UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

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

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E MORFOHISTOLOGICA DE COELHAS EXPOSTAS A ACARICIDA OBTIDO A PARTIR DO ÁCIDO RICINOLÉICO DO ÓLEO DE MAMONA

LUÍS FERNANDO SODELLI

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro - 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
NSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

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

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E MORFOHISTOLOGICA DE COELHAS EXPOSTAS A ACARICIDA OBTIDO A PARTIR DO ÁCIDO RICINOLÉICO DO ÓLEO DE MAMONA

LUÍS FERNANDO SODELLI

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo
Co-orientadora: Dra. Karim Christina Furquim Isler

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

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro - 2019

Sodelli, Luís Fernando
S679a Avaliação Bioquímica e Morfohistológica de coelhas expostas a acaricida obtido a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona / Luís Fernando Sodelli. -- Rio Claro, 2019
35 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo

1. Carrapato. 2. Acaricida. 3. Exames de sangue. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA (SANGUE E URINA) E MORFOHISTOLOGICA (FÍGADO) DE COELHAS EXPOSTAS A ACARICIDA OBTIDO A PARTIR DO ÁCIDO RICINOLÉICO DO ÓLEO DE MAMONA

AUTOR: LUIS FERNANDO SODELLI
ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
COORIENTADORA: PATRICIA ROSA DE OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Profa. Dra. RUSLEYD MARIA MAGALHÃES DE ABREU
Centro de Ciências Biológicas e da Natureza / Universidade Federal do Acre

Prof. Dr. MATHEUS MANTUANELLI ROBERTO
x / Fundação Hermínio Ometto, UNIARARAS

Rio Claro, 26 de fevereiro de 2019

Título alterado para: "Avaliação bioquímica e morfohistológica de coelhas expostas a acaricida obtido a partir do ácido ricinoleico do óleo de mamona"

Dedico este trabalho, aos meus filhos Matheus e Laís, por todo apoio e compreensão ao longo dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus pela vitória alcançada, à minha mãe Beatriz, aos meus filhos, Matheus e Laís, pelo apoio incondicional e não poderia deixar de agradecer à Adriana, mãe dos meus filhos e companheira dedicada.

Gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo pela oportunidade, confiança e ajuda sempre na hora certa e agradeço de forma especial e carinhosa à minha co-orientadora Dra. Karim Christina Furquim Isler, à grande amiga Profa. Dra. Solange Rossini de Oliveira responsável pela minha vinda para o campo da pesquisa e a todos os membros e colegas de trabalho do grupo BCSTM – (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) da UNESP de Rio Claro pelo aprendizado e convivência, bem como aos professores do Departamento de Biologia da UNESP Rio Claro, assim como a todo o corpo técnico, em especial ao Gerson e à Mônika e a todos que contribuíram direta ou indiretamente na conquista desta etapa.

Em especial ao parceiro e inestimável amigo de todas as horas Dr. José Ribamar Lima de Souza e aos “filhos do coração” Jeffeson de Oliveira Lima e Michelen Schiavolin que sempre estiveram presentes desde o início dos trabalhos que deram origem a esta dissertação.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu. É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu. É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações. E assim ter amigos em todas as situações”...

(Ana Vilela, trecho da música “Trem Bala”)

Resumo

No presente trabalho verificou-se o efeito dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona, acaricida químico natural pela avaliação dos parâmetros bioquímicos do sangue e da urina e a morfofisiologia do fígado de coelhas, aqui utilizadas como modelo de hospedeiros de carrapatos, alimentadas com ração enriquecida com os referidos ésteres. Os resultados obtidos a partir dos Bioensaios 1 (ração + NaCl) e 2 (ração + ésteres + NaCl) mostraram que os parâmetros clínicos nas análises das enzimas hepáticas fosfatase alcalina (FAT), gama glutamil transferase (GGT) e alanina aminotransferase (ALT) não foram significativamente alterados, exceto para a enzima hepática aspartato aminotransferase (AST) das coelhas do Bioensaio 2, que apresentou maior variância indicando que os ésteres são hepatotóxicos. Os resultados obtidos nas análises das amostras de urina para os parâmetros hemoglobina livre, proteína, bilirrubina e urobilinogênio demonstraram que os índices de referência não foram alterados. Os dados morfohistológicos e histoquímicos do fígado mostraram que as coelhas alimentadas com ração enriquecida tiveram o tecido hepático alterado, o que foi confirmado pela desorganização dos cordões hepáticos, aumento do espaço intercelular, presença de hepatócitos com limites celulares pouco distintos e de núcleos irregulares e picnóticos, geralmente deslocados para a periferia da célula devido a presença de vacúolos. Histoquimicamente detectou-se nas coelhas do Bioensaio 2 redução na presença de lipídeos e aumento dos depósitos de glicogênio. Verificou-se ainda nestas células hepáticas, atividade da fosfatase ácida, provavelmente resultado da toxicidade causada pelos ésteres, com consequente desorganização celular/tecidual do fígado. Assim, os resultados aqui obtidos sinalizaram que os ésteres ofertados às coelhas hospedeiras nas condições experimentais aqui descritas alteraram a morfofisiologia do tecido hepático das mesmas, informações importantes que deverão ser consideradas quando da exposição de hospedeiros de carrapatos a este acaricida.

Palavras chave: éster do ácido ricinoléico, enzimas hepáticas, morfofisiologia, carrapatos

Abstract

The present study verified the effects of castor oil ricinoleic acid, a natural chemical acaricide, on the clinical blood and urine parameters and on the liver morphophysiology of female rabbits (used as a model of tick hosts) fed with commercial food enriched with castor oil esters. Bioassays 1 (commercial food + NaCl) and 2 (food + esters + NaCl) demonstrated that the clinical parameters of the hepatic enzyme alkaline phosphatase (FAT), gamma glutamyl transferase (GGT) and alanine aminotransferase (ALT) were not significantly altered, except for the hepatic enzyme aspartate aminotransferase (AST) of the rabbits belonging to Bioassay 2, which presented greater variability, indicating that the esters are hepatotoxic. The analyses of the urine samples for the parameters free hemoglobin, protein, bilirubin and urobilinogen demonstrated that the esters were not toxic to the female rabbits. The morphohistological and histochemical data showed that the rabbits fed with enriched food had the hepatic tissue altered, which was confirmed by the disorganization of the hepatic cords, enlargement of the intercellular space, presence of hepatocytes with little evident limits and irregular and pyknotic nuclei, mostly dislocated to the cell periphery due to the presence of vacuoles. Histochemically, the female rabbits of Bioassay 2 presented a decrease in the number of lipids and increased amount of glycogen. In addition, the hepatic cells of these rabbits showed activity of acid phosphatase, probably the result of the toxicity caused by the esters, with consequent disorganization of the liver cells and tissues. Thus, the results provided by the present study signalize that the esters offered to the host rabbits under the experimental conditions described herein altered the morphophysiology of the hepatic tissue, important information regarding the exposure of tick hosts to this acaricide.

Key words: ricinoleic acid ester, hepatic enzymes, morphophysiology, ticks

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 5
2.1. Geral 5
2.2. Específicos 5
3. MATERIAL E MÉTODOS 6
3.1. Locais de realização dos estudos 6
3.2. Obtenção dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) 6
3.3. Obtenção da ração fornecida às coelhas 6
3.4. Hospedeiras 8
3.5. Delineamento experimental 8
3.6. Análises bioquímicas 8
3.6.1. Obtenção das amostras de sangue 12
3.6.2. Dosagem das enzimas hepáticas (sangue) 12
3.6.3. Obtenção das amostras de urina 12
3.6.4. Dosagem dos analitos 12
3.7. Análise estatística 12
3.8. Análises morfológicas 13
3.8.1. Obtenção das amostras de fígado 13
3.8.2. Histologia 13
3.8.3. Histoquímica 14
3.8.4. Citoquímica 15
4. RESULTADOS 16
4.1. Análise dos parâmetros do sangue 16
4.2. Análise dos parâmetros da urina 19
4.3. Análises histológica e histoquímicas 19
4.3.1. Bioensaio 1 19
4.3.2. Bioensaio 2 20
5. DISCUSSÃO 24
6. CONCLUSÃO 28
7. REFERÊNCIAS 29

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes de interesse médico veterinário, visto serem hematófagos e estarem amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais (DANTAS-TORRES, 2010; DANTAS-TORRES, OTRANTO, 2015; NAVA et al., 2014). No início do século XX, no Brasil, os carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu (l.s.), encontravam-se distribuídos geograficamente em alguns estados como Goiás, Bahia, Maranhão, Sergipe, Pará, Minas Gerais, Mato Grosso (ARAGÃO, 1911, 1936, MORAES-FILHO et al., 2011). No entanto, ao longo dos anos essa distribuição foi se ampliando, estendendo-se para praticamente todo o território nacional, especialmente nas áreas urbanas (PEREIRA, 2008; LABRUNA, 2004). Isso deveu-se também aos novos hábitos das famílias em abrigarem nas suas residências animais pet, principalmente cães (hospedeiro preferencial de *R. sanguineus* l. s.) e gatos. De origem africana, o *R. sanguineus* l.s. é popularmente conhecido como carrapato-do-cão, tendo sido introduzido no continente americano juntamente com os cães domésticos oriundos da colonização europeia (GUGLIELMONE et al., 2003; LABRUNA, 2001, 2004). Muito embora o parasitismo em humanos não seja comum, o *R. sanguineus* l. s. já foi encontrado parasitando pessoas, inclusive no Brasil (DANTAS- TORRES et al., 2006).

Durante o seu processo de alimentação, além da espoliação e injúria causadas nos hospedeiros, os carrapatos são ainda potenciais transmissores de patógenos como: protozoários, vírus e bactérias para diferentes grupos de animais principalmente aos seus hospedeiros, causando nestes várias doenças (REY, et al., 1973; KAUFMAN, 2010, BARBOSA SILVA et al., 2017; CONTRERAS, M; DE LA FUENTE, 2016; COSTA et al., 2017). Dentre esses patógenos podem ser citados: *Coxiella burnetii, Ehrlichia canis, Hepatozoon canis, Rickettsia conorii, R. rickettsii* (ANDREOTTI, KOLLER, 2013; DANTAS-TORRES, OTRANTO, 2015; ARAUJO et al., 2015a) e a *Leishmania infantum*, esta última agente etiológico da Leishmaniose Visceral (COUTINHO et al., 2010).

Sob essa perspectiva e ainda considerando os grandes prejuízos econômicos que esses ectoparasitas causam de modo geral, há a necessidade de que um eficaz controle dos mesmos seja realizado. Para que esse controle seja eficiente, alguns parâmetros biológicos precisam ser observados, principalmente aqueles que se

referem ao ciclo biológico do ectoparasita, o qual pode variar de espécie para espécie. São conhecidas espécies de carrapatos monoxênicas, ou seja, que necessitam de apenas um hospedeiro e aquelas heteroxênicas as quais necessitam de mais de um hospedeiro para poderem se alimentar e assim completar o seu ciclo de vida (FORTES, 1993).

Atualmente, o controle de carrapatos vem sendo realizado por meio da aplicação de substâncias químicas com potencial acaricida, as quais podem ser de origem natural ou sintética, muito embora as bases químicas sintéticas sejam aquelas que vem liderado o mercado veterinário. Há ainda que se levar em consideração o fato de que para que um acaricida seja de fato eficiente, precisa-se saber em que estágio de vida do carrapato (específico de cada espécie), ele deverá ser aplicado: larva, ninfa ou adulto, além de ser necessário saber em qual estágio de alimentação o mesmo se encontra: em jejum, em processo de alimentação (semi-ingurgitado) e completamente alimentado (ingurgitado) (CAMARGO-MATHIAS, 2013), para que haja sucesso no controle.

O uso específico de acaricidas químicos sintéticos no controle dos carrapatos, segundo dados registrados na literatura, datam de 1950, com resultados que foram eficientes, porém, gerando problemas, inclusive referentes a aquisição de resistência aos químicos. A utilização de acaricidas, seja ele de que natureza for, demanda certos cuidados, tais como a aplicação da dose correta seguindo as indicações do fabricante, do preparo das soluções, quando for o caso (correta homogeneização) e da aplicação do químico no hospedeiro, a qual deve ocorrer de forma uniforme e, novamente, sempre seguindo as orientações do fabricante do produto (RADOSTITS et al., 2002; ANGELO; BITTENCOURT, 2014).

Na literatura pertinente, existem registros que mostram que os acaricidas químicos sintéticos disponíveis no mercado são aqueles de bases: arsenicais, organocloradas, organofosforadas, carbamatos, piretróides, avermectinas, formamidinas e piretróides (HAUSERMAN et al., 1992) entre outras (LEAL et al., 2003). Apesar de terem sua eficiência comprovada, sabe-se que os mesmos causam danos ao meio ambiente e à saúde pública, por meio da contaminação de corpos d’agua, dos animais e inclusive do solo, deixando nestes, resíduos tóxicos. Segundo os registros disponíveis sabe-se que centenas de litros residuais de acaricidas

químicos sintéticos são gerados anualmente, inclusive resultantes de um descarte inadequado realizado pelo usuário, o qual frequentemente desconhece as normas e boas práticas de uso (MARTHE et al., 2010). Considere-se ainda o fato de que, em animais de importância econômica (caso do gado de corte), a infestação por carrapatos provoca nos seus produtos (carne, couro, leite) não só o acúmulo dos resíduos tóxicos, mas também danos que impedem a utilização dos mesmos de forma mais otimizada, como é o caso do couro (BIEGELMEYER et al., 2012; CAMARGO et al., 2014).

Diante desse cenário, fica clara a urgente necessidade de se buscar novas estratégias de controle de carrapatos, que façam uso de métodos que proporcionem maiores margens de segurança para os organismos não alvos (hospedeiros), bem como para o meio ambiente. Sob essa perspectiva o uso de extratos e de óleos vegetais como acaricidas têm despertado o interesse sanitário e econômico, visto serem estes naturais e mais facilmente biodegradáveis (MORALES; GARCÍA, 2000; ROEL, 2001; IANNACONE; LAMAS, 2002; VATSYA et al., 2006; ÁLVAREZ et al., 2008; BORGES, 2011; CATTO, 2013). Atualmente vêm sendo testados vários compostos os quais podem se tornar, num futuro próximo, viáveis para comercialização (KRISS et al., 2012; VALENTE, 2014), como por exemplo os ésteres derivados do ácido ricinoléico do óleo de “mamona” (*Ricinus communis*) que comprovadamente é um potente acaricida (ARNOSTI et al., 2011a, 20011b; SAMPIERI et al., 2012, 2013a, 20013b,2015, CAMARGO-MATHIAS, 2018). Estes ésteres mostraram ser efetivos no combate dos carrapatos, uma vez que alteraram a morfologia e, consequentemente, a fisiologia de importantes órgãos relacionados à alimentação, caso das glândulas salivares, e à reprodução, caso dos ovários, responsáveis pela produção dos ovócitos e consequentemente das células que darão origem aos novos indivíduos. Os trabalhos que foram desenvolvidos até agora forneceram resultados que mostraram que os ésteres agiram diminuindo as taxas reprodutivas e alterando a dinâmica da vitelogênese, o que por sua vez inibiu a produção de novos ectoparasitas (ARNOSTI et al., 2011 b; SAMPIERI et al., 2012). Ainda segundo a literatura, os ésteres, eficientes no controle dos carrapatos, ainda teriam a vantagem de não provocar nos hospedeiros danos que pudessem interferir na sua biologia (ARNOSTI et al., 2011 b), tendo inclusive sido demonstrado em alguns estudos em laboratório que quando coelhos hospedeiros de carrapatos *R. sanguineus*

foram alimentados com ração enriquecida com esses bioativos, os mesmos não apresentaram alteração nem no aspecto externo e nem no seu comportamento e aumentaram de peso durante o experimento (SAMPIERI et al., 2012, 2013 a, 2013b, 2015). No entanto, não se tem registro ainda na literatura do desenvolvimento de trabalhos que tenham comprovado se estes ésteres alterariam a morfofisiologia dos órgãos internos dos vertebrados (hospedeiros), como por exemplo do fígado, principal órgão responsável pelas rotas metabólicas dos processos de desintoxicação.

Diante desse cenário e sob a perspectiva de num futuro próximo os ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona (*R. communis*) poderem ser utilizados como uma estratégia de controle de carrapatos eficiente de importância econômica mais sustentável, o presente estudo teve como objetivo avaliar bioquímica (sangue e urina) e morfofisiologicamente (fígado) como esses ésteres agiriam nas coelhas que, no caso, estariam representando os modelos hospedeiros de carrapatos em laboratório, informações essas importantes para corroborar a indicação do seu uso no controle de ectoparasitas da espécie *R. sanguineus* l. s..

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

O presente estudo teve como objetivo investigar a ação dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona, usado como acaricida contra carrapatos do cão (*Rhipicephalus sanguineus* l. s.) sobre os parâmetros bioquímicos do sangue e da urina e sobre a morfofisiologia do fígado de coelhas, usadas como modelos biológicos hospedeiros, uma vez que a literatura dispõe de alguns dados que afirmam que esses ésteres não seriam prejudiciais aos hospedeiros de carrapatos.

2.2. Específicos:

- realizar a análise bioquímica dos parâmetros do sangue e da urina dosando as enzimas: fosfatase alcalina, GGT (gama-glutamil transferase), ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) (sangue) e os analitos: proteínas totais, corpos cetônicos, urobilinogênio e hemoglobina livre (urina), verificando assim a ocorrência (ou não) de alteração nos índices de referência, bem como no caso de ter havido alteração se esta interferiu no desempenho do órgão.

- realizar a análise morfofisiológica, citoquímica e histoquímica do fígado, para a obtenção de dados mostrando se a exposição aos ésteres traria algum prejuízo interno para o hospedeiro de *R. sanguineus* l. s..

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais de realização dos estudos

Para a realização deste trabalho foram utilizados os equipamentos disponíveis nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia e do Biotério do Instituto de Biociências (IB) – UNESP, Rio Claro, SP. Nesta instituição está implantada a *Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology* (BCSTM), onde são mantidas colônias de carrapatos, sob a coordenação da Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo.

3.2. Obtenção dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*)

Os ésteres foram produzidos e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice USP - São Carlos, SP, Brasil.

3.3. Obtenção da ração fornecida às coelhas

Para desenvolvimento do presente estudo foram realizados dois Bioensaios (1 e 2), onde no primeiro foi oferecido como alimento às coelhas ração comercial da marca Bandeirante estabilizada com NaCl e no segundo as coelhas foram alimentadas com a mesma ração comercial porém enriquecida com ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona, além do NaCl (Fig. 1). No Bioensaio 1 a ração oferecida foi processada a partir de 20 quilos de ração comercial que foram triturados e posteriormente homogenizados com NaCl. No Bioensaio 2, 20 quilos da ração comercial (Fig. 1A) foram triturados (Fig. 1B) e posteriormente homogenizados com os ésteres (Fig. 1C) na proporção de 5g de ésteres/Kg de ração (SAMPIERI et al., 2015), além da adição do NaCl.

Após, realizou-se a repeletização da ração a ser utilizada em ambos os Bioensaios, em peletizadora extrusora específica para ração (Engmaq) (Fig. 1D). Na sequência, procedeu-se com a secagem em estufa da ração peletizada (Figs. 1E-F) instalada nas dependências do Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu (SP), Brasil, sob a supervisão da Profa. Dra. Carla dos Santos Riccardi.

Figura 1

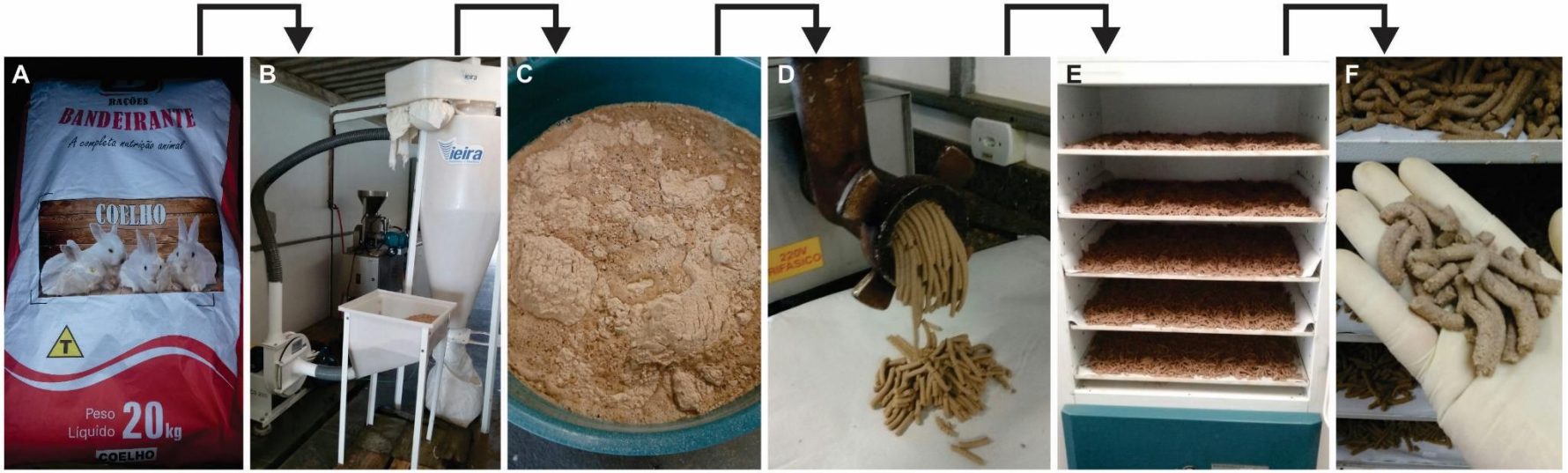


Figura 1: A= ração comercial; **B**= moinho; **C**= pó de ração onde foi adicionado o éster estabilizado com NaCl; **D**=peletizadora extrusora; **E=** estufa para secagem da ração repeletiza; **F=** ração repeletizada pronto para o uso.

3.4. Hospedeiras

Foram utilizadas quatro coelhas saudáveis, com dois meses de idade, do Grupo Genético Botucatu, pesando de 3 a 3.5 Kg, as quais não tiveram contato prévio com carrapatos ou com carrapaticidas, adquiridas do Biotério da UNESP/Botucatu, SP, Brasil. As mesmas foram acondicionadas por 15 dias em gaiolas individuais de arame galvanizado, para adaptação, sob temperatura (22°C +/- 2°) e fotoperíodos (14 horas claro e 10 horas escuro) controlados, recebendo água e ração. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil, certificado nº 14/2017.

3.5. Delineamento experimental

Para o desenvolvimento dos experimentos foram utilizadas duas coelhas hospedeiras por Bioensaio:

- Bioensaio 1: as coelhas receberam diariamente, durante 60 dias, 140g de ração comercial repeletizada sem a adição dos ésteres e com a adição de NaCl.

- Bioensaio 2: as coelhas receberam diariamente durante 60 dias, 140g de ração comercial repeletizada com a adição dos ésteres, bem como de NaCl.

3.6. Análises bioquímicas

Foram testadas amostras de sangue (Figs. 2, 3) e de urina (Fig. 4) colhidas nos tempos 0 (T= 0 a partir dos 15 dias de adaptação), 15, 30, 45 e 60 dias.

As amostras de sangue foram avaliadas em duas análises distintas. Na análise 1 as amostras foram coletadas nos tempos acima estabelecidos e imediatamente analisadas (Fig. 2). Na análise 2 as amostras foram coletadas nos períodos acima determinados e congeladas, para serem posteriormente analisadas em um único evento, após o término dos bioensaios (60 dias) (Fig. 3).

FIGURA 2

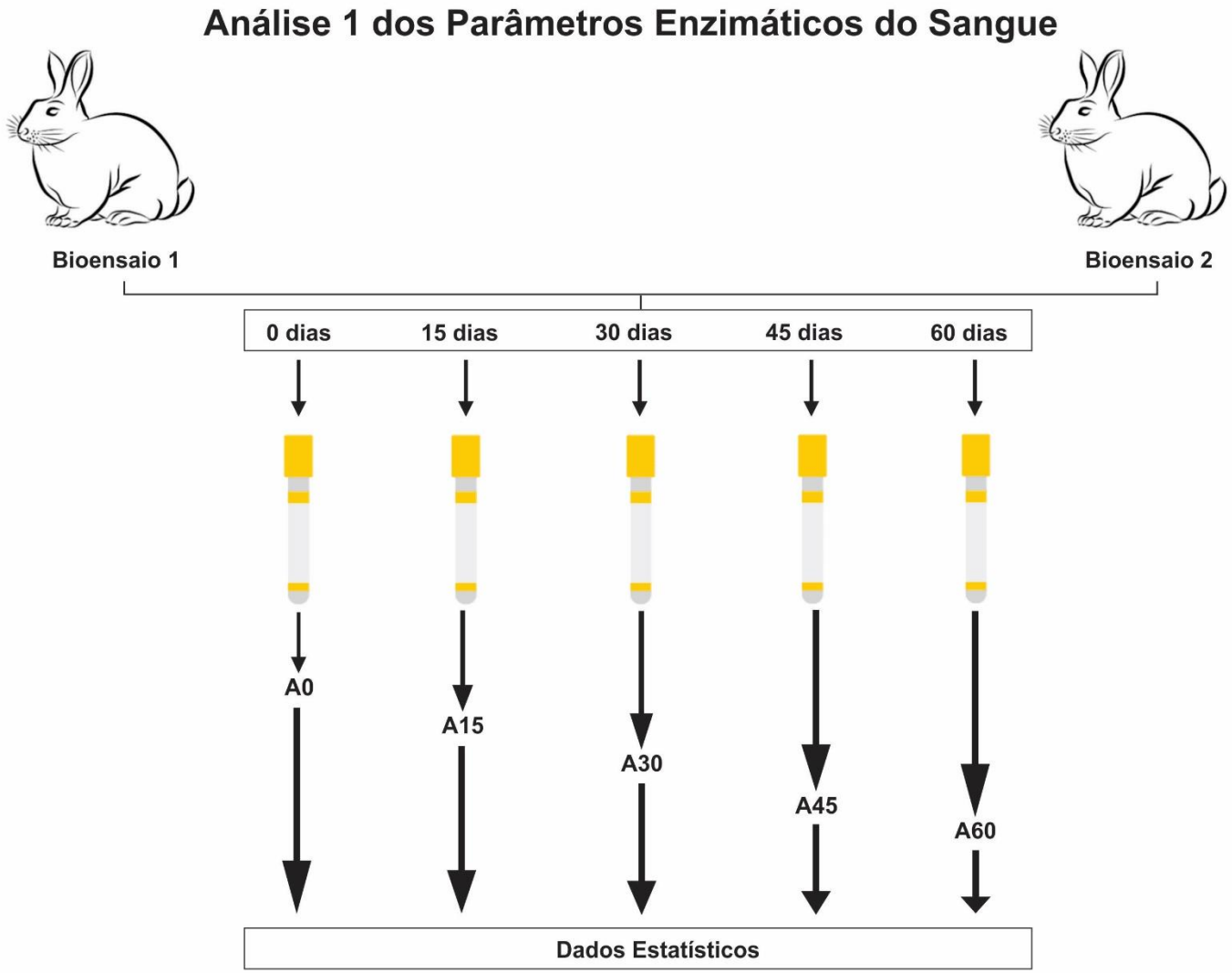


Figura 2: Após as coletas de sangue nos períodos necessários realizou-se a análise bioquímica das amostras de soro nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 dias. **A0=** coleta e análise no início dos Bioensaios; **A15=** 15 dias após o início dos Bioensaios; **A30=** 30 dias após o início dos Bioensaios; **AE45=**45dias após o início dos Bioensaios; **A60=**60 dias após o início dos Bioensaios.

FIGURA 3

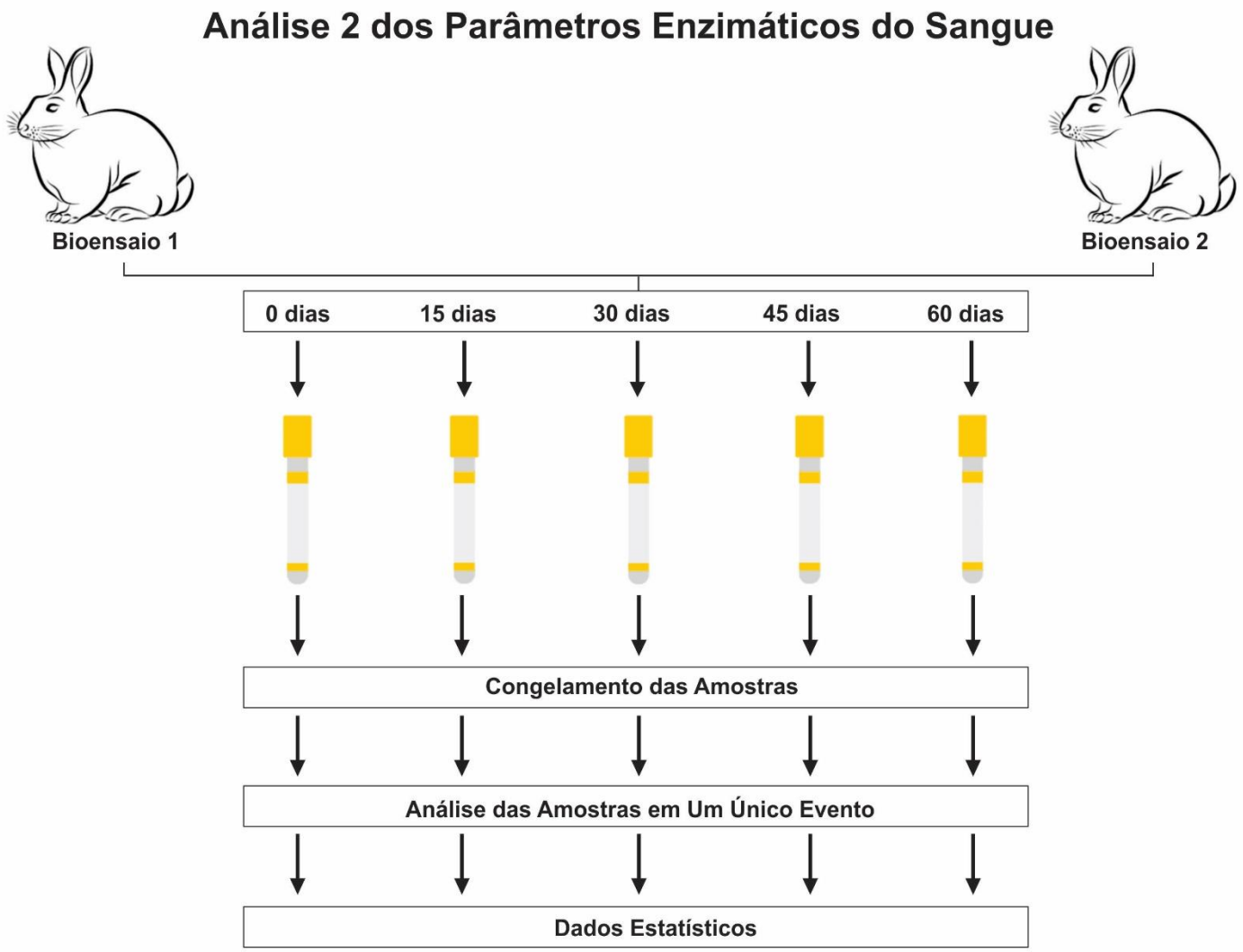


Figura 3: Após as coletas das amostras de sangue nos diferentes tempos estas foram congeladas para serem analisadas bioquimicamente em um único evento, o que ocorreu 60 dias após o início dos Bioensaios.

FIGURA 4

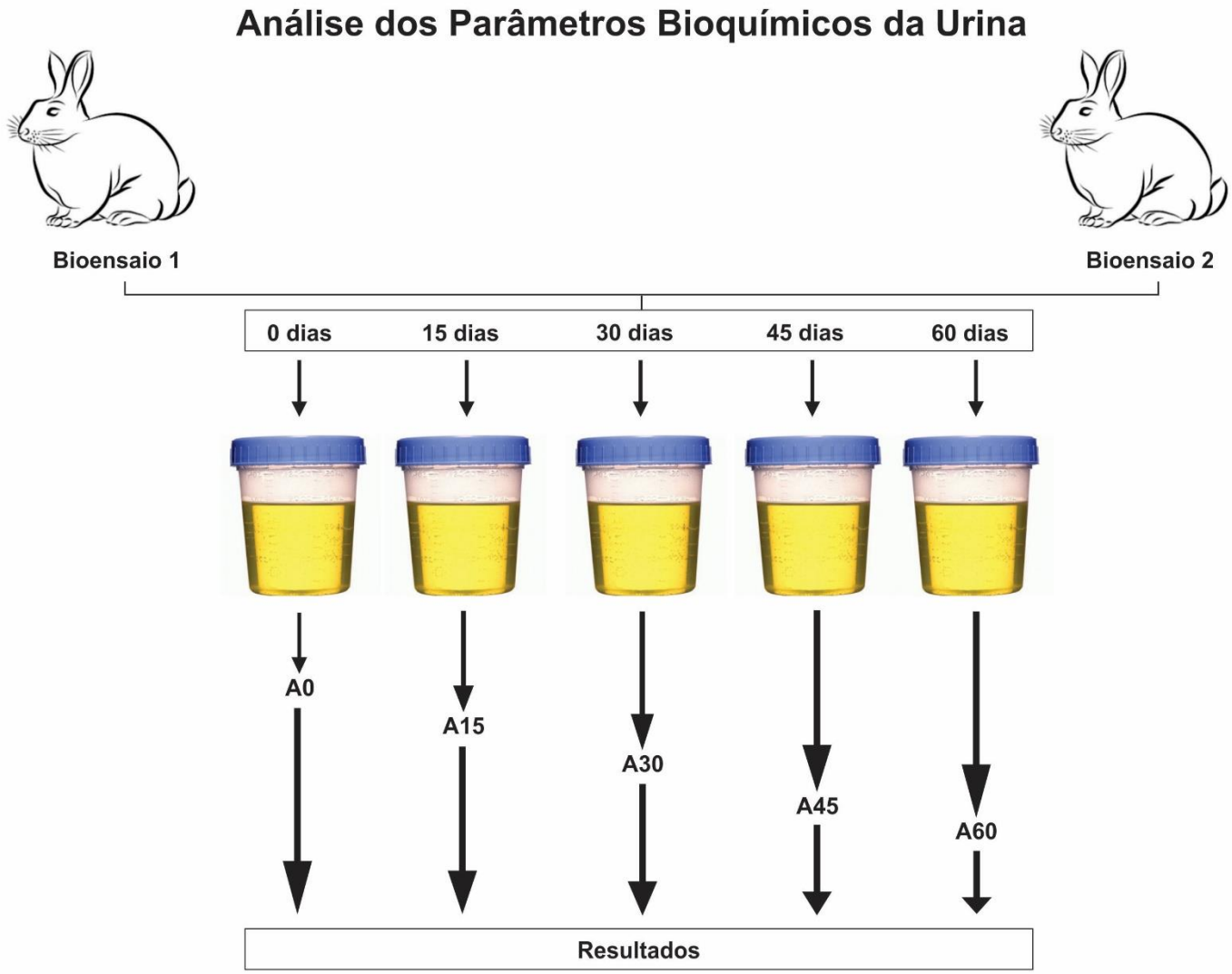


Figura 4: Após as coletas da urina nos diferentes tempos realizou-se a análise bioquímica. **A0=** coleta e análise no início dos Bioensaios; **A15=** 15 dias após o início dos Bioensaios; **A30=** 30 dias após o início dos Bioensaios; **AE45=**45dias após o início dos Bioensaios; **A60=**60 dias após o início dos Bioensaios.

3.6.1. Obtenção das amostras de sangue

Foram coletados 2 mL de sangue via punção jugular das coelhas, com auxílio de seringa de 3 mL e agulha 25x8 (estéreis), que foram acondicionados em tubo seco Vacuntainer com gel separador de soro.

3.6.2. Dosagem das enzimas hepáticas (sangue)

Foram dosadas alanina aminotransferase (ALT) (enzima encontrada no citoplasma dos hepatócitos), aspartato aminotransferase (AST) (enzima encontrada nas mitocôndrias das células do fígado), gama-glutamil transferase (GGT) (enzimas hepáticas presentes em maior quantidade nas células do fígado e dos ductos biliares), fosfatase alcalina (FAL) (presente principalmente no fígado e ductos biliares, mas também pode ser encontrada nas células dos rins, intestinos, pâncreas e baço) utilizando-se o aparelho BIOPLUS (analisador multiparamétrico semi-automático de ensaios colorimétricos e enzimáticos para bioquímica) e “kits” BIOLAB (seguindo instruções do fabricante), nas dependências do Laboratório de Análises Clínicas, das Faculdades Integradas Einstein de Limeira, Limeira-SP, sob responsabilidade técnica Luís Fernando Sodelli (CRBM nº 4.099).

3.6.3. Obtenção das amostras de urina

A urina foi obtida por meio da colocação de saco plástico estéril forrando o fundo da gaiola. Na sequência, com o auxílio de seringa de 5mL a mesma foi coletada e transferida para tubos Falcon.

3.6.4. Dosagem dos analitos

Realizou-se na urina a análise de: proteínas, urobilinogênio, bilirrubina e corpos cetônicos de acordo com a metodologia da fita reativa para urina, (URITEST®) e seguindo as especificações do fabricante, em sala de experimentação alocada no Biotério do Departamento de Biologia do IB/UNESP/Rio Claro, SP.

3.7. Análise estatística

Todos os dados obtidos a partir da avaliação dos parâmetros bioquímicos das coelhas tanto do Bioensaio 1 quanto do 2, foram analisados estatisticamente através da aplicação da Análise de Variância Unifatorial (Analysis of Variance, one-way ANOVA) para cada um dos parâmetros aqui estabelecidos. O teste de Dunnet foi

utilizado para comparar os resultados obtidos entre os dois Bioensaios, pelo software Statistica10 (StatSoft, 2011) (MC HUGH, 2011; KIM, 2015; MIRANDA., 2018).

3.8. Análises morfológicas

3.8.1. Obtenção das amostras de fígado

Depois de completados os 60 dias estabelecidos para a realização do experimento, na sala do Biotério do Departamento de Biologia do IB/UNESP/Rio Claro, SP, realizou-se a eutanásia das coelhas (médica veterinária Dra. Letícia Maria Graballos Ferraz Hebling, CRMV nº 5.412) com ketamina e xilazina aplicada via intraperitoneal nas dosagens de 300 mg/kg e 30 mg/kg respectivamente. A seguir procedeu-se a coleta dos fragmentos do fígado (0,3 a 0,5 cm) destas.

3.8.2. Histologia

- Coloração pela hematoxilina de Harris-eosina aquosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Depois de coletados, os fragmentos do fígado foram fixados em paraformaldeído 4% por 72 horas a 4º C. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na_2HPO_4 2,38 g/L e KH_2PO_4 2,72 g/L) onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em historesina Leica por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit®). Após, os blocos foram seccionados (3 µm) em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) e as secções foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As secções foram reidratadas por 1 minuto em água destilada e, em seguida, coradas pela hematoxilina de Harris durante oito minutos. Depois de lavadas por três minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa por cinco minutos e novamente lavadas em água corrente. Após secagem em suportes de madeira à temperatura ambiente, foram mergulhadas em xilol e cobertas com bálsamo do Canadá e lamínula. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no laboratório de histologia do Biotério do Departamento de Biologia do IB/UNESP/Rio Claro, SP.

3.8.3. Histoquímica

- Técnica do PAS (ácido periódico-Schiff) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Para a detecção de polissacarídeos neutros no fígado, fragmentos do órgão foram fixados em mistura aquosa de Bouin por cinco dias. Depois foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%) em banhos de 30 minutos cada. Na sequência, foram embebidos em historesina Leica por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit). Após, os blocos foram seccionados (3 µm) em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) e as secções recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As secções 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. Foram lavadas por 30 minutos em água corrente, secas à temperatura ambiente e montadas em bálsamo do Canadá. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no laboratório de histologia do Biotério do Departamento de Biologia do IB/UNESP/Rio Claro, SP.

- Técnica do azul de bromofenol (PEARSE, 1985)

Para detecção de proteínas totais, fragmentos de fígado foram fixados em paraformaldeído 4% por 48 horas. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na_2HPO_4 2,38 g/L e KH_2PO_4 2,72 g/L) onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em historesina Leica por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit®). Após esse processo, os blocos foram seccionados (3 µm) em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) e as secções foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas para posterior coloração pelo azul de bromofenol, por uma hora, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com ácido acético 0,5% por 5 minutos e com água corrente por 15 minutos, as mesmas passaram rapidamente pela solução de álcool butílico terciário. A seguir, foram secas ao ar livre, diafanizadas e montadas em bálsamo do Canadá. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no laboratório de histologia do Biotério do Departamento de Biologia do IB/UNESP/Rio Claro, SP.

3.8.4. Citoquímica

- Detecção da atividade da enzima fosfatase ácida (HUSSEIN et al., 1990)

Fragmentos de fígado foram fixados em formalina neutra tamponada 10% (pH 7.4), durante 1 hora e 30 minutos, a 4ºC. Posteriormente foram lavados em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 4,8) e incubados por 45 minutos a 37°C em: naftol AS-TR fosfato, DMSO (dimetil sulfóxido), tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 4,8), MnCl2.4H2O 10% e sal vermelho violeta. Para o preparo do meio de incubação foram dissolvidos 3 mg do substrato naftol AS-TR fosfato em duas gotas de DMSO e, em seguida, adicionados 10 mL de tampão acetato de sódio. Então foi acrescentado 0,2 mL de cloreto de manganês 10%. Essa solução foi misturada delicadamente e adicionada em outro recipiente contendo 6 mg do sal vermelho violeta. Finalmente a solução foi delicadamente agitada, para evitar a formação de precipitado. O controle da técnica foi realizado excluindo-se o substrato (3 mg de naphtol AS-TR fosfato) do meio de incubação. Após a incubação, os materiais foram lavados em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 4,8), desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (30 minutos cada), embebidos em historesina Leica por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador. Após, os blocos foram seccionados em micrótomo Leica RM2265 (Leica®) (7 µm de espessura) e as secções foram coradas com hematoxilina de Harris por 8 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram secas ao ar livre, diafanizadas e montadas em bálsamo do Canadá, para posterior documentação fotográfica em microscópio de campo claro Leica DM750 (Leica®) no laboratório de histologia do Biotério do Departamento de Biologia do IB/UNESP/Rio Claro, SP.

4. Resultados

4.1. Análise dos parâmetros do sangue

Os dados aqui obtidos das amostras de sangue dos Bioensaios 1 e 2 estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Dados estatísticos descritivos dos valores das enzimas hepáticas obtidos das coelhas dos Bioensaios 1 e 2 com média, mínimo, máximo, variância e desvio-padrão (DP) para os parâmetros enzimáticos.

Enzima	Média	Mínimo	Máximo	Variância	DP
FAL1	9,10	8,00	10,00	0,73	0,85
GGT1	7,95	6,00	9,00	0,79	0,89
ALT1	45,60	42,00	49,00	3,31	1,82
AST1	22,80	17,00	28,00	9,33	3,05
FAL2	9,00	8,00	10,00	0,63	0,79
GGT2	8,10	7,00	9,00	0,62	0,79
ALT2	44,85	44,00	46,00	0,66	0,81
AST2	23,75	22,00	26,00	1,46	1,21

FAL= fosfatase alcalina, GGT= gama glutamil transferase, ALT= alanina aminotransferase e AST= aspartato aminotransferase; FAL1, GGT1, ALT1 e AST1 = análise bioquímica 1; FAL2, GGT2, ALT2 e AST2 = análise bioquímica 2.

Segundo o teste ANOVA, não foi verificada a ocorrência de diferença significativa entre os parâmetros enzimáticos FAL, GGT e ALT, entre os indivíduos dos Bioensaios 1 e 2. No parâmetro enzimático AST observou-se diferença significativa para os indivíduos do Bioensaio 2 quando comparados aos do 1. Os valores de *p* obtidos da aplicação dos testes de Dunnet mostraram que não houve diferença significativa entre os indivíduos dos Bioensaios 1 e 2 para as enzimas FAL, GGT e ALT, porém foi observada diferença significativa para a enzima AST dos indivíduos do Bioensaio 2 (Tabela 2; Fig. 5).

Tabela 2: Análise estatística dos parâmetros enzimáticos (testes de Dunnet) a partir dos dados obtidos dos indivíduos dos Bioensaios 1 e 2.

Enzima	Bioensaio 2	Teste de Dunnet (*p*) Bioensaio 1	
		Δ1	Δ2
FAL1	Δ1	0,11	0,29
	Δ2	0,22	0,47
GGT1	Δ1	0,44	0,02
	Δ2	0,68	0,62
ALT1	Δ1	1,00	0,75
	Δ2	0,73	1,00
AST1	Δ1	1,00	<0,001*
	Δ2	0,02*	0,02*
FAL2	Δ1	1,00	0,68
	Δ2	0,68	1,00
GGT2	Δ1	0,68	1,00
	Δ2	0,68	1,00
ALT2	Δ1	1,00	0,91
	Δ2	0,68	0,46
AST2	Δ1	0,94	0,07
	Δ2	0,05*	0,74

Δ1 (coelha 1); Δ2 (coelha 2); fosfatase alcalina (**FAL**), gama glutamil transferase (**GGT**), alanina aminotransferase (**ALT**) e aspartato aminotransferase (**AST**).

* indica $p < 0,05$.

FIGURA 5

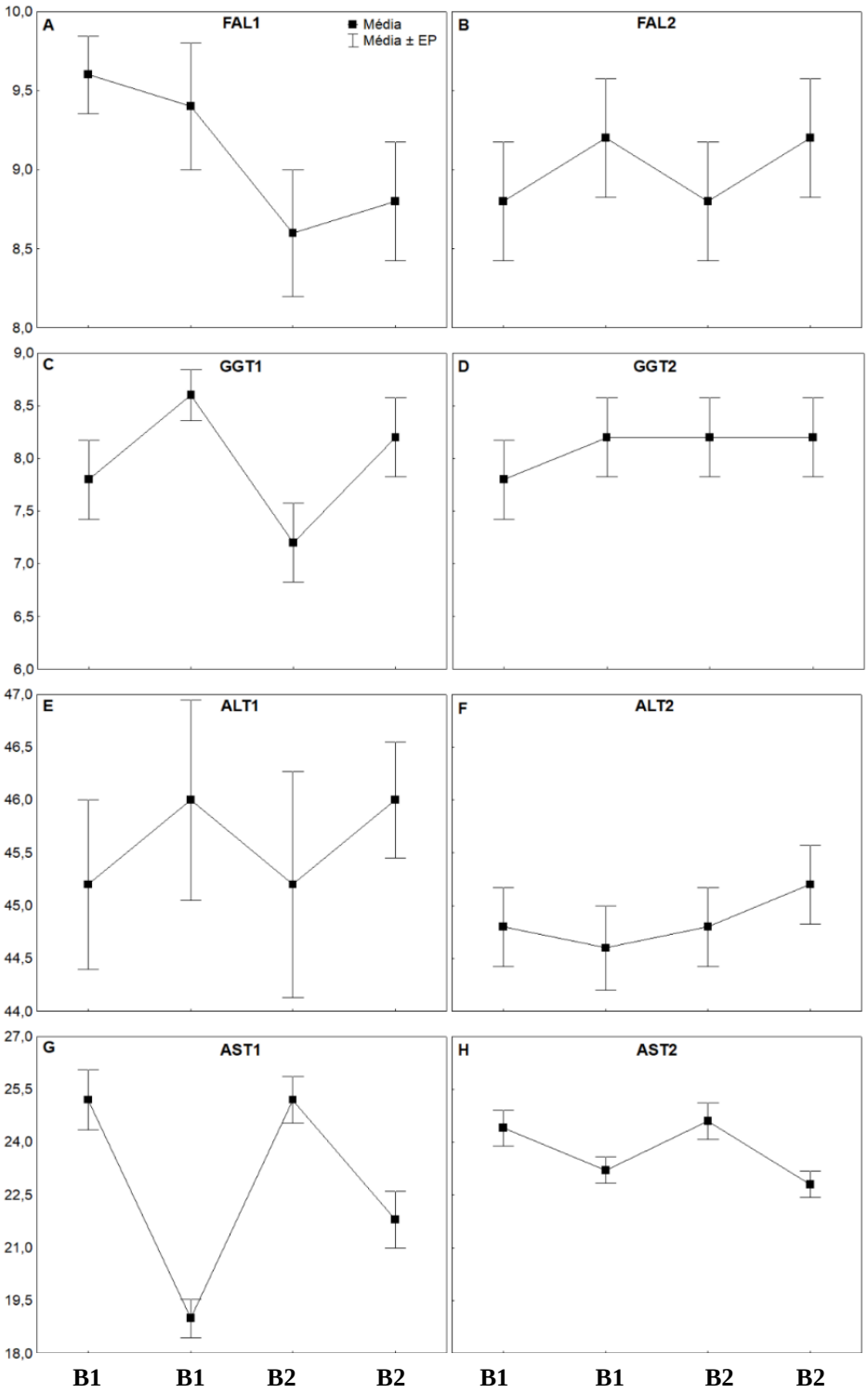


Figura 5: Gráfico mostrando resultados das análises dos parâmetros enzimáticos do sangue das coelhas de ambos os Bioensaios analisados estatisticamente. **A, C, E, G.** Análise 1. **B, D, F, H.** Análise 2.

(**FAL**) fosfatase alcalina; (**GGT**) gama glutamil transferase; (**ALT**) alanina aminotransferase; (**AST**) aspartato aminotransferase; (**valor do eixo Y**) dosagens enzimáticas quantitativas; (**B1**) Bioensaio 1; (**B2**) Bioensaio 2.

4.2. Análise dos parâmetros da urina

Os resultados obtidos a partir da realização da análise da urina das coelhas dos Bioensaios 1 e 2 demonstraram a ausência dos analitos: hemoglobina livre, proteínas, bilirrubina e urobilinogênio (Tabela 3).

Tabela 3: Análise da presença (**+**)/ausência (**-**) dos analitos hemoglobina livre, proteínas, bilirrubina e urobilinogênio dosados na urina de coelhas dos Bioensaios 1 e 2.

	Indivíduos Analisados	
Parâmetros	**Bioensaio 1**	**Bioensaio 2**
hemoglobina livre	**-**	**-**
proteínas	**-**	**-**
bilirrubina	**-**	**-**
urobilinogênio	**-**	**-**

4.3. Análises histológica e histoquímicas

4.3.1. Bioensaio 1

Os resultados histológico e histoquímicos obtidos demonstraram que para esses indivíduos a histologia do órgão manteve-se preservada (Figs. 6B-C), uma vez que os hepatócitos apresentaram-se distribuídos em cordões regulares e com morfologia íntegra, ou seja, células cúbicas, apresentando um ou dois núcleos arredondados com cromatina dispersa e nucléolos íntegros (Fig. 6C), os quais também estavam com sua morfologia preservada. As células de Kupffer, foram observadas por entre os cordões hepáticos e mostraram seus núcleos alongados e com aspecto íntegro (Fig. 6C).

Os resultados dos testes histoquímicos para detecção de proteínas totais, bem como de polissacarídeos neutros, também deixaram claro que não houve alterações

no tecido, e nem nas células (Figs. 6F-G, J-K). A vacuolização citoplasmática nos hepatócitos, evidentes na Figura 6G, onde foi aplicado o teste para detecção de proteínas totais (azul de bromofenol), mostrou espaços que provavelmente estariam representando locais onde haveria um acúmulo de gotículas lipídicas, as quais não puderam ser aqui evidenciadas em virtude da especificidade da técnica (que não evidencia lipídeos). O glicogênio, polissacarídeo que é armazenado no fígado, foi observado distribuído no citoplasma dos hepatócitos, preferencialmente localizados na periferia dos mesmos (Fig. 6K) e sob a forma de fina granulação.

A citoquímica demonstrou ausência de atividade da fosfatase ácida nos fígados dos indivíduos do Bioensaio 1, o que indicou baixa atividade hidrolítica no tecido hepático destes (Figs. 6N-O).

4.3.2. Bioensaio 2

Neste Bioensaio, onde as coelhas receberam como alimento ração enriquecida com os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona estabilizados com o NaCl, verificou-se a partir dos resultados obtidos da análise histológica que no tecido hepático das mesmas houve uma aparente desorganização da disposição dos hepatócitos nos cordões (Fig. 6D-E), inclusive ficando dificultada a visualização dos limites celulares. Uma intensa vacuolização esteve presente não só no citoplasma dos hepatócitos, mas também por entre os mesmos (Fig. 6E). Os núcleos dessas células mostraram-se bastante irregulares, ou seja, perderam a morfologia original arredondada (Fig. 6E) e, além de uma intensa picnose (Fig. 6E), os mesmos foram deslocados do centro da célula para a periferia desta, provavelmente devido a extensa presença destes vacúolos (Fig. 6E) .

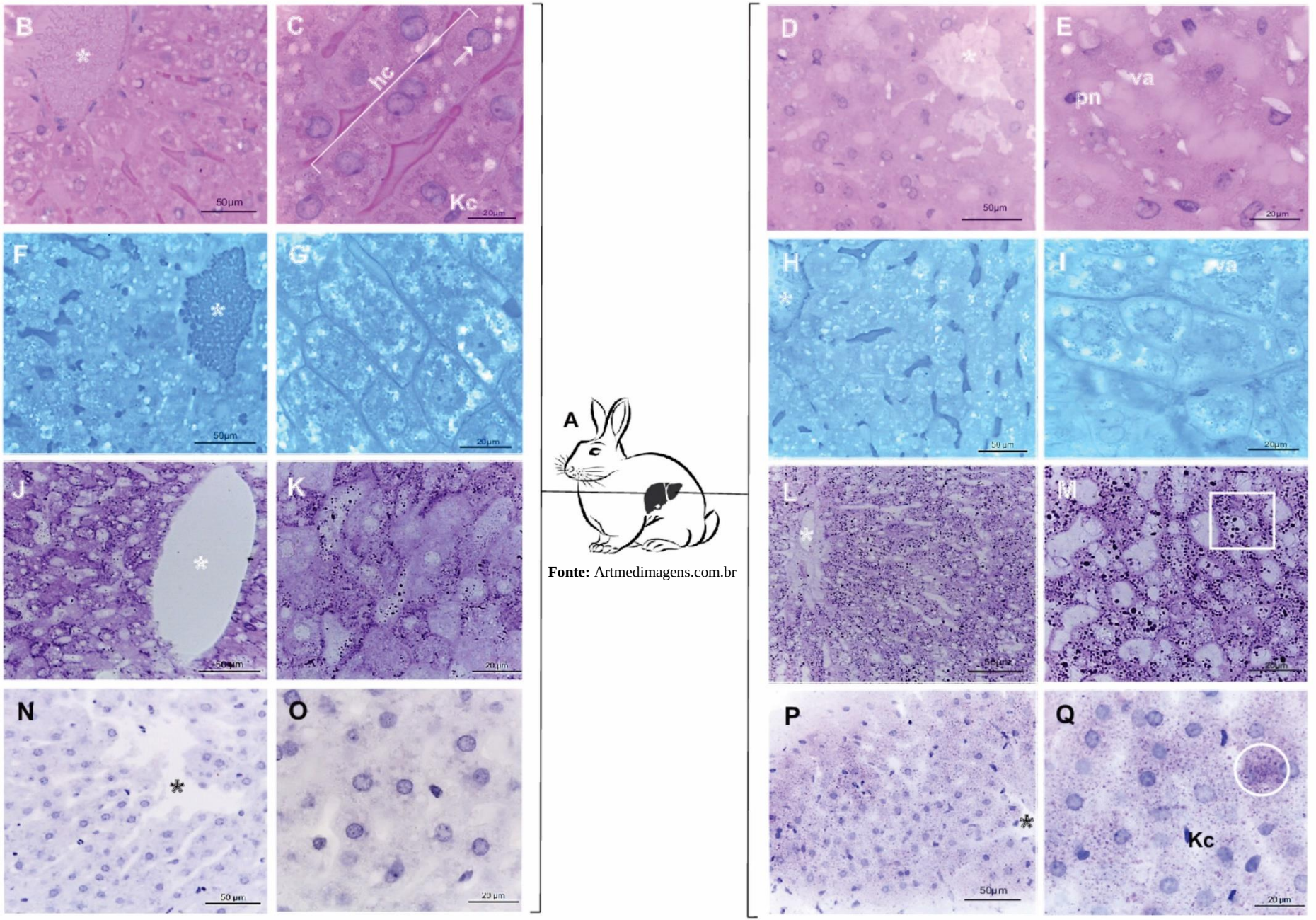
Quanto a detecção das proteínas totais no tecido hepático (Figs. 6H-I), observou-se que a intensidade da marcação das mesmas nos indivíduos deste Bioensaio foi menos intensa do que naqueles do Bioensaio 1. A presença de gotículas lipídicas no citoplasma dos hepatócitos também pareceu ter diminuído, uma vez que regiões não marcadas pela técnica (vacúolos) foram menos frequentes nas células desses indivíduos (Fig. 6I).

A análise histoquímica dos polissacarídeos mostrou que houve modificação na distribuição do glicogênio em toda a extensão do tecido. No Bioensaio 1, verificou-se que este polissacarídeo esteve preferencialmente localizado no citoplasma dos

hepatócitos (intracelular) (Fig. 6K). Aqui, no Bioensaio 2, verificou-se que o glicogênio, além de estar sob a forma de uma granulação mais espessa, esta também foi observada ocupando os espaços extracelulares no tecido (Fig. 6M).

A citoquímica para evidenciar a atividade da enzima fosfatase ácida revelou que esta esteve presente nos hepatócitos destes indivíduos tendo sido observada por meio da forte marcação citoplasmática (Figs. 6P-Q), sinalizando resposta de intensa atividade hidrolítica das células do fígado das coelhas deste grupo de estudo.

FIGURA 6



Fonte: Artmedimagens.com.br

Figura 6: Representação esquemática mostrando o posicionamento do fígado (**A**) e secções histológicas (**B-Q**) do fígado de coelhas (modelos hospedeiros).

B-C: Secções histológicas do fígado dos indivíduos do Bioensaio 1 coradas pela hematoxilina e eosina (HE).
D-E: Secções histológicas do fígado dos indivíduos do Bioensaio 2 coradas pela hematoxilina e eosina (HE).
F-G: Detecção de proteínas totais no fígado dos indivíduos do Bioensaio 1 (azul de bromofenol).
H-I: Detecção de proteínas totais no fígado dos indivíduos do Bioensaio 2 (azul de bromofenol).
J-K: Detecção de polissacarídeos neutros no fígado dos indivíduos do Bioensaio 1 (PAS).
L-M: Detecção de polissacarídeos neutros no fígado dos indivíduos do Bioensaio 2 (PAS).
N-O: Detecção da atividade da enzima fosfatase ácida no fígado dos indivíduos do Bioensaio 1.
P-Q: Detecção da atividade da enzima fosfatase ácida no fígado dos indivíduos do Bioensaio 2.

*****= veia centro lobular; **hc**= cordão de hepatócito; **seta**= núcleo do hepatócito; **pn**= núcleo picnótico; **Kc**= célula de Kupffer; **va**= vacúolo; **quadrado**= glicogênio presente no citoplasma do hepatócito; **círculo**= marcação da atividade da fosfatase ácida.
Escala: **B**, **D**, **F**, **H**, **J**, **L**, **N**, **P** = 50µm; **C**, **E**, **G**, **I**, **K**, **M**, **O**, **Q** = 20µm.

5. Discussão

A literatura tem registrado há várias décadas os benefícios e as propriedades biológicas dos ésteres obtidos a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona os quais vêm sendo utilizados em vários setores da economia, servindo de base para pinturas, vernizes, corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, óleos lubrificantes de baixa temperatura, composição do biodiesel, colas e aderentes, náilon, polímeros e matéria plástica (SILVA, 2000; CANGEMI, 2006; MESSETTI, 2010). Além disso, novos polióis derivados do óleo da mamona foram também desenvolvidos para serem utilizados na fabricação de próteses e de implantes ósseos (REZENDE et al., 2001). Dados obtidos mais recentemente mostraram que esses bioativos podem também ser considerados como excelentes acaricidas, uma vez que trabalhos desenvolvidos por vários autores nesta temática, apresentaram resultados que apontaram para esses bioativos como sendo uma estratégia de controle de carrapatos (ARNOSTI et al., 2011a, 2011b; SAMPIERI et al., 2012, 2013, 2013 b, 2015; CAMARGO-MATHIAS, 2018). Especificamente sobre as propriedades acaricidas destes ésteres, estas embora já fortemente comprovadas em pesquisas desenvolvidas em laboratório, confirmando sua eficiência, ainda deixam lacunas relativas às respostas dos organismos alvos (hospedeiros) à exposição aos mesmos, dados que até o presente são ainda escassos, o que demanda um conhecimento mais aprofundado que aborde inclusive as rotas, bem como os mecanismos de ação desses ésteres. Informações sobre quais seriam as implicações da presença destes nos sistemas biológicos dos animais vertebrados, principalmente daqueles que servem de hospedeiros dos carrapatos tanto em experimentos que são conduzidos no campo quanto aqueles que o são no laboratório, seriam imprescindíveis para se confirmar se esses bioativos poderiam ser indicados/utilizados no controle destes ectoparasitas.

Assim, diante da problemática acima colocada, o presente trabalho objetivou elucidar qual seria a resposta de coelhas hospedeiras quando estas recebessem como alimento ração enriquecida com esses ésteres (em experimentos conduzidos em laboratório) na perspectiva destes bioativos tornarem-se no futuro uma alternativa para controlar infestações de carrapatos do cão *R. sanguineus* l. s. Neste trabalho para obter-se essas informações fez-se uso da análise de parâmetros bioquímicos do sangue e da urina, bem como da histologia, da histoquímica e da citoquímica do tecido hepático das mesmas.

Os resultados aqui obtidos revelaram que quando as coelhas foram expostas aos ésteres (Bioensaio 2), ao contrário do que tem sido reportado na literatura (ARNOSTI, 2011), que estes foram potencialmente capazes de alterar a estrutura histológica e celular do tecido hepático, causando um desarranjo na organização dos cordões de células (hepatócitos), bem como alterando a forma das mesmas, as quais passaram de cúbicas a irregulares. Essas alterações acarretaram na total desorganização das vias normais de circulação sanguínea no interior do órgão, o que provavelmente alterou diretamente a fisiologia do mesmo.

O fígado é considerado um dos órgãos primordiais nos processos de desintoxicação dos vertebrados, sendo sensível a qualquer alteração nos sistemas internos dos mesmos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Ainda segundo a literatura pertinente, esse órgão estaria sendo considerado um excelente indicador para a detecção da toxicidade de diversos elementos, nos mais diversos organismos, o que no presente trabalho, foi base para se mostrar que os ésteres, muito embora eficientes acaricidas, trariam prejuízos aos indivíduos não alvos (hospedeiros) a eles expostos, uma vez que alterariam a morfofisiologia deste órgão.

As alterações morfofisiológicas que foram observadas no fígado das coelhas expostas aos ésteres analisadas no presente estudo foram fortemente corroboradas pela observação da alteração da enzima AST (aspartato aminotransferase), cuja atividade foi avaliada por meio de amostras do sangue, onde detectou-se na circulação dos animais o aumento do índice da mesma. Reporta-se que a observação da elevação dessa enzima na circulação, ocorreria quando o animal apresentasse algum tipo de patologia hepática, ou mesmo quando nele estivessem ocorrendo processos de necrose (MURRAY et al., 1994). Cerca de 80% da enzima AST está presente no interior das mitocôndrias que, em associação com os índices da ALT (alanina aminotransferase), indicam alterações no fígado e sinalizam a instalação de doenças hepáticas. Cabe ressaltar que, no caso de danos hepatocelulares leves predomina no soro sanguíneo a ezima citoplasmática ALT, enquanto que em lesões hepatocelulares graves, ocorre a liberação da AST (mitocondrial) (MOTTA, 2003). Desta forma, os dados aqui obtidos da análise dos níveis da AST no sangue das coelhas do Bioensaio 2 permitiram inferir que os danos morfológicos (com consequente alteração fisiológica no órgão) aqui observados foram intensos no tecido hepático das coelhas, reforçando o potencial hepatotóxico destes ésteres.

Foi também realizado no presente trabalho a análise dos analitos da urina das

coelhas expostas aos ésteres, e constatou-se que não houve alteração nos níveis de referência dos mesmos, indicando que estes não causaram a nível renal toxicidade aos animais.

Como complemento das análises bioquímicas, ainda neste trabalho foram realizadas análises histológicas e histoquímicas do tecido hepático, quando, através de secções histológicas pode-se confirmar a hepatoxicidade dos ésteres nas coelhas que se alimentaram com ração enriquecida com as referidas moléculas (Bioensaio 2). Essa confirmação deu-se por meio da observação de várias alterações que incluíram: a desorganização dos cordões hepáticos com consequente aumento do espaço intercelular, bem como com a presença de hepatócitos irregulares, com núcleos também irregulares e picnóticos, além de extensa vacuolização citoplasmática. Estas alterações aqui observadas foram interpretadas como sendo o resultado da toxicidade severa tanto no nível celular quanto no tecidual do fígado destas coelhas. A hepatotoxicidade dos ésteres foi também fortemente corroborada pela observação de hepatócitos em processo de morte celular, mostrando inclusive a instalação de um processo de necrose, demonstrada também por meio da aplicação de técnica citoquímica que evidenciou a presença da enzima fosfatase ácida no citoplasma dos hepatócitos. Esse evento muito provavelmente deveu-se a intensa atividade hidrolítica no citoplasma, o que por sua vez favoreceu a desestruturação celular, bem como acarretou na desorganização tecidual aqui observadas histologicamente.

Muito embora haja escassez de trabalhos disponíveis na literatura abordando o efeito de acaridas de origem natural em diferentes tecidos de hospedeiros infestados por carrapatos tanto no campo quanto em laboratório, os dados aqui obtidos corroboraram aqueles de Cunha et al. (2017), autores que avaliaram a ação do carvacrol e do timol, acaricidas sintéticos de origem natural, sobre o tecido hepático de camundongos da espécie *Mus musculus*, e obtiveram resultados semelhantes aos aqui encontrados, ou seja, que deixaram claro que estes bioativos, embora de origem natural, seriam hepatotóxicos, provocando nas células danos que as levariam inclusive a entrar em processo de morte.

Foi ainda realizada nesse trabalho a avaliação histoquímica para detecção de alterações nas células do fígado das coelhas dos Bioensaios 1 e 2, como as proteínas e os polissacarídeos importantes elementos que são produzidos e convertidos nesse órgão. Muito embora não se tenha realizado testes histoquímicos para demonstrar a presença e localização de lipídeos no fígado, os resultados obtidos permitiram inferir

que houve redução na frequência deste elemento nas coelhas do Boensaio 2 quando comparou-se com aquelas do Bioensaio 1. Ainda nas coelhas do Bioensaio 2 verificou-se que houve aumento da frequência e localização dos polissacarídeos no citoplasma dos hepatócitos destas, o que foi demonstrado pela forte e extensa marcação de regiões abrigando depósitos de glicogênio. Esses resultados histoquímicos aqui obtidos sugeriram que os ésteres do ácido ricinoléico fornecidos via alimentação estimularam nos hepatócitos a gliconeogênese sinalizando para os mesmos que a melhor rota para obtenção da glicose seria por meio da degradação dos lipídeos ao invés dos depósitos de glicogênio, resultando na liberação de energia para realização da síntese de ATP. Assim, muito provavelmente os ésteres tenham atuado como reguladores da via da gliconeogênese nos hepatócitos em questão, provavelmente com a participação dos peroxissomos, organelas celulares que além de outras teriam também a função de oxidação de ácidos graxos, liberando a acetilcoezima-A, molécula imprescindível à síntese de ATP durante o processo de respiração celular (MURRAY et al., 1994; ALBERTS et al., 2017).

Sendo assim, os dados aqui obtidos demostraram que os ésteres do ácido ricinoléico do óleo da mamona, que já em experimentos realizados anteriormente teve seu potencial acaricida demonstrado (ARNOSTI et al., 2011a, b; SAMPIERI et al., 2012, 2013a, b, 2015) e nas condições experimentais aqui conduzidas, foram capazes de alterar a morfofisiologia do tecido hepático das coelhas alocadas no Bioensaio 2, ou seja, embora efetivos como acaricidas nas infestações por carrapatos *R. sanguineus* l.s. eles teriam ação hepatotóxica no hospedeiro. Tais resultados demonstraram que os ésteres, são ainda um método de controle alternativo de carrapatos pouco seguro para ser recomendado, necessitando ainda de estudos complementares, inclusive de testes de citotoxidade *in vitro*.

Os dados aqui apresentados demonstraram também que os ésteres, ao contrário do que foi relatado anteriormente por outros autores que observaram que os mesmos foram benéficos aos hospedeiros (gado de corte no campo), visto terem promovido o aumentado do peso dos animais durante os experimentos, seriam na realidade hepatotóxicos, causando no fígado dos animais à eles expostos severos danos estruturais e fisiológicos os quais culminaram na morte dos hepatócitos.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo verificou-se que os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (acaricida) ofertados às coelhas hospedeiras de carrapatos, via alimentação:

- provocaram o aumento da concentração da enzima AST (Aspartato Aminotransferase) na circulação sanguínea o que significou que os ésteres, fator exógeno via alimentação, interferiram no metabolismo do fígado.

- não interferiram nos parâmetros da urina aqui analisados, o que significou a não toxicidade destes à nível renal.

- provocaram alterações nas células e no tecido hepático, desorganizando a circulação sanguínea do órgão por meio da desestruturação dos cordões hepáticos e provocando a morte celular de hepatócitos.

- alteraram o metabolismo tanto dos lipídeos quanto dos polissacarídeos (glicogênio) acelerando a conversão dos primeiros para a obtenção de energia (via da gliconeogênese).

- ainda não são seguros para os animais hospedeiros como estratégia de controle de carrapatos *R. sanguineus* l. s.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTS,B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Biologia Molecular da Célula. 6º edição. **Editora Artmed**. Porto Alegre, p. 1428. 2017.

ÁLVAREZ, V. et al. Control *in vitro* de garrapatas (*Boophilus microplus*; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. **Revista de Biologia Tropical**, v. 56, n. 1, p. 291-302, 2008.

ANDREOTTI, R. e KOLLER, W. Apresentação. In: Andreotti, R. e Koller, W. Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças Transmitidas. **Embrapa Gado de Corte, Brasília**, 2013.

ANGELO, I.C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de carrapatos. In: VERISSIMO, C.J. (Org.) Controle de carrapatos nas pastagens. Nova Odessa**: Instituto de Zootecnia**, 2013. p.69-94.

ARAGÃO, H.B. Notas sobre ixódidas brazileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v.3, p.145-195, 1911.

ARAGÃO, H. Ixodidas brazileiros e de alguns paizes limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v.31, n.4, p. 759-843, 1936.

ARAÚJO, R. P., NAVARRO, M. B. M.A., CARDOSO, T. A. O. Febre maculosa no Brasil: estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica. **Caderno Saúde Coletiva**, v. 23, p.354-361, 2015a.

ARNOSTI, A.; BRIENZA, P. D.; FURQUIM, K. C. S.; CHIERICE, G. O.; NETO, S. C.; BECHARA, G. H.; SAMPIERI, B. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v.127, n.2 p. 569-574, 2011a.

ARNOSTI, A.; BRIENZA, P. D.; FURQUIM, K. C. S.; CHIERICE, G. O.; BECHARA, G. H.; CALLIGARIS, I. B.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental Parasitology**, v. 127, n.2 p. 575-580, 2011b.

BARBOSA SILVA, A. et al. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica,** Basel, v. 173, p. 30–33, 2017.

BIEGELMEYER, P. NIZOLI, L.Q. CARDOS, F. F. e Dionello, N. J. L.. Aspectos da resistência de bovinos a carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus.* **Arch Zootec**, 61: 1-11, 2012.

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; BARBOSA, C. S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 20: 89-96, 2011.

CAMARGO, M. G.; MARCIANO, A. F.; SÁ, F. A.; PERINOTTO, W. M. S.; QUINELATO, S.; GÔLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PRATA, M. C.A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**., v. 205, p. 271-276, 2014.

CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S The histology as a tool for the understanding of the morphophysiology of the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*). **In: Jenkins, O. P (Ed), Advances in Zoology Research. USA: Nova Science Publishers Inc**. cap.8, v.5., p. 167-191, 2013.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives. 1. ed. São Paulo**, Editora Unesp**, 2018.

CANGEMI, J. M. “Biodegradação de PU derivado do óleo de mamona”, **Tese de Doutorado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasi**l (2006).

CATTO, J. B. P.; ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças transmitidas. **Campo Grande: Embrapa**. pp. 119-135, 2013.

COUTINHO, L. L. et al. A genômica na bovinocultura de corte. In: PIRES, A. V. (Ed.) Bovinocultura de corte. **Piracicaba: Fealq**,. v.2, p.813-26. 2010

CONTRERAS, M.; DE LA FUENTE, J. Control of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* tick infestations in rabbits vaccinated with the **Q38 Subolesin/Akirin chimera. Vaccine**, v. 34, n. 27, p. 3010–3013, 2016.

COSTA, F. B. et al. *Rickettsia amblyommatis* infecting ticks and exposure of domestic dogs to *Rickettsia spp*. in an Amazon-Cerrado transition region of northeastern Brazil. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–17, 2017.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A.; BRANDAO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.1, p.64- 67, 2006

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus.* **Parasites & Vectors**. United Kingdom v.3, p. 1-11, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 9–13, 2015.

FORTES, J. Controle do carrapato dos bovinos na região sudeste do Brasil. **Cad. Téc. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais**, v.8, p.49-61, 1993.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENÃ, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region**. Atlanta: International Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases** (ICTTD-2), 173 p. 2003.

HAUSERMAN, W.; FRIEDELl,T.; HESS, E. A.; STRONG, M. B.,. A new active ingredient for a new approach to protect cattle against ticks In: **Proceedings of XIX International Congress of Entomology. Beijing, Chin,.** 1992.

HUSSEIN, M. A; BOWEN, 1. D.; LEWIS, G. H. The histochemical localization of ATPase, cholinesterase and acid phosphatase activity in *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) larvae using a methacrylate embedding technique. Cell **Biology International Reports**, London,v. 14,n.9,p. 775-781, 1990.

IANNACONE, J.; LAMAS, G. Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**, v. 65, p. 92-101, 2002.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. 3ª ed. São Paulo: Editora Santos 1983.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Histologia Básica 13ª ed. São Paulo: Editora Guanabara 2017.

KAUFMAN, W. R. Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. **Ticks and Tick-borne Dis**, 1: 11-22. 2010.

KIM, H-Y. Statistical notes for clinical researchers: post-hoc multiple comparisons.Restorative Dentistry & Endodontics. **Korean Academy of Conservative Dentistry** 40: 172–176, 2015.

KRISS, T.; CADAR, D.; SPÎNU, M. Tick prevention at a crossroad: new and renewed solutions. **Veterinary Parasitology**, 187: 357-366, 2012.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em Cães no Brasil. **Clínica Veterinária,** n.30, p. 24-32, 2001.

LABRUNA, M.B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, Supl. 1, p. 123-124, 2004.

LEAL, AT.; FREITAS, DRJ; VAZ JR, IS. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinária**.31 (1),2003.

MARTHE, E. D. B.; BITTENCOURTE, L.M. e QUEIROZ, M. E. L. R. 2010. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretróides em manteiga. **Quím Nova**, 33: 1389-1393, 2010.

Mc HUGH, M. L Multiple comparison analysis testing in ANOVA. **Biochemia Medica,** 21:203-209, 2011.

MIRANDA, C. L. *et al*. Non-estrogenic Xanthohumol Derivatives Mitigate Insulin Resistance and Cognitive Impairment in High-Fat Diet-induced Obese **Mice.Science Reports,** 2018

MESSETTI, M. A.; SANTOS, A. M.; ANGELIS, D. F.; CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Estudo do derivado do óleo de *Ricinus communis L.* (mamona) como agente biocida e redutor da viscosidade produzida por *Leuconostoc mesenteroides* em indústrias sucroalcooleiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.2 p. 301308,2010.

MORAES-FILHO, J. et al. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica,** Basel, v. 117, n. 1, p. 51–55, 2011.

MORALES, S.; GARCÍA, C. M. Metodología para la evaluación del potencial insecticida de especies forestales. **Revista Facultad Nacional Agronomía**, v. 53, n. 1, p. 787-800, 2000.

MOTTA V. T. Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações. 4 ed. **São Paulo: Robe**, 419 p., 2003.

MURRAY, R. K; GRANNER, D. K; MAYES, P. A; RODWELL. V. W.; HARPER: Bioquímica. 7.ed. São Paulo**: Atheneu**, 763p., 1994.

NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae n. sp*., *Amblyomma interandinum n. sp.* and *Amblyomma patinoi n. sp*., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252–276, 2014.

PEARSE, A.G.E., Histochemistry theoretical and applied, 3 ed**. Livingstone: Churchill**, 214 p., 1985.

PEREIRA, M. C. Introdução. In: PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. (eds) ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência.** São Paulo: MEDVET. pp.1-5, 2008.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos caprinos e eqüinos. 9. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2002.

REY, L. Parasitologia.6 ed. Rio de Janeiro**: Guanabara Koogan**, 1973, 641 p.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, n. 2, p. 43-50, 2001.

SAMPIERI, B. R.; ARNOSTI, A.; NUNES, P. H.; FURQUIM, K. C. S.; CHIERICE, G. O.; MATHIAS, M. I. C. 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.; ARNOSTI, A.; FURQUIM, K. C. S.; CHIERICE, G. O.; BECHARA, G. H.; DE CARVALHO, P. L. P. F.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effect of ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*) on the oocyte yolk components of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.191, n.3 p.315-322, 2013a.

SAMPIERI, B. R.; FURQUIM, K. C. S, 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, 2013b.

SAMPIERI, B. R.; FURQUIM, K. C. S.; CARVALHO, P. L. P. F; BUENO, O. C., CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ricinoleic acid esters from castor oil modifying male reproductive system of *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787). **Emergent Life Science Research**, v. 1, n.1 p. 26-37, 2015.

SILVA M.C. Poliuretano de óleo de mamona como substituto de tendão: estudo experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) **Dissertação – Mestrado**. **Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais**; 2000.

VALENTE, P. P.; AMORIM, J. M.; CASTILHO, R. O.; LEITE, R. C.; RIBEIRO, M. F. B. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 113:417–423, 2014.

VATSYA, S.; BANERJEE, P. S.; YADAV, C.I.; KUMAR, R.R. *In vitro* acaricidal effect of some medicinal plantas against *Boophilus microplus*. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 20, n. 2, p. 141-143, 2006.