
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA) (PPG-BCMM)**

**ÉSTERES DO ÁCIDO RICINOLÉICO DO ÓLEO DE MAMONA (*Ricinus
communis*): AÇÕES CONTRA O ECTOPARASITA *Rhipicephalus linnaei* E
CONTRA O ENDOPARASITA *Ascaris lumbricoides***

LUÍS FERNANDO SODELLI

**Rio Claro – SP
2026**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA) (PPG-BCMM)

**ÉSTERES DO ÁCIDO RICINOLÉICO DO ÓLEO DE MAMONA (*Ricinus communis*): AÇÕES CONTRA O ECTOPARASITA *Rhipicephalus linnaei* E
CONTRA O ENDOPARASITA *Ascaris lumbricoides***

LUÍS FERNANDO SODELLI

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

**Rio Claro – SP
2026**

S679e Sodelli, Luís Fernando
ÉSTERES DO ÁCIDO RICINOLÉICO DO ÓLEO DE
MAMONA (*Ricinus communis*) : AÇÕES CONTRA O
ECTOPARASITA *Rhipicephalus linnaei* E CONTRA O
ENDOPARASITA *Ascaris lumbricoides* / Luís Fernando Sodelli.
-- Rio Claro, 2026
70 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo

1. *Ricinus communis*. 2. Enzimas hepáticas. 3. *Ascaris
lumbricoides*. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos
pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ÉSTERES DO ÁCIDO RICINOLÉICO DO ÓLEO DE MAMONA (*Ricinus communis*):
AÇÕES CONTRA O ECTOPARASITA *Rhipicephalus linnaei* E CONTRA O
ENDOPARASITA *Ascaris lumbricoides*

AUTOR: LUIS FERNANDO SODELLI

ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas
(Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Diversidade Biológica e Biologia Ambiental pela
Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente
MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
Data: 27/05/2024 16:32:47-0300
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro

Prof. Dr. JOSÉ RIBAMAR LIMA DE SOUZA (Participação Virtual)
UFAC / Universidade Federal do Acre



Documento assinado digitalmente
JOSE RIBAMAR LIMA DE SOUZA
Data: 28/05/2024 16:32:51-0300
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Profa. Dra. IZABELA BRAGGIÃO CALLIGARIS (Participação Presencial)
x

Prof. Dr. LEONARDO DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Instituto Butantan



Documento assinado digitalmente
LEONARDO DE OLIVEIRA
Data: 29/05/2024 08:09:54-0300
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Rio Claro, 24 de maio de 2024

**Dedico esse trabalho à minha esposa,
Adriana**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer imensamente ao meu filho Matheus, minha filha Laís, minha nora Letícia e meu genro Matheus, por todo apoio e compreensão.

Por embarcarem comigo nessa aventura (literalmente) e me inspirarem a ser uma pessoa e profissional melhor todos os dias. Agradeço também aos meus pais e meus irmãos, pelo apoio e suporte emocional, e por fornecerem toda ajuda que eu precisei durante essa etapa, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço especialmente minha orientadora Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo, pela interminável paciência em me auxiliar nesse processo.

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

Resumo

Carrapatos *Rhipicephalus linnaei* estão distribuídos pelo mundo e são popularmente conhecidos como carrapatos do cão, devido a sua preferência por esses vertebrados, embora parasitem outros mamíferos, inclusive o homem. Atualmente o seu controle é realizado com químicos sintéticos, que causam efeitos colaterais, o que estimula a busca por novas estratégias. Os ésteres sintetizados a partir do ácido ricinoléico do óleo de “mamona” (*Ricinus communis*) tem merecido atenção, visto que os mesmos tem potencial de provocar a mortalidade de cerca de 84% dos carrapatos, resultado aqui obtido e que demonstrou o potencial acaricida destes bioativos. Nas coelhas a eles expostas, simulando modelos hospedeiros de carrapatos, os bioensaios mostraram que as mesmas ao se alimentarem com a ração enriquecida com esses ésteres (1,75g de ésteres/kg de ração Bandeirantes®) não provocou hepatotoxicidade nas mesmas, ou seja, não foram observadas alterações morfológicas/histoquímicas no fígado, tal como, esteatose e vacuolizações citoplasmáticas nos hepatócitos, indicando que o uso desses ésteres poderia representar uma estratégia de controle dos ectoparasitas. Só foram observadas alterações hepáticas quando as coelhas além de serem alimentadas com a ração enriquecida com os ésteres, foram simultaneamente submetidas a infestação com carrapatos. Essas alterações morfológicas detectadas, muito provavelmente deveram-se a infestação, visto que só a presença dos ésteres não foi hepatotóxica. Realizou-se também análises clínicas para avaliar os índices das enzimas hepáticas ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e ALP (fosfatase alcalina), quando as coelhas foram expostas aos ésteres. Os resultados mostraram que não houve alterações dos índices em virtude da exposição, confirmando que os ésteres, poderiam ser utilizados como acaricidas no controle do carrapato do cão, sem causarem hepatotoxicidade nos hospedeiros. Além da ação acaricida, realizou-se também teste (método de Hoffman) para verificar se além de ser um potencial acaricida, os bioativos dos ésteres poderiam também ter ação contra os endoparasitas *Ascaris lumbricoides*, por meio da análise das fezes. Os resultados mostraram que as coelhas expostas aos ésteres já no 5º dia do bioensaio, estavam negativas para a presença de ovos desse endoparasita, comprovando a ação vermífuga dos ésteres, informação essa que, além de inédita, poderá contribuir de forma significativa na busca de novos produtos para o controle de endoparasitoses.

Palavras chave: Carrapatos do cão, ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona, enzimas hepáticas, controle, endoparasitas, ectoparasitas.

Abstract

Rhipicephalus linnaei ticks are distributed throughout the world and are popularly known as brown dog ticks, due to their preference for these vertebrates, although they parasitize other mammals, including humans. Currently, its control is carried out with synthetic chemicals, which cause side effects, stimulating the search for new strategies. Esters synthesized from ricinoleic acid in castor oil (*Ricinus communis*) have received attention, as they appear to potentially cause mortality of around 84% of ticks, result here obtained and which demonstrated the acaricidal potential of these bioactives. In rabbits exposed to them, simulating tick host models, the bioassays carried out here showed that when they were fed feed enriched with these esters (1.75g of esters/kg of conventional feed) it did not cause hepatotoxicity in them, i.e., no morphological/histochemical characteristics were observed in the liver, such as steatosis and cytoplasmic vacuolation in hepatocytes, indicating that the use of these esters could represent a strategy for controlling ectoparasites. Liver changes were only observed when the rabbits, in addition to being fed food enriched with esters, were simultaneously subjected to tick infestation. These morphological changes detected were most likely due to infestation, since the presence of esters alone was not hepatotoxic. Clinical analyzes were also carried out to evaluate the levels of liver enzymes ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase) and ALP (alkaline phosphatase), when the rabbits were exposed to esters. The results showed that there were no changes in the indices due to exposure, confirming that the esters could be used as acaricides to control dog ticks, without causing hepatotoxicity in the hosts. In addition to the acaricidal action, a test was also carried out (Hoffman's method) to verify whether, in addition to being a potential acaricide, the bioactive esters could also have action against the endoparasites *Ascaris lumbricoides*, through analysis of feces. The results showed that rabbits exposed to esters as early as the 5th day of the bioassay, were negative for the presence of eggs of this endoparasite, proving their vermifuge action, information that, in addition to being unprecedented, could contribute significantly to the search for new products to control endoparasitosis.

Keywords: ticks, esters from castor oil, hepatic enzymes, natural controle, endoparasites, ectoparasites.

Sumário

Introdução.....	10
1. Objetivos.....	14
2. Material e Métodos	15
2.1. Locais de Realização dos Estudos.....	15
2.2. Ésteres do Ácido Ricinoléico do Óleo de Mamona (<i>Ricinus communis</i>).....	15
2.3. Obtenção da Ração Enriquecida com os Ésteres	15
2.4. Delineamento Experimental	15
2.5. Coelhas Hospedeiras	16
2.6. Parasitas Intestinais.....	16
2.6.1. Análises Clínicas.....	16
2.6.2. Obtenção das Amostras de Sangue	17
2.6.3. Enzimas Hepáticas	17
2.6.4. Obtenção das Amostras de Fezes	17
2.6.5. Diagnóstico Parasitológico para Pesquisa de Parasitas Intestinais	17
3.7 Análises Morfológicas	17
3.7.1. Obtenção das Amostras de Fígado e Baço das Coelhas.....	18
3.7.2. Coloração pela Hematoxilina de Harris-Eosina Aquosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)	18
3.7.3 Histoquímica.....	19
3.7.3.1. Técnica do PAS (ácido periódico-Schiff) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).....	19
3.7.3.2. Técnica do Azul de Bromofenol (PEARSE, 1985).....	20
3. Resultados	21
1. CAPÍTULO 1 – Action of ricinoleic acid esters from castor oil (<i>Ricinus communis</i>) against <i>Rhipicephalus linnaei</i> ticks: analysis of the liver tissue of infested rabbits, a model simulating hosts of this ectoparasite.	22
2. CAPÍTULO 2 – Ricinoleic acid esters from castor oil interfering with the development of eggs of the endoparasite <i>Ascaris lumbricoides</i> : a new control perspective.....	31
3. CAPÍTULO 3 – Liver and spleen of hosts of <i>Rhipicephalus linnaei</i> exposed to synthetic (afoxolaner) and natural acaricides (esters from castor oil). A comparative clinical-morphological study	38
4. Discussão Geral	52

5. Conclusão	57
6. Referências	58

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos, amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais, são artrópodes de interesse médico veterinário e sanitário (DANTAS-TORRES, OTRANTO, 2015; NAVA et al., 2014), pelo fato de serem hematófagos. Durante o processo de alimentação os mesmos, em virtude da ação de suas glândulas salivares, que os possibilitam tanto se manter fixados quanto se alimentar por vários dias sem que sejam alvos do sistema de defesa do hospedeiro, além da espoliação e injúria, facilitam nos hospedeiros a transmissão de patógenos tais como: *Hepatozoon canis*, *Leishmania infantum* (agente etiológico da Leishmaniose Visceral) (COUTINHO et al., 2010), *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*, *R. rickettsii* e viroses causadas por arbovírus (LABRUNA, 2009; ARAUJO et al., 2015a; BARBOSA SILVA et al., 2017; Nakkoud et al., 2022).

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 liderando o mercado veterinário (CAMARGO-MATHIAS, 2018). 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, um processo que gerou inconvenientes, inclusive referentes a aquisição de resistência aos químicos. A utilização de acaricidas, sejam eles de que natureza forem, demanda certos cuidados, tais como a aplicação na dose correta e obedecendo as indicações do fabricante, na preparação das soluções, quando for o caso (correta homogeneização) e na aplicação do químico no hospedeiro, a qual deve ocorrer de forma uniforme e, novamente, seguindo as orientações do fabricante do produto (ANGELO; BITTENCOURT, 2014; SUNKARA et al., 2022).

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'água, do solo e inclusive dos animais pela liberação de 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 pelos usuários, os quais frequentemente desconhecem as normas e boas práticas de uso. Considere-se ainda o fato de que, em animais de importância econômica (gado de corte), a infestação por carrapatos provoca nos 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., SANTOS et al 2017).

Diante desse cenário, fica clara a urgente necessidade de se buscar novas estratégias de controle de carrapatos, bem como dos patógenos por eles transmitidos, as quais façam uso de métodos que proporcionem maiores margens de segurança para os organismos não alvos (incluindo os hospedeiros), assim 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 mais facilmente degradáveis (BORGES, 2011; CATTO, 2013). Atualmente vêm sendo testados vários compostos os quais podem se tornar, num futuro próximo, viáveis para comercialização, 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, 2011b; SAMPIERI et al., 2013a, 2013b, CAMARGO-MATHIAS, 2018; SODELLI, et al., 2022, 2023).

Até 2019, postulava-se que este composto não era tóxico para os organismos não alvos (hospedeiros), visto que inclusive aqueles que eram expostos a esse bioativo no campo, tinham visivelmente seu peso aumentado (informação pessoal). Segundo a literatura, os ésteres, eficientes no controle dos carrapatos, teriam a vantagem de não provocar nos hospedeiros danos que pudessem interferir na sua biologia (ARNOSTI et al., 2011 b), tendo inclusive sido confirmado em alguns estudos desenvolvidos em laboratório que quando coelhas hospedeiras de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* fossem alimentadas com ração enriquecida com esses bioativos, as mesmas não apresentariam alteração nem no aspecto externo e nem no seu comportamento e, ainda aumentariam de peso durante o experimento (SAMPIERI et al., 2013 a, 2013b), informações que vieram corroborar aquelas obtidas anteriormente em campo por Chierice et al. (informação pessoal).

De forma geral os trabalhos que foram até agora desenvolvidos com a exposição de carrapatos aos ésteres, mostraram que houve nos ectoparasitas uma diminuição de suas taxas reprodutivas, consequência da alteração da dinâmica da vitelogênese nos ovócitos por eles produzidos, o que por sua vez inibiu a gênese de novos ectoparasitas (ARNOSTI et al., 2011 b). No entanto, estudos conduzidos em laboratório e que fizeram a exposição de coelhas hospedeiras aos ésteres, via ração enriquecida na concentração de 5,0g ésteres/kg de ração, demonstraram que a presença dos ésteres nesta concentração, provocaria nos hospedeiros uma alteração, principalmente na organização histológica e celular do tecido hepático, causando um desarranjo nos cordões de hepatócitos, bem como alterando a forma dessas células, as quais passaram de cúbicas a irregulares. Essas alterações desorganizaram as vias normais de circulação sanguínea no interior do órgão, o que interferiu diretamente na fisiologia do mesmo, confirmado pelo aumento do índice da enzima hepática AST (aspartato aminotransferase), segundo resultados de Sodelli et al. (2019).

Todas as informações até então obtidas e somadas aquelas já disponíveis na literatura com relação a utilização dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*R. communis*) como estratégia para o controle de carrapatos, que fosse eficiente e que não causasse prejuízos aos organismos não alvos, incluindo os hospedeiros, é que foi a base da presente proposta. A eficiência acaricida destes bioativos já foi comprovada, no entanto, respostas ainda precisavam ser obtidas, uma vez que a literatura mostrava resultados controversos, tendo sido postulado em alguns trabalhos alterações no fígado dos animais a eles expostos, informação essa de extrema importância e que não podiam ser desconsideradas, visto ser o fígado um órgão vital à sobrevivência dos vertebrados. Para tanto nesse trabalho foi proposto verificar se os ésteres numa concentração menor teriam ainda potencial acaricida e sem trazer hepatotoxicidade ao organismo não alvo, no caso o hospedeiro.

Além do potencial acaricida dos ésteres, na presente proposta objetivou-se também avaliar se em endoparasitas da espécie *Ascaris lumbricoides*, esses bioativos teriam ação antiparasitária, isto por que, o *A. lumbricoides* é o maior nematóide intestinal, ocorrendo no homem e em outros animais, e muitas vezes podendo chegar em casos extremos a medir cerca de 40 cm. A presença dessa

espécie no intestino delgado, no caso dos hospedeiros de carrapatos do cão (alvos preferenciais da espécie *R. linnaei*), pode levar a quadros clínicos graves e até fatais, e quando em grande quantidade provocando inchaços abdominais, cólicas, problemas gastrointestinais, que quando não tratados podem levar a ruptura gastrointestinal (SANTOS et al., 2017, SILVA et al., 2019, LAGATIE et al 2020).

Assim, diante do exposto a presente proposta mostrará resultados que sinalizaram que os ésteres derivados do ácido ricinoléico do óleo de “mamona” (*Ricinus communis*) teria ação não só contra ectoparasitas, no caso controlando carrapatos da espécie *R. linnaei*, como também sobre endoparasitas intestinais, no caso *Ascaris lumbricoides* que afetam os cães, “pets” (que convivem com os humanos) e que são os hospedeiros preferenciais desses carrapatos de importância médico veterinária.

2. Objetivos

Objetivo geral

O presente trabalho propôs trazer à luz novas informações que somadas às até agora disponíveis na literatura, auxiliará a elucidar os efeitos dos ésteres sintetizados a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) acrescido a ração fornecida para coelhas, em laboratório (simulando modelos hospedeiros de carrapatos *Rhipicephalus linnaei*) para verificar se os mesmos provocarão alterações morfohistológicas no fígado e baço das mesmas, bem como se os mesmos podem também controlar endoparasitas, no caso em tela, *Ascaris lumbricoides*.

Objetivos específicos

a) Avaliar o potencial toxico hepático dos ésteres por meio da dosagem das enzimas hepáticas ALT e AST, bem como pela aplicação de técnicas histológica (coloração pela HE) e histoquímicas (reação do PAS, coloração pelo azul de bromofenol), identificando alterações não só na organização celular hepática, mas também na marcação de polissacarídeos e proteínas nos hepatócitos, nas situações de infestação e de não infestação por carrapatos *Rhipicephalus linnaei*

b) Avaliar clinicamente amostras de fezes das coelhas expostas e não expostas aos ésteres para obter informações sobre o potencial antiparasitário desse químico natural no controle do endoparasita intestinal *Ascaris lumbricoides*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais de Realização dos Estudos

Foram utilizados equipamentos disponíveis nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada 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. Ésteres do Ácido Ricinoléico do Óleo de Mamona (*Ricinus communis*)

Os ésteres que foram utilizados para a realização dos diversos bioensaios, foram produzidos e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice USP - São Carlos, (SP) (*in memoriam*) e atualmente encontram-se sob domínio e responsabilidade da Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, (SP), orientadora do presente projeto. Os mesmos foram fornecidos às coelhas hospedeiras via incorporação à ração comercial da marca Bandeirantes®, (150g/dia) na concentração de 1,75 g dos ésteres/Kg de ração, concentração essa baseada nos resultados de estudo piloto realizado anteriormente por Sodelli et al (2019).

3.3. Obtenção da Ração Enriquecida com os Ésteres

O preparo da ração enriquecida com os ésteres deu-se em parceria com o Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes, no Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu - (SP), sob a supervisão do Dr. Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho, pós doutorando e colaborador do presente projeto.

3.4. Delineamento Experimental

No presente trabalho foram realizados vários bioensaios que utilizaram coelhas hospedeiras, as quais foram distribuídas em vários grupos, segundo o

objetivo de cada um dos bioensaios. Os resultados obtidos nessa tese foram então colocados em capítulos, estando cada capítulo representado ou por um artigo completo (full article) ou por uma “short communication”, que foram enviados ou já foram publicados em revistas especializadas da área.

Dessa forma, a metodologia detalhada de cada procedimento poderá ser encontrada na metodologia descrita em cada um dos artigos, a qual contempla todas as etapas que foram realizadas para a obtenção dos resultados.

3.5. Coelhas Hospedeiras

Foram utilizadas coelhas saudáveis do Grupo Genético Botucatu, com dois meses de idade, pesando entre 3,0 a 3,5 Kg, sem contato prévio com carrapatos ou com carrapaticidas, que foram adquiridas do Biotério Central da UNESP/Botucatu - (SP). Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UNESP de Rio Claro – SP e foi aprovado sob número CEUA n° 23/219.

3.6. Parasitas Intestinais

Os ovos de *Ascaris lumbricoides* foram obtidos a partir de amostras mantidas em condições controladas, (8°C, em geladeira) no Laboratório de Análises Parasitológicas das Faculdades Integradas Einstein de Limeira, FIEL, Limeira - (SP), e foram gentilmente cedidos pelo Me. Prof. André Ré.

3.6.1. Análises Clínicas

As análises clínicas, realizadas a partir da coleta de amostras de sangue e de fezes, envolveram tanto a avaliação das enzimas hepáticas ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e ALP (fosfatase alcalina) quanto das fezes, e foram realizadas fazendo uso de equipamentos disponíveis nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada e no Biotério do Instituto de Biociências (IB) – UNESP, Rio Claro, (SP).

3.6.2. Obtenção das Amostras de Sangue

Foram coletados, pela médica veterinária Letícia Maria Graballos Ferraz Hebling, CRMV nº 5.412, 2 mL de sangue via punção jugular, com auxílio de seringa de 3 mL e agulha 25x0,08mm (estéreis), que foram acondicionados em tubos da marca Vacutainer® para a realização das dosagens das enzimas hepáticas.

3.6.3. Enzimas Hepáticas

As enzimas hepáticas ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e ALP (fosfatase alcalina) foram analisadas em aparelho BIOPLUS (analisador multiparamétrico semiautomático de ensaios colorimétricos e enzimáticos para bioquímica) fazendo uso dos “kits” LABTEST® linha veterinária (segundo instruções do fabricante), nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada e do Biotério do Instituto de Biociências (IB) - UNESP, Rio Claro, (SP) pelo responsável Ms. Luís Fernando Sodelli, CRBM 4.099.

3.6.4. Obtenção das Amostras de Fezes

As fezes das coelhas foram coletadas por meio da colocação de saco plástico estéril forrando o fundo das gaiolas que as abrigou. Com auxílio de pinça estéril as amostras foram recolhidas, armazenadas em frascos estéreis e encaminhadas para análise que foi realizada pelo Ms. Luís Fernando Sodelli, CRBM 4.099.

3.6.5. Diagnóstico Parasitológico para Pesquisa de Parasitas Intestinais

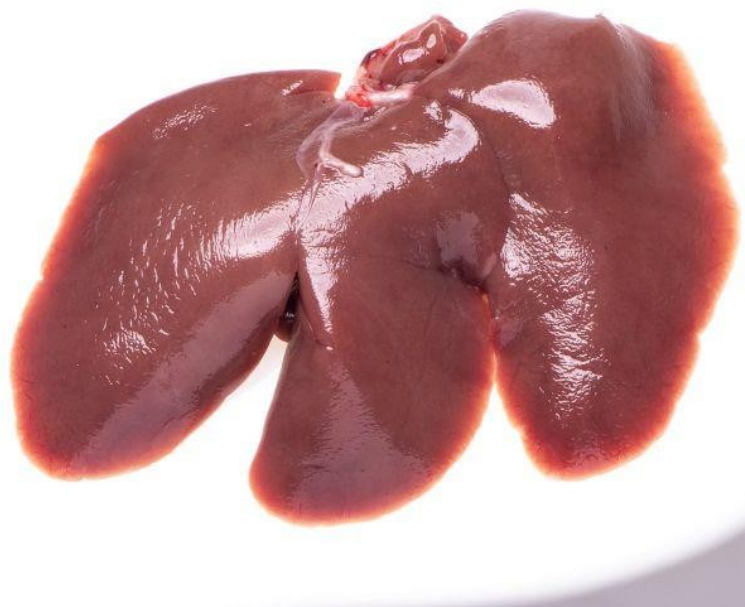
Para o diagnóstico parasitológico, as coelhas (alimentadas com a ração enriquecida com os ésteres) foram infestadas (via oral) com cepas de *A. lumbricoides* agente causador de infecções intestinais, seguindo para tanto o protocolo do método de Hoffman modificado (HOFFMAN et al., 1934).

3.7 Análises Morfológicas

3.7.1. Obtenção das Amostras de Fígado e Baço das Coelhas

Em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro, SP, realizou-se a eutanásia das coelhas (médica veterinária Letícia Maria Graballos Ferraz Hebling, CRMV nº 5.412) fazendo uso da ketamina e xilazina, aplicadas 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) (Figura 1) e do baço.

Figura 1: Fotomicrografia (macro) de fígado de coelho



Fonte: Pel-Freez Biologicals.

3.7.2. Coloração pela Hematoxilina de Harris-Eosina Aquosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Depois de coletados os fragmentos do fígado e do baço das coelhas hospedeiras, estes foram fixados em paraformaldeído 4% por 72 horas a 4°C. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄

2,38 g/L e KH_2PO_4 2,72 g/L) onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, o material foi desidratado em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada), embebido em historesina Leica por 24 horas e incluído 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, 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 Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro, (SP).

3.7.3. Histoquímica

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

Para a detecção de polissacarídeos neutros, fragmentos do fígado e do baço 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. Na sequência foram lavadas em água destilada por 1 minuto e imersas por 1 hora no reagente de Schiff. Foram novamente 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 Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro, (SP).

3.7.3.2. Técnica do Azul de Bromofenol (PEARSE, 1985).

Para detecção de proteínas totais, fragmentos do fígado e do baço foram fixados em paraformaldeído 4% por 48 horas. Em seguida, foram transferidos para solução tampão fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 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 recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas para posterior coloração pelo azul de bromofenol, por uma hora, à temperatura ambiente. Após serem passadas em ácido acético 0,5% por 5 minutos e lavadas em água corrente por 15 minutos, as mesmas passaram rapidamente por solução de álcool butílico terciário. A seguir, foram secas ao ar livre 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 Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro, SP.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese estão sendo apresentados sob a forma de três capítulos, onde o primeiro compreende o artigo em fase de publicação, o segundo em preparação para publicação e o terceiro publicado em periódico especializado.

1. Capítulo 1 (Submetido)

Nascimento, B.J.A.; **SODELLI, L.F.**; Gainza, Y.A.; Camargo-Mathias, M.I. Action of ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*) against *Rhipicephalus linnaei* ticks: analysis of the liver tissue of infested rabbits, a model simulating hosts of this ectoparasite.

Archives of Veterinary Science. 2024.

2. Capítulo 2 (Submetido)

SODELLI, L.F.; Silva, O.; Vinha, E. C. D.; Camargo-Mathias, M.I. Ricinoleic acid esters from castor oil interfering with the development of eggs of the endoparasite *Ascaris lumbricoides*: a new control perspective.

Archives of Veterinary Science. 2024.

3. Capítulo 3 (Publicado)

SODELLI, L.F.; Silva, O.; Nascimento, B.J.A.; Camargo-Mathias, M.I. Liver and spleen of hosts of *Rhipicephalus linnaei* exposed to synthetic (afoxolaner) and natural acaricides (esters from castor oil). A comparative clinical-morphological study.

Braz J Vet Parasitol 2023; 32(3): e004023. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612023041>

Capítulo 1

Avaliação em laboratório da ação dos ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona sobre carrapatos *Rhipicephalus linnaei* infestados em coelhas hospedeiras.

Resumo

O controle de carrapatos tem sido realizado por meio do uso indiscriminado de acaricidas químicos sintéticos. No entanto, sabe-se que o desenvolvimento de resistência aos mesmos pelos ectoparasitas tem aumentado, o que leva a necessidade de se realizar novas abordagens com relação ao seu controle. Poucos estudos têm tido como alvo dietas enriquecidas com produtos naturais, com o objetivo de minimizar o potencial reprodutivo dos ectoparasitas, forma de controle que não elimina o ectoparasita, mas sim impede que seus processos de reprodução e de alimentação sejam bem sucedidos. Assim, sob a perspectiva de se encontrar estratégias de controle de carrapatos que sejam mais sustentáveis, no presente estudo objetivou-se avaliar em laboratório os efeitos dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) sobre os carrapatos da espécie *Rhipicephalus linnaei*, quando os animais hospedeiros ingeriram a ração enriquecida com os ésteres. Foram utilizadas três coelhas hospedeiras/grupo, sendo que no grupo tratamento elas foram alimentadas com ração enriquecida na concentração de 1,75g dos ésteres/Kg de ração e concomitantemente infestadas com 25 casais de carrapatos *Rhipicephalus linnaei*. Os resultados mostraram que após nove dias dos hospedeiros estarem se alimentando com a ração enriquecida, a mortalidade média dos carrapatos alcançou 84%, sinalizando que os bioativos presentes nos ésteres foram efetivos, provocando a morte de grande parte dos ectoparasitas, e ainda, em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo BCSTM, já havia se demonstrado que os hospedeiros não sofreram alterações hepáticas quando expostos a esses bioativos, informações qu

e vem confirmar o potencial desses bioativos como estratégia para controle de carrapatos, sem trazer prejuízos para o animal hospedeiro.

Palavras-chave: carrapatos, acaricida natural, *Rhipicephalus linnaei*, controle.

In vivo evaluation of the action of castor oil (*Ricinus communis*) ricinoleic acid esters on *Rhipicephalus linnaei* tick infested in host rabbits.

Bruna Jéssyca Nascimento Araújo¹, Yousmel Alemán Gainza², Luis Fernando Sodelli³, Maria Isabel Camargo-Mathias⁴*

¹Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. ORCID: 0000-0002-4364-9614

²Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. ORCID: 0000-0002-8257-9495

³Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. ORCID: 0000-0002-9232-5448

⁴Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. ORCID: 0000-0002-9418-8934

Correspondence email: maria.izabel@unesp.br.

Abstract: Tick infestations have been controlled through the indiscriminate use of acaricides. However, few studies have targeted diets enriched with natural products to minimize the reproductive potential of ectoparasites. Thus, we aimed to evaluate in the laboratory the effects of castor oil (*Ricinus communis*) ricinoleic acid esters on *Rhipicephalus linnaei* when the host animals ingested the feed enriched with the esters. Three host rabbits/groups were used. In the treatment group, they were fed with feed enriched with esters in the concentration of 1.75 g of esters/Kg of feed and concomitantly infested with 25 males *Rhipicephalus linnaei* ticks. The primary results showed that the average mortality of the ticks reached 84% after nine days of the hosts being fed with food enriched with esters. This information confirms the potential of these bioactive compounds as a strategy for tick control without bringing more significant damage to the hosts or the environment.

Keywords: ticks, natural acaricide, *Rhipicephalus linnaei*, control strategy

1. Introduction

Ticks (Acari: Ixodidae) are ectoparasites with a remarkable ability to adapt to various environments, especially in urban areas (Wikel, 2018). The rapid geographical expansion of these arthropods and the infections transmitted by them project a challenging picture in the medical, veterinary, and sanitary fields (Dantas-Torres, 2015; Fonsêca et al., 2022). These ectoparasites demonstrate their versatility by parasitizing various vertebrate hosts, ranging from domestic to wild animals and humans (de Oliveira et al., 2020). The species *Rhipicephalus linnaei*, referred to as the tropical lineage of *Rhipicephalus sanguineus* (Šlapeta et al., 2022; Almazán et al., 2023), is popularly known as the brown dog tick and plays a vital role as a vector of pathogens that bring harm to dogs, their preferred hosts.

Controlling tick infestations has been a challenge. This is currently done using synthetic chemicals dominating the veterinary market. However, the literature has shown that these drugs cease to be effective in the control of ticks after some time (Pfister and Armstrong, 2016; Klafke et al., 2017; Vilela et al., 2020), demonstrating the need to search integrated methods of control and prevention aiming to reduce the transmission of pathogens and minimize health, ecological, and economic impacts. It should be noted that compounds of botanical origin or even from other animals (secretions, for example) have been investigated in order to find new biopesticides that are still efficient but less harmful to non-target organisms (Ellse and Wall, 2014; Ntalli et al., 2019).

From this perspective, studies (in the laboratory) have shown interesting and encouraging results on the use of bioactive compounds extracted from various parts of plants that are already recognized for their use in folk medicine in many places in Brazil and worldwide. This type of biotherapy dates to ancient times and is now considered one of the pillars of modern medicine (Quadros et al., 2020; Nwanade et al., 2020). The use of these plants is a tradition that has been passed from generation to generation and gradually refined by new high-precision tools that help in the scientific exploration of the vast potential of these bioactive compounds, which originate from the specialized metabolism of plants (Salmerón-Manzano, 2020).

Given this scenario that search new strategies to control ectoparasites, attention has been drawn to using esters derived from castor oil (*Ricinus communis*) ricinoleic acid esters. The use of castor oil ricinoleic acid has emerged as a promising strategy based on field and laboratory experiments, with encouraging results obtained by several researchers, most participants in the Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM), installed at UNESP in Rio Claro-SP, and which can be cited here since they evaluated the changes caused on dog ticks *R. linnaei*, and on the hosts. These results showed that the morphology of many of the ectoparasites' organs changes after exposure to esters, making the success of essential processes for their survival (reproduction, feeding) impossible, with interference in reproductive rates, decreasing the number of viable eggs due to changes in the dynamics of vitellogenesis of exposed females, and causing early degeneration of the salivary glands, which implied a deficient diet (Arnosti et al., 2011a, 2011b; Sampieri et al., 2012, 2013a, 2013b, 2014; Sodelli et al., 2019). Studies also showed that exposure to esters did not cause liver toxicity to the hosts (Sodelli et al., 2023).

Thus, in this perspective of finding more sustainable and clean tick control strategies, in the present study, we aimed to evaluate in the laboratory the effects of castor oil (*Ricinus communis*) ricinoleic acid esters on the ticks of the species *Rhipicephalus linnaei* when the host animals ingested the feed enriched with the esters.

2. Materials e Methods

2.1. General experimental procedures

The results presented here were obtained through bioassays conducted in the Vivarium of the Department of General and Applied Biology of the Institute of Biosciences/UNESP/Rio Claro, São Paulo. Six healthy rabbits of the Botucatu Genetic Group were used at two months of age, each weighing between 3.0 and 3.5 Kg, without previous contact with ticks or pesticides.

2.2. Castor oil (*Ricinus communis*) ricinoleic acid esters

The esters were produced and kindly provided by Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice USP – São Carlos (SP), in memoriam, and are currently under the domain and responsibility of Prof. Dr. Maria Izabel Souza Camargo of the Department of General and Applied Biology of the Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil.

2.3. Obtaining the food enriched with esters

The food and its enrichment with castor oil ricinoleic acid esters, in the concentration of 1.75 g of esters/Kg of the Bandeirante brand® (previously established in a pilot study by Sodelli et al., 2019) were produced and performed at the Fish Nutrition and Health Laboratory of the Department of Animal Breeding and Nutrition of the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu – SP, Brasil. The food was provided daily to the rabbits infested with the ticks.

2.4. Obtaining the ticks

The *R. linnaei* ticks used for infestation in rabbits were provided by the Butantã Institute and maintained in a BOD greenhouse in the Vivarium of the Department of General and Applied Biology of the Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro – SP, Brasil, under controlled conditions (28 ±1°C, 80% humidity, and 12-hour photoperiod).

2.5. Experimental design

Three host rabbits/groups were used for the bioassays, according to the allocation of animals in the control groups (CG) and treatment (TG), respectively, as described below:

Control Group (CG): rabbits fed daily for 60 days, with a commercial food of the Bandeirante brand®.

Treatment Group (TG): rabbits fed daily for 60 days with a commercial food of the Bandeirante brand®, enriched with castor oil ricinoleic acid esters at a concentration of 1.75 g esters/Kg feed and infested with 25 males of *Rhipicephalus linnaei* ticks. Tick mortality was calculated using the formula: Mortality (%) = dead ticks x100/total ticks.

Bioassays that produced results with mortality in the control group greater than 10% were not quantified. In bioassays with mortality in the control group between 5 and 10%, each mean mortality was corrected by applying the formula described by Abbott (1925). No corrections were made when control mortality was between 0 and 5% and bioassay mortality was 0 or 100%.

2.6. Statistical analysis

The normality of tick mortality results was tested by the Shapiro-Wilk test and later analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunns test. All statistical analyses were performed using the MedCalc software v. 22.019 (MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgium), adopting a significance level of 5%.

3. Results

The rabbits infested with ticks and receiving the feed enriched with castor oil ricinoleic acid esters showed a total decrease in tick survival from the 17th day after feeding compared to the control group. No significant differences were observed ($P>0.05$) concerning the tick fall patterns from the host body, as stated (in absolute numbers of detached ticks) in Table 1.

Group / Animal		Days after treatment							
		1-3		4-7		8-16		17-22	
		% M.	N.C.D	% M.	N.C.D	% M.	N.C.D	% M.	N.C.D
TG	Rabbit 1	4.0±1.0 ^b	0 ^a	44.0±1.4 ^b	0 ^a	84.0±0.9 ^b	0 ^a	100±0.0 ^c	0 ^a
	Rabbit 2	8.0±1.3 ^c	0 ^a	48.0±1.4 ^c	2 ^b	84±1.0 ^b	0 ^a	100±0.0 ^c	0 ^a
	Rabbit 3	0.0±0.0 ^a	0 ^a	44.0±1.3 ^b	0 ^a	84±0.9 ^b	0 ^a	100±0.1 ^c	0 ^a
	Rabbit 4	0.0±0.0 ^a	0 ^a	0.0±0.0 ^a	0 ^a	0.0±0.0 ^a	0 ^a	0.0±0.0 ^a	0 ^a
CG	Rabbit 5	0.0±0.0 ^a	0 ^a	0.0±0.0 ^a	0 ^a	0.0±0.0 ^a	0 ^a	0.0±0.0 ^a	0 ^a
	Rabbit 6	0.0±0.0 ^a	0 ^a	0.0±0.0 ^a	0 ^a	0.0±0.0 ^a	0 ^a	4.0±1.0 ^b	1 ^b

*Different letters in the same column for each rabbit mean significant differences ($P < 0.05$) for mortality and tick fall pattern.

Table 1. Comparison of the result of the overall average mortality (% M.) and the number of detached *R. linnaei* ticks (N.D.T) between the control group (CG) and the treatment group (TG).

There was no mean mortality of ticks lower than 5% in the control group. Therefore, the mortality in the treatment group was not corrected. When the ticks were manipulated using the “Fidelis O'tom Tick Twister” by placing slight pressure on the rabbits of the control group (Figure 1), the ticks, being alive and feeding, moved their articulated appendages and offered some resistance when trying to remove them. This did not occur in the rabbits of the group exposed to esters (Figure 2), whose ectoparasites could be easily removed without resistance.

The mortality of ticks in the treatment group (TG) from the 3rd day was 4%, reached 48% on the 7th day, and reached 100% on the 17th day after ingesting the feed enriched with esters. It was observed that tick specimens, although dead, remained attached to the skin of the rabbits, but with a dehydrated (withered) appearance and with their shrunken articulated appendages (Figure 2).



Figure 1. *Rhipicephalus linnaei* ticks inside a feeding chamber fixed in a rabbit of the Control Group, kept in a Vivarium of the Department of Biology of the Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP).



Figure 2. Dead *Rhipicephalus linnaei* ticks inside a feeding chamber fixed in a rabbit of the Treatment Group, kept in a Vivarium of the Department of Biology of the Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP).

4. Discussion

Medicinal plants are used empirically by folk medicine in treating diseases and controlling animal and human parasites in several regions of Brazil (Quadros et al., 2020). The idea of using castor oil ricinoleic acid esters as a possible tick control strategy is justified by the field reports of Prof. Dr. Gilberto Chierice (in memoriam), who observed an accelerated fall pattern of thicks (*Rhipicephalus microplus*) in cattle when cattle were fed a diet enriched with these esters (Arnosti, 2011), which corroborates the recovery of this knowledge that can be used as a shortcut in pharmacological research, optimizing it. Based on this principle, we sought to expand the record of scientific knowledge concerning the use of castor oil ricinoleic acid esters for tick control.

There are few studies on the effect of diets enriched with castor oil ricinoleic acid esters on animals infested with tick species and ectoparasite. Sampieri et al. (2015) found that the use of a diet enriched with 5g/Kg of esters changed the dynamics of development and production of male gametes of *Amblyomma cajennense*, with consequent interference in the production of spermatophores and seminal fluid. In the specific case of *R. linnaei* (before *R. sanguineus*), Arnosti et al. (2011 a,b), Sampieri et al. (2013a,b), and Camargo-Mathias et al. (2016) obtained results of morphological changes in the reproductive system of engorged female ticks and the secretory cycle of their salivary glands, respectively. These morphological results corroborate the original results presented here, which demonstrated in the laboratory that the efficiency of these esters promoted an average mortality of 84% of ticks in nine days, during which the rabbits were fed with the enriched feed. According to the literature, and depending on the species considered, ticks can remain fixed to the host from 15 to 70 days, remembering that their physiological state and other factors are determinants for establishing this period (Soneshine e Roe, 2014).

The results presented in the present work showed the efficiency of castor oil ricinoleic acid esters on ticks of the species *R. linnaei* in the laboratory since feeding the hosts with the enriched feed caused the mortality of half of the population of ticks in the feeding chambers in seven days since this indicated that the esters would have an excellent acaricidal potential. It should be noted that studies conducted by other authors showed the changes caused by exposure to various bioactive compounds in engorged females (Gadelhaq et al., 2024; Oliveira et al., 2024; Tadee et al., 2024) (whether in vitro or in vivo), leaving few studies demonstrating this type of acaricidal action in male ticks.

In general, the present work brought initial data on the acaricidal potential of castor oil ricinoleic acid esters since they have been effective against ticks of the species *R. linnaei*, which is susceptible to the bioactive compounds present in these esters in laboratory bioassays.

5. Conclusion

The data presented here indicate that esters alter the metabolism of *R. linnaei* ticks, causing the death of about 100% when introduced to the diet of the hosts, confirming that these bioactive compounds may represent a future strategy for controlling ectoparasites.

Briefing notes

Information notes: All procedures performed in this study involving parasites and hosts were approved by the Ethics Committee in Animal Use (CEUA) of UNESP of Rio Claro – SP, opinion no. 03/22.

6. References

- Abbott WS. A method for computing the effectiveness of insecticides. *J Econ Entomol.*, 18 (2): 265-267, 1925. Doi: 10.1093/jee/18.2.265a.
- Almazán C, Reyes de Luna G, Tinoco-Gracia L, González-Álvarez VH, Zajac Z, Kulisz J, Woźniak A, Cabezas-Cruz A, Mosqueda J. Morphological and molecular identification of the brown dog tick in Mexico. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.*, 44: 100908, 2023. Doi: 10.1016/j.vprsr.2023.100908.
- Arnosti A, Brienza PD, Furquim KC, Chierice GO, Bechara GH, Calligaris IB, Camargo-Mathias MI. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. *Exp Parasitol.*, 127 (2): 575–580, 2011a. Doi: 10.1016/j.exppara.2010.10.006.
- Arnosti A, Brienza PD, Furquim KC, Chierice GO, Neto SC, Bechara GH, Sampieri BR, Camargo-Mathias MI. Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Exp Parasitol.*, 127 (2): 569–574, 2011b. Doi: 10.1016/j.exppara.2010.10.009.
- Camargo-Mathias MI, Chierice GO, Brienza PD, Arnosti A, Calligaris IB, Sampieri BR, Nodari EF, Ferreira ARF. Esters from castor oil: interfering with the salivary gland secretory cycle of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). *Emer Life Sci Res.*, 2 (2): 66-72, 2016.
- Dantas-Torres F. Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect. *Int J Parasitol Parasites Wildl.*, 4 (3): 452-461, 2015. Doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.07.001.
- de Oliveira GMB, da Silva IWG, da Cruz Ferreira Evaristo A M, de Azevedo Serpa MC, Silva Campos AN, Dutra V, Nakazato L, de Aguiar DM, Bahia Labruna M, Horta MC. Tick-borne pathogens in dogs, wild small mammals and their ectoparasites in the semi-arid Caatinga biome, northeastern Brazil. *Ticks tick Borne Dis.*, 11 (4): 101409, 2020. Doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101409.
- Ellse L, Wall R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. *Med Vet Entomol.*, 28 (3): 233–243, 2014. Doi: 10.1111/mve.12033.
- Fonsêca, ADV, Oliveira LMB, Jorge FR, Cavalcante RO, Bevilaqua CML, Pinto FJM, Santos JMLD, Teixeira BM, Rodrigues AKPP, Braz GF, Viana GA, Costa EC, Serpa MCA, Weck BC, Labruna MB. Occurrence of tick-borne pathogens in dogs in a coastal region of the state of Ceará, northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.*, 31 (1): e021321, 2022. Doi: 10.1590/S1984-29612022010.
- Klafke G, Webster A, Dall Agnol B, Pradel E, Silva J, de La Canal LH, Becker M, Osório MF, Mansson M, Barreto R, Scheffer R, Souza UA, Corassini VB, Dos Santos J, Reck J, Martins JR. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*, 8(1): 73–80, 2017. Doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.09.019
- Ntalli N, Koliopoulos G, Giatropoulos A, Menkissoglu-Spiroudi U. Plant secondary metabolites against arthropods of medical importance. *Phytochem Rev.*, 18: 1255–1275, 2019. Doi: 10.1007/s1101-019-09647-7.
- Pfister K, Armstrong R. Systemically and cutaneously distributed ectoparasiticide: a review of the efficacy against ticks and fleas on dogs. *Parasit Vectors.*, 9 (1): 436, 2016. Doi: 10.1186/s13071-016-1719-7.
- Quadros DG, Johnson TL, Whitney TR, Oliver JD, Oliva Chávez AS. Plant-Derived Natural Compounds for Tick Pest Control in Livestock and Wildlife: Pragmatism or Utopia? *Insects*, 11 (8): 490, 2020. Doi: 10.3390/insects11080490.
- Nwanade CF, Yu Z, Liu J. Botanical acaricides induced morphophysiological changes of reproductive and salivary glands in tick: A mini-review. *Res Vet Sci*, 132: 285–291, 2020. Doi: 10.1016/j.rvsc.2020.07.008.
- Salmerón-Manzano E, Garrido-Cardenas JA, Manzano-Agugliaro F. Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. *Int J Environ Res Public Health.*, 17 (10): 3376, 2020. Doi: 10.3390/ijerph17103376.
- Sampieri BR, Arnosti A, Nunes PH, Furquim KC, Chierice GO, Mathias MI. Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*). *Micros Res Tech.*, 75 (5): 683–690, 2012. Doi: 10.1002/jemt.21112.
- Sampieri BR, Furquim KC, Nunes PH, Camargo-Mathias MI. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to castor oil (*Ricinus communis*): an ultrastructural overview. *Parasitol Res.*, 112 (2): 611–619, 2013a. Doi: 10.1007/s00436-012-3173-6.
- Sampieri BR, Arnosti A, Furquim KC, Chierice GO, Bechara GH, de Carvalho PL, Nunes PH, Camargo-Mathias MI. Effect of ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*) on the oocyte yolk components of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol.*, 191 (3-4): 315–322, 2013b. Doi: 10.1016/j.vetpar.2012.09.013.
- Sampieri BR, Labruna MB, Bueno OC, Camargo-Mathias MI. Dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks (Acari: Ixodidae) *Amblyomma cajennense* [corrected] (Fabricius, 1787) and *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772): a comparative analysis. *Parasitology Res.*, 113 (4): 1511–1519, 2014. Doi: 10.1007/s00436-014-3795-y.
- Sampieri BR, Furquim KCS, Carvalho PLPF, Bueno OC, Camargo-Mathias MI. Ricinoleic acid esters from castor oil modifying male reproductive system of *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787). *Emer Life Sci Res.*, 1 (1): 26-37, 2015.
- Šlapeta J, Halliday B, Chandra S, Alanazi AD, Abdel-Shafy S. *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) recognised as the "tropical lineage" of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Neotype designation, redescription, and establishment of morphological and molecular reference. *Ticks Tick Borne Dis.*

- Borne Dis., 13(6): 102024, 2022. Doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.102024.
- Sodelli LF. Avaliação bioquímica e morfohistológica de coelhas expostas a acaricida obtido a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona. Dissertação MSc em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 35p. 2019.
- Vilela VLR, Feitosa TF, Bezerra RA, Klafke GM, Riet-Correa F. Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. Ticks Tick Borne Dis., 11(4): 101413, 2020. Doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101413.
- Wikel SK. Ticks and Tick-Borne Infections: Complex Ecology, Agents, and Host Interactions. Vet Sci., 5 (2): 60, 2018. Doi: 10.3390/vetsci5020060.

Capítulo 2

Os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona interferindo no desenvolvimento de ovos do endoparasita *Ascaris lumbricoides*: uma nova perspectiva de controle.

Resumo

O uso dos ésteres sintetizados a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) tem mostrado ser uma promissora estratégia na busca por bioativos que tenham potencial acaricida, mas que ao mesmo tempo não provoquem danos aos hospedeiros, aos organismos não alvos e que ainda mitiguem os impactos ambientais. Estudos, tanto em campo quanto em laboratório, vêm demonstrando a eficácia acaricida desses bioativos. Estudos recentes desenvolvidos pelo grupo BCSTM, vem trazendo à luz informações que comprovam a resposta tanto dos ectoparasitas quanto dos hospedeiros quando expostos a esses ésteres, buscando assegurar que os mesmos poderão ser utilizados futuramente como uma estratégia de controle de ectoparasitas. Muito embora essa busca por bioativos acaricidas ainda tenha um longo caminho a ser percorrido, também avaliou-se no presente projeto a possibilidade de os ésteres terem alguma ação sobre organismos endoparasitas, no caso específico sobre *Ascaris lumbricoides* normalmente encontrados parasitando os hospedeiros. Para tanto realizou-se uma análise clínica das fezes de coelhas expostas aos ésteres fazendo para tanto o uso da técnica de Hoffman. Nove coelhas foram distribuídas em: Grupo Controle (GC) que abrigou três coelhas que foram alimentadas apenas com a ração Bandeirante® e Grupo Tratado (GT) que abrigou seis coelhas que foram alimentadas com ração Bandeirante® enriquecida com os ésteres na concentração de 1,75g dos ésteres/Kg. Os resultados mostraram que nas fezes das coelhas do GT, (expostas aos ésteres) a partir do 5º já não foram mais encontrados ovos de *A. lumbricoides*, sinalizando a potencialidade dos ésteres em eliminar esses endoparasitas (via inativação de seus ovos), resultado que não foi observado nas coelhas do GC, nas quais o exame parasitológico foi positivo para os ovos de *A. lumbricoides* em todas as amostras de fezes recolhidas.

Palavras-chave: Endoparasita intestinal, Hoffman, *Ascaris lumbricoides*, ésteres, ração enriquecida.

Ricinoleic acid esters from castor oil interfering with the development of eggs of the endoparasite *Ascaris lumbricoides*: a new control perspective

Luis Fernando Sodelli³¹, Odaiza da Silva², Eduarda Cristina Da Vinha³, Maria Izabel Camargo-Mathias⁴*

¹ Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. ORCID: 0000-0002-9232-5448

² Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. ORCID: 0000-0003-1588-4358

³ Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. ORCID: 0000-0002-6450-8642

⁴ Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. ORCID: 0000-0002-9418-8934

Correspondence email: maria.izabel@unesp.br.

Abstract: The use of esters synthesized from ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*) has proven to be a promising strategy in the search for bioactives with acaricidal potential, but which at the same time do not cause collateral damage to hosts, non-target organisms and which also mitigate environmental impacts. Recent studies developed by the BCSTM group have brought to light important information that proves the response of both ectoparasites and hosts when exposed to these esters, seeking to ensure that they can be used in the near future as a control strategy for these ectoparasites. Therefore, clinical analysis of feces from rabbits exposed to esters using the Hoffman technique was also performed. In the bioassays, nine rabbits were divided into two groups: Control Group (CG) that housed three rabbits fed only with Bandeirante® food and Treated Group (GT) that housed six rabbits that were fed with Bandeirante® food enriched with esters at a concentration of 1.75g of esters/Kg. The parasitological results showed that in the feces of the GT rabbits, (exposed to ricinoleic acid esters from castor oil) from the 5th day onwards, they no longer presented *A. lumbricoides* eggs in their feces, signaling and proving the effectiveness of the esters and as expected, in the CG the parasitological examination of all rabbits showed positivity in all fecal samples.

Palavras-chaves: Endoparasita intestinal, Hoffman, *Ascaris lumbricoides*, ésteres, ração enriquecida.

1. Introdução

A busca pelo controle e combate de ecto e endoparasitas tem sido atualmente uma ação contínua e que traz consigo muitos desafios, visto que os parasitas tem a capacidade de desenvolver inúmeros mecanismos para driblar a atuação dos seus hospedeiros. Considerado o maior nematóide intestinal, o *Ascaris lumbricoides* vem sendo amplamente estudado, visto o mesmo ser cosmopolita, estando amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais alcançando status ambiental e socioeconômico como influenciador. A literatura vem registrando inclusive que os estudos abrangem grandemente a preferência de ocorrência desse endoparasita, regionalmente falando, e os resultados vem revelando em regiões onde os níveis sócio demográfico e socioeconômico são fatores de relevância para a alta prevalência da ascariíase (SANTOS et al., 2019).

O *A. lumbricoides* é um endoparasita de grande importância médica/veterinária, por provocar infecções intestinais em vários animais, onde se incluem os humanos e os cães, estes últimos, causando grandes preocupações a seus tutores, visto que os mesmos, nos dias atuais, fazem inclusive parte das famílias. Sendo assim controlar esses endoparasitas torna-se importante, mesmo porque os gastos econômicos com medicamentos e visitas ao veterinário, no caso dos “pets”, vem a ser um estimulador para que esse controle seja efetivo.

A transmissão do *A. lumbricoides* ocorre por via oral, através da ingestão dos ovos maduros os quais podem estar presentes no solo, em alimentos mal lavados e na água não tratada, uma vez que os ovos podem sobreviver por anos. Depois de entrarem no sistema dos hospedeiros esses ovos se alojam no intestino delgado, local esse onde os mesmos irão se desenvolver (SILVA et al., 2019). Essas infecções podem levar o hospedeiro a quadros clínicos que muitas vezes são considerados de significante gravidade e, sendo até fatais, quando esses endoparasitas são encontrados em grande quantidade. Nesse último caso, o hospedeiro pode sofrer inchaços abdominais, bem como ser acometido por cólicas gastrointestinais. Cabe ressaltar que esses quadros mais graves quando não tratados podem levar a ruptura do intestino.

Ressalte-se que outro fator que é de extrema importância é o de conhecer como se dá a interação entre o meio ambiente em que o hospedeiro se encontra e o próprio parasito, informações que auxiliam na detecção destas infecções parasitárias, bem como na aplicação de métodos adequados para o seu controle. Além de tudo deve-se levar em consideração as características intrínsecas do próprio indivíduo hospedeiro (imunidade) frente ao parasito (carga contaminante) (ANDRADE et al., 2010; CHIEFFI, 2015; NEVES, 2016).

Quando se aborda o controle ambiental desses endoparasitas, uma vez que os mesmos ocorrem com frequência em homens e cães, os métodos de tratamento mais convencionais incluem vermifugação dos hospedeiros, o que se faz com compostos químicos

de natureza sintética tais como albendazol e piperazina, bem como pela própria higienização do ambiente em que vivem (HAYASHI et al., 2019; SANTOS et al., 2019).

Vários resultados de estudos que já foram previamente desenvolvidos, mostraram que o uso de compostos químicos que sejam formulados a partir de bases sintéticas (caso da vermifugação dos ambientes onde os ovos de *A. lumbricoides* estão depositados), embora alcance um controle satisfatório, os mesmos fornecem uma tênue margem de segurança para os organismos não alvos (incluindo os hospedeiros), e sob essa perspectiva a busca por alternativas mais limpas e também sustentáveis, tem sido uma constante. Dentro dessa temática, informações obtidas de estudos que vem fazendo uso de extratos e de óleos vegetais tem sido animadoras e podem, a médio prazo, serem consideradas como alternativas no controle desses endoparasitas nos níveis sanitário e econômico, visto serem estes mais facilmente degradáveis e, consequentemente deixando menos resíduos no ambiente (CAVALCANTE et al., 2015; KOCHPEKA et al., 2015; SILVA, 2023).

Diante dessas informações anteriormente expostas, o presente trabalho teve como objetivo analisar se os ésteres derivados do óleo de mamona (*Ricinus communis*), bioativos estes que já foram confirmados ter ação acaricida contra carrapatos do cão *Rhipicephalus linnaei* e ainda sem causar toxicidade aos hospedeiros, teriam também ação antiparasitária, no caso, interferindo no desenvolvimento de ovos do nematóide *A. lumbricoides*. Essa informação, em caso positivo, seria de extrema importância no controle desses endoparasitas, uma vez que os ésteres são formulados a partir de base química natural, o que minimizaria os impactos tanto no ambiente quanto nos organismos não alvos. Ressalte-se ainda que esse resultado, em caso positivo, seria um dos pioneiros nessa área, trazendo à luz dados científicos e relevantes obtidos por meio de bioensaios realizados em laboratório.

2. Material e Métodos

2.1. Locais de realização dos estudos

Foram utilizados equipamentos disponíveis nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada 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.

2.2. Ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*)

Os ésteres aqui testados foram produzidos e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice USP - São Carlos, (SP) (*in memoriam*) e atualmente encontram-se sob domínio e responsabilidade da Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, (SP), orientadora do presente projeto, e que foram fornecidos às coelhas hospedeiras juntamente com ração comercial da marca Bandeirantes®, (150g/dia) na concentração de 1,75 g dos ésteres/Kg de ração. Essa concentração foi balizada nos resultados de um estudo piloto realizado anteriormente por Sodelli et al (2022).

2.3. Obtenção da ração enriquecida

A ração enriquecida com os ésteres foi preparada em parceria com o Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu - (SP), sob a supervisão do Dr. Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho, pós doutorando e colaborador do presente projeto.

2.4. Coelhas Hospedeiras

Foram utilizadas nove coelhas saudáveis do Grupo Genético Botucatu, com dois meses de idade, pesando entre 3,0 a 3,5 Kg, sem contato prévio com carrapatos ou com carrapaticidas, adquiridas do Biotério Central da UNESP/Botucatu - (SP). Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UNESP de Rio Claro – SP e foi aprovado sob a decisão CEUA nº23/219.

2.5. Parasitas Intestinais

Os ovos de *A. lumbricoides* foram obtidos a partir de cepas mantidas em condições controladas, (8°C, em geladeira) no Laboratório de Análises Parasitológicas das Faculdades Integradas Einstein de Limeira, Limeira - (SP), Brasil e foram gentilmente cedidas pelo Prof. Me. André Ré.

2.6. Delineamento experimental

As nove coelhas foram divididas em:

- **Grupo Controle (GC):** três coelhas que receberam diariamente apenas ração comercial da marca Bandeirante®.
- **Grupo Tratado (GT):** seis coelhas que receberam diariamente ração comercial da marca Bandeirante® enriquecida com ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona na concentração de 1,75g dos ésteres/Kg de ração.

2.7. Análises clínicas

Foram coletadas amostras de fezes das coelhas nos intervalos de tempos 1, 3, 5 e 7 dias para avaliação da presença de ovos de *A. lumbricoides*, segundo a metodologia de Hoffman et al., (1934), procedimento que deu-se nas dependências do Laboratório de

Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada e em sala do Biotério do Instituto de Biociências (IB) – UNESP, Rio Claro, (SP).

2.7.1 Obtenção das amostras de fezes

As fezes das coelhas foram coletadas por meio da colocação de saco plástico estéril forrando o fundo das gaiolas que as abrigou. Com auxílio de pinça estéril essas amostras foram recolhidas, armazenadas em frascos estéreis e encaminhadas para análise que ficou sob a responsabilidade do Ms. Luís Fernando Sodelli, CRBM. 4.099.

2.7.2. Infestação das coelhas

A infestação das coelhas deu-se por via oral, fazendo a diluição das cepas de *A. lumbricoides* em 10 mL de solução salina, por meio de seringa que normalmente é utilizada para alimentação de aves. O procedimento foi realizado em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB/UNESP/Rio Claro, SP, sob a supervisão da médica veterinária Letícia Maria Graballos Ferraz Hebling, CRMV nº 5.412.

2.7.3. Diagnóstico parasitológico

Para obtenção do diagnóstico parasitológico foi seguido o protocolo de Hoffman modificado (HOFFMAN et al., 1934), método de comprovação da ação antiparasitária dos ésteres, que consistiu na sedimentação espontânea, ou seja, na mistura das fezes coletadas com água. Após promoveu-se a sua filtração fazendo uso de gaze cirúrgica, e em repouso, esperou-se a sedimentação dos restos fecais no fundo do recipiente. Uma alíquota desse sedimento foi pipetada sobre lâmina de vidro, a qual foi gotejada com uma gota de lugol. Após realizou-se um esfregaço, e procedeu-se a observação microscópica. Este método possibilitou a detecção de ovos nas fezes.

3. Resultados

Os resultados obtidos no presente estudo compararam clinicamente durante 7 dias as fezes colhidas e processadas de coelhas simulando hospedeiros de *A. lumbricoides* que foram alimentadas apenas com ração específica da marca Bandeirante® (GC - Grupo Controle) com as fezes daquelas coelhas que foram alimentadas com a ração da marca Bandeirante® e que ainda foi enriquecida com os ésteres do ácido ricinoléico do óleo da mamona na proporção de 1,75g/kg de ração (GT- grupo tratado).

Os resultados mostraram, como já era de se esperar, que nas coelhas do Grupo Controle, em todas as coletas detectou-se nas fezes positividade para a presença de ovos de *A. lumbricoides*, resultado esse que também está demonstrado na Tabela 1.

Quando foram realizadas as análises das fezes das coelhas do Grupo Tratados (exposto aos ésteres), que foi alimentado com ração da marca Bandeirante® enriquecida com os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona, pode-se notar a ausência de ovos nas mesmas, muito provavelmente devido a presença dos ésteres que provavelmente teriam agido como um antiparasitário, já a partir do terceiro dia pós exposição (Tabela 1, GT).

Esses resultados negativos para a presença de ovos de *A. lumbricoides* continuaram a ser observados nas fezes das coelhas do GT, e a partir do quinto dia de exposição aos ésteres, não se observou mais positividade para a presença de ovos nas fezes das coelhas expostas, sinalizando que os bioativos presentes nos ésteres estariam interferindo no desenvolvimento desses ovos, inviabilizando-os na geração de novos indivíduos (Tabela 1).

Grupo Controle (GC)	1º dia	3º dia	5º dia	7º dia
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
Grupo Tratado (GT)				
1	+	-	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	-	-
4	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	+	-	-

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos das análises parasitológicas das coelhas dos grupos GC (controle) e tratado GT nos respectivos intervalos de tempo 1, 3, 5 e 7 dias após infestação pelos ovos de *A. lumbricoides*.

+ positivo para a presença de ovos de *A. lumbricoides*

- negativo para a presença de ovos de *A. lumbricoides*

4. Discussão

A busca por alternativas sustentáveis para o controle de ecto e de endoparasitas tem sido objeto de inúmeros estudos, envolvendo especialistas de diversas áreas, na tentativa de mitigar os danos causados por eles, buscando também não ocasionar prejuízos aos hospedeiros e aos organismos não alvos, bem como ao próprio meio ambiente. As estratégias de controle que vem sendo aplicadas sempre estão associadas a condições higiênico-sanitárias, bem como aos fatores nutricionais em países/regiões onde o índice de desenvolvimento não é baixo (OKENIYI et al., 2007; FERREIRA et al., 2017).

Atualmente, essas estratégias de controle para a eliminação, ou pelo menos para a minimização dos danos causados principalmente pelos *Ascaris lumbricoides*, fazem uso da intervenção farmacológica por meio de medicamentos que são formulados a partir das bases químicas sintéticas, tais como albendazol, mebendazol e ivermectina. Porém, o uso indiscriminado dos mesmos provoca resistência por parte dos parasitas, comprometendo o mecanismo de ação dos fármacos (EFFENDY et al., 2014). Há que se considerar também o fato de que, além da resistência, esses medicamentos não tem caráter sustentável em relação a degradação dos mesmos no meio ambiente, e ainda, ao serem administrados aos hospedeiros, muitas vezes em doses não recomendadas, provocam efeitos colaterais indesejáveis nos mesmos, como náuseas, cólicas além de outros distúrbios gastrintestinais (OHANU et al., 2015).

Na medicina veterinária o estudo relacionado às plantas medicinais tem se expandido, no sentido de se inibir o desenvolvimento dos endoparasitas em alguma fase do seu ciclo de vida (MINHO et al., 2010). Sob a perspectiva de controlar esses endoparasitas com eficiência e ainda não causar danos colaterais aos hospedeiros, vem sendo desenvolvidos métodos de estudo que envolvem o uso de bioativos que são naturalmente produzidos por plantas, como frente às dificuldades de medicações sintéticas (FERREIRA et al., 2017). Assim, no presente trabalho que mostrou como os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona seriam eficientes na eliminação de ectoparasitas, no caso, carrapatos do cão da espécie *Rhipicephalus linnaei* (ARNOSTI et al., 2011a, 2011b; SAMPIERI et al., 2012, 2015, CAMARGO-MATHIAS, 2018; SODELLI, et al., 2023) buscou-se também investigar se esses bioativos não poderiam agir como potenciais vermífugos para a eliminação do endoparasita *Ascaris lumbricoides* que tanto mal causa aos seus hospedeiros.

Os resultados obtidos mostraram que os ésteres do ácido ricinoléico do óleo da mamona quando incorporados a ração que foi fornecida às coelhas, aqui simulando modelos hospedeiros de carrapatos, atuaram como potentes agentes ovicidas, uma vez que a partir do quinto dia da exposição aos mesmos a análise das fezes já mostrou a ausência de ovos desses endoparasitas, o que não foi observado no grupo controle que só se alimentou de ração. O que foi de importância também muito relevante foi o fato de que, em trabalhos anteriores já desenvolvidos, a ação dos ésteres não provocou hepatotoxicidade nas coelhas hospedeiras, o que subsidia a perspectiva de que esses bioativos podem ser num futuro próximo utilizados como agentes não só no controle de ecto, mas também de endoparasitas. Estudos anteriormente desenvolvidos por Calzada et al. (2007) testando a atividade antiparasitária de sementes de *Carica papaya*, mostraram resultados contrários aqueles aqui encontrados, visto que apesar da atividade antiparasitária dessa espécie vegetal, foi detectada hepatotoxicidade causada pela mesma quando utilizada via extrato metanólico.

5. Conclusão

De forma geral, a perspectiva do uso de produtos naturais vem se apresentando como um importante e valioso recurso, nessa busca incessante por substâncias que tenham atividade biológica relevante, o que coloca os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona no status de ser uma alternativa para um controle efetivo não só de ecto, mas também de endoparasitoses, como no caso daquela provocada pelo *Ascaris lumbricoides*.

6. Referência

- Andrade, E. C., Leite, I. C. G., de Oliveira Rodrigues, V., Cesca, M. G. Parasitoses intestinais: uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. Revista de APS, 13:(2), 2010.
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L., Tapia-Contreras, A. Effect of Mexican medicinal plant used to treat Trichomonas vaginalis trophozoites. J. Ethnopharmacol, 113, 2007.
- Cavalcante, P. M. M. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. Educación Química, 26, 319-329, 2015.
- Chieffi, Pedro Paulo. Helminthoses e alterações ambientais e climáticas. Arquivos Médicos, 60(1), 2015.
- Effendy, A. M. W., Suparjo, N. M., Ameen, S. A., Abdullah, O. A. Evaluation of Anthelmintic Potential of Pawpaw (*Carica papaya*) Seeds Administered In-Feed and In-Water for West African Dwarf (WAD) Goats. Evaluation, 4 (16), 2014.

- Ferreira, M. Z., Marin, V. A. Avaliação da atividade antiparasitária da semente de *Carica papaya* (*Caricaceae*): uma revisão sistemática. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 19 (1): 75-80, 2017.
- Hayashi, I., Kanda, S., Lamaningao, P., Mishima, N., Nishiyama, T. Shared expression of mucin12 in *Ascaris lumbricoides* and the human small intestine. *Molecular and biochemical parasitology*, 227:19-24, 2019.
- Hoffman, W. A., Pons, J. A., Ja Ner, J. L. Sedimentation concentration method in *Schistosoma mansoni*. *Puerto Rico J. Publ. Health & Trop. Med.* 9: 283-298. <https://doi.org/10.1590/S003786821974000300003>.
- Kochepka, Débora Merediane. Produção de ésteres etílicos a partir de óleos residuais e gorduras residuais empregando a lipase Novozym 435. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.101, 2015. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/41729>.
- Minho, A., Gennari, S. M., Amarante, A. F. T., Abdala A. L. Anthelmintic effects of condensed tannins on *Trichostrongylus colubriformis* in experimentally infected sheep. *Semina Cien. Agrar.* 31 (4): 1009-1016, 2010.
- Neves, David Pereira. *Parasitologia Humana*. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.
- Ohanu, E.; Inyang-Etoh, P. The efficacy of plant extracts on cecal amebiasis in rats. *Ve. Sci. Develop.*, 5 (5793):41-46, 2015.
- Santos, F. C. P. et al. Registros Parasitários caninos na cidade de Guaratinguetá - São Paulo (2017). In: XVI encontro de iniciação científica - bioeconomia: diversidade e riqueza para o desenvolvimento sustentável, 16., 2019, Lorena. Registros Parasitários caninos na cidade de Guaratinguetá- São Paulo (2017). Lorena: Unifatae, 2019. 1-9. Disponível em: <https://doity.com.br/media/doity/submissoes/5dc1e0a3-db20-4a10-8ebe-5a7943cda1d7-artigo-2017--eic-2019-fer-nickpdf.pdf>.
- Silva, E. P., Silva, J. M., Nascimento, M. C., Aoyama, E. A., Rabelo, L. M., Alexandre, K. V., Rodrigues, G. M. *Ascaris lumbricoides*, quais os danos causados por essa enfermidade nas crianças? *Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde*, 6(11), 19-24, 2019.
- Silva, F. A. Avaliação da toxicidade do óleo essencial de *Lippia schaueriana* Mart. (verbenaceae), potencial acaricida: estudo morfohistológico do rim e do fígado de fêmeas de camundongos *Mus musculus* a ele expostas. 2023. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 69p. 2023. <https://hdl.handle.net/11449/251735>.
- Sodelli, L. F., I. B. Calligaris, J. R. L. Souza, O. Silva, B. J. N. Araújo, M. L. Rodrigues, and M. I. Camargo-Mathias. Clinical and morphophysiological hepatic alterations caused by the ingestion of food with added ricinoleic acid esters a bioactive with acaricidal potential. *Brazilian Journal Of Development* 8(8): 58599-58612, 2022. DOI:10.34117/bjdv8n8-242.

Capítulo 3

Fígado e baço de hospedeiros de *Rhipicephalus linnaei* expostos aos acaricidas sintético (afoxolaner) e natural (ésteres do óleo de mamona). Estudo clínico-morfológico comparativo.

Resumo

Carrapatos *Rhipicephalus linnaei* transmitem patógenos como *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*, para os cães. O mercado veterinário dispõe de acaricidas sintéticos para o controle desses ectoparasitas. Ésteres derivados do óleo de mamona são eficientes, mas há pouca informação sobre seus efeitos em organismos não-alvos. Esse trabalho objetivou analisar clínica (AST, ALT e ALP), histológica e histoquímicamente (fígado e baço) coelhas expostas aos ésteres e ao afoxolaner, tendo sido as mesmas alocadas nos grupos: Controle (GC) que recebeu ração Bandeirante®; Tratamento 1 (TG1), além da ração foram expostas ao afoxolaner, Tratamento 2 (TG2) receberam ração enriquecida com os ésteres (1,75 g ésteres/kg). Não houve alterações nas enzimas AST, ALT e ALP na exposição aos ésteres (TG2). No TG1 houve alterações na AST. O fígado das coelhas do TG1 apresentou alterações histológicas e histoquímicas, tais como esteatose e vacuolização, bem como fraca marcação de proteínas. Polissacarídeos foi intensamente marcados no fígado do TG2. O baço não apresentou alterações em nenhum dos grupos. Os ésteres do óleo de mamona causaram menos alterações hepáticas nas coelhas do que quando elas foram expostas ao afoxolaner.

Palavras-chave: Carrapato vermelho do cão, produto natural, *Ricinus communis*, isoxazolina, Nexgard®.

Liver and spleen of hosts of *Rhipicephalus linnaei* exposed to synthetic (afoxolaner) and natural acaricides (esters from castor oil). A comparative clinical-morphological study

Fígado e baço de hospedeiros de *Rhipicephalus linnaei* expostos aos acaricidas sintético (afoxolaner) e natural (ésteres do óleo de mamona). Estudo clínico-morfológico comparativo

Luís Fernando Sodelli¹; Odaiza da Silva¹; Bruna Jéssyca Nascimento Araújo¹; Maria Izabel Camargo-Mathias^{1*} 

¹ Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil

How to cite: Sodelli LF, Silva O, Araújo BJN, Camargo-Mathias MI. Liver and spleen of hosts of *Rhipicephalus linnaei* exposed to synthetic (afoxolaner) and natural acaricides (esters from castor oil). A comparative clinical-morphological study. *Braz J Vet Parasitol* 2023; 32(3): e004023. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612023041>

Abstract

In dogs, *Rhipicephalus linnaei* transmits pathogens such as *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, and *Hepatozoon canis*. The veterinary market has synthetic acaricides to ticks control. Esters derived from castor oil are efficient. However, there is little information about their effects on non-target organisms. This work consisted of a clinical (AST, ALT, and ALP) and histological and histochemical analysis (liver and spleen) of female rabbits exposed to these esters and afoxolaner. The rabbits were divided into three groups: control group (CG) received Bandeirante® rabbit feed; the afoxolaner treatment (TG1) received rabbit feed and two doses of afoxolaner; castor oil esters treatment (TG2) received rabbit feed enriched with esters (1.75 g esters/kg). No alterations were observed in the AST, ALT, and ALP enzymes in exposure to esters TG2. Rabbits from TG1 showed changes in AST. The liver of rabbits exposed to afoxolaner underwent histological and histochemical changes, such as steatosis and vacuolation, as well as poor protein labeling. Polysaccharides were intensely observed in the group exposed to esters. The spleen showed no changes in any of the exposure. Esters from castor oil caused fewer liver changes when incorporated into the feed and fed to rabbits than exposure to afoxolaner.

Keywords: Brown dog tick, natural product, *Ricinus communis*, isoxazoline, Nexgard®.

Resumo

Carrapatos *Rhipicephalus linnaei* transmitem patógenos como *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*, para os cães. O mercado veterinário dispõe de acaricidas sintéticos para o controle desses ectoparasitas. Ésteres derivados do óleo de mamona são eficientes, mas há pouca informação sobre seus efeitos em organismos não-alvos. Esse trabalho objetivou analisar clínica (AST, ALT e ALP), histológica e histoquimicamente (fígado e baço) coelhas expostas aos ésteres e ao afoxolaner, tendo sido as mesmas alocadas nos grupos: Controle (GC) que recebeu ração Bandeirante®; Tratamento 1 (TG1), além da ração foram expostas ao afoxolaner, Tratamento 2 (TG2) receberam ração enriquecida com os ésteres (1,75 g ésteres/kg). Não houve alterações nas enzimas AST, ALT e ALP na exposição aos ésteres (TG2). No TG1 houve alterações na AST. O fígado das coelhas do TG1 apresentou alterações histológicas e histoquímicas, tais como esteatose e vacuolização, bem como fraca marcação de proteínas. Polissacarídeos foi intensamente marcados no fígado do TG2. O baço não apresentou alterações em nenhum dos grupos. Os ésteres do óleo de mamona causaram menos alterações hepáticas nas coelhas do que quando elas foram expostas ao afoxolaner.

Palavras-chave: Carrapato vermelho do cão, produto natural, *Ricinus communis*, isoxazolina, Nexgard®.

Received March 22, 2023. Accepted May 30, 2023.

*Corresponding author: Maria Izabel Camargo-Mathias. E-mail: maria.izabel@unesp.br



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Many mammal species are hosts to ectoparasites that frequently infest them and transmit causative agents of various diseases (Nakkoud et al., 2022). *Rhipicephalus linnaei*, formerly known as the tropical lineage of *R. sanguineus*, known as the brown dog tick, has canids as its primary hosts (Abreu et al., 2020; Dantas-Torres, 2008; Šlapeta et al., 2022). This arthropod is distributed worldwide and can transmit dangerous pathogens to dogs, such as *Ehrlichia canis*, causative agent of canine monocytic ehrlichiosis (CME). In addition, protozoa such as *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* can also cause serious illness (Huggins et al., 2022; Chaber et al., 2022). The veterinary market offers a diversity of acaricides formulated from different chemical classes. Many of these products are toxic and select resistant individuals (Sunkara et al., 2022). Even with sparing use, these chemical agents can cause a wide range of problems and complications in the host of the ectoparasite, the dog. According to the information provided by the manufacturer in the package insert afoxolaner, a member of the pharmacological class of isoxazolines, episodes of adverse reactions such as vomiting, dry skin or peeling, skin irritation (itching), diarrhea, lethargy, and anorexia have manifested in controlled field studies. These events were classified as non-serious and rare and occurred in a self-limiting manner, of short duration, and with a reduction in subsequent doses.

Afoxolaner is one of the acaricidal medications available on the veterinary market. It protects the animal against ticks, fleas, and mites (Tinkruejeen et al., 2019) and is presented in a 0.5 g chewable form containing 11.3 mg of afoxolaner per tablet (Drag et al., 2014) and formulated from a chemical class belonging to the isoxazoline family. This drug acts on the γ -aminobutyric acid (GABA) receptor and glutamate receptors, causing excessive neural stimulation and arthropod death 48 hours after the bite (Beugnet et al., 2015; Cutolo et al., 2021), acting quickly in the host organism, which is a considerable advantage. The drug acts as an acaricide for approximately one month and is recommended for dogs at 30-day intervals (Burgio et al., 2016; Beugnet et al., 2015; Tinkruejeen et al., 2019).

Medicinal plants have been used for curing diseases, preferably in humans and they are the bases of new products with acaricide action (Mabasa et al., 2021). Therefore, bioactive compounds found in plants have been the source of new studies and include esters derived from the ricinoleic acid of castor oil (*Ricinus communis*). These bioactives act as a natural acaricide against ticks, changing the morphology and physiology of organs, such as salivary glands and ovaries. Pilot studies have indicated that they would not cause damage to the hosts or the environment (Arnosti et al., 2011; Sodelli et al., 2022; Camargo-Mathias, 2018). In general, most studies on acaricidal products focus on understanding how it acts on the ectoparasite organism (Abreu et al., 2020; Souza et al., 2019; Sodelli et al., 2022), overlooking how these chemicals would act on the host systems and other non-target organisms (Camargo-Mathias, 2018). In that sense, the main objective of this study was to evaluate the effects of acaricidal substances (of natural and synthetic origin) through clinical examinations of liver enzymes and morpho-histology of the liver and spleen of tick host animals exposed to castor oil ricinoleic acid esters incorporated in the commercial feed of the brand Bandeirante® and the drug afoxolaner (chemical acaricide belonging to the isoxazoline family). These organs were chosen because they are critical indicators of the cytotoxic potential of chemical agents since the liver detoxifies the body and the spleen defends against antigens present in the blood.

Material and Methods

Host rabbits

Nine rabbits from the Botucatu Genetic Group, aged two months, weighing 3.0 to 3.5 kg, without previous contact with ticks or acaricides, acquired at UNESP/Botucatu (SP) were used. They were divided into three groups: GC (control group), TG1 (treatment with afoxolaner) and TG2 (treatment with castor oil). They were placed in individual cages made of galvanized wire, for adaptation, under controlled temperature and photoperiods, receiving water and food ad libitum.

Castor oil ricinoleic acid esters (*Ricinus communis*)

To evaluate the effects of esters, the rabbits were fed 175g of ester-enriched feed daily at a concentration of 1.75 g ester/kg of Bandeirante® commercial feed, a concentration previously established in a pilot study conducted by Sodelli (2019).

Experimental Design

- 1) **Control Group (CG):** the rabbits were provided daily with Bandeirante® commercial feed for 60 days.
- 2) **Afoxolaner treatment (TG1):** rabbits were fed Bandeirante® commercial feed and exposed to two doses in 0.5 g chewable form containing 11.3 mg afoxolaner per Nexgard® tablet for 60 days with a 30 day interval between administrations.
- 3) **Castor oil treatment (TG2):** the rabbits received daily the Bandeirante® commercial feed enriched with castor oil ricinoleic acid esters at a 1.75 g of esters/Kg of feed for 60 days.

Clinical Analysis

Tables 1-3 show the results obtained from the blood samples of rabbits representatives of the three groups evaluating enzymes AST, ALT, and ALP, performed using the BIOPLUS device (semi-automatic multiparametric analyzer of colorimetric and enzymatic assays for biochemistry), LABTEST® reagents, following the protocols performed by the manufacturer.

Table 1. Data found in the evaluation of the enzyme aspartate aminotransferase (AST) of all animals of all groups analyzed in the present study at different times of blood collection. Note the reference values for this enzyme on the right of the table. Note (in red) the values found in the TG1 that are above those references.

Aspartate Aminotransferase (AST)							
Group	Rabbit	T 0	T 15	T 30	T 45	T 60	Reference value
CG	1	44	38	42	38	40	18 – 56 U/L
	2	33	47	44	41	39	
	3	34	44	39	34	41	
TG1	1	37	102	68	92	59	
	2	32	123	61	103	68	
	3	48	98	66	85	64	
TG2	1	32	34	30	29	36	
	2	40	36	39	43	42	
	3	46	40	41	38	40	

CG: control group; TG1: afoxolaner treatment; TG2: castor oil treatment; T: time in days; U/L: unit per liter, values above reference.

Table 2. Data found in the evaluation of the enzyme alanine aminotransferase (ALT) of all animals of all groups analyzed in the present study at different times of blood collection. Note the reference values for this enzyme on the right of the table.

Alanine Aminotransferase (ALT)							
Group	Rabbit	T 0	T 15	T 30	T 45	T 60	Reference value
CG	1	65	52	47	52	49	34 – 123 U/L
	2	43	49	51	47	52	
	3	48	56	52	54	45	
TG1	1	47	49	53	49	50	
	2	50	46	48	43	45	
	3	52	67	55	45	64	
TG2	1	59	52	47	54	51	
	2	50	47	54	49	44	
	3	46	49	44	61	57	

CG: control group; TG1: afoxolaner treatment; TG2: castor oil treatment; T: time in days; U/L: unit per liter.

Table 3. Data found in the evaluation of the enzyme alkaline phosphatase (ALP) of all animals of all groups analyzed in the present study at different times of blood collection. Note the reference values for this enzyme on the right of the table.

Alkaline Phosphatase (ALP)							Reference value
Group	Rabbit	T 0	T 15	T 30	T 45	T 60	
CG	1	301	289	285	298	307	250 – 600 U/L
	2	286	341	323	328	295	
	3	296	320	336	316	309	
TG1	1	315	335	327	299	321	
	2	321	317	299	276	314	
	3	300	319	301	295	289	
TG2	1	294	288	307	311	296	
	2	301	296	279	297	300	
	3	297	321	315	319	288	

CG: control group; TG1: afoxolaner treatment; TG2: castor oil treatment; T: time in days; U/L: unit per liter.

By jugular puncture, 2 mL of blood was collected from each rabbit using a 3 mL syringe and 25x0.08 mm needle (sterile) placed in a dry Vacuntainer® with separating gel, for biochemical tests of liver enzymes AST, ALT, and ALP.

Morphological Analysis

Obtaining liver and spleen samples from the rabbits

The CG, TG1, and TG2 rabbits were euthanized in a room of the Department of General and Applied Biology Viverium by veterinarian Letícia Maria Graballos Ferraz Hebling, CRMV nº 5.412, using ketamine and xylazine, applied intraperitoneally in dosages of 300 mg/kg and 30 mg/kg, respectively, to collect the fragments of the liver and spleen.

Harris hematoxylin-aqueous eosin staining (Junqueira & Junqueira, 1983)

The host rabbits’ liver and spleen fragments were fixed in 4% paraformaldehyde for 72 hours at 4 °C. They were then transferred to a phosphate buffer solution (NaCl 7.5 g/ L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L, and KH₂PO₄ 2.72 g/L), where they remained for 24 hours. Subsequently, they were dehydrated in increasing series of 70%, 80%, 90%, and 95% ethyl alcohol (baths of 30 minutes each), soaked in Leica historesin for 24 hours, and placed in plastic molds containing historesin plus polymerizer (Leica Historesin Kit®). The blocks were sectioned (3 µm thick) in Leica RM2265 microtome (Leica®), the sections were rehydrated for 1 minute in distilled water and then stained by Harris hematoxylin for eight minutes. After washing for three minutes in running water, they were stained by aqueous eosin for five minutes and again washed in running water. After drying, the slides were dipped in xylol and then covered with Entellan and coverslip. The permanent slides were examined and photographed under a Leica DM750 bright field microscope (Leica®).

Histochemistry

PAS technique (periodic acid-Schiff) (Junqueira & Junqueira, 1983)

Liver fragments were fixed in 4% paraformaldehyde for 72 hours at 4 °C and dehydrated in concentrations of alcohol 70%-95% in baths of 30 minutes each to detect neutral polysaccharides. They were soaked in Leica historesin for 24 hours and placed in plastic molds containing historesin plus polymerizer (Leica Historesin Kit®). Later, the blocks were sectioned (3 µm thick) in Leica RM2265 microtome (Leica®), and the sections were rehydrated for 1 minute in distilled water and transferred to a 4% periodic acid solution for 10 minutes. Washing was performed

in distilled water for 1 minute and immersion for 1 hour in Schiff's reagent. They were then washed for 15 minutes under running water, dried at room temperature, and mounted on Entellan. The permanent slides were examined and photographed under a Leica DM750 (Leica®) bright-field microscope.

Bromophenol blue technique (Pearse, 1985)

Fragments of the liver and spleen were fixed in 4% paraformaldehyde for 72 hours to detect total proteins. They were dehydrated in increasing series of ethyl alcohol 70%-95% (30 minutes each), soaked in Leica historesin for 24 hours, and placed in plastic molds containing historesin plus polymerizer (Leica Historesin Kit®). The blocks were sectioned (3 µm thick) in Leica RM2265 microtome (Leica®). The sections were bromophenol blue staining for one hour at room temperature. After being washed under running water for 15 minutes, they were dried, mounted on Entellan, and covered with a coverslip. The permanent slides were examined and photographed under a Leica DM750 (Leica®) bright-field microscope.

Results

Clinical analysis

The data obtained from the analysis of blood samples from rabbits from the control groups (CG), the group exposed to afoxolaner (TG1), and the group exposed to esters derived from castor oil (TG2) at times 0, 15, 30, 45, and 60 days are arranged in Table 1 (AST), Table 2 (ALT), and Table 3 (ALP) with the respective results and reference values.

The data obtained from the enzymes AST, ALT, and ALP of the rabbits allocated in the (CG) served as a reference for comparison with the results obtained from the rabbits allocated in Treatment Groups 1 and 2 (Tables 1-3).

The rabbits allocated to this group were fed with Bandeirante® commercial feed and exposed to two doses of afoxolaner. The first dose was administered at T0 (baseline time) and the second after 30 days at T30. Table 1 shows that this group presented no changes in the parameters of the liver enzymes ALT and ALP. However, it presented a significant increase in serum levels for the enzyme parameter AST at times T15, T30, T45, and T60.

The rabbits (TG2) were fed with the Bandeirante® commercial feed enriched with castor oil ricinoleic acid esters at a concentration of 1.75 g of esters/Kg on days 0, 15, 30, 45, and 60. The blood sample data did not differ from those found in the control group (CG) used as a reference for the enzymes AST, ALT, and ALP.

Morphology

Liver-control group (CG)

The results showed that the liver of the rabbits of the CG, showed preserved liver tissue, with hepatocyte cords parallel to each other and evident cell boundaries. Hepatocytes showed the presence of one or two rounded nuclei and a nucleolus (Figure 1A-1B).

The cytoplasm of the hepatocytes was generally homogeneous, i.e., with no vacuoles or lipid droplets of significant size (Figure 1B).

A large amount of red blood cells was observed inside the hepatic blood vessels, which was also expected.

Nuclei with elongated shapes belonging to Kupffer cells, known as liver macrophages, can be observed between the strands of hepatocytes (Figure 1 A-1B).

Histochemical tests applied to the livers of the (CG) individuals confirmed that the liver tissue was preserved (Figure 1C-1D). The test for protein detection showed the cytoplasm nuclei of hepatocytes strongly positive for this element (Figure 1C).

The test for carbohydrates showed hepatocytes with strongly positive cytoplasm since the liver tissue is physiologically involved with the production and storage of complexes with carbohydrates in their constitution (Figure 1D).

The nuclei of hepatocytes and Kupffer cells could not be evidenced due to the specificity of this histochemical technique.

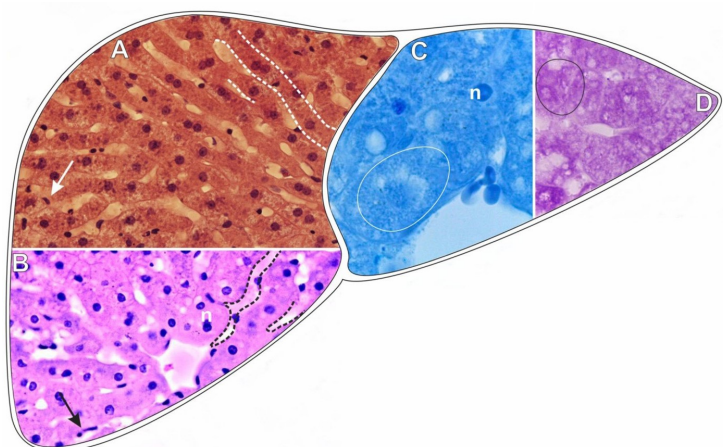


Figure 1. Scheme and histological sections of the liver of rabbits allocated in the control group (CG), stained by HE (A-B) for the general observation of tissue organization and by bromophenol blue (C) and PAS reaction (D) to detect total proteins and carbohydrates, respectively. **Circle**= hepatocyte, **n**= hepatocyte nucleus, **arrow**= Kupffer cell nucleus, **dashed**= hepatocyte cords. **A-B**= 40X. **C-D**= 100X.

Liver of afoxolaner treatment (TG1)

Despite showing hepatocytes with their cell boundaries quite evident, the liver tissue of the rabbits exposed to afoxolaner also showed that, unlike what was observed in the rabbits of the (CG), the cytoplasm of these cells was more heterogeneous, that is, with lipid droplets distributed throughout the cell (Figure 2A-2B). The onset of cytoplasmic vacuolation around the hepatocyte nucleus (Figure 2B) and vacuoles between the hepatocyte cords (Figure 2A) were also noted.

Contrary to what was observed in the CG rabbits, the detection of proteins in the liver tissue of the rabbit exposed to afoxolaner was less intense (Figure 2C). The cytoplasm of hepatocytes showed extensive areas with very weak markings or even absence of markings for protein, also highlighting that, contrary to what was observed in the (CG), the hepatocyte nuclei were medially positive (Figure 2C) but still with the evident nucleolus.

Cytoplasmic changes were observed in the PAS reaction for carbohydrate detection compared with the **CG**. Many vacuolated areas could be observed in the cytoplasm of hepatocytes and are composed of strongly positive clusters of fine granulations (carbohydrate aggregates) distributed over almost the entire extent of the hepatocytes (Figure 2D). The nuclei of hepatocytes and Kupffer cells could not be evidenced.

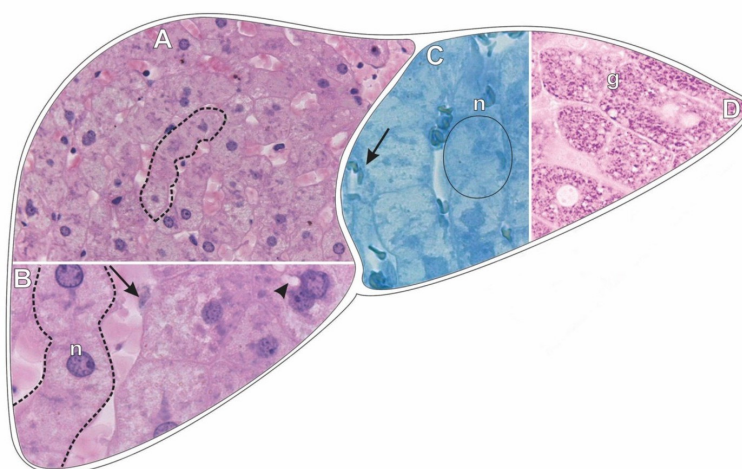


Figure 2. Scheme and histological sections of the liver of rabbits exposed to afoxolaner (TG1) and stained by HE (A-B). Histochemical tests: bromophenol blue (C) and PAS reaction (D) to detect total proteins and carbohydrates, respectively. **Circle**= hepatocyte, **n**= hepatocyte nucleus, **arrow**= Kupffer cell nucleus, **arrow head**= vacuolation around the nucleus, **g**= fine cytoplasmic granulation PAS-positive, **dashed**= hepatocyte cords. **A**= 40X. **B, C, D**= 100X.

Liver of castor oil treatment (TG2)

Morphological changes in liver tissue were observed in rabbits exposed to Bandeirante® commercial feed enriched with castor oil ricinoleic acid esters. However, these were not as aggressive as those observed in rabbits that received doses of afoxolaner (Figure 3A-3B).

The vacuolation of the cytoplasm concentrated around the nuclei of the hepatocytes in (TG2) was not observed at the time of exposure to esters (Figure 3B). On the contrary, the exposure to esters showed an increase in the form of fine granulation of polysaccharide nature, probably glycogen granules (Figure 3D), showed the cytoplasm of hepatocytes almost filled by strongly positive PAS granulation, contrary to that observed in the exposure of liver tissue to afoxolaner (Figure 2D).

Also under the histochemical aspect, the protein detection in the liver tissue of rabbits exposed to esters showed more significant preservation of elements of a protein nature in the cytoplasm of hepatocytes than was observed in exposure to afoxolaner (Figures 2D, 3D).

Although cytoplasmic vacuolation was evidenced, strong (coarse) granulation of protein elements was observed. Additionally, contrary to what was observed in exposure to afoxolaner, the hepatocyte nuclei were strongly marked by bromophenol blue, as were the nucleoli (Figure 3D).

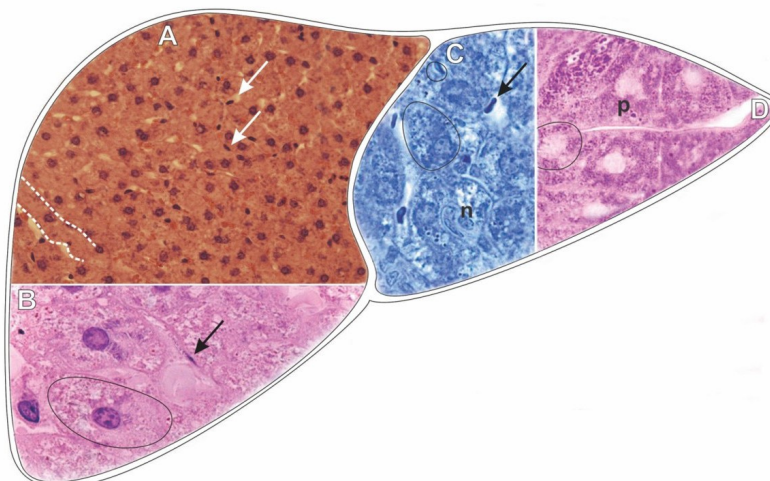


Figure 3. Scheme and histological sections of the liver of rabbits allocated to the castor oil treatment group (TG2) (*Ricinus communis*). The sections were stained by HE (A-B) and bromophenol blue (C), and PAS reaction (D) to detect total proteins and carbohydrates. **Dashed**= hepatocyte cord, **p**= accumulation of polysaccharide granulation, **n**= nucleus, **arrow**= Kupffer cell, **circles**= hepatocyte. **A**= 40X. **B, C, D**= 100X.

Spleen-control group (CG)

We also evaluated the morphology/histology of the spleen of rabbits of the control group (CG), afoxolaner treatment (TG1), and castor oil treatment (TG2). The most evident change occurred in the group exposed to castor oil ricinoleic acid esters (TG2) (Figures 4-6), with apparent clear tissue vacuolation when the red pulp was analyzed (Figure 5A).

The spleen is considered the highest concentration of lymphoid tissue in the body, representing an organ of defense against microorganisms and the destroyer of erythrocytes. This organ is subdivided into white pulp (lymphoid tissue) and red pulp (tissue rich in cells and reticular fibers) rich in blood.

The data obtained showed that there were only minor morphological changes in the spleen when comparing the two exposure groups (TG1 and TG2) to the control group (CG) (Figures 4-7).

Histologically, no significant changes were detected when applying the techniques for detecting proteins and carbohydrates (Figure 7A-7B).

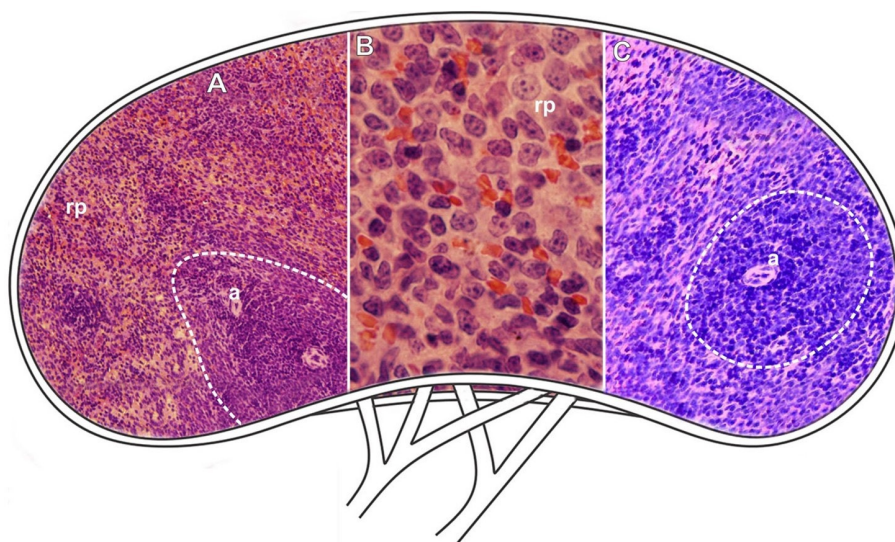


Figure 4. Scheme and histological sections of the spleen of rabbits allocated in the control group (CG), stained by HE (A-C) for the general observation of the tissue after exposure. **Dashed**= white pulp, **a**= arteriole, **rp**= red pulp. **A**= 10X. **B**= 100X. **C**= 40X.

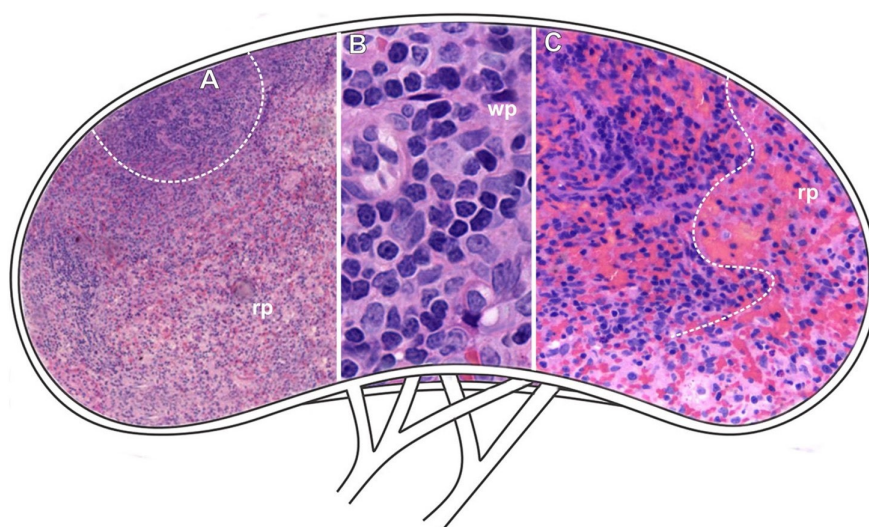


Figure 5. Scheme and histological sections of the spleen of rabbits allocated to the afoxolaner treatment group (TG1), stained by HE (A-C) for the general observation of the tissue after exposure. **Dashed**= white pulp region (**wp**), **rp**= red pulp. **A**= 10X. **B**= 100x. **C**= 40X.

Discussion

Rabbits and dogs share anatomical, physiological, and immunological similarities, making them relevant models for studying the effectiveness of tick control products and strategies in dogs. This approach allows a better understanding of the effects and safety of treatments in a similar biological system. In addition, rabbits are widely used in research and readily available in many laboratories and institutions, facilitating access to these experimental models (Mapara et al., 2012). By using rabbits as models, it is possible to better control the study variables, such as exposure to ticks and the treatments applied, which can be challenging in experiments performed directly on dogs. This approach also reduces the need to expose dogs to invasive or potentially harmful procedures, contributing to a reduction in the use of pets in research. Thus, the use of rabbits in experiments follows the "3Rs" principle (reduction, refinement, and replacement) in animal experimentation, while providing valuable information on the effectiveness of treatments and the understanding of the mechanisms involved in the tick-host interaction (Gad, 2016; Calasans-Maia et al., 2009).

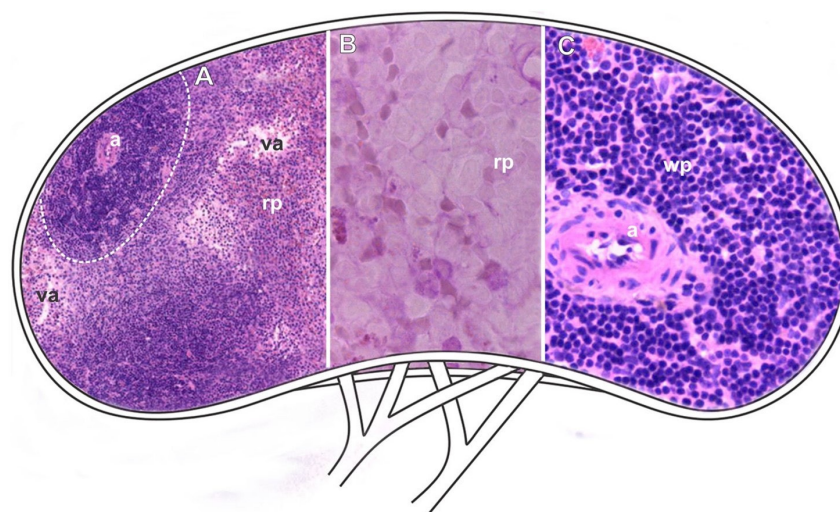


Figure 6. Scheme and histological sections of the spleen of rabbits allocated to the castor oil treatment group (TG2) (*Ricinus communis*), subjected to HE stain (A-C) and PAS reaction (B) to detect carbohydrates. **Dashed**= white pulp region (**wp**), **a**= central arteriole, **rp**= red pulp. **A**= 10X. **B**= 100X. **C**= 40X.

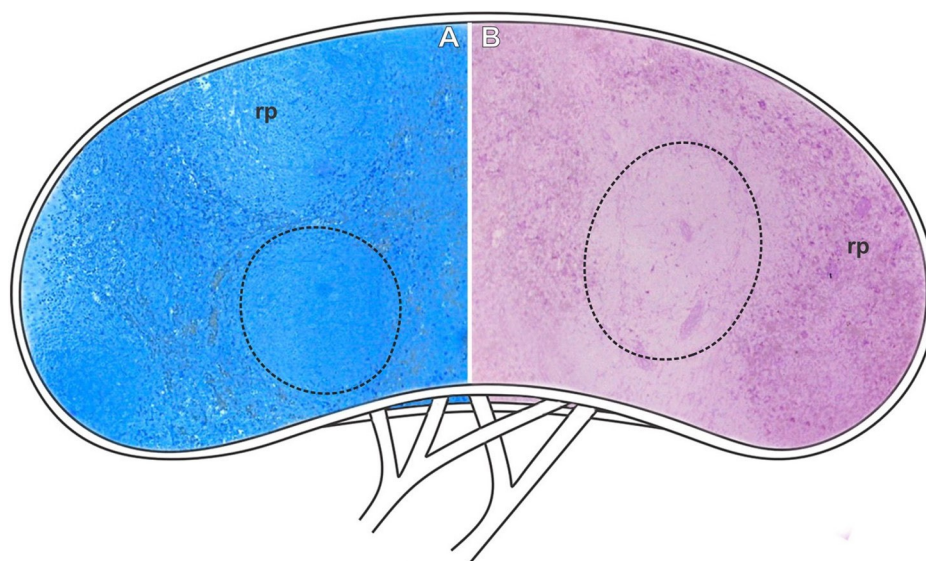


Figure 7. Scheme and histological sections of the spleen of rabbits allocated in the control group (CG), stained by bromophenol blue to detect total proteins (A), and reacted by PAS to detect carbohydrates (B). **Dashed**= white pulp, **rp**= red pulp. **A-B**= 10X.

Tick control is necessary to eliminate this ectoparasite, especially in urban environments where hosts, such as dogs, are in constant contact with humans. Because these “pets” are often considered family members, concern about ectoparasite control increases due to the potential for humans to become targets for tick parasitism. Research focusing on the bioactive compounds found in castor oil esters (*Ricinus communis*) have demonstrated their effectiveness in the main organs related to tick feeding (salivary glands) and reproduction (ovaries), as demonstrated by Sampieri et al. (2013), Arnosti et al. (2011), and Sodelli et al. (2022). However, despite the efficiency of esters as acaricides, little is known about their effects on non-target organisms. Many studies, including those by Cunha et al. (2017), Sodelli et al. (2022), and Vieira et al. (2006), highlighted that these compounds can be toxic to both hosts and non-target organisms, despite their potency as acaricides. Synthetic chemical-based acaricides, such as afoxolaner, have gained prominence in the veterinary market. Afoxolaner acts on glutamate receptors, causing excessive neural stimulation and leading to tick death, as described by Drag et al. (2014), Cutolo et al. (2021), and Tinkruejeen et al. (2019). Over all, this research contributes to understanding the challenges and potential risks

associated with tick control methods, highlighting the need for further studies to develop safer and more effective strategies for tick management in both human and veterinary contexts.

This information stimulated the development of this project, which aimed to analyze the levels of hepatic enzymes in the liver of rabbits when exposed to natural (castor esters) and synthetic (afoxolaner) acaricides by analyzing the enzymes AST, ALT, and ALP (Tables 1-3), demonstrating that the esters did not change the pattern of these enzymes and the results are within the reference values and close to those of the CG. These findings indicate that esters have a promising safety profile and can be considered a viable option for treating tick infestations. Arnosti et al. (2011) and Sampieri et al. (2013) have proven the effectiveness of these compounds as acaricides, showing their potential in the fight against these ectoparasites, highlighting their relevance in research, and making esters a new control strategy.

On the other hand, the data obtained from rabbits allocated in TG1, exposed to the synthetic acaricide afoxolaner, showed an increase in the parameters of the enzyme aspartate aminotransferase (AST), suggesting the occurrence of drug poisoning, probably due to the synthetic chemical. Aspartate aminotransferase (AST) is a liver enzyme that has its blood levels increased in the presence of liver cell injury. Its specificity is lower than that of ALT, and the increase in serum levels can occur in cases of intoxication, mainly due to drug intake (1 and 2). An increase in this enzyme in the blood of TG1 rabbits was found in the experiment conducted as a result of the drug administration, indicating liver poisoning. However, the blood levels of this enzyme in TG2 remain similar to those of CG, compatible with the reference values indicative of normality. This means that there is no impairment of the liver and that ricinoleic acid esters are more indicated for use as an acaricide.

The analysis of the liver and spleen of rabbits exposed to the synthetic acaricide afoxolaner and the castor oil esters comparatively and from morpho-histological and histochemical aspects showed that the liver of rabbits exposed to afoxolaner presented lipid droplets distributed in the cytoplasm of hepatocytes evidencing the occurrence of hepatic steatosis due to the use of this specific drug. Steatosis is a condition with a significant accumulation of lipids in hepatocytes. Steatosis can be classified as microvesicular (enlargement of the cytoplasmic accumulation of small lipid droplets due to impairment in mitochondrial β -oxidation) or macrovesicular (related to clinical conditions, including nutritional, metabolic, and drug-induced processes) (Minamikawa et al., 2020). The results here presented suggest the installation of macrovesicular steatosis due to exposure to synthetic acaricide. Metabolic disorders can occur due to the prolonged use of substances that cause hepatotoxicity, in this case, the synthetic acaricide, resulting in liver inflammation (Albadry et al., 2022). Excess fat in the cytoplasm of hepatocytes leads to cytoplasmic and tissue disorganization, consequently causing structural changes, especially circulatory, damaging the organ and body since perfect blood circulation is essential for the integrity of liver physiology (Junqueira & Carneiro, 2017). Along with the steatosis observed in the liver of rabbits exposed to afoxolaner, the onset of cytoplasmic vacuolation around the hepatocyte nucleus was noted. Previous work by Cunha et al. (2017) and Roma et al. (2012) showed the occurrence of cytoplasmic vacuolation, including around the nucleus in the liver of mice (*Mus musculus*) due to the exposure to synthetic acaricides fipronil, thymol, and permethrin, which could suggest a strategy of hepatocyte preservation in response to the presence of the toxic element in the tissue. In other words, this vacuolation would be removing damaged organelles or even certain regions of the cytoplasm that were altered by the presence of the toxic element, sheltering them in vacuoles that would later be digested and/or eliminated, thus preserving the content that was still intact in the cytoplasm. The vacuolation around the nucleus could indicate that the liver cell, under the action of the toxic product, would be preserving its genetic material by removing any residue that could alter its DNA, since changes in nuclear physiology, lead to the deregulation of essential characteristics that contribute to the function of hepatocytes (Alberts et al., 2017). The exposure to the drug also showed a vacuolation between the hepatocyte cords, which disorganized the hepatic circulation and suggested a process of tissue edema, which would influence the blood flow through the tissue, thus affecting the efficiency of the organ.

The histochemical evaluation of the liver of rabbits exposed to afoxolaner (TG1) to mark proteins and polysaccharides showed in CG strong positivity for proteins in the cytoplasm of hepatocytes, corroborating Junqueira & Carneiro (2017), who stated that this strong positivity would be normal in hepatocytes since the synthesis and release of proteins would occur in this environment to be later used by the organ or digestive system. Contrary to data from the CG, the rabbits exposed to afoxolaner presented weak positivity for protein. According to Roma et al. (2012), in studies with mice exposed to permethrin, the decrease of protein in the liver due to exposure to the acaricide would signal that the processes involved with protein synthesis and the construction of structural proteins would be impaired, causing damage to the general metabolism of the liver and to the body.

Histochemistry to detect polysaccharides in the liver of rabbits exposed to afoxolaner showed hepatocytes with cytoplasmic areas containing polysaccharide granulation aggregates distributed over almost the entire extent of

the cells, data different from those found in the CG, which presented preserved liver tissue, with homogeneous cytoplasm. According to some authors (Cunha et al., 2017; Junqueira & Carneiro, 2017), the increase and accumulation of polysaccharides in the cytoplasm of hepatocytes exposed to toxic products could be the result of processes involved with the elimination of metabolites, in this case, the afoxolaner.

The morpho-histology and histochemistry of the liver of rabbits exposed to the castor oil ricinoleic acid esters (TG2) were also analyzed. The results showed that, although of natural origin, they still caused changes in liver tissue, but less aggressively than the rabbits exposed to the synthetic drug. The liver of rabbits exposed to esters showed hepatocytes organized in hepatic cords and remained intact since their cellular outlines could be evidenced. The cytoplasm of these cells remained as in the CG without the presence of lipid droplets. This same pattern was described in the study of Shanmuganath et al. (2021), who reported the absence of hepatocellular alterations in rats exposed to the natural bioactive compound *Ageratum conizoides*. The hepatocytes of rabbits of TG2 presented well-preserved nuclei and nucleoli indicating that esters did not cause toxicity to cells, since that changes are directly linked to the occurrence of cell death, a cellular strategy to preserve the tissue. Exposure to esters did not cause cytoplasmic or nuclear vacuolation in hepatocytes, also absent or minimal between the strands of hepatocytes, indicating that the esters at the concentration in question were not hepatotoxic (Gonzalez & Silva, 2017).

The liver rabbits exposed to castor oil esters showed strong PAS positivity in the cytoplasm of hepatocytes due to an increase in the intensity of polysaccharide granulation, most likely an accumulation of glycogen. According to the literature, this suggests that the esters somehow interfered in the production and storage of this element when compared with the CG and TG1. Glycogen, abundant in hepatocytes shows the individual's nutritional status (Gonzalez & Silva, 2017), or the presence of toxic substances in the system. In this case, the data suggested that esters stimulated glycogen production.

The observations regarding proteins indicated no change in the histochemical pattern when compared with the data obtained in the CG, demonstrating that the liver continued to synthesize and release/store proteins, even in the presence of esters, corroborating the morphological information described for the mammalian liver (Junqueira & Carneiro, 2017).

The spleen here analyzed, in addition to other functions, is involved with immunology, acting against the presence of antigens that may be transported via blood circulation (Santos, 2017). Morphologically, it is divided into red pulp (splenic cords where blood capillaries, red blood cells, macrophages, dendritic cells, and stromal cells) and acts in blood filtration, destruction of erythrocytes, and elimination of immune complexes, and by the white pulp (B and T lymphocytes, macrophages, and dendritic cells) responsible for processing the antigens transported by the bloodstream.

The spleen analysis revealed no changes in the tissue of rabbits exposed to afoxolaner (TG1) since the same morphological characteristics found in the control group were observed. The exposure to castor oil esters showed vacuolation, not cellular, but tissular of the red pulp, data not found in other studies with spleen exposure to other bioactive compounds. The histochemical techniques to detect proteins and polysaccharides in this organ showed results similar to those found in CG, i.e., the absence of changes due to exposure to synthetic and natural acaricides.

In conclusion, the data obtained in this study revealed that the castor oil esters caused no detectable toxicity in the rabbits exposed to them when incorporated into the feed, data confirmed by clinical analysis of the hepatic parameters of the enzymes. The morphological data of the liver and spleen showed that the castor oil esters did not induce detectable alterations the cells or tissue of these organs indicating that esters may be an alternative for tick control that causes minimum damage to the hosts and is potentially cleaner due to its lower contamination compared to synthetic chemical acaricides that leave toxic residues in the environment. On the other hand, the administration of afoxolaner resulted in a significant increase in the AST enzyme, indicating an alleged occurrence of drug poisoning in rabbits exposed to it. In addition, morphohistological changes in the liver were observed, including the presence of steatosis (accumulation of fat) and cellular and tissue vacuolizations. These findings corroborate the hypothesis that afoxolaner can cause liver damage in cases of improper administration.

Acknowledgements

This research has been supported FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) Grant No. 2022/03364-2, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). The authors thank Dr. Pedro Luiz Pucci de Carvalho, Ms. Letícia Maria Graballos Ferraz Hebling, Dr. Marina de Abreu Rodrigues and Matheus Victor Maso Lacôrte e Silva by the technical support.

Ethics declaration

The study procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animal of the Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Rio Claro, SP, (CEUA protocol no. 1181).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

References

- Abreu MR, Delalibera I Jr, Pereira NRC, Camargo-Mathias MI. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) to ozonated water: integument response. *Ozone Sci Eng* 2020; 42(6): 507-516. <http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2020.1727310>.
- Albadry M, Hopfl S, Ehteshamzad N, Konig M, Bottcher M, Neumann J, et al. Periportal steatosis in mice affects distinct parameters of pericentral drug metabolism. *Sci Rep* 2022; 12(1): 21825. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-26483-6>. PMID:36528753.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. 6th ed. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artmed; 2017.
- Arnosti A, Brienza PD, Furquim KCS, Chierice GO, Bechara GH, Calligaris IB, et al. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. *Exp Parasitol* 2011; 127(2): 575-580. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.006>. PMID:21070770.
- Beugnet F, Liebenberg J, Halos L. Comparative efficacy of two oral treatments for dogs containing either afoxolaner or fluralaner against *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and *Dermacentor reticulatus*. *Vet Parasitol* 2015; 209(1-2): 142-145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.002>. PMID:25716658.
- Burgio F, Meyer L, Armstrong R. A comparative laboratory trial evaluating the immediate efficacy of fluralaner, afoxolaner, sarolaner and imidacloprid + permethrin against adult *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks attached to dogs. *Parasit Vectors* 2016; 9(1): 626. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1900-z>. PMID:27912787.
- Calasans-Maia MD, Monteiro MI, Áscoli FO, Granjeiro JM. The rabbit as an animal model for experimental surgery. *Acta Cir Bras* 2009; 24(4): 325-328. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502009000400014>. PMID:19705034.
- Camargo-Mathias MI. *Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives*. São Paulo: Editora Unesp; 2018. <http://dx.doi.org/10.7476/9788595462861>.
- Chaber AL, Easter R, Cumming B, Irving R, Keyburn AL, Smart C, et al. *Ehrlichia canis* rapid spread and possible enzooty in northern South Australia and distribution of its vector *Rhipicephalus linnaei*. *Aust Vet J* 2022; 100(11): 533-538. <http://dx.doi.org/10.1111/avj.13201>. PMID:36053779.
- Cunha ELR, Matos RS, Pereira NRC, Oliveira PR, Daemon E, Camargo-Mathias MI. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. *J Histol Histopathol* 2017; 4(1): 9. <http://dx.doi.org/10.7243/2055-091X-4-9>.
- Cutolo AA, Perier N, Menz I, Thyssen P, Silva FO, Beugnet F. Efficacy of afoxolaner (NexGard®) on the treatment of myiasis caused by the New World screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in naturally infested dogs. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 2021; 24: 100569. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100569>. PMID:34024385.
- Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol* 2008; 152(3-4): 173-185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>. PMID:18280045.
- Drag M, Saik J, Harriman J, Larsen D. Safety evaluation of orally administered afoxolaner in 8-week-old dogs. *Vet Parasitol* 2014; 201(3-4): 198-203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.022>. PMID:24629431.
- Gad SC. *Animal models in toxicology*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2016.
- Gonzalez FHD, Silva SC. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 3rd ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2017.
- Huggins LG, Stevenson M, Baydoun Z, Mab R, Khouri Y, Schunack B, et al. Field trial investigating the efficacy of a long-acting imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar (Seresto®, Elanco) compared to monthly topical fipronil for the chemoprevention of canine tick-borne pathogens in Cambodia. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis* 2022; 2: 100095. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crpvbd.2022.100095>. PMID:35865719.
- Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica - texto e atlas*. 13th ed. Barueri: Guanabara Koogan; 2017.
- Junqueira LCU, Junqueira LMMS. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos; 1983.

Mabasa R, Malemela K, Serala K, Kgakishe M, Matsebatlela T, Mokgotho M, et al. *Ricinus communis* butanol fraction inhibits MCF-7 breast cancer cell migration, adhesion, and invasiveness. *Integr Cancer Ther* 2021; 20: 1534735420977684. <http://dx.doi.org/10.1177/1534735420977684>. PMID:33565349.

Mapara M, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J* 2012; 9(1): 111-118. <http://dx.doi.org/10.4103/1735-3327.92960>. PMID:22363373.

Minamikawa T, Ichimura-Shimizu M, Takanari H, Morimoto Y, Shiomi R, Tanioka H, et al. Molecular imaging analysis of microvesicular and macrovesicular lipid droplets in non-alcoholic fatty liver disease by Raman microscopy. *Sci Rep* 2020; 10(1): 18548. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-75604-6>. PMID:33122711.

Nakkoud JR, Santos CM, Aquino DRRRA, Favacho ARM. Um olhar para as populações de ectoparasitas em cães com leishmaniose visceral canina (LVC) em Mato Grosso do Sul – potenciais vetores de transmissão para essa doença. *Ens Ciênc* 2022; 26(1): 43-47. <http://dx.doi.org/10.17921/1415-6938.2022v26n1p43-47>.

Pearse AGE. *Histochemistry: theoretical and applied*. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1985.

Roma GC, Oliveira PR, Bechara GH, Mathias MIC. Cytotoxic effects of permethrin on mouse liver and spleen cells. *Microsc Res Tech* 2012; 75(2): 229-238. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.21047>. PMID:21809414.

Sampieri BR, Arnosti A, Furquim KCS, Chierice GO, Bechara GH, Carvalho PLPF, et al. Effect of ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*) on the oocyte yolk components of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae). *Vet Parasitol* 2013; 191(3-4): 315-322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.013>. PMID:23040769.

Santos JC. *Estudo da toxicidade hepática e esplênica do extrato de Crataegus oxyacantha em camundongos: análises histológicas* [dissertation]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2017.

Shanmuganath C, Kumar S, Singh R, Sharma AK, Saminathan M, Saini M, et al. Development of an efficient antitick natural formulation for the control of acaricide-resistant ticks on livestock. *Ticks Tick Borne Dis* 2021; 12(3): 101655. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101655>. PMID:33503550.

Šlapeta J, Halliday B, Chandra S, Alanazi AD, Abdel-Shafy S. *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) recognised as the “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: neotype designation, redescription, and establishment of morphological and molecular reference. *Ticks Tick Borne Dis* 2022; 13(6): 102024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102024>. PMID:36063755.

Sodelli LF, Calligaris IB, Souza JRL, Silva O, Araújo BJN, Rodrigues ML, et al. Clinical and morphophysiological hepatic alterations caused by the ingestion of food with added ricinoleic acid esters a bioactive with acaricidal potential. *Braz J Develop* 2022; 8(8): 58599-58612. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv8n8-242>.

Sodelli LF. *Avaliação bioquímica e morfohistológica de coelhas expostas a acaricida obtido a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona* [dissertation]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2019.

Souza JRL, Oliveira PR, Anholeto LA, Arnosti A, Daemon E, Remedio RN, et al. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: ixodidae). *Micron* 2019; 116: 66-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2018.09.015>. PMID:30308332.

Sunkara P, Chennuru S, Krovvidi S, Chitichoti J. Cypermethrin and ivermectin resistance in field populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille, 1806) collected from dogs in south India. *Vet Res Commun* 2022; 46(1): 67-78. <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-021-09830-2>. PMID:34535851.

Tinkruejeen G, Meesaimongkon P, Tangtrongsup S, Thitaram N, Srifawattana N, Beugnet F, et al. Comparative efficacy of afoxolaner and ivermectin in dogs naturally infested with *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: a clinical field study conducted in Thailand. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 2019; 18: 100340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100340>. PMID:31796179.

Vieira GAB, Lima MAS, Bezerra AME, Silveira ER. Chemical composition of teas from two cultivated chemotypes of *Egletes viscosa* (“Macela-da-terra”). *J Braz Chem Soc* 2006; 17(1): 43-47. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532006000100006>.

5. DISCUSSÃO GERAL

Coelhos e cães são mamíferos que compartilham semelhanças anatômicas, fisiológicas e imunológicas, características estas que permitem que os primeiros sejam relevantes modelos nos estudos de toxicologia, principalmente para se avaliar a eficácia de compostos bioativos e suas estratégias para o controle, como no caso em tela, de carrapatos do cão, espécie *Rhipicephalus linnaei*, uma vez que os cães, “pets”, vem sendo considerados hoje em dia membros das famílias e os cuidados dos seus tutores abrangem também a eliminação de endo e de ectoparasitas (CAMARGO-MATHIAS et al., 2018).

A busca por estratégias de controle de endo e de ectoparasitas tem sido uma constante entre os estudiosos dessa temática, assim como se tem conhecimento de que os melhores métodos para se chegar ao sucesso desse controle, tem como agentes principais formulações químicas que tem bases sintéticas, como o fipronil que induz alterações nas glândulas salivares (PEREIRA et al., 2011); a permetrina que provoca a degeneração do sistema reprodutor (ROMA et al., 2014); o fluazuron, que age no integumento (OLIVEIRA et al., 2014); o dinotefuran que age no intestino médio (OLIVEIRA et al., 2017) e o afoxolaner que atua nos receptores de glutamato (CUTOLO et al. 2021). Estas, tem sido muito eficientes para eliminar esses parasitas, no entanto, tem deixado tanto nos animais não alvos, quanto no próprio ambiente, resíduos que interferem no metabolismo e que também ficam depositados em solos, águas, bem como em outros nichos (ANGELO; BITTENCOURT, 2014; SUNKARA et al., 2022).

Dados obtidos mais recentemente mostraram que os bioativos encontrados nos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*R. communis*) podem ser considerados como excelentes acaricidas, ação esta demonstrada em trabalhos desenvolvidos por vários autores nesta temática, e que apresentaram resultados que apontaram para esses bioativos como sendo uma promissora estratégia de controle carrapaticida (ARNOSTI et al., 2011a b; SAMPIERI et al., 2012, 2013a b, 2015; CAMARGO-MATHIAS, 2018).

Embora as propriedades acaricidas destes ésteres já tenha tido sua eficiência confirmada em laboratório, ainda pouco se sabe quanto às respostas dos

organismos não-alvos (hospedeiros) frente à exposição aos mesmos, dados que são ainda escassos principalmente os dos mecanismos de ação desses ésteres nos sistemas biológicos dos animais vertebrados, respostas que seriam imprescindíveis para se assegurar que esses bioativos poderiam ser utilizados no controle destes ectoparasitas, sem provocar efeitos colaterais nos hospedeiros.

Diante dessas informações expostas, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o potencial dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) na concentração de 1,75 g de éster/Kg de ração como acaricida, verificando se os mesmos não trariam prejuízos aos organismos não alvos, no caso o próprio hospedeiro, bem como verificando se, além de serem efetivos contra os carrapatos (no seu controle), os mesmos também poderiam agir no controle de endoparasitas, aqui no caso, de *Ascaris lumbricoides*, que causa patologias importantes nos cães. Ressalte-se ainda que pesquisas focadas nos compostos bioativos encontrados nos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) já foram desenvolvidas por outros autores que obtiveram resultados que demonstraram sua eficácia como acaricida (ARNOSTI et al., 2011; SAMPIERI et al., 2013), contudo, não existe na literatura pertinente estudo que mostre os efeitos desses ésteres sobre os organismos não-alvos.

Com o objetivo de se avaliar a ação dos ésteres sobre os organismos não-alvos elegemos como biomarcador de toxicidade o fígado para a realização das análises histológicas e histoquímicas, uma vez que tal órgão desempenha papel fundamental nos processos de desintoxicação do sistema interno dos vertebrados (YAO et al., 2019; ROSS PAWLINA, 2021) e, para tanto, fez-se a avaliação dos parâmetros considerados referencia de suas enzimas, a saber, a alanina aminotransferase (ALT), o aspartato aminotransferase (AST) e a fosfatase alcalina (FAL), marcadores biológicos frequentemente usados na triagem básica de disfunção hepática, visto que, quando ocorre lesão ou destruição das células hepáticas essas enzimas se encontram aumentadas na corrente sanguínea, índice/informação que auxilia no diagnóstico e prognóstico das doenças hepáticas (HALL, GUYTON, 2021).

Dessa forma, os resultados que são apresentados neste trabalho, mostraram que o tecido hepático das coelhas do grupo alimentado com a ração enriquecida

com os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) na concentração de 1,75 g de éster/Kg de ração, não apresentou alterações histológicas significativas, assim como as enzimas hepáticas mensuradas por meio de exames de sangue, não sofreram alterações nos seus índices de referencia, quando os mesmos foram comparados aos resultados anteriormente obtidos por Sodelli et al (2023). Esses dados confirmam a não hepatotoxicidade desses bioativos, uma vez que os cordões hepáticos se mantiveram preservados, assim como os limites celulares dos hepatócitos, corroborando dados disponibilizados por Junqueira e Carneiro (2023), bem como por Shanmuganath et al. (2021), estes últimos tendo encontrado resultados semelhantes quando da exposição de ratos ao bioativo obtido de *Ageratum conizoides*, planta da família Asteraceae, também conhecida no Brasil como erva de São João.

Os resultados das análises histoquímicas realizadas para detectar proteínas totais e polissacarídeos neutros no tecido hepático das coelhas alimentadas com ração enriquecida com os ésteres, quando comparados aqueles obtidos do grupo controle, sinalizaram que o fígado mesmo na presença dos ésteres não apresentou alteração no seu tecido, o que permitiu inferir que o órgão também não sofreu alterações fisiológicas, continuando com suas funções normais de produção, armazenamento e liberação de proteínas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2023).

A análise das enzimas ALT, AST e ALP realizada por meio da coleta do sangue das coelhas hospedeiras que se alimentaram com a ração enriquecida com os ésteres, mostrou que também não houve alterações nos índices de referencia clínico/veterinário, quando comparou-se aqueles obtidos do GC indicando o não comprometimento do fígado. Resultado contrário, no entanto, foi obtido em estudo desenvolvido por Sodelli et al (2023) que verificou que a enzima ALT a qual tem alta especificidade hepática, e cujo aumento dos níveis séricos é resultado principalmente de intoxicação, quando foi analisada no sangue de coelhas alimentadas com ração enriquecida com ésteres, só que na proporção de 5,0 g de éster/Kg de ração apresentou valores aumentados indicando comprometimento hepático, e que os ésteres, quando oferecidos em concentrações maiores do que aquela que foi aqui utilizada, apesar de ser eficiente como carrapaticida, poderia ser hepatotóxico ao hospedeiro, o que inviabilizaria o sua indicação para o

controle de *R. linnaei*. Essas altas concentrações de ésteres associadas a ração oferecida às coelhas hospedeiras, provocariam então a mesma resposta que foi encontrada no presente trabalho quando se administrou às mesmas, o acaricida sintético afoxolaner, que provocou intoxicação, nesse caso medicamentosa, observada pelo aumento dos valores da enzima aspartato aminotransferase (AST).

Ainda no presente trabalho, que demonstrou que os ésteres extraídos a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) quando incorporados a ração que foi oferecida às coelhas hospedeiras, na concentração de 1,75 g de éster/Kg de ração, tem potencial acaricida comprovado e não tóxico para o hospedeiro, foi aqui realizado um estudo que demonstrou que além do potencial de eliminar ectoparasitas, esses bioativos tem também ação sobre endoparasitas, em especial *Ascaris lumbricoides*, visto os mesmos terem eliminado os ovos desse endoparasita, sinalizando seu potencial vermífugo, uma vez que as fezes coletadas a partir do quinto dia de exposição a esses bioativos, já não apresentavam ovos desses endoparasitas.

A literatura pertinente ainda é muito deficiente no que diz respeito a resultados de trabalhos que contemplem a ação de compostos bioativos agindo como vermífugos, porém no presente trabalho os resultados obtidos mostraram que os ésteres do ácido ricinoléico do óleo da mamona quando incorporados a ração que foi fornecida às coelhas, atuaram como potentes agentes ovicidas, resultado esse que não foi observado no grupo controle que só se alimentou de ração. O que foi de importância também muito relevante foi o fato de que, em trabalhos anteriores já desenvolvidos (SODELLI et al., 2023), a ação dos ésteres não provocou hepatotoxicidade nas coelhas hospedeiras, o que subsidia a perspectiva de que esses bioativos podem ser num futuro próximo utilizados como agentes não só no controle de ecto, mas também de endoparasitas. Estudos anteriormente desenvolvidos por Calzada et al. (2007) testando a atividade antiparasitária de sementes de *Carica papaya*, mostraram resultados contrários aqueles aqui encontrados, visto que apesar da atividade antiparasitária dessa espécie vegetal, foi detectada hepatotoxicidade causada pela mesma quando utilizada via extrato metanólico.

De forma geral, esse trabalho sinalizou positivamente que o uso de produtos

naturais, principalmente obtidos a partir de plantas, vem se apresentando como um importante e valioso recurso estratégico para o combate de muitos artropodos praga. Nessa busca incessante por substancias que tenham atividade biológica relevante, e que sejam pouco danosas aos organismos não alvos, os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona pode ser colocado como uma alternativa viável na realização de um controle efetivo de ectoparasitas, com a informação adicional de que os mesmos não teriam ação apenas contra os ectoparasitas, aqui no caso, carrapatos *R. linnaei*, mas também contra endoparasitas, no caso em tela, de *Ascaris lumbricoides*, informação inédita e que põe em perspectiva a importância de se continuar realizando estudos toxicológicos que tenham esse foco.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo, que avaliou a ação dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) na concentração de 1,75 g de éster/Kg de ração quando incorporados a dieta oferecida à coelhas, modelos hospedeiros de carrapatos (ectoparasitas) e de *Ascaris* (endoparasitas), permitiram concluir que:

- 1- Esses bioativos não são hepatotóxicos, visto que não alteram os índices das enzimas AST, ALT e FAL.
- 2- Não provocam alterações morfohistológicas e nem histoquímicas nos tecidos hepático e esplênico, os quais mantiveram-se íntegros frente a exposição.
- 3- Quando comparada a ação dos ésteres no sistema dos hospedeiros, com aquela do acaricida sintético afoxolaner, os primeiros foram menos danosos para as células e tecidos hepático e esplênico, do que o químico sintético.
- 4- Coelhas infestadas com carrapatos e que receberam ração enriquecida com os ésteres sofreram alterações hepatohistológicas (hepatócitos irregulares e intensamente vacuolizados) e histoquímicas (aumento da síntese e armazenamento de proteínas e de carboidratos), provavelmente em decorrência da infestação pelos carrapatos e não pela presença dos ésteres no sistema.
- 5- Além de ter potencial de controlar ectoparasitas os esterres comprovaram ser eficientes agentes ovicidas, eliminando das fezes das coelhas ovos de *Ascaris lumbricoides* já no quinto dia da exposição.

7. REFERÊNCIAS

- Abbott WS. A method for computing the effectiveness of insecticides. **J Econ Entomol.**, 18 (2): 265-267, 1925. Doi: 10.1093/jee/18.2.265a.
- Abreu MR, Delalibera I Jr, Pereira NRC, Camargo-Mathias MI. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) to ozonated water: integument response. **Ozone Sci Eng** 2020; 42(6): 507-516. <http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2020.1727310>.
- Albadry M, Hopfl S, Ehteshamzad N, König M, Bottcher M, Neumann J, et al. Periportal steatosis in mice affects distinct parameters of pericentral drug metabolism. **Sci Rep** 2022; 12(1): 21825. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-26483-6>. PMID:36528753.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. 6th ed. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artmed; 2017.
- Almazán C, Reyes de Luna G, Tinoco-Gracia L, González-Álvarez VH, Zajac Z, Kulisz J, Woźniak A, Cabezas-Cruz A, Mosqueda J. Morphological and molecular identification of the brown dog tick in Mexico. **Vet Parasitol Reg Stud Reports.**, 44: 100908, 2023. Doi: 10.1016/j.vprsr.2023.100908.
- Andrade, E. C., Leite, I. C. G., de Oliveira Rodrigues, V., Cesca, M. G. Parasitoses intestinais: uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **Revista de APS**, 13:(2), 2010. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/aps/article/view/14508>.
- Angelo, I.C.; Bittencourt, V. R. E. P.; Verissimo, C.J. 2014. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de carrapatos. In: (Org.) Controle de carrapatos nas pastagens. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, p.69-94.
- Araujo, R. P., Navarro, M. B. M.A., Cardoso, T. A. O. 2015a. Febre maculosa no Brasil: Estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica. **Caderno Saúde Coletiva**, v. 23, p.354-361.
- Arnosti, A., P. D. Brienza, K. C. S. Furquim, G. O. Chierice, S. C. Neto, G. H. Bechara, B.R. Sampieri, and M. I. Camargo-Mathias. 2011a. "Effects of *Ricinus*

communis oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)." **Experimental Parasitology** 127 (2): 569-574.

<https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2018.01.046>.

Arnosti, A., P. D. Brienza, K. C. S. Furquim, G. O. Chierice, G. H. Bechara. I. B. Calligaris, and M. I. Camargo-Mathias. 2011b. „Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks." **Experimental Parasitology** 127(2): 575-580. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.006>.

Barbosa Silva, A. et al. 2017. *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. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/20124>.

Biegelmeyer, P. Nizoli, L.Q. Cardos, F. F. e Dionello, N. J. L. 2012. Aspectos da resistência de bovinos a carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Arch Zootec**, 61: 1-11. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/922238>.

Beugnet F, Liebenberg J, Halos L. Comparative efficacy of two oral treatments for dogs containing either afoxolaner or fluralaner against *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and *Dermacentor reticulatus*. **Vet Parasitol** 2015; 209(1-2): 142-145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.002>. PMID:25716658.

Borges, L. M. F.; Sousa, L. A. D.; Barbosa, C. S, 2011. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 20: 89-96. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000200001>.

Burgio F, Meyer L, Armstrong R. A comparative laboratory trial evaluating the immediate efficacy of fluralaner, afoxolaner, sarolaner and imidacloprid + permethrin against adult *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks attached to dogs. **Parasit Vectors** 2016; 9(1): 626. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1900-z>. PMID:27912787.

- Calasans-Maia MD, Monteiro MI, Áscoli FO, Granjeiro JM. The rabbit as an animal model for experimental surgery. **Acta Cir Bras** 2009; 24(4): 325-328. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502009000400014>. PMID:19705034.
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L., Tapia-Contreras, A. Effect of Mexican medicinal plant used to treat *Trichomonas vaginalis* trophozoites. **J. Ethnopharmacol**, 113, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.001>.
- Camargo, M. G.; Marciano, A. F.; SÁ, F. A.; Perinotto, W. M. S.; Quinelato, S.; Golo, P. S.; Angelo, I. C.; Prata, M. C.A.; Bittencourt, V. R. E. P. 2014. Comercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 271-276. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.07.011. Epub 2014, 18 de julho.
- Camargo-Mathias MI, Chierice GO, Brienza PD, Arnosti A, Calligaris IB, Sampieri BR, Nodari EF, Ferreira ARF, 2016. Esters from castor oil: interfering with the salivary gland secretory cycle of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Emer Life Sci Res.**, 2 (2): 66-72.
- Camargo-Mathias, M. I. 2018. "Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives". 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, <https://doi.org/10.7476/9788595462861>.
- Cavalcante, P. M. M. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, 26, 319-329, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2015.07.003>.
- Chieffi, P. P. Helminthoses e alterações ambientais e climáticas. **Arquivos Médicos**, 60(1), 2015. Disponível em: <https://arquivosmedicos.fcmsantacasasp.edu.br/index.php/AMSCSP/article/view/163>.
- Chaber AL, Easter R, Cumming B, Irving R, Keyburn AL, Smart C, et al. *Ehrlichia canis* rapid spread and possible enzooty in northern South Australia and distribution of its vector *Rhipicephalus linnaei*. **Aust Vet J** 2022; 100(11): 533-538. <http://dx.doi.org/10.1111/avj.13201>. PMID:36053779.

- Catto, J. B. P.; Andreotti, R.; Koller, W. W, 2013. Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças transmitidas. Campo Grande: **Embrapa**. pp. 119-135.
<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1041177>.
- Coutinho, L. L. et al. A genômica na bovinocultura de corte. In: PIRES, A. V. 2010. (Ed.) Bovinocultura de corte. Piracicaba: **Fealq**, v.2, p.813-26.
<https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300009>.
- Cunha ELR, Matos RS, Pereira NRC, Oliveira PR, Daemon E, Camargo-Mathias MI. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **J Histol Histopathol** 2017; 4(1): 9. <http://dx.doi.org/10.7243/2055-091X-4-9>.
- Cutolo AA, Perier N, Menz I, Thyssen P, Silva FO, Beugnet F. Efficacy of afoxolaner (NexGard®) on the treatment of myiasis caused by the New World screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in naturally infested dogs. **Vet Parasitol Reg Stud Reports** 2021; 24: 100569.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100569>. PMID:34024385.
- Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Vet Parasitol** 2008; 152(3-4): 173-185.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>. PMID:18280045.
- Dantas-Torres, F., and D. Otranto. 2015. „Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks.”” **Veterinary Parasitology** 208 (1-2): 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.014>.
- de Oliveira GMB, da Silva IWG, da Cruz Ferreira Evaristo A M, de Azevedo Serpa MC, Silva Campos AN, Dutra V, Nakazato L, de Aguiar DM, Bahia Labruna M, Horta MC. Tick-borne pathogens in dogs, wild small mammals and their ectoparasites in the semi-arid Caatinga biome, northeastern Brazil. **Ticks tick Borne Dis.**, 11 (4): 101409, 2020. Doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101409.
- Drag M, Saik J, Harriman J, Larsen D. Safety evaluation of orally administered afoxolaner in 8-week-old dogs. **Vet Parasitol** 2014; 201(3-4): 198-203.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.022>. PMID:24629431.

- Effendy, A. M. W., Suparjo, N. M., Ameen, S. A., Abdullah, O. A. Evaluation of Anthelmintic Potential of Pawpaw (*Carica papaya*) Seeds Administered In-Feed and In-Water for West African Dwarf (WAD) Goats. **Evaluation**, 4 (16), 2014. Disponível em: <https://core.ac.uk/reader/234660030>.
- Ellse L, Wall R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. **Med Vet Entomol.**, 28 (3): 233-243, 2014. Doi: 10.1111/mve.12033.
- Ferreira, M. Z., Marin, V. A. Avaliação da atividade antiparasitária da semente de *Carica papaya* (*Caricaceae*): uma revisão sistemática. **Rev. Bras. Pl. Med.**, 19 (1): 75-80, 2017. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20219847607>.
- Fonsêca, ADV, Oliveira LMB, Jorge FR, Cavalcante RO, Bevilaqua CML, Pinto FJM, Santos JMLD, Teixeira BM, Rodrigues AKPP, Braz GF, Viana GA, Costa EC, Serpa MCA, Weck BC, Labruna MB. Occurrence of tick-borne pathogens in dogs in a coastal region of the state of Ceará, northeastern Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet.**, 31 (1): e021321, 2022. Doi: 10.1590/S1984-29612022010.
- Gad SC. *Animal models in toxicology*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2016.
- Gonzalez FHD, Silva SC., 2017. Introdução à bioquímica clínica veterinária. 3rd ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS.
- HALL, J.E.; Guyton, A. C., 2021. Guyton & Hall Tratado de Fisiologia Médica.14. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Hayashi, I., Kanda, S., Lamaningao, P., Mishima, N., Nishiyama, T. Shared expression of mucin12 in *Ascaris lumbricoides* and the human small intestine. *Molecular and biochemical parasitology*, 227:19-24, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.11.004>.
- Hauserman, W.; Friedeli,T.; Hess, E. A.; Strong, M. B., 1992. A new active ingredient for a new approach to protect cattle against ticks In: Proceedings of XIX International Congress of Entomology. Beijing, Chin.

Hoffman, W. A., Pons, J. A., Ja Ner, J. L. 1934. Sedimentation concentration method in *Schistosoma mansoni*. Puerto Rico J. **Publ. Health & Trop. Med.** 9: 283-298. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821974000300003>.

Huggins LG, Stevenson M, Baydoun Z, Mab R, Khouri Y, Schunack B, et al. Field trial investigating the efficacy of a long-acting imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar (Seresto®, Elanco) compared to monthly topical fipronil for the chemoprevention of canine tick-borne pathogens in Cambodia. **Curr Res Parasitol Vector Borne Dis** 2022; 2: 100095. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crpvbd.2022.100095>. PMID:35865719.

Junqueira, L. C. U, and L. M. M. Junqueira, 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, v. 123.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica – texto e atlas*. 13th ed. Barueri: Guanabara Koogan; 2017.

Junqueira, L. C. U. and, J. Carneiro, 2023. *Histologia básica: texto e atlas*. 14 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Klafke G, Webster A, Dall Agnol B, Pradel E, Silva J, de La Canal LH, Becker M, Osório MF, Mansson M, Barreto R, Scheffer R, Souza UA, Corassini VB, Dos Santos J, Reck J, Martins JR. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.**, 8(1): 73-80, 2017. Doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.09.019.

Kochepka, D. M. Produção de ésteres etílicos a partir de óleos residuais e gorduras residuais empregando a lipase Novozym 435. Dissertação (Mestrado) -Curso de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.101, 2015. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/41729>.

Labruna, M. B. 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v. 1166, n. 1, p. 156-166. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04526.x>.

Lagatie, Ole *et al.* 2-Methyl-pentanoyl-carnitine (2-MPC): a urine biomarker for patent *ascaris lumbricoides* infection. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 2-13, 25 set.

Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-72804-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-72804-y#citeas>. Acesso em: 05 dez. 2023.

Leal, AT.; Freitas, DRJ; Vaz Jr, IS. 2003. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinária**. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.16965>

Leonardo, M.R.; Silva, L.A.B.; Tanomaru Filho, M.; Bonifacio, K.C.; ITO, I.Y. , 2001 In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. **Journal of Endodontics**, 27: 717-719. <https://doi.org/10.1097/00004770-200112000-00001>.

Mabasa R, Malemela K, Serala K, Kgakishe M, Matsebatlela T, Mokgotho M, et al. *Ricinus communis* butanol fraction inhibits MCF-7 breast cancer cell migration, adhesion, and invasiveness. **Integr Cancer Ther** 2021; 20: 1534735420977684. <http://dx.doi.org/10.1177/1534735420977684>. PMID:33565349.

Mapara M, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research. **Dent Res J** 2012; 9(1): 111-118. <http://dx.doi.org/10.4103/1735-3327.92960>. PMID:22363373.

Marthe, E. D. B.; Bittencourte, L.M.; Queiroz, M. E. L. R. 2010. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretróides em manteiga. *Quím Nova*, 33: 1389-1393. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600030>.

Minamikawa T, Ichimura-Shimizu M, Takanari H, Morimoto Y, Shiomi R, Tanioka H, et al. Molecular imaging analysis of microvesicular and macrovesicular lipid droplets in non-alcoholic fatty liver disease by Raman microscopy. **Sci Rep** 2020; 10(1): 18548. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-75604-6>. PMID:33122711.

Minho, A., Gennari, S. M., Amarante, A. F. T., Abdala, A. L. Anthelmintic effects of condensed tannins on *Trichostrongylus colubriformis* in experimentally infected sheep. **Semina Cien. Agrar.** 31 (4): 1009-1016, 2010.

Nakkoud JR, Santos CM, Aquino DRRRA, Favacho ARM, 2022. Um olhar para as populações de ectoparasitas em cães com leishmaniose visceral canina (LVC) em Mato Grosso do Sul – potenciais vetores de transmissão para essa doença. *Ens Ciênc*; 26(1): 43-47. <http://dx.doi.org/10.17921/1415-6938.2022v26n1p43-47>.

- Nava, S., L. Beati, M. B. Labruna, A. G. Cáceres, A. J. Mangold, and A. A. Guglielmone. 2014. "Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* 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*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae)." **Ticks and Tick-borne Diseases** 5(3):252-276. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>.
- Neves, D. P. Parasitologia Humana. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n4p1009>.
- Ntalli N, Koliopoulos G, Giatropoulos A, Menkissoglu-Spiroudi U. Plant secondary metabolites against arthropods of medical importance. **Phytochem Rev.**, 18: 1255-1275, 2019. Doi: 10.1007/s11101-019-09647-7.
- Nwanade CF, Yu Z, Liu J. Botanical acaricides induced morphophysiological changes of reproductive and salivary glands in tick: A mini-review. **Res Vet Sci**, 132: 285-291, 2020. Doi: 10.1016/j.rvsc.2020.07.008.
- Ohanu, E.; Inyang-Etoh, P. The efficacy of plant extracts on cecal amebiasis in rats. **Ve. Sci. Develop.**, 5 (5793):41-46, 2015. <https://doi.org/10.4081/vsd.2015.5793>
- Oliveira, M.G.R., 2005. Estudo da decomposição de sacarose por hidrólise utilizando uma mistura de ésteres derivados do óleo de mamona. 98f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Química de São Carlos USP, São Carlos/SP. 2005. <https://doi.org/10.11606/T.75.2009.tde-05012010-081105>.
- Oliveira, P. R. et al., 2014. Fluazuron-induced morphological changes in *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs: An ultrastructural evaluation of the cuticle formation and digestive processes. **Acta Tropica**, v. 133, n. 1, p. 45-55. <https://doi:10.1016/j.actatropica.2014.01.008>.
- OLIVEIRA, P. R. et al. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks: Ultrastructural evaluation. **Acta Tropica**, v. 166, p. 139-154, 2017a. <https://doi:10.1007/s00436-015-4814-3>.

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

Pereira, C. P. M. et al. Fipronil-induced cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 2, p. 481-489, 2011. <http://doi:10.1016/j.exppara.2010.10.003>.

Pfister K, Armstrong R. Systemically and cutaneously distributed ectoparasitocides: a review of the efficacy against ticks and fleas on dogs. **Parasit Vectors.**, 9 (1): 436, 2016. Doi: 10.1186/s13071-016-1719-7.

Quadros DG, Johnson TL, Whitney TR, Oliver JD, Oliva Chávez AS. Plant-Derived Natural Compounds for Tick Pest Control in Livestock and Wildlife: Pragmatism or Utopia? *Insects*, 11 (8): 490, 2020. Doi: 10.3390/insects11080490.

Roma GC, Oliveira PR, Bechara GH, Mathias MIC. Cytotoxic effects of permethrin on mouse liver and spleen cells. **Microsc Res Tech** 2012; 75(2): 229-238. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.21047>. PMID:21809414.

Ross, M. H., W. Pawlina, 2021. ROSS HISTOLOGIA TEXTO E ATLAS: correlações com biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

Salmerón-Manzano E, Garrido-Cardenas JA, Manzano-Agugliaro F. Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. *Int J Environ Res Public Health.*, 17 (10): 3376, 2020. Doi: 10.3390/ijerph17103376

Sampieri BR, Arnosti A, Nunes PH, Furquim KC, Chierice GO, Mathias MI. Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*). **Microsc Res Tech.**, 75 (5): 683-690, 2012. Doi: 10.1002/jemt.21112.

Sampieri BR, Furquim KC, Nunes PH, Camargo-Mathias MI. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to castor oil (*Ricinus communis*): an ultrastructural overview. **Parasitol Res.**, 112 (2): 611-619, 2013a. Doi: 10.1007/s00436-012-3173-6.

- Sampieri, B. R., A. Arnosti, K. C. S. Furquim, G. O. Chierice, G. H. Bechara, P. L. P. F. Carvalho, P. H. Nunes, and M. I. Camargo-Mathias. 2013a. 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** 191(3-4): 315-322. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.013>.
- Sampieri, B. R., K. C. S. Furquim, P. H. Nunes, and M. I. Camargo-Mathias. 2013b. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to castor oil (*Ricinus communis*): An ultrastructural overview. **Parasitology Research** 112(2):611-619. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3173-6>.
- Sampieri BR, Labruna MB, Bueno OC, Camargo-Mathias MI. Dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks (Acari: Ixodidae) *Amblyomma cajennense* [corrected] (Fabricius, 1787) and *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772): a comparative analysis. **Parasitology Res.**, 113 (4): 1511-1519, 2014. Doi: 10.1007/s00436-014-3795-y.
- Sampieri BR, Furquim KCS, Carvalho PLPF, Bueno OC, Camargo-Mathias MI. Ricinoleic acid esters from castor oil modifying male reproductive system of *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787). **Emer Life Sci Res.**, 1 (1): 26-37, 2015.
- Santos JC. *Estudo da toxicidade hepática e esplênica do extrato de Crataegus oxyacantha em camundongos: análises histológicas* [dissertation]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2017.
- Santos, Fernanda Cristina Paulino dos *et al.* Registros Parasitários caninos na cidade de Guaratinguetá- São Paulo 2019. In: XVI Encontro de Iniciação Científica- Bioeconomia: diversidade e riqueza para o desenvolvimento sustentável, 16., 2019, Lorena. Registros Parasitários caninos na cidade de Guaratinguetá- São Paulo (2017). Lorena: Unifatae, 2019. p. 1-9. Disponível em: <https://doity.com.br/media/doity/submissoes/5dc1e0a3-db20-4a10-8ebe-5a7943cda1d7-artigo-2017--eic-2019-fer-nickpdf.pdf>. Acesso em: 04 dez. 2023.
- Shanmuganath C, Kumar S, Singh R, Sharma AK, Saminathan M, Saini M, et al. Development of an efficient antitick natural formulation for the control of acaricide-

resistant ticks on livestock. **Ticks Tick Borne Dis** 2021; 12(3): 101655. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101655>. PMID:33503550.

Silva, Elane Pereira da *et al.* 2019. *Ascaris lumbricoides*, quais os danos causados por essa enfermidade nas crianças? **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, S.I, v. 6, n. 11, p. 19-24, jun.. Disponível em: <http://revistas.icesp.br/index.php/RBPeCS/article/view/841/648>. Acesso em: 05 dez. 2023.

Silva, F. A. Avaliação da toxicidade do óleo essencial de *Lippia schaueriana* Mart. (verbenaceae), potencial acaricida: estudo morfohistológico do rim e do fígado de fêmeas de camundongos *Mus musculus* a ele expostas. 2023. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso -Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 69p. 2023. <https://hdl.handle.net/11449/251735>.

Šlapeta J, Halliday B, Chandra S, Alanazi AD, Abdel-Shafy S. *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) recognised as the "tropical lineage" of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Neotype designation, redescription, and establishment of morphological and molecular reference. **Ticks Tick Borne Dis.**, 13(6): 102024, 2022. Doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.102024.

Sodelli LF. Avaliação bioquímica e morfohistológica de coelhas expostas a acaricida obtido a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona. Dissertação MSc em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 35p. 2019.

Sodelli, L. F., I. B. Calligaris, J. R. L. Souza, O. Silva, B. J. N. Araújo, M. L. Rodrigues, and M. I. Camargo-Mathias. 2022. Clinical and morphophysiological hepatic alterations caused by the ingestion of food with added ricinoleic acid esters a bioactive with acaricidal potential. **Brazilian Journal Of Development** 8(8): 58599-58612. DOI:10.34117/bjdv8n8-242

Sodelli, L. F., O. Silva, B. J. N. Araújo, and M. I. Camargo-Mathias. 2023. Liver and spleen of hosts of *Rhipicephalus linnaei* exposed to synthetic (afoxolaner) and natural acaricides (esters from castor oil). A comparative clinical-morphological study.

Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária 32(3): e004023.

<https://doi.org/10.1590/S1984-29612023041>.

Souza JRL, Oliveira PR, Anholeto LA, Arnosti A, Daemon E, Remedio RN, et al. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: ixodidae). **Micron** 2019; 116: 66-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2018.09.015>. PMID:30308332.

Sunkara P, Chennuru S, Krovvidi S, Chitichoti J. 2022. Cypermethrin and ivermectin resistance in field populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latrielle, 1806) collected from dogs in south India. **Vet Res Commun**; 46(1): 67-78. <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-021-09830-2>.

Tinkruejeen G, Meesaimongkon P, Tangtrongsup S, Thitaram N, Srifawattana N, Beugnet F, et al. Comparative efficacy of afoxolaner and ivermectin in dogs naturally infested with *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: a clinical field study conducted in Thailand. **Vet Parasitol Reg Stud Reports** 2019; 18: 100340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100340>. PMID:31796179.

Vieira GAB, Lima MAS, Bezerra AME, Silveira ER. Chemical composition of teas from two cultivated chemotypes of *Egletes viscosa* ("Macela-da-terra"). **J Braz Chem Soc** 2006; 17(1): 43-47. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532006000100006>.

Vilela VLR, Feitosa TF, Bezerra RA, Klafke GM, Riet-Correa F. Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.**, 11(4): 101413, 2020. Doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101413.

Wikel SK. Ticks and Tick-Borne Infections: Complex Ecology, Agents, and Host Interactions. **Vet Sci.**, 5 (2): 60, 2018. Doi: 10.3390/vetsci5020060.

Yao, Y., Y. Zang, J. Qu, M. Tang, and T. Zhang. 2019. The Toxicity Of Metallic Nanoparticles On Liver: The Subcellular Damages, Mechanisms, And Outcomes. **Int J Nanomedicine** 7(14): 8787-8804. <https://doi.org/10.2147/IJN.S212907>.