicólise em resposta à necessidade energética durante os períodos de não alimentação ou jejum do carrapato.

O intestino dos carrapatos é também um local propício para o desenvolvimento e a propagação de diversos agentes causadores de doenças os quais potencialmente poderão ser transmitidos para o hospedeiro durante o repasto sanguíneo (Parizi et al., 2007). Segundo Narasimhan e Fikrig (2015), alguns patógenos colonizam o intestino do carrapato ainda quando este se encontra no estágio larval, durante a alimentação em um hospedeiro infectado. Um exemplo é a *Enterobacter* spp., além de outros que podem sair do intestino e ir infectar outros órgãos como as glândulas salivares como é o caso de *Anaplasma phagocytophilum* e de *Borrelia hermsii*, os quais podem permanecer nestes órgãos durante as fases posteriores dos estágios de vida do carrapato (transmissão transestadial). Especificamente as bactérias do gênero *Rickettsia* spp. são encontradas, além de no intestino, nos túbulos de Malpighi, ovários e glândulas salivares e nos ovos do ectoparasita. Estas bactérias também podem ser transmitidas via transovariana, garantindo a sua continuidade nas próximas gerações dos carrapatos (Sonenshine e Roe, 2014).

Outros estudos, fazendo uso de ferramentas molecular/bioquímica e tendo como foco os intestinos dos carrapatos já demonstraram que as células desse órgão, apresentam um “antígeno oculto”, a saber a proteína de intestino (Bm86), descoberta em *R. microplus*, e que impulsionou o desenvolvimento de vacinas contra esse ectoparasita (Leal et al., 2003). A proteína Bm86 agiu induzindo a resposta imunológica em bovinos o que posteriormente levou

as mesmas a servirem de base para produção das duas vacinas já disponíveis no mercado veterinário (de la Fuente et al., 1999) que, apesar da sua utilização ainda não garantem 100% da proteção necessária para suprimir o uso de carrapaticidas (Willadsen et al., 1996; Jonsson et al., 2000).

Outras moléculas como a BmTIs, têm sido utilizadas como inibidoras de serinoproteases em larvas de *R. microplus* (Sasaki et al., 2004; Tanaka et al., 1999), com função de inibir a tripsina, elastase de neutrófilos, plasmina e kallikreína plasmática. Estudos demonstraram redução de 67,9% no número total de carrapatos, 71,3% no peso total de ovos e 69,5% no peso de fêmeas ingurgitadas, provenientes de bovinos imunizados com a BmTIs (Andreotti et al., 2002).

1.2 Óleo de mamona e seus derivados, como potenciais no controle de carrapatos

Ricinus communis é uma planta que cresce nos trópicos e nas regiões de temperatura quente (Burrascano, 2000). No Brasil, é conhecida como mamoneira, rícino, carrapateira, bafureira, baga e palma-criste. Na Inglaterra e nos EUA é denominada como "castor bean" e "castor seed". Suas sementes fornecem até 50% de óleo frequentemente apresentado em soluções: emoliente, veículo oleaginoso e/ou solvente e atóxico quando utilizado como excipiente. Sua composição inclui o éster derivado do ácido ricinoleico (87%), do ácido oleico (7%), do ácido linoleico (3%), do ácido palmítico (2%) e do ácido esteárico (1%) (Rowe et al., 2009; Omohu e Omale, 2017).

Especificamente a molécula da ricina é formada por duas subunidades: a cadeia A, citotóxica e a cadeia B, receptor-ligação (lectina), ambas unidas por uma ligação covalente de dissulfeto (-S-S-) (Jackson et al., 2006; Ostin et al., 2007) apresentando efeito tóxico devido a habilidade da ricina de inativar os ribossomos eucarióticos específica e irreversivelmente, promovendo a morte das células pela inibição da síntese de polifenilalaninas. Embora nenhum efeito tóxico seja conhecido quando se considera as cadeias isoladamente, sabe-se que quando ligadas formam uma das citotoxinas mais potentes conhecidas na natureza (Mackinnon e Alderton, 2000; Lindsey et al., 2005; Lubelli et al., 2006).

As propriedades do óleo de mamona incluem o efeito medicinal e, mais recentemente o acaricida/carrapaticida (Zahir et al., 2009; 2010; Arnosti et al., 2011a; Sampieri et al., 2012; 2013; Ghosh et al., 2013; Islam et al., 2018; Aniley e Atenafu, 2020). Sob o aspecto carrapaticida, a alta toxicidade dos extratos de *R. communis* contra carrapatos deveu-se à presença de ricina (Kodio et al., 2011), um dos compostos naturais mais venenosos (El

Nikhely et al., 2007).

Ainda sob a perspectiva deste bioativo ter ação carrapaticida, estudos morfológicos desenvolvidos, por pesquisadores da BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) sediada na Unesp de Rio Claro, SP, demonstraram a ocorrência de alterações morfofisiológicas nos ovários de carrapatos *R. linnaei*, quando os seus hospedeiros se alimentaram com ração enriquecida com os ésteres, sinalizando a capacidade destes bioativos em alterar a estrutura e a fisiologia dos ovócitos, o que impediria a reprodução destes ectoparasitas por meio da inibição da produção de novas gerações (Arnosti et al., 2011a; Sampieri et al., 2012; 2013). Outros estudos mostraram que os ésteres, atuam na hidrólise de sacarídeos e na dissolução de substâncias de natureza lipídica nos diferentes sistemas biológicos (Oliveira, 2005; Arnosti et al., 2011b; Camargo-Mathias et al., 2016).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar como a exposição de carrapatos do cão *Rhipicephalus linnaei* aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona, potencial acaricida natural, e como atuaria sobre os parâmetros bioquímico/enzimático e toxicológico destes ectoparasitas sob a perspectiva de se buscar informações que possam ser importantes na busca por alternativas “mais limpas” para o controle dos mesmos.

Objetivos específicos

1- Avaliar o efeito pós exposição de fêmeas adultas ingurgitadas aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona sobre:

a) a atividade das fosfatase alcalina, fosfatase ácida, serinoproteases, enzimas envolvidas na desintoxicação metabólica de acaricidas, resistência aos acaricidas, no transporte e na digestão do material alimentar absorvido pelo lúmen intestinal, além de terem sido alvos para o desenvolvimento de vacinas contra carrapatos.

b) o conteúdo de proteína total/quitina da cutícula, visto que a quitina atua como barreira física na permeabilidade dos produtos acaricidas e isso serviria para saber o poder de penetração dos compostos aqui propostos.

2- Avaliar o efeito pós exposição de fêmeas adultas ingurgitadas aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona na histofisiologia do intestino médio destas mesmas fêmeas, detectando alterações nos processos celulares e subcelulares consequentes da ação dos produtos.

3- Avaliar o efeito pós exposição de larvas de *R. linnaei* aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona, sobre a atividade das esterases, monoxigenases e glutathione S-transferase, enzimas envolvidas na desintoxicação metabólica de acaricidas, na resistência aos acaricidas e em várias atividades biológica/fisiológica importantes, como o comportamento reprodutivo e o funcionamento do sistema nervoso.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Compostos e reagentes químicos

Os reagentes químicos necessários para o desenvolvimento desta proposta, foram obtidos da Sigma-Aldrich e/ou da União Química Farmacêutica Nacional, Embu- Guaçu, com recursos da reserva técnica, contemplada pela concessão da bolsa. Ressalte-se que os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gilberto Chierice (*in memoriam*) e se encontram em poder do BCSTM.

3.2 Isolados de *Rhipicephalus sanguineus* (atualmente, *Rhipicephalus linnaei*)

Os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil) sob Decisão CEUA Nº 05/2023

Para o desenvolvimento da presente proposta foram utilizadas fêmeas ingurgitadas de *R. linnaei*, as quais foram alimentadas por meio de infestações artificiais em coelhas da linhagem do Grupo Genético Botucatu, pesando cada uma entre 3 a 3,5 Kg. As infestações ocorreram em sala alocada no Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, São Paulo, Brasil onde também está em atividade a Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM).

3.3 Ensaio com fêmeas adultas

As avaliações *in vitro* foram realizadas através do Teste de Imersão de Adultos (TIA) seguindo a técnica do biocarrapaticidograma, segundo Drummond et al. (1973) que utiliza grupos de 10 teleógenas, homogêneas em peso, por tratamento/concentração. Os testes foram realizados em triplicata contando com controles negativo (água destilada) e positivo (carrapaticida comercial- Revolution®)

3.3.1 TIA com os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona

As fêmeas ingurgitadas foram colhidas manualmente de coelhas hospedeiras, com auxílio de pinças, por meio de movimentos de rotação até seu total desprendimento, o que permitiu preservar a integridade do aparelho bucal do ectoparasita. Na sequência foram

higienizadas com água destilada, enxutas com papel absorvente e selecionadas usando como base similaridade em tamanho, peso, mobilidade, coxas completas e ausência de tegumento proveniente do hospedeiro no aparelho bucal.

Os bioensaios foram realizados em triplicatas, segundo a alocação das fêmeas ingurgitadas nos grupos Controles (C1-C3) e Tratamentos (T1-T10), respectivamente, segundo descrição abaixo:

C1: controle, expostas somente a água destilada

C2: controle, expostas somente ao Tween 80 a 2%

C3: controle, expostas somente ao Revolution® na concentração de 0,512 mg/mL.

T1-T10: tratamento, expostas aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona nas concentrações de 0,195 a 100 mg/mL

A imersão dos carrapatos (10 indivíduos/grupo durante 5 minutos) foi realizada em recipientes de vidro preenchidos com 3 mL de cada composto a ser testado, segundo protocolo proposto por Drummond et al. (1973). Em seguida, o excesso do composto foi retirado em papel absorvente e os grupos foram acondicionados em placas de Petri devidamente identificadas para serem mantidos em estufa BOD sob condições controladas ($28 \pm 3^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas) por 15 dias para oviposição. Finalizada a postura foi realizada a mensuração do peso dos ovos, os quais foram realocados para seringas plásticas de 5 mL, que tiveram sua abertura vedada com algodão hidrófilo e que foram novamente colocadas em estufa nas mesmas condições anteriormente descritas por um período de 15 dias.

3.4 Impacto das formulações nas enzimas intestinais das fêmeas ingurgitadas tratadas

Três enzimas digestivas, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, e serina proteases foram relatadas estar presentes em células do intestino médio de carrapato (Agyei et al., 1992; Gough e Kemp, 1995; Reyes et al., 2020). Na presente proposta essas enzimas foram quantificadas nas fêmeas adultas expostas aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona, seguindo o protocolo proposto por Muharsini et al. (2000).

Após 24 h de exposição aos compostos, as fêmeas foram dissecadas, para retirada do intestino médio e de fragmentos do integumento (cutícula), que foram identificados e devidamente armazenados a -20°C para posteriores análises das diferentes enzimas. A fim de se padronizar o volume de amostra necessário para os testes, placas de microtitulação de 96 poços foram incubadas no escuro, e preenchidas com 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 e 1 mL de fosfatase alcalina, fosfatase ácida e serina proteases, respectivamente, utilizando uma placa para cada

enzima.

3.4.1 Atividade da fosfatase alcalina

Solução substrato de trabalho de p-Nitrofenilfosfato 7,6 mM e tampão de glicina (pH 10,5) contendo 9,5 mg de cloreto de magnésio (MgCl₂) foram preparados em água destilada e hidróxido de sódio (NaOH) 1 N, respectivamente, para armazenamento a 4°C. A solução substrato de trabalho foi preparada a fresco misturando-se volumes iguais do p-Nitrofenilfosfato e da solução tampão. Uma amostra (100 mg) de intestino médio foi triturada em tampão de glicina (pH 10,5), centrifugada a 1.100 xg por 5 min, e coletado o sobrenadante. Três microtubos (um teste, um branco de teste e um branco de reagente) contendo substrato (76 mg de p- Nitrofenilfosfato), exceto o tubo em branco de teste, foram pré-incubados por 5 min a 37°C. Os 0,2 mL de sobrenadante foram adicionados aos tubos, exceto no tubo do reagente em branco. Em seguida, 0,2 mL de água destilada foram adicionados e incubados a 37°C por 30min e então 1mL de NaOH 0,1 N foi adicionado a todos os tubos. A densidade ótica (DO) foi lida a 405 nm contra o branco e a atividade da enzima determinada como:

$$\begin{aligned} \text{Atividade de fosfatase alcalina (IU)} &= \{[A(T) - A(TB) - A(RB)]/Exb\} \times 10^6 \times \\ & (TV/EV) \times (1/t) = \{[A(T) - A(TB) - A(RB)]/18530\} \times 10^6 \times (2.5/0.02) \times (1/30) = \\ & A(T) - A(TB) - A(RB) \times 20.25 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{L} \end{aligned}$$

Onde: A(T) - Absorbância da amostra de teste; A(TB) - absorbância do branco de teste;

A(RB) - absorbância do branco do reagente; 10⁶- convertendo moles em μmol; TV - volume de teste; EV - volume da amostra; t - tempo de incubação; Exb - valor do coeficiente.

3.4.2 Atividade da fosfatase ácida

Solução de p-Nitrofenilfosfato 0,02 M e tampão de citrato (pH 5,0) foram preparados em água destilada e armazenados a 4°C. A solução de substrato de trabalho foi preparada misturando-se volumes iguais de p-Nitrofenilfosfato e de tampão antes do uso. Três microtubos contendo substrato (74 mg de p-Nitrofenilfosfato), exceto o branco de teste, foram pré-incubados por 5 min a 37°C. Um volume padronizado de sobrenadante foi adicionado, exceto no tubo de reagente em branco, junto com igual volume de água destilada. As amostras então foram incubadas a 37°C por 30 min e 1 mL de NaOH 0,1 N foi adicionado em todos os tubos. A DO foi estimada a 420 nm contra o branco e a atividade da enzima determinada usando a fórmula:

$$\begin{aligned} \text{Atividade de fosfatase ácida (IU)} &= \{[A(T) - A(TB) - A(RB)]/Exb\} \times 10^6 \times (TV/EV) \times \\ & (1/t) = \{[A(T) - A(TB) - A(RB)]/18530\} \times 10^6 \times (2.5/0.02) \times (1/30) = A(T) - A(TB) - \\ & A(RB) \times 20.25 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{L} \end{aligned}$$

3.4.3 Atividade das serinoproteases

A p-Nitroanilina disponível comercialmente foi usada para a preparação da curva padrão. A solução estoque foi preparada dissolvendo 5 mg de p-Nitroanilina em 5 mL de Tris-cloridrato 100 mM (Tris-HCl) contendo 20 mM de cloreto de cálcio (CaCl_2). Em placa de microtitulação de 96 poços, 100 μL da solução estoque foram utilizados para realizar diluições seriadas, sendo que a concentração final de p-Nitroanilina foi de 1mg/mL. Após a preparação da curva padrão, foi preparado em água destilada o Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 contendo CaCl_2 20 mM e SAPNA 3,5 mM (N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida), tendo sido esta solução, posteriormente armazenada a 4°C.

Fragmentos do intestino médio de fêmeas expostas ao composto aqui descrito, foram mantidos de forma independente para cada concentração do composto avaliado, em solução de Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 contendo CaCl_2 20 mM até as análises da atividade enzimática. Os ensaios foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços adicionando 40 μL de substrato (3,5 mM SAPNA) a 150 μL de tampão (10 μL de amostra para cada poço). As placas foram incubadas (1 h, 37°C) e a absorbância foi medida a 405 nm. A curva padrão de p-Nitroanilina (Sigma) foi usada para determinar a concentração do produto.

3.4.4 Determinação de proteína total e da quitina da cutícula

Para avaliação da ação da exposição aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona sobre a cutícula das fêmeas dos carrapatos, as mesmas, após o TIA, foram determinadas, segundo Bradford (1976), as concentrações de proteína total e a concentração de quitina do homogenato cuticular.

Análise da Concentração de Proteínas: Fragmentos da cutícula foram removidos, lavados com tetraborato de sódio a 1% e rapidamente lavados em água destilada e etanol. A pureza das proteínas foi então verificada segundo protocolo de Bradford (1976). Cerca de 10 mg de cutícula por replica foram mantidos em -80°C, triturados em tampão Tris 5 mM contendo ureia 7M em cadinho com pistilo, sonificados e centrifugados a 10.000 xg por 10 min. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi estimada usando-se uma curva padrão do método BSA (soro albumina bovina).

Análise da Concentração de Quitina

N-acetil-D-glucosamina disponível comercialmente foi usado para a preparação da curva padrão. A solução estoque foi preparada dissolvendo-se 20 mg de N-acetil-D-glucosamina em 10 mL de água destilada, e em seguida foram preparadas diluições seriadas com água destilada, e a concentração final ajustada para 2 mg/mL. O homogenato cuticular

foi centrifugado (1.500 xg, 5 min, 2°C), o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 4 mL de lauril sulfato de sódio (SDS 3% p/v) e aquecido (100°C, 15 min). Após resfriamento, foi realizada mais uma etapa de centrifugação e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi então lavado uma vez com água destilada, ressuspenso em 3 mL de hidróxido de potássio (KOH) (120 g em 100 mL de água) e aquecido (130°C, 1 h). Após o resfriamento, 8 mL de etanol gelado (75% v/v) foram adicionados e as amostras foram agitadas até que o KOH e o etanol formassem apenas uma fase.

Os tubos foram mantidos em água gelada por 15 min e 0,3 mL de suspensão de Celite (1 g de Celite 545 foi misturado com etanol 75% para coletar o sobrenadante após 2 min). Depois foram centrifugados (1.500 xg, 5 min, 2°C) e o sedimento lavado uma vez com etanol gelado (40% v/v) e duas vezes com água gelada. O sedimento contendo quitosana insolúvel foi armazenado a 4°C para o bioensaio subsequente. Água destilada foi adicionada ao pellet de quitosana até a marca de 0,5 mL nos tubos das amostras. Uma vez que a quitosana é avaliada em relação a uma quantidade conhecida de glucosamina, os padrões contêm 0,2 mL de água ou 0,2 mL de glucosamina (10 µg/mL) foram ajustados.

Foram adicionados em cada uma das amostras, 0,5 mL de nitrito de sódio (NaNO₂ 5% p/v) e 0,5 mL de bissulfato de potássio (KHSO₄ 5% p/v); finalmente 0,2 mL de cada solução foram adicionados aos padrões. Todos os tubos foram suavemente misturados três vezes e depois centrifugados (1.500 xg, 2 min, 2°C).

Um volume de 0,6 mL de sobrenadante dos tubos de amostra foram retirados em dois tubos e juntamente com os padrões foram trazidos à temperatura ambiente. Foram adicionados em todos os tubos 0,2 mL de sulfamato de amônio (12,5% p/v) e estes foram misturados vigorosamente por 5 min. Em seguida, 0,2 mL de uma solução de MBTH (50 mg de 3-metil-benzo-2-tiazolona hidrazona HCl monoidratado em 10 mL de água) preparado a fresco foi adicionado e os tubos então foram aquecidos (100°C, 3 min).

Após o resfriamento, 0,2 mL de hexaidrato de cloreto férrico (FeCl₃·6H₂O 0,83% p/v) foi adicionado e a densidade óptica (650 nm) medida após 25 min em um espectrofotômetro. O conteúdo de quitina foi expresso como um equivalente de glucosamina.

A cutícula não tratada que deu uma leve reação de cor foi utilizada como branco. O conteúdo de quitina da cutícula (X) foi determinado pela equação: $X = 5(A - B) + (G - W)$ µg de glucosamina, onde a densidade óptica (650 nm) para a amostra de teste é A, o controle não tratado é B, o padrão de glucosamina é G e o padrão de água é W.

3.4.5 Análise morfológica do intestino medio

Após 24 h da exposição das fêmeas (5/grupo) às diferentes concentrações dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, estas foram coletadas. Na sequência foram anestesiadas por choque térmico (em freezer a 2°C por 1 minuto para diminuição do metabolismo sem causar a morte) para retirada dos intestinos, os quais foram fragmentados e fixados em paraformaldeído a 4% por 72 horas.

Depois foram transferidos para solução tampão fosfato de sódio (pH 7,2) por 24 horas para posterior desidratação em série crescente de álcool etílico (70, 80, 90 e 95%) a intervalos de 20 minutos. A infiltração foi realizada em resina Leica (Leica Historesin Embedding Kit) e após o material foi colocado em moldes plásticos para serem mantidos a 4°C, retardando assim a polimerização da resina e permitindo que a mesma penetrasse no material, o qual foi seccionado com 3 µm de espessura em micrótomo Leica RM 2255. Após as secções foram recolhidas em lâminas de vidro que foram secas à temperatura ambiente. A seguir, procedeu-se à aplicação das técnicas histológica e histoquímicas.

3.4.5.1 Coloração pela hematoxilina de Harris-eosina aquosa

As secções recolhidas em lâminas de vidro foram reidratadas por 1 minuto em água destilada e coradas pela hematoxilina de Harris, durante oito minutos. Depois de lavadas por três minutos em água corrente, as mesmas foram coradas pela eosina aquosa por cinco minutos e novamente lavadas em água corrente (Junqueira e Junqueira, 1983). Após secagem em suportes de madeira à temperatura ambiente, foram mergulhadas em xilol e cobertas com Entellan (meio para montagem de lâminas permanentes) entre lamínula para posterior observação microscópica.

3.4.6 Histoquímica

3.4.6.1 Técnica do Azul de Bromofenol

Para a detecção de proteínas totais, as secções recolhidas em lâminas de vidro foram coradas pela solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente durante 2 horas (Pearse, 1985). Em seguida foram banhadas em solução aquosa de ácido acético 0.5%, durante 5 minutos. Logo após, foram passadas no álcool butílico terciário por 5 minutos. Em seguida, foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em Entellan e lamínula para posterior observação microscópica.

3.4.6.2 Técnica do PAS ácido periódico-Schiff

As secções recolhidas em lâminas de vidro foram reidratadas por 1 minuto em água

destilada e transferidas para solução de ácido periódico 4%, por 10 minutos. Após, foram lavadas em água destilada, por 1 minuto e imersas por 1 hora no reagente de Schiff (Junqueira e Junqueira, 1983). Foram lavadas por 30 minutos em água corrente, secas à temperatura ambiente, diafanizadas em xilol e montadas em Entellan e lâmina para posterior observação microscópica.

Após a aplicação das técnicas histológica e histoquímicas, as lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro, São Paulo.

3.5 Bioensaios com larvas

Com o objetivo de se verificar a atividade residual do bioativo aqui descrito, ovos com 10 dias pós postura foram separados das fêmeas ingurgitadas que sobreviveram a exposição aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona.

Outro lote de ovos com 10 dias pós postura, foi separado e não exposto ao bioativo aqui testado. Cada lote de ovos independentemente, foi pesado em alíquotas de 10 mg (~200 ovos) e acondicionado em seringas de 3 mL vedadas na sua abertura com algodão hidrófilo, e incubado a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ até a eclosão das larvas. As seringas que não apresentaram eclosão superior a 95% foram descartadas.

As avaliações *in vitro* foram realizadas através do Teste de Imersão de Larvas (TIL) seguindo protocolo de Sindhu et al. (2012) com modificações. Foram utilizados grupos homogêneos em peso por tratamento/concentração. Grupos: controle negativo, controle de solvente e controle positivo (carrapaticida comercial) também fizeram parte do experimento.

3.5.1 TIL com os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona

Os bioensaios foram realizados em triplicata segundo a alocação das seringas (contendo as larvas) nos grupos controle (C1-C3) e Tratamento (T1-T12), respectivamente, segundo descrição abaixo:

C1: controle, expostas somente a água destilada

C2: controle, expostas somente ao Tween 80 0,5%

C3: controle, expostas somente ao Revolution® na concentração de 0,512 mg/mL.

T1-T12: tratamento, expostas aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona nas concentrações de 0,003 a 6,24 mg/mL

A imersão das larvas (200 indivíduos/seringa/grupo durante 1 minuto em agitação) foi realizada nas próprias seringas que foram preenchidas com 2 mL de cada concentração dos

ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona de forma independente. Em seguida, foi retirado o excesso do bioativo, empurrando-se o êmbolo da seringa até a gaze. Papel filtro foi colocado na gaze para remover completamente as soluções teste e o êmbolo foi puxado de volta para a marca de 2 mL.

Todas as seringas dos respectivos grupos (tratamento e controle), ficaram em capela por 1 hora, com a extremidade cortada para cima. Após todas as seringas foram colocadas em câmara BOD a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ por 24, 48 e 6 dias. As seringas foram retiradas e abertas no final de cada período de incubação, respetivamente, e quantificadas as larvas vivas e mortas. As que conseguiram andar foram classificadas como vivas e as que não conseguiram ou apenas exibiram pequenos movimentos nas pernas sem mudar de posição foram consideradas mortas.

3.6 Atividade das esterases

Larvas com 12 dias de idade e armazenadas em freezer -80°C foram homogeneizadas separadamente em 150 μL de água destilada em cadinho com pistilo e centrifugadas a 1.100 xg a 4°C durante 15 min. O sobrenadante foi coletado para a estimativa comparada das atividades da esterase. O experimento foi realizado em triplicata utilizando-se 40 larvas/grupo.

As soluções de trabalho de α e β -acetato de naftilo foram preparadas pela adição de 100 μL de solução estoque α ou β -acetato de naftilo 30mM (armazenada a 4°C) em 9,9 mL de tampão de fosfato 0,02 M, pH 7,2 enquanto a solução de coloração azul rápido foi feita pela adição de 15 mg de azul rápido em 1,5 mL de água destilada e 3,5 mL de SDS a 5% em tampão de fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2). As misturas de reação compreendendo 20 μL de homogenato de larva e 150 μL de solução de trabalho α ou β -acetato de naftilo foram adicionadas em placa de microtitulação de 96 poços e foram mantidas em temperatura ambiente por 15 min. A seguir, 50 μL de solução de azul rápido foram adicionados a cada poço e novamente incubados por 5 min. O controle incluiu 20 μL de água destilada no lugar do homogenato de larvas. A intensidade do desenvolvimento da cor foi medida a 570 nm em leitor de ELISA.

A quantidade de naftol foi derivada da curva padrão obtida e com base naquela já descrita e disponível na literatura (Hemingway e Brogdon, 1998). Para determinar a concentração de proteína total de cada amostra foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). Para a preparação da curva padrão de proteína, foi utilizada albumina sérica bovino padrão (2 mg/mL; Sigma Aldrich). A absorbância foi medida a 595 nm e consequentemente

a concentração média de proteína foi determinada.

A quantidade de naftol produzida por minuto foi dividida pelo tempo (em minutos) em que o substrato e o homogenato foram incubados antes da adição do corante. Os valores obtidos foram novamente divididos pelo valor da proteína. Atividades de esterase foram relatadas como μ moles de produto formado/min/mg de proteína (Habig et al., 1974).

3.6.1 Atividade das monoxigenases

Três réplicas, cada uma contendo 80 das larvas armazenadas em -80°C foram homogeneizadas separadamente com 150 μL de água destilada em cadinho com pistilo e centrifugadas a 1.100 xg a 4°C durante 15 min. Em placa de microtitulação de 96 poços, 20 μL do sobrenadante larval foi adicionado em poços duplicados adjacentes com 80 μL de tampão fosfato de potássio 0,625M (pH 7,2), 200 μL de solução 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMBZ) e 25 μL de peróxido de hidrogênio a 3%. A absorbância foi medida no ponto final de 650 nm após incubação por 5 min no escuro. Nos poços brancos de controle, 20 μL de tampão de homogeneização foram adicionados no lugar do sobrenadante larval. As densidades ópticas médias resultantes (DO) foram analisadas usando a curva padrão de citocromo C purificada para o teor de proteína total do sobrenadante. Os valores foram expressos em nanomoles equivalentes ao citocromo P450/mg de proteína.

3.6.2 Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

Segundo protocolo de Habig et al. (1974), modificado (Ghosh et al., 2017), larvas com 20 dias de idade armazenadas em -80°C foram homogeneizadas separadamente com 150 μL de água destilada em cadinho com pistilo e centrifugadas a 1.100 xg a 4°C durante 15 min. A mistura de reação em cada poço da placa de microtitulação de 96 poços consistiu em 10 μL do sobrenadante com 150 μL solução de trabalho em quadruplicado. A solução foi preparada em tampão fosfato (pH 6,5) pela adição de 2,5mL de glutathione reduzida (GSH) 10mM, com 125 μL de cloroditrobenzeno (CDNB) 63 mM. No poço de controle branco, 10 μL de tampão de homogeneização foram adicionados no lugar do sobrenadante larval. A absorbância foi lida a 340 nm após incubação das placas por 20 min no escuro. A atividade GST foi estimada da seguinte forma:

$$\text{GST (mM/mg/min)} = (\text{Densidade ótica} \times 100) / 4.39\text{mM}^{-1} \times 6 \text{ mm} \times \text{total proteína em } 10\mu\text{L homogenato} \times 20 \text{ min.}$$

Para cálculo da atividade específica da GST, utilizou-se o conteúdo de proteína total do homogenato de larvas armazenadas em -80°C , seguindo protocolo de ensaio de Bradford (1976).

4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros biológicos utilizados para avaliar os efeitos dos compostos aqui propostos pelo TIA foram os já estabelecidos por Drummond et al (1973) e Bennett (1974). A percentagem de eficiência no controle e a percentagem de mortalidade foram corrigidas pela fórmula de Abbott, a partir do número de fêmeas vivas na testemunha (T) e no tratamento (Tr): $E\% = ((T - Tr) / T) \times 100$. Para o TIL, o cálculo da eficácia dos produtos foi realizado pela fórmula: $100 \times (\text{Média de larvas mortas} / (\text{Média de larvas vivas} + \text{Média de larvas mortas}))$.

Para os TIL, ainda foi realizada análise ANOVA Two-Way pelo procedimento GLM, considerando no modelo os efeitos de origem das larvas (fêmeas não expostas e fêmeas sobreviventes do TIA), concentrações (1 a 7) e a interação origem*concentração. Para comparação múltipla entre as médias dos efeitos da origem das larvas e da interação foi adotada a opção LSMEANS usando o teste de Tukey e o teste F, respectivamente.

O probit de análise de regressão foi aplicado aos dados obtidos dos TIA e TIL, respectivamente para expressar as CL_{50} .

Os dados obtidos do impacto das formulações sobre a atividade das diferentes enzimas, tanto em fêmeas adultas quanto em larvas foram analisados pelo teste de ANOVA One-Way seguido pelo teste post hoc de Dunnett's, para avaliar as diferenças entre as médias aritméticas dos grupos tratados e controle. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa XLSTAT 2021, e o nível de significância para todos os testes foi estabelecido em $p < 0,05$.

5.0 RESULTADOS

5.1 Ensaio com fêmeas ingurgitadas

Na Tabela 1 estão dispostos os resultados médios obtidos pelo teste de imersão de adultos - TIA para as diferentes concentrações dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona e para os controles negativo e positivo.

Tabela 1. Médias de peso das fêmeas ingurgitadas (PF), peso dos ovos (PO), % de eclosão das larvas de *Rhipicephalus linnaei*, Índice de Eficiência Reprodutiva (IER) e Eficácia dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona e do controle positivo pelo Teste de Imersão de Adultos (TIA).

Tratamentos (mg/mL)	PF (g)	PO (g)	% de eclosão	IER	Eficácia (%)
100	2,49 ± 0,2	1,25 ± 0,3	95,00 ± 1,2	98,14 ± 2,0	-
50	2,44 ± 0,1	1,20 ± 0,0	95,00 ± 1,5	98,10 ± 2,0	-
25	2,40 ± 0,0	1,10 ± 0,0	98,00 ± 2,1	98,07 ± 1,1	-
12,5	2,42 ± 0,0	1,13 ± 0,0	98,00 ± 2,1	98,03 ± 1,1	-
6,25	2,38 ± 0,0	1,20 ± 0,1	98,00 ± 2,1	98,00 ± 1,1	-
3,13	2,38 ± 0,0	1,10 ± 0,0	98,00 ± 1,9	98,00 ± 1,1	-
1,56	2,40 ± 0,0	1,00 ± 0,0	98,00 ± 1,5	98,02 ± 1,1	-
0,78	2,36 ± 0,0	1,13 ± 0,0	98,00 ± 1,1	98,21 ± 1,1	-
0,39	2,38 ± 0,0	1,11 ± 0,0	98,00 ± 1,7	98,12 ± 3,1	-
0,195	2,36 ± 0,0	1,13 ± 0,0	97,00 ± 2,2	99,01 ± 1,1	-
H ₂ O (Ctrl Negativo)	2,40 ± 0,0	1,19 ± 0,0	98,00 ± 1,2	98,31 ± 3,1	-
Revolution® [0,512]	2,42 ± 0,0	0,61 ± 0,2	83,00 ± 2,4	2,80 ± 3,3	96,9 ± 4,0

De acordo com a Tabela 1, é possível observar que o controle negativo (água destilada) não causou efeito deletério sobre as fêmeas ingurgitadas, resultando em alto Índice de Eficiência Reprodutiva (IER): 98,31%.

Na maior concentração avaliada (100 mg/mL), e nas subseqüentes concentrações dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, não foi observada eficácia e nem efeito tanto na inibição da postura das fêmeas, como na inibição da eclosão das larvas; enquanto no controle positivo, Revolution® a 0,512 mg/mL, houve eficácia de 96,9% de eficácia sobre as fêmeas ingurgitadas.

De acordo com os resultados obtidos e mostrados na Tabela 1 não foi possível calcular as respectivas concentrações letais, a saber CL₅₀ e CL₉₀. Para os subseqüentes experimentos, diga-se análises morfohistoquímicas, foram utilizadas as fêmeas ingurgitadas expostas ao bioativo nas doses de 25 a 0,195 mg/mL.

5.1.1 Impacto dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona nas enzimas intestinais das fêmeas ingurgitadas

Os níveis de fosfatase alcalina, fosfatase ácida e serino protease, respectivamente, estão apresentados na Tabela 2. De forma comparada entre os grupos tratamento e controles, não foram observadas diferenças significativas entre as mesmas.

Tabela 2. Perfil quantitativo comparativo das enzimas (média $\pm$ error standard) no homogeneizado de tecido intestinal de *R. linnaei* após exposição aos esteres do acido ricinoleico do óleo de mamona.

Enzimas do intestino médio (μ mole/min/L)	Grupos Controles				Grupos Tratamentos					
	H ₂ O		Revolution® [0,512]		25		12,5		6,25	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Fosfatase alcalina	15,22 $\pm$ 0,2	16,10 $\pm$ 0,2	23,00 $\pm$ 0,2	27,27 $\pm$ 0,5	15,77 $\pm$ 0,4	18,22 $\pm$ 0,2	16,16 $\pm$ 0,1	18,00 $\pm$ 0,3	15,41 $\pm$ 0,3	17,08 $\pm$ 0,2
Fosfatase ácida	28,47 $\pm$ 0,3	29,27 $\pm$ 0,1	46,87 $\pm$ 0,1	50,21 $\pm$ 0,9	27,09 $\pm$ 0,9	29,16 $\pm$ 0,7	26,12 $\pm$ 0,2	29,11 $\pm$ 0,2	28,00 $\pm$ 0,1	31,33 $\pm$ 0,3
Serino proteases	0,89 $\pm$ 0,0	0,99 $\pm$ 0,0	1,56 $\pm$ 0,1	2,01 $\pm$ 0,2	0,90 $\pm$ 0,1	1,00 $\pm$ 0,1	0,87 $\pm$ 0,0	0,93 $\pm$ 0,0	0,91 $\pm$ 0,0	0,99 $\pm$ 0,1

Tabela 2. Continuação

Enzimas do intestino médio (μ mole/min/L)	Grupos Tratamentos									
	3,13		1,56		0,78		0,39		0,195	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Fosfatase alcalina	15,12 $\pm$ 0,4	16,80 $\pm$ 0,6	14,97 $\pm$ 0,0	16,11 $\pm$ 0,1	15,00 $\pm$ 0,5	16,96 $\pm$ 0,3	15,11 $\pm$ 0,3	17,22 $\pm$ 0,1	16,23 $\pm$ 0,4	18,88 $\pm$ 0,4
Fosfatase ácida	29,12 $\pm$ 0,3	32,44 $\pm$ 0,3	29,56 $\pm$ 0,2	29,88 $\pm$ 0,1	30,98 $\pm$ 0,1	33,47 $\pm$ 0,2	36,40 $\pm$ 0,2	37,12 $\pm$ 0,3	37,47 $\pm$ 0,3	39,27 $\pm$ 0,1
Serino proteases	0,93 $\pm$ 0,0	1,01 $\pm$ 0,2	0,89 $\pm$ 0,1	0,97 $\pm$ 0,0	0,88 $\pm$ 0,0	0,99 $\pm$ 0,0	0,96 $\pm$ 0,3	1,00 $\pm$ 0,5	0,98 $\pm$ 0,1	1,06 $\pm$ 0,1

Com relação às enzimas fosfatase alcalina e ácida, o presente estudo mostrou que os índices de atividade de ambas as enzimas nos grupos controle (água), e tratamentos (0,195 a 25,0 mg/mL) foram estatisticamente semelhantes para um mesmo período de avaliação (24 ou 48 h após exposição), porém, todos os anteriores diferiram estatisticamente do grupo controle positivo (Revolution® a 0,512 mg/mL), onde foi observado o maior índice de atividade enzimática de 23,00 a 27,27 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{L}$ e 46,87 a 50,21 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{L}$ após 24 e 48 h, respectivamente, das fêmeas ingurgitadas terem sido expostas aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona.

A análise da serino protease em todos grupos tratamentos e controle negativo foram estatisticamente semelhantes, quando comparados os resultados no mesmo período de exposição aos bioativos. Porém, todos eles diferentes estatisticamente do grupo controle positivo (Revolution®); onde os maiores índices de atividade (1,56 a 2,01 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{L}$) foram detectados.

5.1.2 Efeito dos ésteres do ácido ricinoleico sobre a produção de proteína total e da quitina da cutícula das fêmeas ingurgitadas

Na Tabela 3 são apresentados os resultados de proteína total bem como a quantificação do conteúdo de quitina. As concentrações de proteínas dos extratos obtidos a partir do intestino de carrapatos dos diferentes grupos aqui analisados foram detectadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando-se a albumina de soro fetal bovino como padrão.

Tabela 3. Perfil quantitativo do conteúdo de quitina e de proteína cuticular total de fêmeas ingurgitadas de *R. linnaei* expostas aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona

Tratamentos (mg/mL)	Conteúdo de quitina (mg de glucosamina/mL)	Proteína total (mg/mL)
100	0,89 $\pm$ 0,0	2,96 $\pm$ 0,0
50	0,90 $\pm$ 0,0	2,92 $\pm$ 0,2
25	0,89 $\pm$ 0,0	2,98 $\pm$ 0,0
12,5	0,89 $\pm$ 0,0	2,98 $\pm$ 0,0
6,25	0,88 $\pm$ 0,0	2,97 $\pm$ 0,0
3,13	0,88 $\pm$ 0,0	2,99 $\pm$ 0,0
1,56	0,89 $\pm$ 0,0	2,98 $\pm$ 0,0
0,78	0,87 $\pm$ 0,0	2,98 $\pm$ 0,0

0,39	0,89 ± 0,0	2,98 ± 0,0
0,195	0,88 ± 0,0	2,99 ± 0,1
H₂O (Ctrl Negativo)	0,91 ± 0,0	3,02 ± 0,1
Revolution® [0,512]	0,68 ± 0,1	2,12 ± 0,1

Os resultados do conteúdo de quitina foram os seguintes: Controle (água destilada) = 0,91 mg de glucosamina/mL; Tratamento (0,195 a 100 mg/mL) = 0,88 a 0,89 ± 1 mg de glucosamina/mL; Controle Positivo (Revolution®) = 0,68 mg de glucosamina/mL, resultados que foram estatisticamente semelhantes, porém, os grupos tratamentos e controle, respectivamente, diferiram estatisticamente do controle positivo.

O comportamento do conteúdo de proteína total do integumento das fêmeas ingurgitadas, expostas aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, foi o mesmo da quantificação de quitina. Os grupos tratamento e controle negativo, foram estatisticamente semelhantes, porém, diferiram estatisticamente do grupo controle positivo.

5.1.3 Análises morfológico e histoquímico das fêmeas ingurgitadas expostas aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona

O tubo digestório das fêmeas de *Rhipicephalus linnaei* é composto por três regiões distintas: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Neste estudo, o intestino médio das fêmeas ingurgitadas foi analisado através de técnicas histológicas (coloração pela hematoxilina e eosina) e histoquímicos (reação pelo ácido periódico de Schiff para marcação de polissacarídeos neutros - PAS e técnica de marcação das proteínas totais pelo azul de bromofenol).

5.1.3.1 Análise histológica

Grupo controle

Os resultados histológicos revelaram que o intestino médio de fêmeas ingurgitadas está revestido por um epitélio estratificado, com células que variam de cúbicas a cilíndricas; possuindo núcleos redondos ou ovais em diferentes posições (Figura 1A). Estas últimas estão posicionadas próximas ao lúmen e exibem núcleos esféricos a ovais com heterocromatina condensada. As células das camadas basais (indiferenciadas) possuem citoplasma intensamente corado pela hematoxilina e alguns vacúolos fracamente corados. As células das camadas mais próximas do lúmen apresentam citoplasma altamente vacuolizado e fracamente corado com os corantes testados. Na região apical das células da camada mais próxima do lúmen, provavelmente células digestivas, observam-se mais vacúolos. Algumas células parecem estar

ainda liberando vesículas em direção ao lúmen, de forma arredondada e com vários tamanhos. Além disso, algumas destas últimas estão fortemente coradas, sugerindo conterem restos celulares

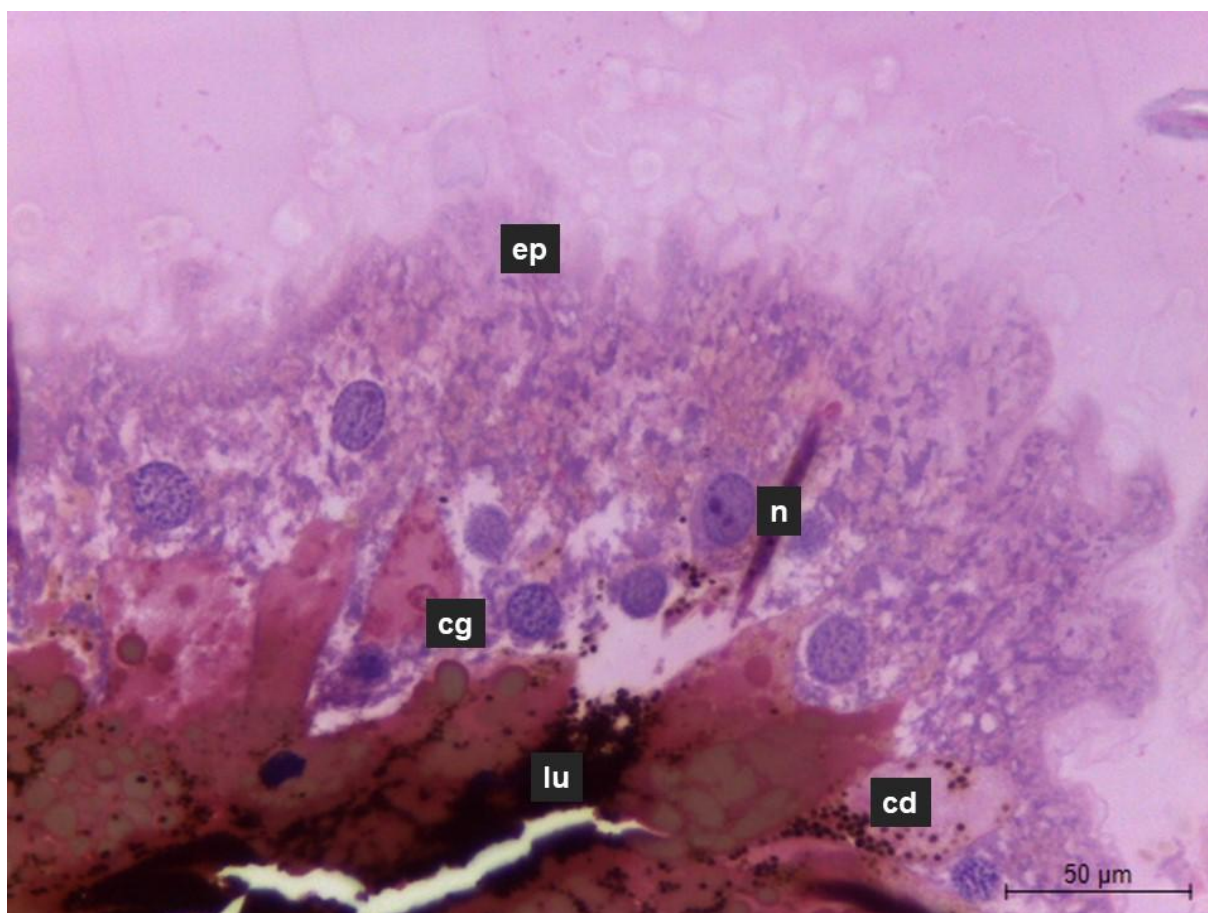


Figura 1. Secção histológica do intestino médio de fêmeas ingurgitadas *R. linnaei*, do grupo controle negativo. Detalhe do epitélio estratificado (ep), núcleo (n), células germinativas (cg), células digestivas (cd) e lúmen (lu). Barra: 50 μm.

Grupos tratamento

Nestes grupos (doses de 0,78 a 12,5 mg/mL) o epitélio intestinal estratificado passa a sofrer desorganização, antes não observada nos indivíduos do grupo controle (Fig. 2 A-E). Nota-se também que o epitélio do grupo exposto à dose de 25,0 mg/mL (Fig. 2 F), apresenta as células com as mesmas características observada no grupo controle.

As células generativas, na maioria cúbicas, apresentaram vacuolização citoplasmática e núcleos variando de menos condensados a picnóticos (Fig. 2 B). Mais intensa desorganização foi observada no intestino das fêmeas expostas a 0,79 mg/mL (Fig. 2 A) do bioativo, onde o epitélio intestinal apresentou-se simples, com a membrana basal que sustenta o epitélio destacando-se do mesmo deixando um grande espaço vazio. Os limites celulares já

não estavam tão evidentes, principalmente aqueles das células generativas (Fig. 2 B-E). De forma geral, as alterações celulares não seguiram um padrão dose-resposta, isto é, as maiores alterações foram observadas apenas nas exposições das fêmeas às doses menores do bioativo.

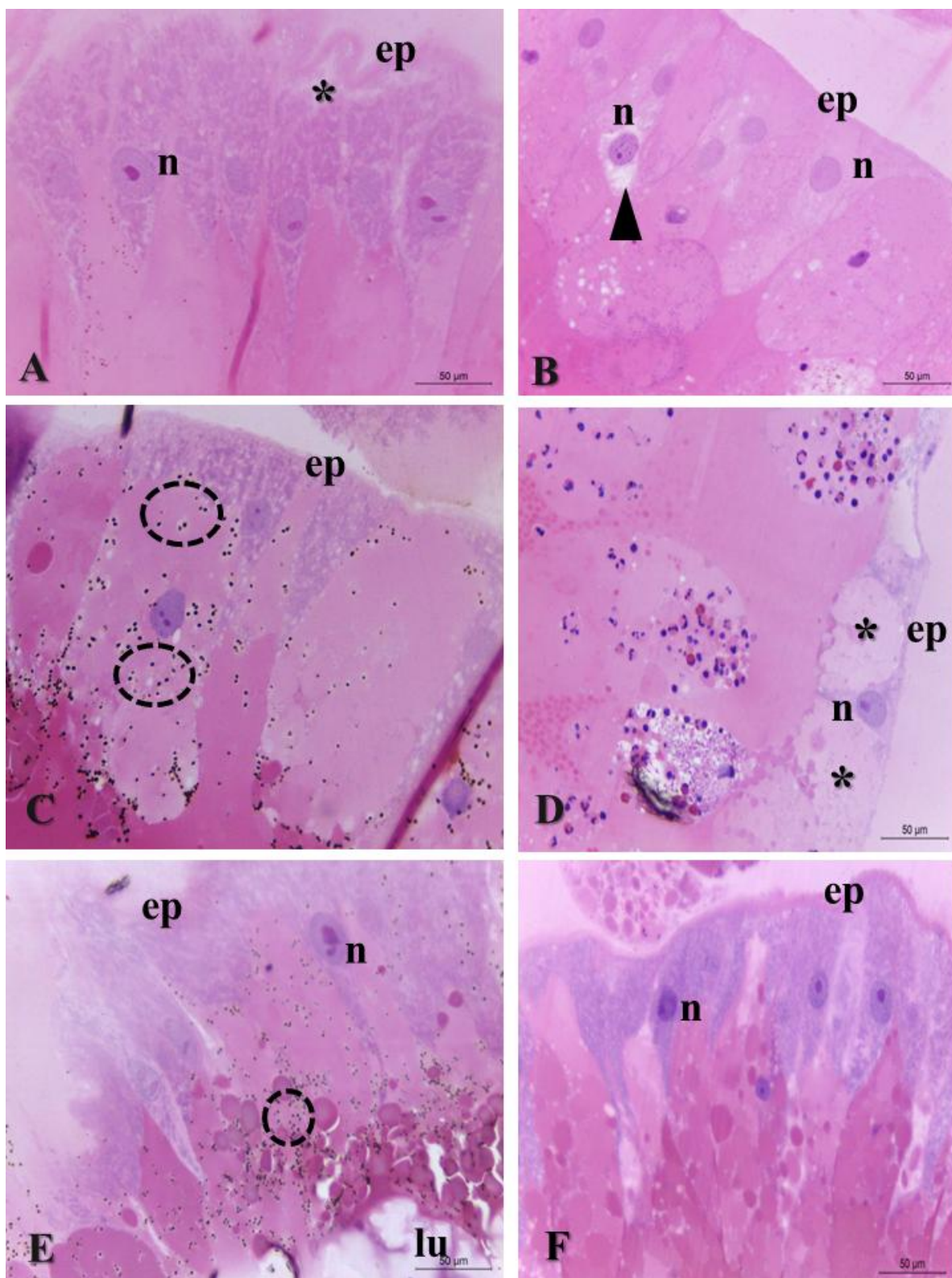


Figura 2. Secções do intestino médio de fêmeas de *R. linnaei* expostas às diferentes doses

(0,78 a 25 mg/mL) dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona (HE). A-F=Detalhes dos diferentes tipos de células presentes no intestino médio. ep: epitélio; n: núcleo; seta: vacuolização; *: espaço resultante do desprendimento da membrana basal; círculo pontilhado: fragmentos de células lizadas ricas em hematina e partículas livres; lu: lúmen. Escala: barra = 50µm

5.1.3.2 Análise histoquímica

A) Detecção de proteínas

Os resultados do estudo histoquímico obtidos por meio da aplicação da técnica do azul de bromofenol mostram que, nas fêmeas de carrapatos *R. linnaei* ingurgitadas as células digestivas apresentam reação positiva ao teste.

No grupo controle (Fig. 3 A), a análise histoquímica detectou que o epitélio do intestino médio ainda se apresenta estratificado, apresentando reação positiva ao teste. O conteúdo citoplasmático das células digestivas não apresentou variação na intensidade de marcação pelo azul de bromofenol, a qual ocorre fortemente positiva à técnica. Foi possível observar as células com aspecto íntegro, porém, fracamente marcadas, evidenciando um baixo conteúdo proteico. Próximo ao lúmen observou-se a presença de vacuolização fracamente positiva ao azul de bromofenol, em meio a restos citoplasmáticos também fracamente positivos.

Quanto aos grupos tratamento, isto é, fêmeas expostas aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona nas doses de 0,78 a 12,5 mg/mL, os limites celulares já não puderam ser evidenciados, principalmente nas células generativas (Fig. 3 B-F). O citoplasma das células generativas apresentou diminuição na intensidade de marcação para o azul de bromofenol em relação ao grupo controle, se tornando medianamente positivo a esta técnica. As células dos estratos do epitélio mais próximos do lúmen do intestino mostraram citoplasma com vacuolização fracamente positiva ao azul de bromofenol. Na figura 3 E-F, observa-se que o domínio apical das células digestivas é o local onde existe maior vacuolização e este apresenta-se fracamente positivo. De igual maneira, nestas figuras, as células dos estratos basais (células generativas ou indiferenciadas) apresentaram citoplasma fortemente corado pelo azul de bromofenol com a presença de alguns vacúolos fracamente positivos.

Entretanto as características descritas anteriormente, no grupo de fêmeas expostas à dose de 25,0 mg/mL (Fig. 3G), não seguiram o mesmo comportamento; permanecendo as células com características íntegra semelhante àquelas encontradas no grupo controle, e com marcação fracamente positiva para proteínas.

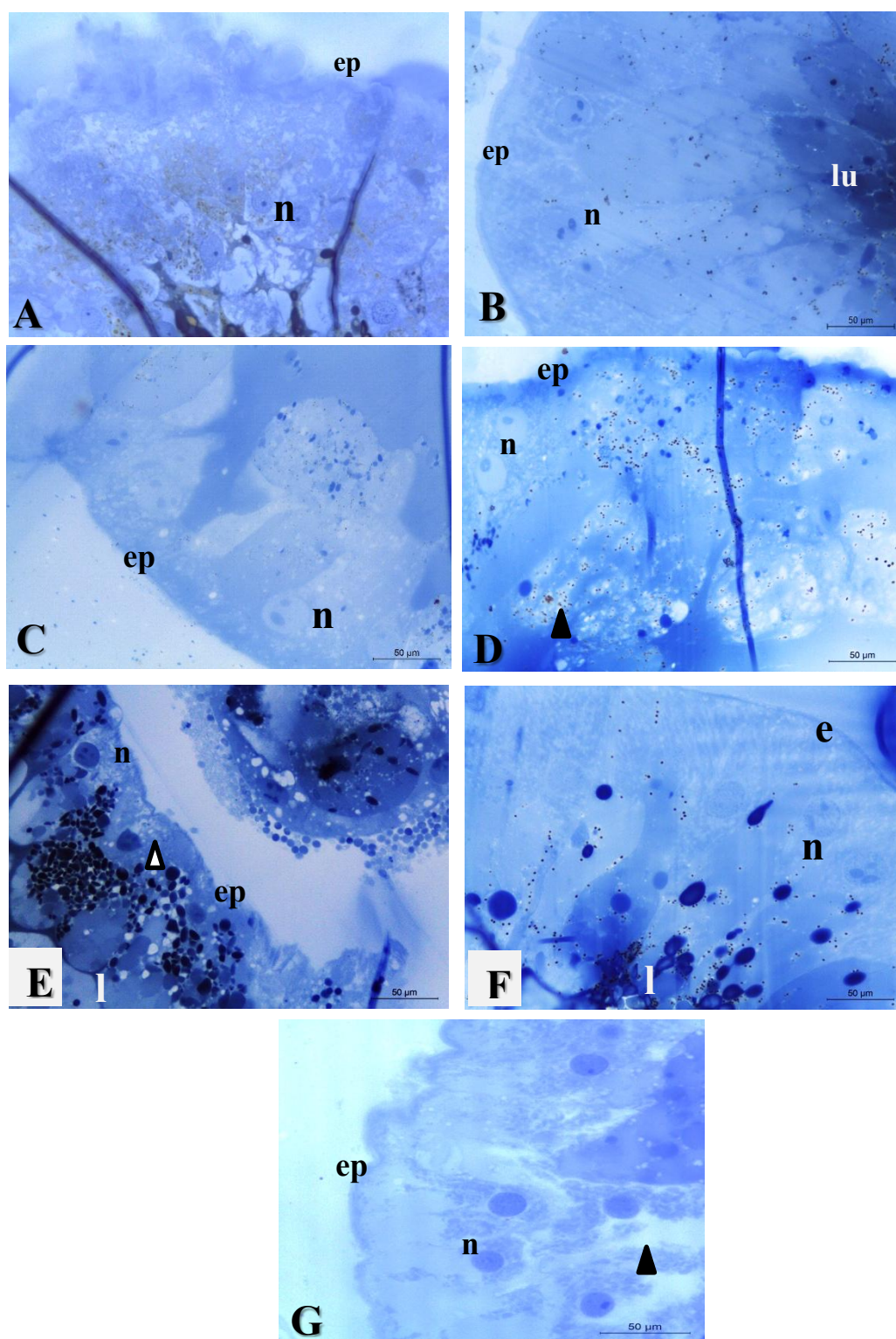


Figura 3. Secções histológicas do intestino médio de fêmeas de *R. linnaei* expostas às diferentes doses dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, coradas pelo azul de bromofenol. A: Grupo controle; B-G Grupo tratamento nas doses de 0,78 a 25 mg/mL, respetivamente. Detalhes nas imagens= lu: lúmen; n: núcleo; seta: vacuolização. Escala: barra = 50μm.

B) Detecção de polissacarídeos

As células generativas pertencentes ao intestino das fêmeas alocadas no grupo controle, apresentaram o citoplasma com intensa granulação polisacarídica positiva distribuída heterogeneamente (Fig. 4A). Observou-se ainda a presença de polissacarídeos no espaço intercelular das células digestivas e generativas.

Nos grupos tratamento, foi observada marcação PAS positiva mais intensa no citoplasma (Fig. 4 E-G). As células em contato direto com o lúmen apresentaram vacúolos negativos ao PAS. Algumas pareciam estar liberando porções ou mesmo se desprendendo do epitélio em direção ao lúmen, sob a forma de esferas fortemente PAS positivas (Fig. 4 B, D, F e G).

Nas células digestivas observou-se vacuolização citoplasmática com o mesmo padrão de marcação para proteínas descrito para o grupo controle (Fig. 4 G). Nestas células também foram observados grânulos citoplasmáticos que reagiram moderadamente ao PAS. Além disso, observou-se células digestivas parcial ou totalmente preenchidas por granulação amarelada/amarronzada.

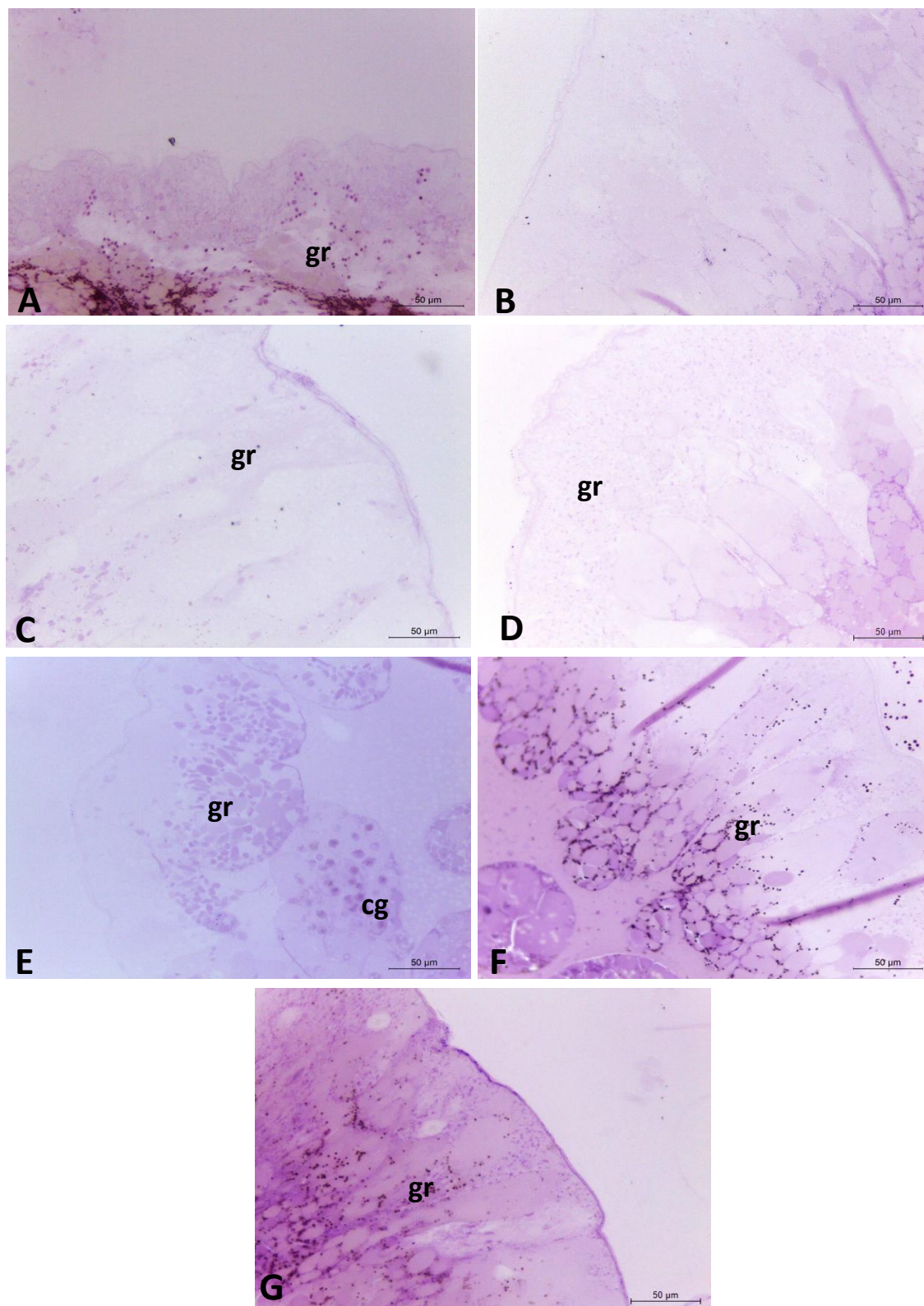


Figura 4. Secções do intestino médio de fêmeas de *R. linnaei* expostas às diferentes doses dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, coradas pela técnica de PAS. A: Grupo controle; B-G Grupo tratamento nas doses de 0,78 a 25 mg/mL, respetivamente. Detalhes nas imagens = cg: células generativas; gr: granulação citoplasmática. Escala: barra = 50µm.

5.2 Ensaios com larvas

Na Tabela 4 estão as médias de mortalidade de larvas de *R. linnaei*, obtidas para os bioensaios de tratamento e controle, a partir do TIL.

Tabela 4. Médias de eficácia dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona em relação à mortalidade (%) das larvas de *R. linnaei* pelo Teste de Imersão de Larvas (TIL).

Concentrações (mg/mL)	% Mortalidade larval	
	Lote 1	Lote 2
6,24	1,16 ± 0,0	1,09 ± 0,1
3,12	1,16 ± 0,0	1,15 ± 0,0
1,56	1,10 ± 0,0	1,13 ± 0,0
0,78	1,10 ± 0,0	1,00 ± 0,0
0,39	1,10 ± 0,0	1,00 ± 0,0
0,195	1,11 ± 0,0	1,00 ± 0,0
0,098	1,10 ± 0,0	1,00 ± 0,0
0,049	1,10 ± 0,0	1,00 ± 0,0
0,024	1,10 ± 0,0	1,00 ± 0,0
0,012	1,10 ± 0,0	1,00 ± 0,0
0,006	1,03 ± 0,0	1,00 ± 0,0
0,003	1,03 ± 0,1	1,00 ± 0,0
H ₂ O (Ctrl Negativo)	1,86 ± 0,1	1,22 ± 0,0
Revolution® [0,512]	100 ± 0,0	100 ± 0,0

***Lote 1:** larvas com idade de 10 dias obtidas das posturas de fêmeas ingurgitadas com previa exposição aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona. **Lote 2:** larvas com idade de 10 dias obtidas das posturas de fêmeas que não foram expostos ao bioativo

De forma geral os resultados demonstraram que as larvas de ambos os lotes expostos aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona tiveram comportamento semelhante entre os grupos tratamento e controle negativo, sem diferenças estatísticas, porém, estes grupos diferiram estatisticamente do grupo controle positivo. Os ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona não tiveram efeito residual entre as gerações de larvas, indicando que existe baixo risco de resistência aos bioativos.

5.2.1 Atividades das estearases, monoxigenase e glutathione transferase-GST, em larvas expostas aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona

Nas Tabelas 5-7, são apresentados os resultados referentes à atividade enzimática das estearases, monoxigenase e glutathione transferase, respectivamente, em larvas de *R. linnaei* após exposição aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona.

Tabela 5. Atividade máxima das enzimas obtidas após 24h de exposição aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, nos diferentes lotes das larvas de *R. linnaei*.

Concentrações	Estearase ($\mu\text{mole}/\text{min}/\text{L}$)		Monoxigenase ($\text{mM}/\text{mg}/\text{min}$)		GST ($\text{mM}/\text{mg}/\text{min}$)	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
6,24	$0,69 \pm 0,0$	$0,62 \pm 0,0$	$0,37 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$	$0,33 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$
3,12	$0,68 \pm 0,0$	$0,62 \pm 0,0$	$0,37 \pm 0,0$	$0,33 \pm 0,0$	$0,33 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$
1,56	$0,68 \pm 0,0$	$0,61 \pm 0,0$	$0,38 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$
0,78	$0,69 \pm 0,0$	$0,61 \pm 0,0$	$0,38 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$
0,39	$0,67 \pm 0,0$	$0,60 \pm 0,0$	$0,38 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$
0,195	$0,68 \pm 0,0$	$0,60 \pm 0,0$	$0,38 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$
0,098	$0,68 \pm 0,0$	$0,60 \pm 0,0$	$0,39 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$
0,049	$0,69 \pm 0,0$	$0,60 \pm 0,0$	$0,38 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$
0,024	$0,68 \pm 0,0$	$0,60 \pm 0,0$	$0,38 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$
0,012	$0,68 \pm 0,0$	$0,60 \pm 0,0$	$0,38 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,31 \pm 0,0$
0,006	$0,69 \pm 0,0$	$0,60 \pm 0,0$	$0,38 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$
0,003	$0,68 \pm 0,0$	$0,60 \pm 0,0$	$0,38 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$
H ₂ O	$0,69 \pm 0,0$	$0,60 \pm 0,0$	$0,38 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,32 \pm 0,0$
Revolution®	$0,87 \pm 0,0$	$0,80 \pm 0,0$	$0,44 \pm 0,1$	$0,43 \pm 0,1$	$0,41 \pm 0,0$	$0,42 \pm 0,1$

***Lote 1:** larvas com idade de 10 dias obtidas das posturas de fêmeas ingurgitadas com previa exposição aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona. **Lote 2:** larvas com idade de 10 dias obtidas das posturas de fêmeas que não foram expostas ao bioativo

Tabela 6. Atividade máxima das enzimas obtidas após 48h de exposição aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, nos diferentes lotes das larvas de *R. linnaei*.

Concentrações	Estearase ($\mu\text{mole}/\text{min}/\text{L}$)		Monoxigenase ($\text{mM}/\text{mg}/\text{min}$)		GST ($\text{mM}/\text{mg}/\text{min}$)	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
6,24	$0,72 \pm 0,0$	$0,63 \pm 0,0$	$0,36 \pm 0,0$	$0,35 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,33 \pm 0,0$
3,12	$0,70 \pm 0,0$	$0,65 \pm 0,3$	$0,39 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,33 \pm 0,0$
1,56	$0,70 \pm 0,0$	$0,64 \pm 0,0$	$0,39 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,33 \pm 0,0$
0,78	$0,70 \pm 0,0$	$0,64 \pm 0,0$	$0,39 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,33 \pm 0,0$
0,39	$0,70 \pm 0,0$	$0,64 \pm 0,0$	$0,39 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,33 \pm 0,0$
0,195	$0,70 \pm 0,0$	$0,64 \pm 0,0$	$0,38 \pm 0,1$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,33 \pm 0,0$
0,098	$0,70 \pm 0,0$	$0,64 \pm 0,0$	$0,38 \pm 0,1$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,33 \pm 0,0$
0,049	$0,70 \pm 0,0$	$0,64 \pm 0,0$	$0,39 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,34 \pm 0,0$	$0,33 \pm 0,0$

0,024	0,70 ± 0,0	0,64 ± 0,0	0,39 ± 0,1	0,34 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,33 ± 0,0
0,012	0,70 ± 0,0	0,64 ± 0,0	0,39 ± 0,1	0,34 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,33 ± 0,0
0,006	0,69 ± 0,0	0,64 ± 0,0	0,39 ± 0,1	0,34 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,33 ± 0,0
0,003	0,69 ± 0,0	0,64 ± 0,0	0,39 ± 0,1	0,34 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,33 ± 0,0
H₂O	0,69 ± 0,0	0,64 ± 0,0	0,38 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,32 ± 0,0
Revolution®	0,87 ± 0,0	0,80 ± 0,0	0,44 ± 0,1	0,43 ± 0,1	0,41 ± 0,0	0,42 ± 0,1

***Lote 1:** larvas com idade de 10 dias obtidas das posturas de fêmeas ingurgitadas com previa exposição aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona. **Lote 2:** larvas com idade de 10 dias obtidas das posturas de fêmeas que não foram expostos ao bioativo

Tabela 7. Atividade máxima das enzimas obtidas após 6 dias de exposição aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, nos diferentes lotes das larvas de *R. linnaei*.

Concentrações	Esterase (μ mole/min/L)		Monoxigenase (mM/mg/min)		GST (mM/mg/min)	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
6,24	0,71 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,38 ± 0,0	0,35 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,34 ± 0,1
3,12	0,70 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,37 ± 0,0	0,35 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,33 ± 0,1
1,56	0,70 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,37 ± 0,0	0,35 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,32 ± 0,1
0,78	0,69 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,37 ± 0,0	0,35 ± 0,0	0,36 ± 0,0	0,33 ± 0,1
0,39	0,70 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,38 ± 0,0	0,35 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,33 ± 0,1
0,195	0,70 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,37 ± 0,0	0,35 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,33 ± 0,1
0,098	0,70 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,37 ± 0,0	0,35 ± 0,0	0,36 ± 0,2	0,32 ± 0,1
0,049	0,70 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,38 ± 0,1	0,35 ± 0,0	0,35 ± 0,0	0,33 ± 0,1
0,024	0,70 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,38 ± 0,1	0,35 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,32 ± 0,1
0,012	0,70 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,38 ± 0,1	0,34 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,32 ± 0,1
0,006	0,70 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,38 ± 0,1	0,35 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,32 ± 0,1
0,003	0,70 ± 0,0	0,66 ± 0,0	0,38 ± 0,1	0,34 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,32 ± 0,1
H₂O	0,69 ± 0,0	0,66 ± 0,1	0,38 ± 0,1	0,34 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,32 ± 0,1
Revolution®	0,87 ± 0,0	0,83 ± 0,1	0,44 ± 0,1	0,43 ± 0,1	0,41 ± 0,0	0,42 ± 0,1

***Lote 1:** larvas com idade de 10 dias obtidas das posturas de fêmeas ingurgitadas com previa exposição aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona. **Lote 2:** larvas com idade de 10 dias obtidas das posturas de fêmeas que não foram expostos ao bioativo.

Esterase

Conforme descrito nas tabelas acima, para cada lote de larvas selecionado foi analisada a atividade enzimática máxima. A maior atividade enzimática de 0,72 μ mole/min/L, foi observada nas larvas do lote 2 após 48h de exposição aos ésteres do ácido ricinoleico de mamona, porém sem diferenças estatísticas entre as diferentes concentrações, lotes de larvas e período de exposição aos bioativos. O padrão de reatividade dos bioativos nas populações de larvas foram semelhantes nos grupos controle e tratamento, sem diferenças significativas, porém significativamente diferente dos resultados obtidos no grupo exposto ao Revolution®.

GST

Nos diferentes períodos de exposição aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, a maior atividade enzimática foi observada no grupo controle positivo (Revolution®). Nenhuma diferença significativa na atividade enzimática foi observada entre os lotes e período após exposição das larvas aos bioativos.

Monoxigenase

A maior atividade enzimática foi observada no grupo controle positivo. Da mesma maneira às enzimas anteriormente descritas, a atividade da monoxigenase não apresentou diferença significativa entre os períodos após exposição aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, quando comparada a atividade obtida entre os grupos controle e tratamento.

6.0 DISCUSSÃO GERAL

No presente estudo, a avaliação das diferentes doses dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, não apresentaram atividade inibidora na redução das massas de ovos das fêmeas ingurgitadas de *R. linnaei*, expostas aos bioativos através do bioensaio de imersão. Desta maneira, a avaliação do potencial tóxico (CL₅₀) obtida a partir dos bioensaios, nos quais as fêmeas ingurgitadas são submersas em concentrações diferentes dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona (Teste de Imersão de Adultos), não foi estimada, dado a baixa eficácia do bioativo.

Para o controle de carrapatos, carrapaticidas químicos são usados para interromper funções específicas dos órgãos alvos para que a população possa ser controlada em um nível significativo. No presente estudo, focou-se no intestino médio dos carrapatos, que é o local de predileção para a digestão do sangue (Sonenshine e Roe, 2014). Como a digestão em carrapatos é um processo intracelular, as mudanças no perfil celular das células digestivas podem afetar o processo de digestão do sangue e, portanto, a síntese de proteínas vitais necessárias na vitelogênese e na produção de ovos. Várias enzimas digestivas estão envolvidas na digestão do sangue (Chevillon et al., 2007; Sojka et al. 2013).

As enzimas digestivas, fosfatase ácida (FAC), fosfatase alcalina (FAI) e serinas proteases (SP) foram relatadas em células do intestino médio de carrapatos (Mulenga et al., 2003) estando localizadas em vesículas intracelulares dentro dos epitélios do intestino médio e normalmente não estão disponíveis no lúmen. No nosso estudo, foi observada uma atividade das enzimas FAC, FAI e SP, em ambos os períodos de avaliação (24 e 48h), onde obteve-se valores bem próximos aos do grupo controle negativo (água destilada). A diminuição na

atividade enzimática sugeriu a incapacidade das células digestivas alteradas de absorver as proteínas do hospedeiro e a formação de endossomos e, finalmente, a formação de fagolisossomos (Bisht et al., 2024). Os resultados sugeriram que não houve envolvimento destas enzimas no processo de desintoxicação contra os agentes xenobióticos (Shekari et al., 2008), portanto, bem pouco provável o surgimento da resistência aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona. A estimativa quantitativa das enzimas digestivas em fêmeas expostas aos carrapaticidas pode fornecer informações cruciais sobre a possível via de ação dos novos produtos.

A cutícula do carrapato forma o seu exoesqueleto e está composta por proteínas e quitina que fornecem estabilidade e flexibilidade (Hackman, 1982; Kramer et al., 1988). As proteínas produzem uma matriz de propriedades mecânicas variáveis e estabilizam a quitina. Ela interage com a quitina em uma zona estreita (a camada Schmidt) onde uma quantidade relativamente grande de água (cerca de 90%) está presente, presumivelmente para conduzir as interações hidrofóbicas entre quitina e proteína, um fator importante no processo de estabilização (Hillerton e Vincent, 1983). Embora não tenham sido observadas, no presente estudo, mudanças morfológicas significativas no tegumento de carrapatos tratados com os ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, o perfil quantitativo de proteína e quitina foi realizado. Nenhuma diferença significativa no conteúdo de quitina entre as fêmeas tratadas com o bioativo ($0,88 \pm 0,0$ mg/mL) em comparação com as do grupo controle ($0,91 \pm 0,0$ mg/mL) foi observada. Da mesma forma, Remedio et al. (2014) avaliaram o extrato aquoso das folhas de neem em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e não relataram variação significativa na morfometria da cutícula, entretanto, alterações morfológicas foram observadas no tegumento dos carrapatos tratados.

Outros resultados obtidos neste trabalho mostraram o potencial tóxico dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, sobre a morfohistologia do intestino médio de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus linnaei*, bem como alterações morfohistoquímicas que as concentrações de 0,78 a 6,25 mg/mL desse composto provocaram neste órgão. No presente estudo, o epitélio, células digestivas não uniformes e lúmen preenchido com vesículas digestivas rompidas e grânulos de hematina foram observados no intestino médio de fêmeas expostas aos bioativos. Semelhantes resultados foram obtidos por Araujo et al. (2014) após o tratamento de *R. sanguineus* com selamectina que mostrou efeito citotóxico nos diferentes tipos de células do intestino médio incluindo a degeneração do epitélio intestinal. Da mesma forma, de Oliveira et al. (2013, 2016) relataram a presença de vacuolização nas células do intestino médio e alterações significativas nos subtipos de células digestivas em *R. sanguineus* durante o

tratamento com fluazuron e dinotefuran.

Segundo a literatura já descreveu, as células digestivas seriam consideradas as principais células do epitélio do intestino médio, e seriam responsáveis pela produção e pela secreção de enzimas digestivas, além da absorção de água e de outras substâncias digeridas (Harrison e Foelix, 1999). O presente estudo confirmou que embora as alterações morfohistológicas ocorridas nas células do intestino medio das fêmeas expostas aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, a participação das enzimas digestivas permaneceu inalterada em relação aos resultados obtidos no grupo controle negativo. Este achado indicou que os ésteres conseguem desestruturar a nível celular o intestino médio sem que exista uma sobre expressão enzimática como mecanismo de defesa ao xenobiótico/carrapaticida. Dos dois mecanismos amplos envolvidos no desenvolvimento de resistência, o papel da superexpressão de enzimas metabólicas no desenvolvimento de resistência já foi estabelecido em várias espécies de artrópodes (Hemingway e Ranson, 2000; Rosario-Cruz et al., 2009; Bass e Jones, 2018).

O estudo histoquímico dos intestinos médios de fêmeas de *R. linnaei* expostas aos ésteres, também forneceu importantes informações sobre a presença de proteínas, as quais nas células digestivas do epitélio do intestino nas concentrações de 0,78 a 6,25 mg/mL do bioativo, mostrou menores quantidades destas no seu citoplasma, provavelmente devido á maior desorganização estrutural do próprio intestino médio, o que provavelmente interferiu na produção das mesmas (principalmente na forma de enzimas digestivas) e em quantidades significativas. As poucas proteínas que foram aí encontradas, provavelmente seriam as chamadas proteínas estruturais, pelo menos em parte, produzidas para serem utilizadas pelas próprias células, e/ou ainda parte delas poderiam estar sendo sintetizadas e armazenadas para uso posterior (Harrison e Foelix, 1999).

Em estudos prévios com *R. sanguineus* que foram expostos aos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, à medida que as concentrações do bioativo foram diminuindo, observou-se nas células digestivas do intestino médio, um aumento da vacuolização citoplasmática a qual reagiu fracamente aos corantes utilizados que foram azul de bromofenol e reagente de Schiff; dados que corroboraram, aqueles encontrados para o intestino anterior e médio de carrapatos da espécie *R. appendiculatus* (Till, 1961; Coons et al., 1982). Estes autores interpretaram a presença destes vacúolos como resultado da fusão de vesículas contendo secreção, as quais não liberaram seu conteúdo para o lúmen, indicando que os carrapatos expostos ao bioativo já poderiam estar fabricando produtos de defesa (não enzimáticos), os quais poderiam estar afetando a fisiologia do intestino dos mesmos

(Sonenshine e Roe, 2014).

Quanto ao estudo com larvas de *R. linnaei*, no presente estudo, as diferentes doses avaliadas dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, não tiveram atividade biológica que fosse potencial para causar mortalidade larval. Desta maneira, a avaliação do potencial tóxico (CL₅₀) obtido a partir dos bioensaios de Teste de Imersão de Larvas, não foi possível ser estimado, dado a baixa eficácia do bioativo.

Principalmente três enzimas, a saber, estearase, monooxigenase e glutathione S-transferase, são relatadas como envolvidas na desintoxicação metabólica e frequentemente correlacionadas com o desenvolvimento de resistência a carrapaticidas em larvas de carrapatos (Guerrero et al., 2012). No presente estudo, a atividade das enzimas supracitadas, obtiveram resultados próximos aos do grupo controle, indicando, portanto, a baixa eficácia na mortalidade larval em decorrência da exposição aos ésteres, o que poderia estar diretamente correlacionado com a baixa atividade enzimática o que consequentemente descartaria a possível ocorrência de resistência.

7.0 CONCLUSÃO

Os danos provocados pelos bioativos presentes nos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, sobre as células digestivas de fêmeas ingurgitadas de *R. linnaei*, interferiram na produção de novas células digestivas essenciais no processo de digestão do sangue. Assim, quando os processos digestivos são inibidos, também os de armazenamento dos elementos nutritivos do sangue, necessários para a nutrição do próprio ectoparasita e para formação de elementos vitelínicos não se completarão, o que interferirá diretamente sobre o desenvolvimento de suas células germinativas (ovócitos) e, portanto, na formação de novos indivíduos.

Futuras pesquisas podem ser desenvolvidas utilizando-se o mesmo modelo de estudo aqui relatado, mas dessa vez com fêmeas semi-ingurgitadas. Acredita-se que essa fase de vida dos carrapatos poderá mostrar com mais evidências os efeitos dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona sobre o intestino médio dos carrapatos.

8.0 DESCRIÇÃO DO APOIO INSTITUCIONAL RECEBIDO NO PERÍODO

No período referente ao relatório, o apoio institucional recebido do Instituto de Biociências de Rio Claro foi adequado e fundamental para o desenvolvimento das atividades acima descritas.

- Manejo dos coelhos: colaboração da equipe do setor de Manejo Animal, composta por

assistentes e analistas, para acompanhamento médico veterinário dos animais.

- Apoio técnico dos estudantes do Laboratório de Microscopia e do Técnico Gerson de Mello: foram de fundamental importância nas atividades de pesquisa do laboratório, bem como ajuda na realização das análises e processamento do material biológico coletado.

- Análise e interpretação dos resultados: Um elemento fundamental foi o apoio em todo momento da Supervisora deste projeto, Profa Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias. Seu auxílio foi essencial no aperfeiçoamento do delineamento experimental, escolha das análises adequadas dos diferentes conjuntos de dados obtidos, bem como formulações e reformulações das análises estatísticas para um melhor entendimento e interpretação dos resultados.

9.0 LISTA DE PUBLICAÇÕES RESULTANTES DE AUXÍLIO DA BOLSA

9.1 Desenvolvimento de material didático ou instrucional - ebook

MORTE CELULAR PROGRAMADA, APOPTOSE. Capítulo 2. In: A morte celular como estratégia biológica de sobrevivência: benefícios e prejuízos. 2023. Doi: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.33543.37288>.

9.2 Artigo em elaboração

Yousmel Alemán Gainza, Bruna Jéssyca Nascimento Horn, Eduarda Cristina Vinha, Kirley Marques Canuto, Maria Izabel Camargo-Mathias., 2024. Morphological characterization in the midgut and digestive enzyme profile in *Rhipicephalus linnaei* ticks, exposed to the ricinoleic acid salt of castor oil.

10.0 OUTRAS ATIVIDADES

Durante o período referente ao relatório, o bolsista participou das seguintes atividades docente educativa:

- Professor voluntário da disciplina de Imunologia geral. Ministrada durante o período de março de 2023 a julho de 2023, totalizando 60h (ANEXO).
- Participação do evento Brunch de Boas-Vindas da Internacionalização 2023 realizado em 30/03/2023, contabilizando carga horária total de 3 horas (ANEXO).
- Participação na “Mentoria para Consolidação da Carreira em Pesquisa dos bolsistas de Pós-Doutorado (PD) da FAPESP” (ANEXO).
- Participação no 1º Encontro do Programa de Pós-Doutorado (ANEXO).
- Participação do Ciclo ILP + FAPESP de Ciência e Inovação 2024: IMPACTOS ECONÔMICOS DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS (ANEXO).
- Participação como coautor no VIII Simpósio Brasileiro de Acrologia – SIBAC (ANEXO).

11.0 ANEXOS



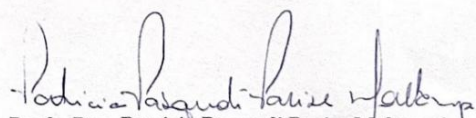
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências - Câmpus de Rio Claro
Departamento de Biologia Geral e Aplicada



Rio Claro, 24 de junho de 2023

ATESTADO

Atesto para fins acadêmicos que Yousmel Alemán Gainza, pós-doutorando vinculado ao Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, ministrou voluntariamente a disciplina "Imunologia" para os alunos do Curso de Ciências Biológicas-integral no 1º semestre do ano de 2023, totalizando 60 horas.


Profa. Dra. Patricia Pasquali Parise Maltempi
Chefe do Departamento de Biologia Geral e Aplicada

CERTIFICADO

Certificamos que **Yousmel Alemán Gainza**, participou com êxito do evento Brunch de Boas-Vindas da Internacionalização 2023 realizado em 30/03/2023, contabilizando carga horária total de 3 horas.

São Paulo, 30 de março de 2023.

Código de autenticidade: 1506919.86109453.6.8.5379690763985170
PROPG/AREX



AREX
Assessoria de Relações Externas



Programação:
- Oportunidades de bolsas para estágio no exterior
- Oportunidades de Internacionalização



AREX
Assessoria de Relações Externas

mentoriapd@fapesp.br

Ativo

1 de 8

RES: CONVITE FAPESP / Webinário do Programa Iniciativa de Mentoria para Consolidação da Carreira em Pesquisa dos bolsistas de Pós-Doutorado (PD) da FAPESP

Caixa de entrada x

DC <DC@fapesp.br>

para DC

ter., 18 de abr. de 2023, 12:27

Caro(a) Bolsista de Pós-doutorado da FAPESP,

Agradecemos a presença de todos durante os três dias de realização do Webinário do Programa Iniciativa de Mentoria para Consolidação da Carreira em Pesquisa dos bolsistas de Pós-Doutorado (PD) da FAPESP.

Conforme mencionado durante o Webinário, é importante a avaliação de cada atividade desenvolvida para o seu aprimoramento. Assim, contamos com a colaboração de todos(as) no preenchimento da Avaliação em anexo. Por favor, encaminhar até o dia 28/04/2023 para o e-mail: mentoriapd@fapesp.br.

Atenciosamente,

Profa. Catarina Segreti Porto
Coordenadora Programa
Membro da Assessoria DC

De: DC



1º ENCONTRO DO PROGRAMA DE PÓS-DOCTORADO

Certificamos que **Yousmel Alemán Gainza**, participou do 1º Encontro do Programa de Pós-Doutorado da Unesp realizado em 18 de Abril de 2024, na cidade de São Paulo, contabilizando carga horária total de 8 horas.

São Paulo, 18 de Abril de 2024

Edson Cocchieri Botelho
Pró-Reitor de Pesquisa





INSTITUTO
DO LEGISLATIVO
PAULISTA



ASSEMBLEIA LEGISLATIVA
DO ESTADO DE SÃO PAULO

CERTIFICADO

A Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo, por meio do Instituto de Estudos, Capacitação e Políticas Públicas do Poder Legislativo (Instituto do Legislativo Paulista – ILP), com fundamento nas atribuições dadas pelo Ato da Mesa nº 11, de 16 de Abril de 2019, artigos 141 e 142, certifica que

YOUSMEL ALEMÁN GAINZA

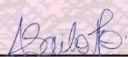
portador(a) do CPF 236.499.318-00 participou do Ciclo ILP + FAPESP de Ciência e Inovação 2024

IMPACTOS ECONÔMICOS DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS

realizado de forma telepresencial em 01/04/2024, com carga horária de 2h.

São Paulo, 01 de abril de 2024


AIRTON GERMANO DA SILVA
Diretor Executivo do ILP


AGNES THAIS SACILOTTO
Diretora-Presidente do ILP


NATÁCHA SOUZA JONES
Diretora Executiva do ILP

Programa

As ameaças ao desenvolvimento econômico global pelos efeitos das mudanças climáticas. A situação de vulnerabilidade do Brasil. Medidas para mitigação dos riscos econômicos (transformação e da transição para economia de baixo carbono, investimentos na adaptação para o enfrentamento das mudanças climáticas e avaliação dos impactos e riscos em cada setor econômico e da vida humana).
Evento disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=l3vpz0mFVME>

Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo
Avenida Pedro Álvares Cabral 201, 04097-900, São Paulo (SP) PABX 3886-6000 www.al.sp.gov.br

VIII SIBAC

Acarologia e Biodiversidade: da inovação à sustentabilidade

Certificamos que o trabalho **CANNABIS SATIVA: AÇÃO DO SEU EXTRATO NA ORGANIZAÇÃO TECIDUAL DO TEGUMENTO E DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE CARRAPATOS RHIPICEPHALUS LINNAEI** foi apresentado por **Odaiza Da Silva, Davy Sapatini, Milena de Lima Rodrigues, Yousmel Alemán Gainza, Marina Rodrigues de Abreu e Maria Izabel Camargo Mathias**, na forma **Pôster**, na área temática **Ácaros de Importância Veterinária**, durante o **VIII Simpósio Brasileiro de Acarologia**, realizado em **São Luís, Maranhão**, no período de **23/06/2024 a 26/06/2024**.



Dra. Ester Azevedo do Amaral
PRESIDENTE VIII SIBAC



Dra. Andréia Serra Galvão
VICE-PRESIDENTE VIII SIBAC

12.0 REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.
- ARAUJO, A. M.; OLIVEIRA, P. R.; SAMPIERI, B. R.; FURQUIM, K. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological changes in the midgut of *Rhipicephalus sanguineus* females (Acari: Ixodidae) exposed to selamectin. **Curr Top Toxicol**, v. 10, p. 87–93, 2014.
- AGYEI, A.; RUNHAM, N.; BLACKSTOCK, N. Histochemical changes in the midgut of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. **Experimental and Applied Acarology**, v. 13, n. 3, p. 187-212, 1992.
- ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; SASAKI, S. D.; SAMPAIO, C. A.; TANAKA, A. S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 4, p. 557-563, 2002.
- ARNOSTI, A.; BRIENZA, P. D.; FURQUIM, K. C.; 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**, v. 127, n. 2, p. 575-580, 2011a.
- ARNOSTI, A.; BRIENZA, P. D.; FURQUIM, K. C.; 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, n. 2, p. 569-574, 2011b.
- ANILEY, S.; ATENAFU, G. Laboratory acaricidal activity of *Phytolacca dodecandra*, *Calpurnia aurea* and *Ricinus communis* against *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae). **Entomology, Ornithology & Herpetology**, v. 9, n. 4, p. 1-6, 2020.
- BALASHOV, I. U. S. **A Translation of Bloodsucking Ticks (Ixodoidea)-Vectors of Diseases of Man and Animals**. College Park, Md: Entomological Society of America, 1972.
- BASS, C.; JONES, C. M. Editorial overview: Pests and resistance: Resistance to pesticides in arthropod crop pests and disease vectors: mechanisms, models and tools. **Curr Opin Insect Sci**, v. 27, p. iv–vii, 2018.
- BECKER, S.; WEBSTER, A.; DOYLE, R. L.; MARTINS, J. R.; RECK, J.; KLAFKE, G. M. Resistance to deltamethrin, fipronil and ivermectin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto, Latreille (Acari: Ixodidae). **Ticks and tick-Borne Disease**, v. 10, n. 5, p. 1046-1050, 2019.
- BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, n. 1, p. 52-61, 1974.
- BISHT, N.; FULAR, A.; SAINI, M.; KUMAR, S.; SANKAR, M.; SHARMA, A. K.; GHOSH, S. Effect of ivermectin, amitraz and fipronil on midgut epithelium and digestive enzyme profile in *Rhipicephalus microplus* ticks (Acari: Ixodidae). **Exp Appl Acarol**, v. 92, n. 4, p. 851–870, 2024.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BURRASCANO, C. *Ricinus communis*. In: Bossard CC, Randall JM, Hoshovsky MC **Invasive Plants of California's Wildlands**. University of California Press, Berkeley, CA. p. 273, 2000.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I.; CHIERICE, G.; BRIENZA, P. D.; ARNOSTI, A.; CALLIGARIS, I. B.; SAMPIERI, B.; NODARI, E. F.; FERREIRA, A. R. Esters from castor

oil: interfering with the salivary gland secretory cycle of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Emergent Life Sciences Research**, v. 2, n. 2, p. 66-72, 2016.

CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Histopathology and ultrastructure features of the midgut of adult females of the tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in various feeding stages and submitted to three infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249-259, 2009.

CAPERUCCI, D.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. **Micron**, v. 41, n. 7, p. 710-721, 2010.

CHEVILLON, C.; KOFFI, B.B.; BARRÉ, N.; DURAND, P.; ARNATHAU, C.; DE MEEÛS, T. Direct and indirect inferences on parasite mating and gene transmission patterns: pangamy in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Infect. Genet. Evol.** v. 7, p. 298–304, 2007.

COLES, T. B.; DRYDEN, M. W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 8, 2014.

COONS, L. B.; TARNOWSKI, B.; OURTH, D. D. *Rhipicephalus sanguineus*: localization of vitellogenin synthesis by immunological methods and electron microscopy. **Exp Parasitol**, v. 54, n. 3, p. 331–339, 1982.

COONS, L. B.; ROSELL-DAVIS, R.; TARNOWSKI, B. Bloodmeal digestion in ticks. In: Sauer JR, Hair JA, editors. **Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks**. Chichester, England: Ellis Horwood limited. p. 248-273, 1986.

DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M.; MONTERO, C. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**, v. 15, n. 3-5, p. 143–148, 1999.

DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; MANZANO-ROMAN, R.; NARANJO, V.; ALMAZAN, C.; PEREZ DE LA LASTRA, J. M.; ZIVKOVIC, Z.; JONGEJAN, F.; KOCAN, K. M. Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. **Genomics**, v. 90, n. 6, p. 712-722, 2007.

DE MENEGHI, D.; STACHURSKI, F.; ADAKAL, H. Experiences in Tick Control by Acaricide in the Traditional Cattle Sector in Zambia and Burkina Faso: Possible Environmental and Public Health Implications. **Frontiers in Public Health**, v. 4, p. 239, 2019.

DE OLIVEIRA, P. R.; CALLIGARIS, I. B.; ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Fluazuron-induced morphophysiological changes in the cuticle formation and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs. **Parasitol Res**, v. 112, p. 45–58, 2013.

DE OLIVEIRA, P. R.; REMÉDIO, R. N.; BECHARA, G. H.; ANHOLETO, L. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in the ovaries and midgut of semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Parasitol Res**, v. 115, p. 829–849, 2016.

DRUMMOND R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.

EL-NIKHELY, N.; HELMY, M.; SAEED, H. M.; SHAMA, L. A.; EL-RAHMAN, Z. A. Ricin A chain from *Ricinus sanguineus*: DNA sequence, structure and toxicity. **The Protein Journal**, v. 26, n. 7, p. 481-489, 2007.

ELLSE, L.; WALL, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: A review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 28, n. 3, p. 233-243, 2014.

FIGUEIREDO, T. F. B.; LIMA, C. J.; FERNANDES, A. B.; ZÂNGARO, R. A.; MENDES, A. L. D. S.; MOREIRA, L. H. Effect of Ozone on Engorged *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) Females during the Pre-Laying Period. **Ozone Science & Engineering**, v. 41, n. 3, p. 286-293, 2018.

GHOSH, S.; TIWARI, S. S.; SRIVASTAVA, S.; SHARMA, A. K.; KUMAR, S.; RAY, D. D.; RAWAT, A. K. Acaricidal properties of *Ricinus communis* leaf extracts against organophosphate and pyrethroids resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 259-267, 2013.

GHOSH, S.; GUPTA, S.; KUMAR, K. A.; SHARMA, A. K.; KUMAR, S.; NAGAR, G.; KUMAR, R.; PAUL, S.; FULAR, A.; CHIGURE, G.; NANDI, A. Characterization and establishment of a reference deltamethrin and cypermethrin resistant tick line (IVRI-IV) of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 138, p. 66-70, 2017.

GOUGH, J. M.; KEMP, D. H. Acid phosphatase in midgut digestive cells in partially fed females of the cattle tick *Boophilus microplus*. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 3, p. 341-349, 1995.

GRANDJEAN, O.; AESCHLIMANN, A. Contribution to the study of digestion in ticks: histology and fine structure of the midgut epithelium of *Ornithodoros moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). **Acta Tropica**, v. 30, n. 4, p. 193-212, 1973.

GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012.

HA, E. M.; LEE, K. A.; SEO, Y. Y.; KIM, S. H.; LIM, J. H.; OH, B. H.; KIM, J.; LEE, W. J. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in *Drosophila* gut. **Nature Immunology**, v. 10, n. 9, p. 949-957, 2009.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases-The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HARRISON, W. F.; FOELIX, R. F., **Microscopic Anatomy of Invertebrates**. Volume 8B, Chelicerata Arthropoda. Wiley-Liss Editors. p. 267-514, 1999

HEMINGWAY, J.; BROGDON, W. **Techniques to Detect Insecticide Resistance Mechanism (field and Laboratory Manual)**. World Health Organization, Geneva (Document WHO/CTD/CPC/MAL/98.6), 1998.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annu. Rev. Entomol.** v. 45, p. 371-391, 2000.

ISLAM, S.; TALUKDER, S.; FERDOUS, J.; HASAN, M. M.; SARKER, Y. A.; SACHI, S.; ALIM, M. A.; SIKDER, M. H. *In-vitro* efficacy of verenda (*Ricinus communis*) leaves extract against ticks in cattle. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v. 16, n. 1, p. 81-86, 2018.

JACKSON, L. S.; TOLLESON, W. H.; CHIRTE, S. J. Thermal Inactivation of Ricin Using Infant Formula as a Food Matrix. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7300- 7304, 2006.

JONSSON, N. N.; MATSCHOSS, A. L.; PEPPER, P.; GREEN, P. E.; ALBRECHT, M. S.; HUNGERFORD, J.; ANSELL, J. Evaluation of TickGARD ^{PLUS}, a novel vaccine

against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. **Veterinary Parasitology**, v. 88, n. 3-4, p. 275-285, 2000.

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

KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; AGNOL, B. D.; PRADEL, E.; SILVA, J.; DE LA CANAL, L. H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M. F.; MANSSON, M.; BARRETO, R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and tick-Borne Disease**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2017.

KODJO, T. A.; GBÉNONCHI, M.; SADATE, A.; KOMI, A.; YAOVI, G.; DIEUDONNE, M.; KOMLA, S. Bio-insecticidal effects of plant extracts and oil emulsions of *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae) on the diamondback, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) under laboratory and semi-field conditions. **Journal of Applied Biosciences**, v. 43, p. 2899-2914, 2011.

KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: Resistance and environmental impact. **Revue Scientifique et Technique**, v. 13, n. 4, p. 1249-1286, 1994.

LAING, G.; ARAGRANDE, M.; CANALI, M.; SAVIC, S.; DE MENECHI, D. Control of Cattle Ticks and Tick-Borne Diseases by Acaricide in Southern Province of Zambia: A Retrospective Evaluation of Animal Health Measures According to Current One Health Concepts. **Frontier in Public Health**, v. 6, p. 45, 2018.

LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; DA SILVA VAZ, I. JR. Perspectives for control of bovine tick. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 1, p. 1-11, 2003.

LINDSEY, C. Y.; PACE-TEMPLETON, J. G.; MILLARD, C. B.; WANNEMACHER, R. W.; HEWETSON, J. F. Validation of ELISA for the determination of anti-ricin immunoglobulin G concentration in mouse sera. **Biologicals**, v. 34, n. 1, p. 33-41, 2006.

LUBELLI, C.; CHATGILIALOGLU, A.; BOLOGNESI, A.; STROCCHI, P.; COLOMBATTI, M.; STIRPE, F. Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immuno- polymerase chain reaction assay. **Analytical Biochemistry**, v. 355, n. 1, p. 102-109, 2006.

MACKINNON, P. J.; ALDERTON, M. R. An investigation of the degradation of the plant toxin, ricin, by sodium hypochlorite. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 287-291, 2000.

MORAES, J.; CAMPOS, E.; LOGULLO, C. Metabolismo Energético durante a Embriogênese do Carrapato Bovino *Rhipicephalus microplus*. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. INCT-EM. Capítulo 3. p. 1-25, 2012.

MUHARSINI, S.; RIDING, G.; PARTOUTOMO, S.; HAMILTON, S.; WILLADSEN, P.; WIJFFELS, G. Identification and characterization of the excreted/secreted serine proteases of larvae of the old-world screwworm fly, *Chrysomya bezziana*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 705-714, 2000.

MULENGA, A.; MISAO, O.; SUGIMOTO, C. Three serine proteinases from midguts of the hard tick *Rhipicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. **Exp. Appl. Acarol**, v. 29, p. 151-164, 2003.

NARASIMHAN, S.; FIKRIG, E. Tick microbiome: The force within. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 7, p. 315-323, 2015.

NTALLI, N.; KOLIOPOULOS, G.; GIATROPOULOS, A.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Plant secondary metabolites against arthropods of medical importance. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 5, p. 1255-1275, 2019.

OLEAGA, A.; OBOLO-MVOULOUGA, P.; MANZANO-ROMÁN, R.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. Midgut proteome of an argasid tick, *Ornithodoros erraticus*: a comparison between unfed and engorged females. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 525, 2015.

OLIVEIRA, Maria Gabriela Rabelo de; CHIERCE. **Estudo da decomposição de sacarose por hidrólise utilizando uma mistura de ésteres derivados do óleo de mamona**. 2005. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

OMOHU, O. J.; OMALE, A. C. Physicochemical Properties and Fatty Acid Composition of Castor Bean *Ricinus communis* L. Seed Oil. **European Biophysics Journal**, v. 5, n. 4, p. 62-65, 2017.

OSTIN, A.; BERGSTRÖM, T.; FREDRIKSSON, S. A.; NILSSON, C. Solvent-assisted trypsin digestion of ricin for forensic identification by LC-ESI MS/MS. **Annals of Chemistry**, v. 79, n. 16, p. 6271-6278, 2007.

PARIZI, L. F.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ, I. JR. Modulação da resposta imune do hospedeiro pelos carrapatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 285-294, 2007.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied**. 4 ed., Churchill: Livingstone., p. 614, 1985.

PFISTER, K.; ARMSTRONG, R. Systemically and cutaneously distributed ectoparasitocides: A review of the efficacy against ticks and fleas on dogs. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 436, 2016.

REMEDI, R.N.; NUNES, P.H.; ANHOLETO, L.A.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological alterations in the synganglion and integument of *Rhipicephalus sanguineus* ticks exposed to aqueous extracts of neem leaves (*Azadirachta indica* A. JUSS). **Microsc Res Tech**, v. 77, p. 989-998, 2014.

REYES, J.; AYALA-CHAVEZ, C.; SHARMA, A.; PHAM, M.; NUSS, A. B.; GULIA-NUSS, M. Blood digestion by trypsin-like serine proteases in the replete Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. **Insects**, v. 11, n. 3, p. 201, 2020.

ROSARIO-CRUZ, R.; ALMAZAN, C.; MILLER, R.J.; DOMINGUEZ-GARCIA, D.I.; HERNANDEZ-ORTIZ, R.; DE LA FUENTE, J. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. **Front Biosci**, v. 14, p. 2657-2665, 2009.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. London: Pharmaceutical Press. p. 917, 2009.

SAMPIERI, B. R.; ARNOSTI, A.; NUNES, P. H.; FURQUIM, K. C.; CHIERICE, G. O.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 5, p. 683-690, 2012.

SAMPIERI, B. R.; FURQUIM, K. C.; NUNES, P. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to castor oil (*Ricinus communis*): an ultrastructural overview. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 611-619, 2013.

SASAKI, S. D.; AZZOLINI, S. S.; HIRATA, I. Y.; ANDREOTTI, R.; TANAKA, A. S. *Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. **Biochimie**, v. 86, n. 9-10, p. 643-649, 2004.

SHEKARI, M.; SENDI, J. J.; ETEBARI, K.; ZIBAEE, A.; SHADPARVAR, A. Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on nutritional physiology and enzyme activities of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Mull. (Coleoptera: Chrysomellidae). **Pesticide Biochem Physiol**, v. 91, p. 66-74, 2008.

SINDHU, Z. U.; JONSSON, N. N.; IQBAL, Z. Syringe test (modified larval immersion test): a new bioassay for testing acaricidal activity of plant extracts against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3-4, p. 362-367, 2012.

SOJKA, D.; FRANTA, Z.; HORN, M.; CAFREY, C. R.; MAREŠ, M.; KOPACEK, P. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. **Trends Parasitol**, v. 29, p. 276–285, 2013.

SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 7046-7063, 2008.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. 2nd edition. Oxford University Press: NY, USA. p. 540, 2014.

TANAKA, A. S.; ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; TORQUATO, R. J.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. A double headed serine proteinase inhibitor-human plasma kallikrein and elastase inhibitor-from *Boophilus microplus* larvae. **Immunopharmacology**, v. 45, n. 1-3, p. 171- 177, 1999.

TARNOWSKI, B. I.; COONS, L. B. Ultrastructure of the midgut and blood meal digestion in the adult tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 6, n. 4, p. 263-289, 1989.

TAYLOR, D. Innate immunity in ticks: a review. **Journal of the Acarological Society of Japan**, v. 15, n. 2, p. 109-127, 2006.

TILL, W. M. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Mem Entomol Soc Southern Africa**, v. 6, p.1-124, 1961.

VILELA, V. L. R.; FEITOSA, T. F.; BEZERRA, R. A.; KLAFKE, G. M.; RIET-CORREA, F. Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. **Ticks and tick-Borne Disease**, v. 11, n. 4, p. 101413, 2020.

WANZALA, W. Potential of Traditional Knowledge of Plants in the Management of Arthropods in Livestock Industry with Focus on (Acari) Ticks. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 8647919, 2017.

WILLADSEN, P.; COBON, G.; MCKENNA, R. V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. **Parasite and Immunology**, v. 18, n. 5, p. 241-246, 1996.

ZAHIR, A. A.; RAHUMAN, A. A.; KAMARAJ, C.; BAGAVAN, A.; ELANGO, G.; SANGARAN, A.; KUMAR, B. S. Laboratory determination of efficacy of indigenous plant extracts for parasites control. **Parasitology Research**, v. 105, n. 2, p. 453-461, 2009.

ZAHIR, A. A.; RAHUMAN, A. A.; BAGAVAN, A.; SANTOSHKUMAR, T.; MOHAMED, R. R.; KAMARAJ, C.; RAJKUMAR, C.; ELANGO, G.; JAYASEELAN, C.; MARIMUTHU, S. Evaluation of botanical extracts against *Haemaphysalis bispinosa* Neumann and *Hippobosca maculata* Leach. **Parasitology Research**, v. 107, n. 3, p. 585-592, 2010.