

AÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Acmella oleracea* EM CARRAPATOS *Amblyomma cajennense* (ACARI: IXODIDAE): AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

Luís Adriano Anholetto¹, Patrícia Rosa de Oliveira², Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues³, Karina Neob de Carvalho Castro⁴ e Maria Izabel Camargo-Mathias⁵

1. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil;
2. Programa de Pós-graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (CCET), Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brasil;
3. Divisão Química de Produtos Naturais, CPQBA/UNICAMP, Paulínia, São Paulo, Brasil;
4. Embrapa Meio-Norte, Parnaíba, Piauí, Brasil;
5. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

RESUMO

No presente estudo avaliou-se ultraestruturalmente os efeitos de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto das flores, folhas e caules de *Acmella oleracea* sobre o sistema reprodutor masculino carrapatos *Amblyomma cajennense*. Para tanto, foram utilizados 100 machos com pesos homogêneos ($p > 0,05$), os quais foram alocados em cinco grupos experimentais de carrapatos (10 animais/grupo): Controle 1 - foram expostos à água destilada; Controle 2 - ao solvente etanol 50% e DMSO 1%; Tratamentos 1 a 3 - às concentrações de: 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato, respectivamente, obtidas por diluição em etanol 50% e DMSO 1% (em duplicata). Os carrapatos foram imersos nas diferentes concentrações do extrato por cinco minutos, secos em papel absorvente e levados à incubadora BOD sob condições controladas por sete dias. Após esse período, foram dissecados para remoção dos sistemas reprodutores, que foram submetidos às técnicas de microscopia eletrônica de transmissão. Foi observado nos indivíduos dos grupos tratamento que o extrato provocou alterações significativas nas células secretoras do complexo de glândulas acessórias dos testículos, que incluíram mudanças na sua forma, desorganização e vacuolização citoplasmática, diminuição dos grânulos de secreção e presença de figuras mielínicas. Além disso, as espermátides maduras apresentaram desarranjo do citoesqueleto. Os dados aqui obtidos confirmaram o potencial citotóxico do extrato etanólico de *A. oleracea* sobre o sistema reprodutor masculino de carrapatos *A. cajennense*, vindo abrir a possibilidade do seu uso como alternativa eficiente e sustentável para o controle populacional dessa espécie.

Palavras-chave: Controle químico, Citotoxicidade e Jambu.

ABSTRACT

In the present study, the effects of different concentrations of the crude ethanolic extract of *Acmella oleracea* on the male reproductive system of *Amblyomma cajennense* ticks were evaluated ultrastructurally. For this purpose, 100 males with homogeneous weights ($p > 0.05$) were used, which were allocated to five experimental groups (10 animals / group): Control 1 - were exposed to distilled water; Control 2 - solvent 50% ethanol and 1% DMSO; Treatments 1 to 3 - at concentrations of: 6.2; 12.5 and 25 mg / mL of the extract, respectively, obtained by dilution in 50% ethanol and 1% DMSO (in duplicate). The ticks were immersed in the different concentrations of the extract for five minutes, dried on absorbent paper and taken to the BOD incubator under controlled conditions for seven days. After this period, they were dissected to remove the reproductive system, which were submitted to transmission electron microscopy techniques. It was observed in the individuals in the treatment groups that the extract caused significant changes in the secretory cells of the testicular accessory gland complex, which included changes in its shape, cytoplasmic disorganization and vacuolization, decreased secretion granules and the presence of myelinated figures. In addition, the mature spermatids showed a breakdown of the cytoskeleton. The data obtained here confirmed the cytotoxic potential of the ethanol extract of *A. oleracea* on the male reproductive system of ticks *A. cajennense*, opening the possibility of its use as an efficient and sustainable alternative for the population control of this species.

Keywords: Control chemical, Cytotoxicity and Jambu.

1. INTRODUÇÃO

Carrapatos do complexo *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) são importantes artrópodes de relevância médica e veterinária por parasitarem diferentes hospedeiros, dentre eles os humanos. A relevância de sua importância no contexto atual reside ainda no fato de que estes ectoparasitas são também vetores potenciais da *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira ou Febre das Montanhas Rochosas (SOARES et al., 2015; TARRAGONA et al., 2015). Eles estão distribuídos por todo o continente americano e, especificamente no Brasil, a espécie *A. cajennense* pode ser encontrada na zona Norte ocidental da Bacia Amazônica, enquanto que *A. sculptum* nos estados do Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Sul do Paraná (ESTRADA-PEÑA et al., 2014).

Atualmente, o método de controle de carrapatos mais eficiente, além de ser o mais amplamente utilizado, é aquele que faz uso de acaricidas químicos de natureza sintética (CHAGAS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016). Entretanto, o uso indiscriminado desses produtos pode induzir a seleção de indivíduos resistentes o que compromete a eficiência dos acaricidas, bem como sua toxicidade pode ser letal aos organismos não alvos. Além disso, seus resíduos se acumulam no ambiente, o que pode comprometer o solo, cursos d'água, a

flora e a saúde animal, inclusive a humana (OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; ROMA et al., 2009).

Diante desse cenário, a busca por novas estratégias de controle tem sido uma constante. Dentre elas está a utilização de vacinas ou de acaricidas químicos de origem natural, geralmente com seus princípios ativos originados de extratos de plantas (CASTRO et al., 2014; REMEDIO et al., 2015; RODRÍGUEZ-MALLON, 2016).

Acmella oleracea é uma planta da família Asteraceae, encontrada em regiões tropicais próximas à linha do Equador na África, Ásia e América do Sul. No Brasil ela é conhecida popularmente como jambu, sendo muito utilizada na culinária e na medicina popular como potente analgésico e anestésico local (CHENG et al., 2015; BARBOSA et al., 2016; FAVORETO; GILBERT, 2010). Estudos recentes mostraram que extratos das flores, folhas e caules de *A. oleracea* apresentaram atividades fungistática, fungicida e inseticida (FAVORETO; GILBERT, 2010; BARBOSA et al., 2016).

Diante deste cenário bastante promissor quanto ao uso de *A. oleracea* como acaricida, o presente trabalho teve por objetivo avaliar ultraestruturalmente os efeitos de diferentes concentrações (6,2; 12,5 e 25 mg/mL) do extrato etanólico de *A. oleracea* sobre o sistema reprodutor de machos de carrapatos *A. cajennense*, a fim de se estabelecer se este químico natural poderá num futuro próximo se tornar uma estratégia a ser utilizada no controle desses carrapatos.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1 EXTRATO DE *Acmella oleracea*

O extrato etanólico bruto das partes aéreas (flores, folhas e caules) de *A. oleracea* foi produzido no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil, sob a supervisão do Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

2.1.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal foi semeado e cultivado no campo experimental do CPQBA/UNICAMP, localizado no município de Paulínia, SP, Brasil (coordenadas geográficas -22° 47' 52" S, -47° 6' 49"). As sementes foram gentilmente cedidas pela empresa Centroflora (Botucatu, SP, Brasil) e a coleta das partes aéreas (flores, folhas e caule) foi realizada no mês de abril de 2015. A planta foi identificada pelo Dr. John F. Pruski do *Missouri Botanical Garden (USA)* e a exsicata está depositada no Herbário do CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, sob nº 181.452. Também foi obtida autorização de acesso e de remessa de patrimônio genético (CGEN) sob nº 010577/2014-9. Além disso, o estudo está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen sob número A34093F.

2.1.2 Secagem e moagem do material vegetal

Depois de coletadas, as flores, folhas e caules de *A. oleracea* foram secas em estufa com ventilação forçada por 48h a 40° C até massa constante (RODRIGUES et al., 2006). A moagem deu-se em moinho de facas com peneira de 48 mesh – 0,297 mm. O material vegetal seco e moído foi armazenado em embalagem de papel craft com revestimento de polipropileno com fechamento simples e mantido em freezer - 20° C até a utilização.

2.1.3 Preparação do extrato etanólico bruto de *Acmella oleracea* (L.) R. L. Jansen

A extração foi realizada em etanol 96° GL (na proporção de 1:5, planta/solvente) à temperatura ambiente, em tanque de aço inox com agitação mecânica por uma hora e trinta minutos, ao final da qual o resíduo foi separado por filtração. Este processo foi repetido por mais duas vezes (RODRIGUES et al., 2006). Os extratos brutos obtidos foram filtrados, reunidos e concentrados sob vácuo em sistema de evaporação rotativo na temperatura de 40°C. O extrato foi então liofilizado até massa constante, acondicionado em frasco âmbar e armazenado em freezer - 20° C até a utilização.

2.1.4 Monitoramento analítico do extrato

A presença do espilantol, componente majoritário das partes aéreas (flores, folhas e caules) de *A. oleracea* e do extrato etanólico bruto aqui utilizado, foi monitorada em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS, Agilent® 5890 Series II mass selective detector Agilent® 5970 EI 70eV) equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, HP5-MS, Agilent®, dimensões 30m x 0.25 mm x 0.25 µm. As condições de análise foram: temperatura do injetor: 220° C; temperatura do detector: 250° C; programa de temperatura: 60-240° C (3° C/min), injeção de amostra usando modo de divisão de proporção 1:40; gás Hélio foi utilizado como transportador a 0,7 bar, 1 mL/min.

2.2 HOSPEDEIROS

Foram utilizados como hospedeiras coelhas adultas do Grupo Genético Botucatu com peso entre 3 a 3,5 Kg, sem contato prévio com carrapatos ou carrapaticidas, que foram adquiridas do Biotério da UNESP de Botucatu, SP, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas e receberam água e ração comercial *ad libitum*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil sob nº 11/2015.

2.3 CARRAPATOS *A. cajennense* (FABRICIUS, 1787)

Os carrapatos *A. cajennense* foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP, SP, Brasil. Os carrapatos adultos foram coletados da vegetação do Município de Governador Jorge Teixeira, Rondônia, região ocidental da Amazônia brasileira (coordenadas geográficas 10° 31' 00" S, 62° 38' 00" W) e mantidos em colônia. A identificação das espécies foi realizada por Martins et al. (2016).

Para o presente estudo foram utilizados machos de *A. cajennense* alimentados por 10 dias em coelhas hospedeiras e mantidos em estufa BOD sob condições controladas (28° ± 1°C, 85% de umidade e fotoperíodo de 12 h) em sala de Biotério do Departamento de Biologia, I.B, – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

2.4 AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL

2.4.1 Delineamento experimental

Para a avaliação ultraestrutural do sistema reprodutor dos machos alimentados de *A. cajennense* após a exposição ao extrato etanólico bruto de *A. oleracea* em concentrações subletais (concentrações menores que a CL_{50}), foi utilizado o Teste de Imersão de Adultos (DRUMMOND et al., 1973). As concentrações subletais foram determinadas por Anholetto et al. (2017a)

Machos alimentados com peso médio de 10 mg (cerca de 10 dias de alimentação em coelhas hospedeiras) (150 indivíduos) de *A. cajennense*, foram coletados de infestações artificiais de três coelhas hospedeiras (50 casais de carrapato/coelho). Antes do início dos testes, os carrapatos foram lavados em água corrente e depois, secos em papel absorvente macio.

Machos com pesos homogêneos ($p > 0,05$), foram alocados em cinco grupos experimentais de 10 carrapatos cada e expostos a concentrações subletais do extrato:

Machos alimentados: Grupo Controle 1 - os carrapatos foram expostos à água destilada; Grupo Controle 2 - foram expostos ao solvente etanol 50% e DMSO 1%; Grupos Tratamento 1 a 3 - foram expostos às concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato etanólico bruto das partes aéreas (flores, folhas e caules) de *A. oleracea*, respectivamente, obtidas por diluição em etanol 50% e DMSO 1%.

Em cada grupo experimental, os indivíduos foram imersos nas substâncias a serem testadas durante cinco minutos. Em seguida, foram secos em papel absorvente, colocados em placas de Petri identificadas e levadas à estufa BOD sob condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 85% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas) por sete dias, intervalo de tempo sugerido por Oliveira, Bechara e Camargo-Mathias (2008) em estudos com fêmeas de *R. sanguineus* submetidas ao fipronil, visto que a maioria dos efeitos dos acaricidas não são imediatos e as alterações morfológicas geralmente aparecem após esse período. Foram realizadas observações diárias e os carrapatos foram estimulados com gás carbônico e com a ponta de um pincel por 30 minutos. Os indivíduos considerados mortos foram aqueles sem capacidade de movimento após dez minutos do estímulo e não foram utilizados para as análises ultraestruturais. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após o teste de imersão, os machos de *A. cajennense* foram dissecados sob estereomicroscópio em placas de Petri contendo solução fisiológicas tamponada (NaCl 7,5

g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L) para coleta do sistema reprodutor para posterior análise.

2.4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise ultraestrutural, as amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7.2), durante 72 horas. Em seguida, foram realizadas duas lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, com duração de 15 minutos cada e, logo depois, foi realizada a pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1%, durante duas horas. As amostras foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio por duas vezes de 15 minutos e imersas em etanol aquoso a 10% por 15 minutos. O material foi contrastado em solução de acetato de uranila a 1%, dissolvido em álcool 10%, por 24 horas no escuro, sendo, em seguida, desidratado em série gradativa de acetona (de 50 a 100%). Posteriormente, o material foi embebido em resina Epon-Araldite mais acetona, na proporção de 1:1, por 24 horas, incluído em resina pura e levado à estufa por 72 horas, a 60°C, para polimerização.

Secções ultrafinas obtidas em ultra micrótomo Leica Reichert Supernova foram depositadas sobre grades de cobre e contrastadas em acetato de uranila a 4%, durante 20 minutos, e citrato de chumbo por 10 minutos (REYNOLDS, 1963). O material foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1011 nas dependências do Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RESULTADOS

3.1.1 Grupos controle 1 E 2

O sistema reprodutor de machos de *A. cajennense* alimentados por 10 dias em coelhos hospedeiros (Grupos Controle I e II), apresentou as características típicas já descritas anteriormente por Sonenshine e Roe (2014) e Anholetto et al. (2015). As células

secretoras do complexo de glândulas acessórias multilobuladas mostraram-se íntegras, com núcleo arredondado apresentando heterocromatina localizada na região periférica e eucromatina na porção central dele (Figuras 1A, 5). O citoplasma, se mostrou homogêneo, com presença de retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, além de grande quantidade de ribossomos livres (Figuras 1B, 5). Além disso, foram observados grânulos de secreção arredondados, sendo esses eletrondensos (Figuras 1B, 5). Já nos testículos, foram observadas espermatídes maduras, também chamadas de espermióforos ou prospermia, que apresentaram ultraestrutura preservada conforme já descrito por Feldman-Muhsam e Filshie (1976) (Figuras 1A-B, 5).

3.1.2 Grupo tratamento 1: exposição a 6,2 mg/mL do extrato

Os machos alocados nesse grupo de estudo quando expostos à concentração de 6,2 mg/mL do extrato etanólico bruto de *A. oleracea*, apresentaram alterações ultraestruturais no seu sistema reprodutor em comparação aos dados obtidos dos indivíduos dos grupos Controle I e II (Figuras 2A-C, 5). O núcleo das células secretoras das glândulas acessórias apresentou morfologia alterada, visto terem passado de arredondado a irregular (Figuras 2A, 5). No citoplasma, foi possível notar a presença de grânulos de secreção eletrondensos de morfologia irregular (Figuras 2A-B, 5). Além disso, vacúolos foram encontrados sobretudo ao redor dos grânulos de secreção (Figuras 2B-C, 5). Em relação ao espermióforo, verificaram dobras na membrana plasmática e desarranjo do citoesqueleto (Figuras 2C-D, 5).

3.1.3 Grupo tratamento 2: exposição a 12,5 mg/mL do extrato

Neste grupo de tratamento, as alterações ultraestruturais foram mais acentuadas, sendo que os núcleos das células secretoras das glândulas acessórias apresentaram-se irregulares e com marginalização cromatínica (Figuras 3A, 5). Em relação ao citoplasma, foi possível observar grânulos de secreção menores quando comparados aos do grupo controle (Figuras 3A-D, 5). Além disso, foram encontrados grânulos de secreção irregulares com conteúdo desorganizado, além de grânulos fragmentados e até mesmo vacuolizados (Figuras 3A-D, 5), bem como regiões desorganizadas e eletrólúcidas, vacúolos autofágicos com organelas em seu interior (Figuras 3A-D, 5) e figuras mielínicas (Figuras 3B, 5). Em relação ao espermióforo, pode-se notar dobras na membrana plasmática, bem como desarranjo do citoesqueleto (Figuras 3E-F, 5).

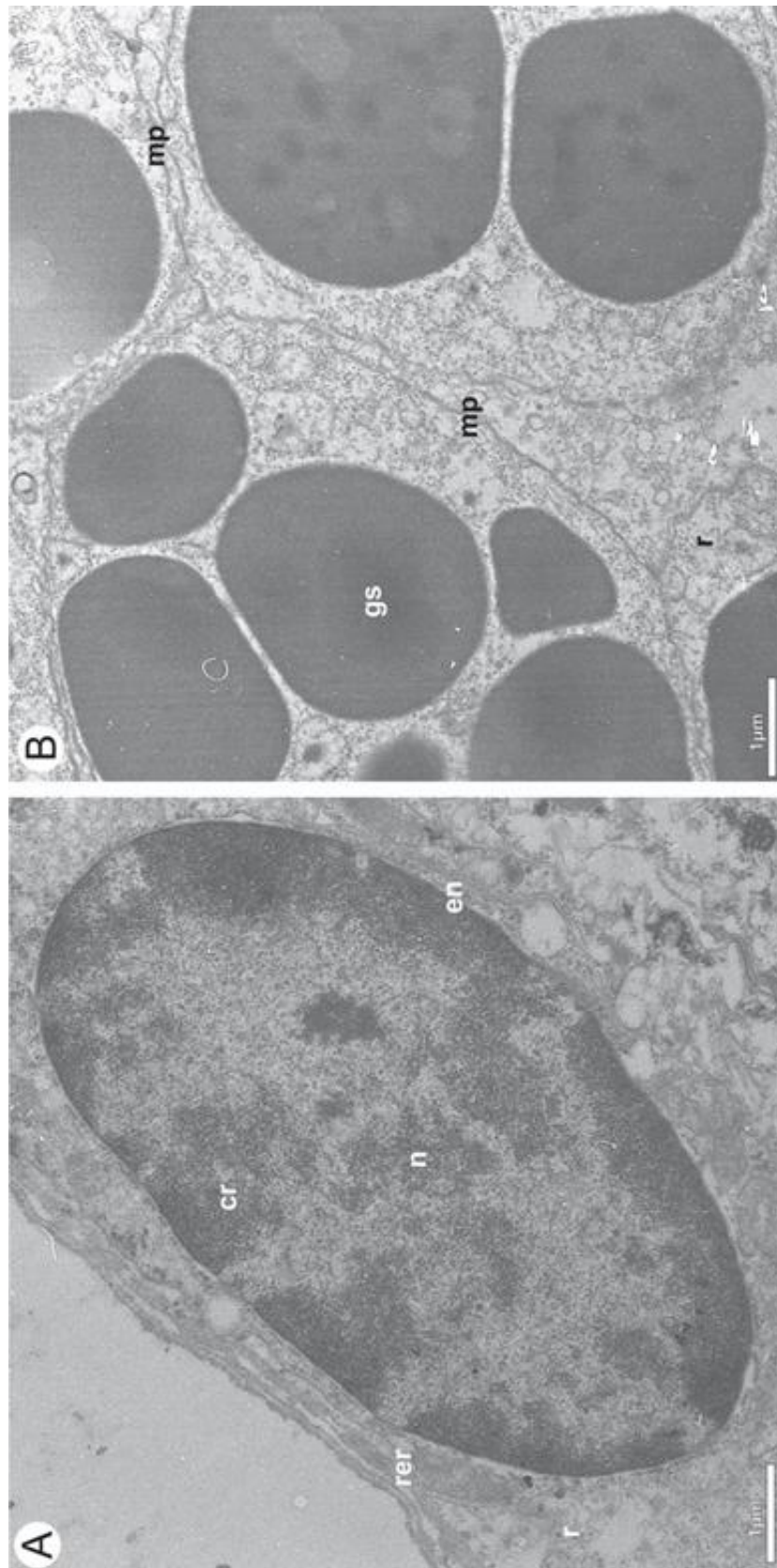


Figura 1. Ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense* (Grupos Controles I e II).

A-B. Células secretoras do complexo de glândulas acessórias multilobuladas. cr= cromatina; en= envoltório nuclear; gs= grânulos de secreção; mp = membrana plasmática; n= núcleo; r= ribossomos livres; rer: retículo endoplasmático rugoso. Barras: A-B= 1µm.

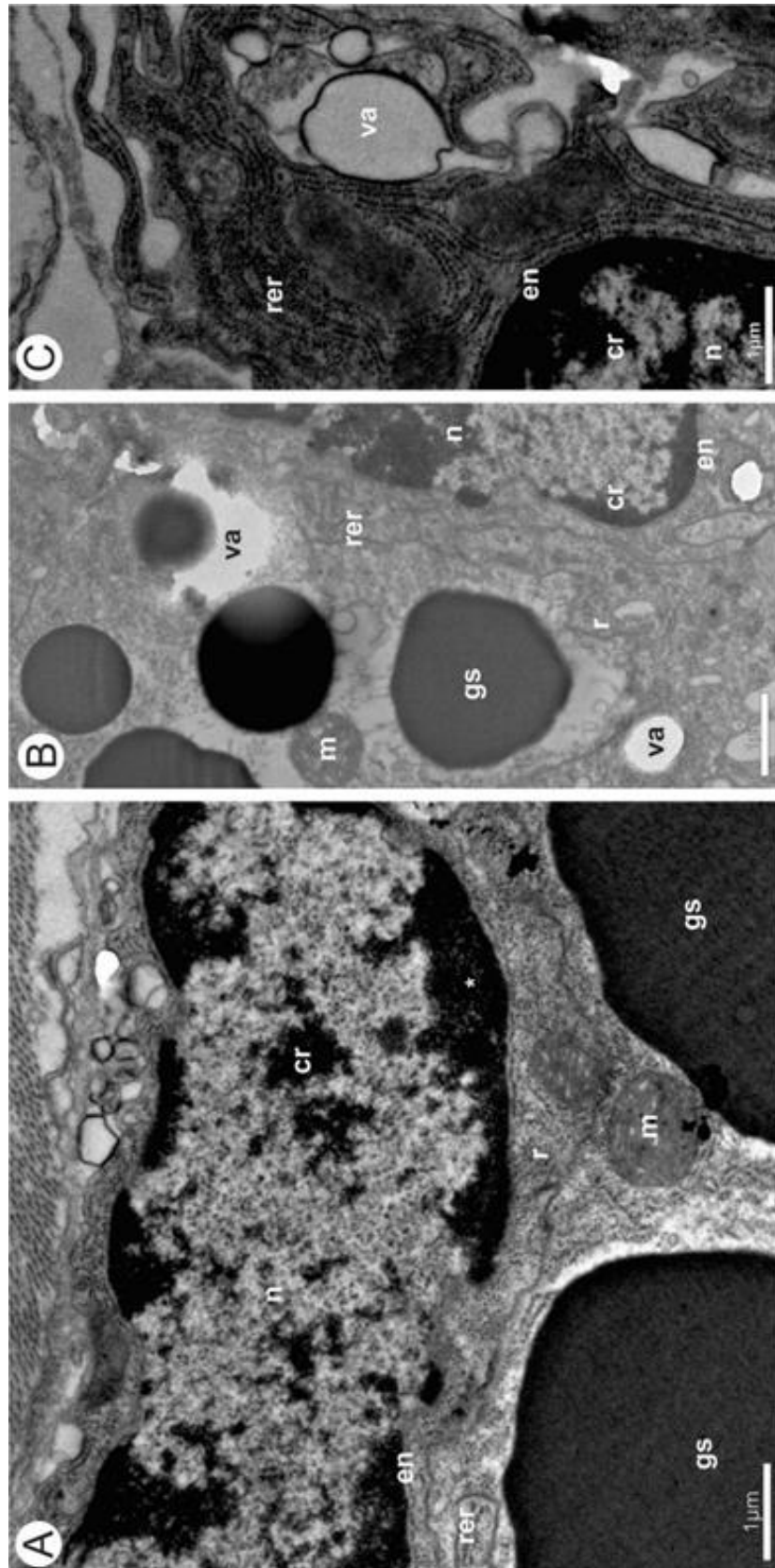


Figura 2. Ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense* (Grupo Tratamento 1: exposição a 6,2 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*). A-C. Células secretoras do complexo de glândulas acessórias multilobuladas. cr= cromatina; gs= grânulos de secreção; m= mitocôndria; en= envoltório nuclear; n= núcleo; r= ribossomos livres; rer: retículo endoplasmático rugoso; va= vacúolo; * = marginalização cromatínica. Barras: A-C= 1μm

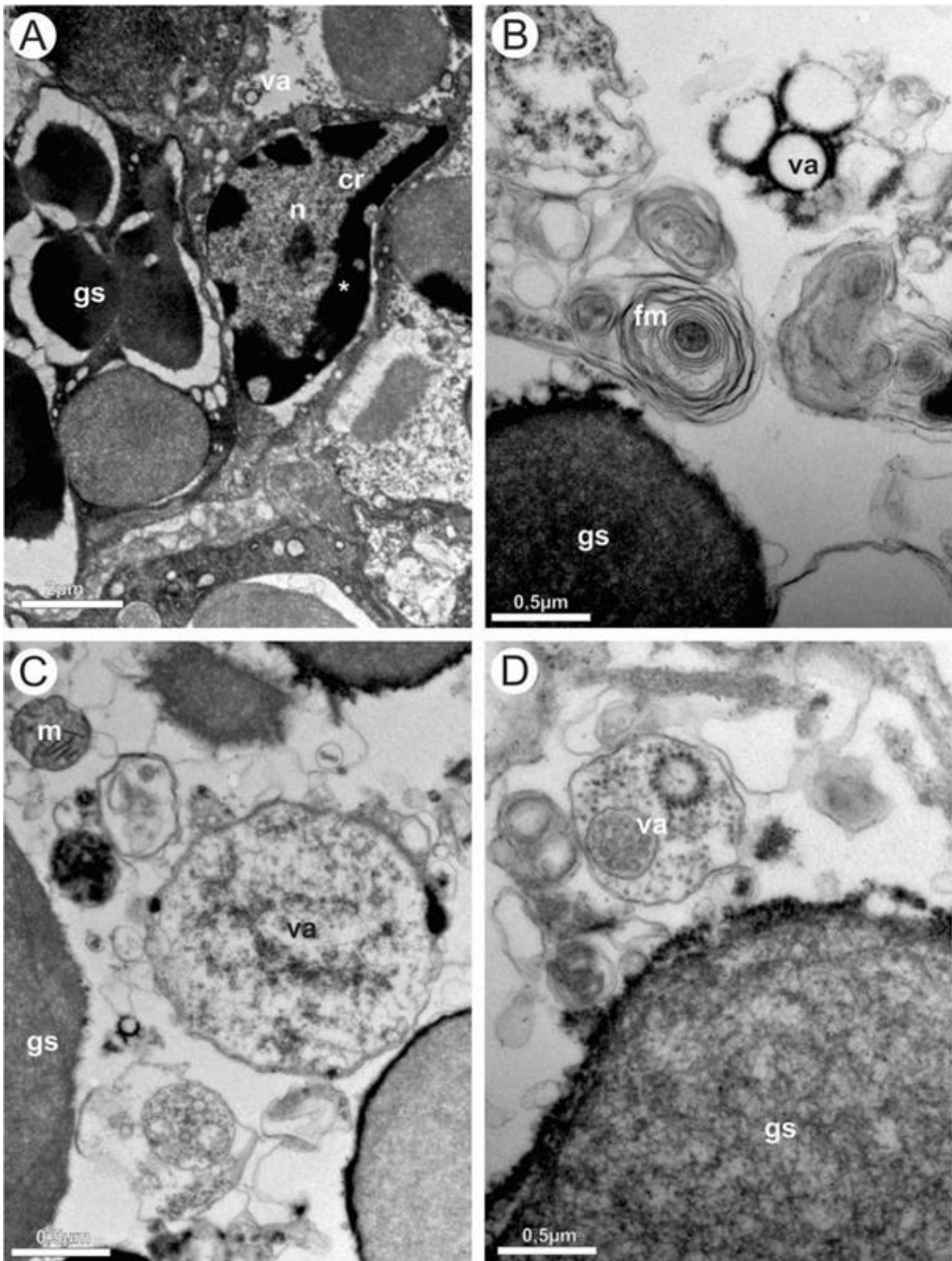


Figura 3. Ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense* (Grupo Tratamento 2: exposição a 12,5 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*). A-D. Células secretoras do complexo de glândulas acessórias multilobuladas. cr= cromatina; fm= figura mielínica; gs= grânulos de secreção; m= mitocôndria; n= núcleo; r= ribossomos livres; rer: retículo endoplasmático rugoso; va= vacúolo autofágico; * = marginalização cromatínica. Barras: A= 2µm; B-D= 0,5 µm.

3.1.4 Grupo tratamento 3: exposição a 25 mg/mL do extrato

Nesses machos houve alterações ultraestruturais severas no complexo de glândulas acessórias multilobuladas. Os núcleos das células secretoras mostraram morfologia irregular (Figuras 4A-D, 5) e o citoplasma apresentou grânulos de secreção ainda menores quando comparados aos dos grupos controle e aos de tratamento anteriormente descritos (Figuras 4A-F, 5). Além disso, no citoplasma foram observadas regiões desorganizadas e eletrólúcidas, grânulos de secreção irregulares com conteúdo desorganizado, grânulos fragmentados (Figuras 4A-F, 5), grânulos com vacuolização ao seu redor (Figuras 4A-F, 5) e vacúolos autofágicos com restos celulares em seu interior (Figura 4A-F, 5). Em relação ao espermióforo, observou-se dobras na membrana plasmática, bem como desarranjo do citoesqueleto (Figuras 4G, 5).

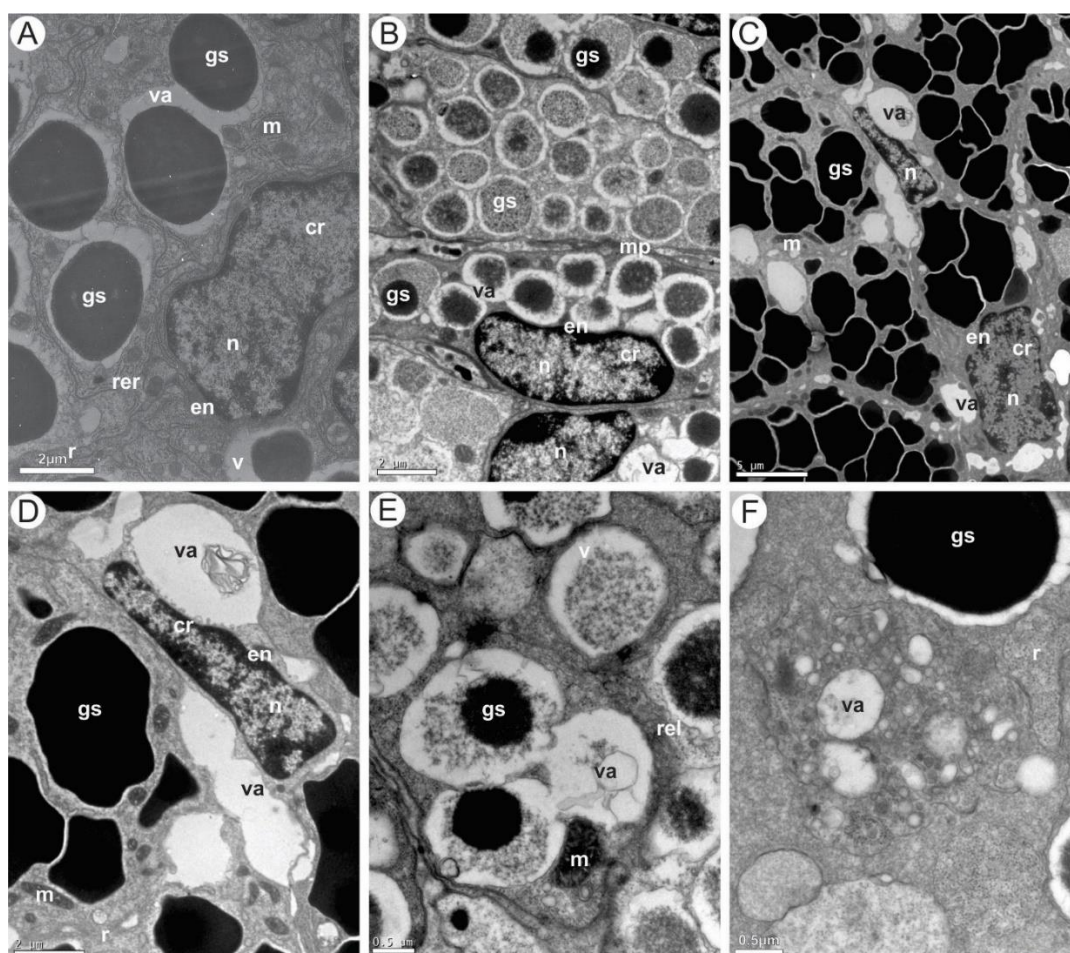


Figura 4. Ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense* (Grupo Tratamento 3: exposição a 25 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*). A-F. Células secretoras do complexo de glândulas acessórias multilobuladas. cr= cromatina; gs= grânulos de secreção; m= mitocôndria; en= envoltório nuclear; mp = membrana plasmática; n= núcleo; r= ribossomos livres; rer: retículo endoplasmático rugoso; va= vacúolo. Barras: A, B, D= 2 µm; C= 5µm; E-F= 0,5 µm.

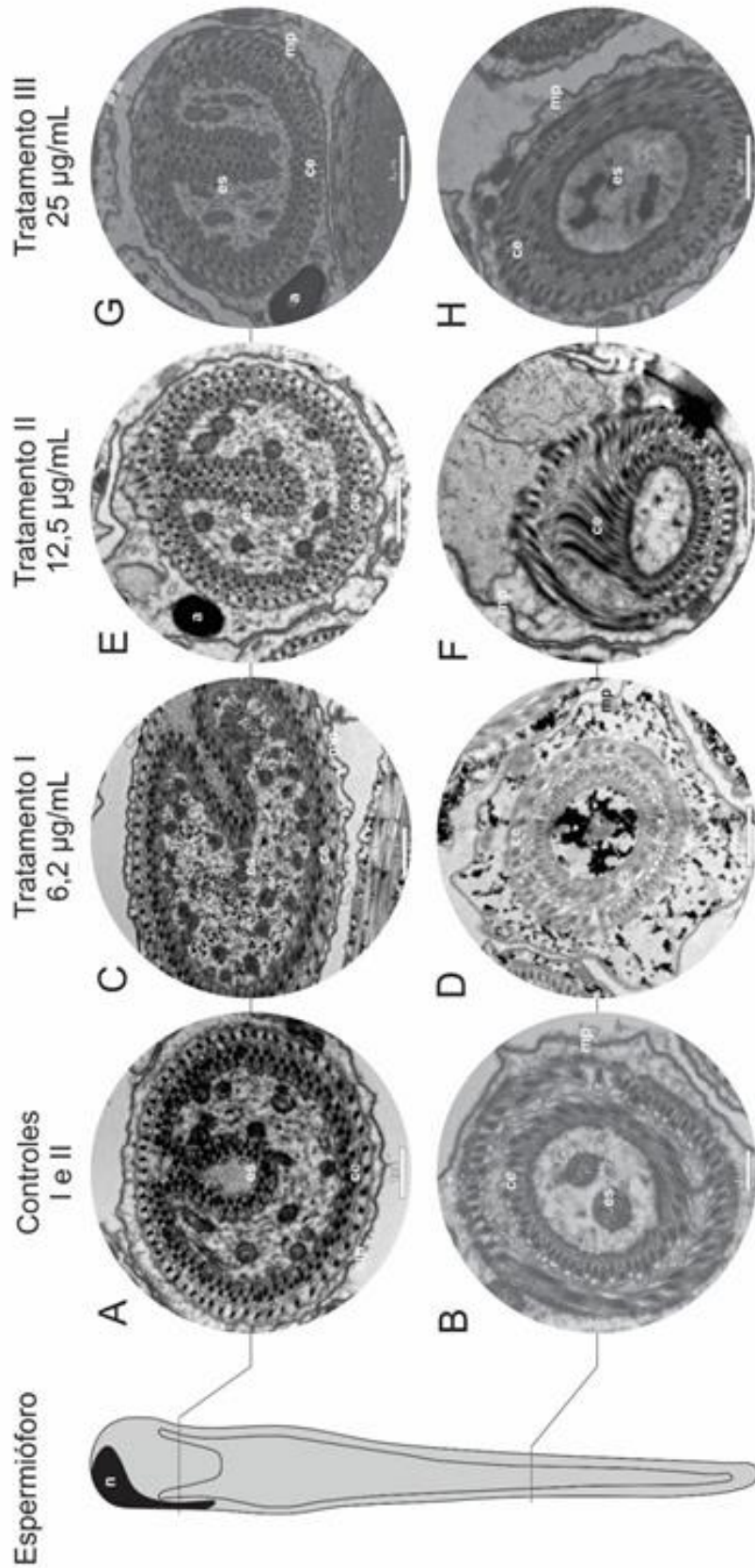


Figura 5. Ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense*. Evidenciando os espermióforos no interior do testículo A-B. Grupo Controles I e II: C-D. Grupo Tratamento 1. E-F. Grupo Tratamento 2. G-H. Grupo Tratamento 3. ce= citoesqueleto; es= espermióforo; mp= membrana plasmática; n= núcleo. Barras: A-H= 1µm

3.2 DISCUSSÃO

Segundo Anholeto et al. (2015) e Sampieri et al. (2015b), o sistema reprodutor masculino dos carrapatos *A. cajennense* é composto por um par de testículos tubulares responsáveis pela produção e maturação das células germinativas até o estágio de espermátides e por um complexo de glândulas acessórias multilobuladas responsável pela produção e secreção do fluído espermático e pela síntese do espermátóforo. Os dados ultraestruturais aqui obtidos para a mesma espécie nos indivíduos dos grupos Controles I e II confirmaram aqueles de Sampieri et al. (2015b)

Segundo Sonenshine e Roe (2014), o desenvolvimento morfológico das espermátides dos carrapatos da família Ixodidae ocorre basicamente em duas etapas: a espermatogênese, caracterizada pela sequência de divisões mitóticas e meióticas das espermatogônias e dos espermátócitos, originando as espermátides; e a espermiogênese, etapa final do desenvolvimento (diferenciação) das espermátides e que resultarão nos espermatozóides. A espermatogênese na maioria dos Ixodidae tem início no final do estágio de ninfa e é concluída logo após a ecdise do estágio de ninfa para o adulto (OLIVEIRA et al., 2012). Porém, esta dinâmica não é regra, visto que para algumas espécies a espermatogênese só é concluída quando o macho, depois de atingir o estágio adulto, inicia o processo de alimentação, caso de *Dermacentor variabilis* (SONENSHINE; ROE, 2014). A espermiogênese ocorre em etapas que são dependentes de outros processos fisiológicos, tais como o avanço da alimentação do adulto, bem como a produção do espermátóforo e da síntese das secreções ejaculatórias (REGGER, 1961, 1974; FELDMAN-MUHSAM; BORUT, 1978, 1983; SONENSHINE; ROE, 2014). No presente estudo, o estágio celular mais avançado da espermiogênese foi a espermátide madura, que segundo Sampieri et al. (2015b) é a espermátide V, com morfologia alongada (REGGER, 1961, 1974; SAMPIERI et al., 2015b). Outros trabalhos já desenvolvidos com o sistema reprodutor masculino de carrapatos postularam que as células germinativas em processo de desenvolvimento (espermatogênese e espermiogênese) seriam mais sensíveis às alterações fisiológicas do animal, incluindo a exposição dos indivíduos às substâncias com comprovado potencial tóxico (SAMPIERI et al., 2015a). Aqui pode-se sugerir que as concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato etanólico de *A. oleracea* foram suficientes para provocar danos nas espermátides, danos representados por dobras na membrana plasmática e desorganização dos elementos do citoesqueleto, resultados semelhantes aqueles obtidos por Montasser e Amin (2005) quando analisaram ultraestruturalmente os testículos de *Argas persicus*

expostos à ivermectina, lactona macrocíclica, na dose de 400 µg/Kg do hospedeiro, onde foi observado o rompimento da membrana plasmática e das organelas das espermátides.

Já em relação às células secretoras do complexo de glândulas acessórias do sistema reprodutor de *A. cajennense*, indivíduos expostos às concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato etanólico bruto das partes aéreas (folhas, flores e caules) de *A. oleracea*, respectivamente, apresentaram alterações ultraestruturais significativas. Essas células apresentaram regiões do citoplasma desorganizadas e eletronlúcidas, além da presença de vacúolos autofágicos abrigando organelas no seu interior, provavelmente já desativadas, as quais passariam posteriormente pelo processo de digestão intracelular. Sugere-se que tais alterações ultraestruturais poderiam provocar a diminuição de síntese e de armazenamento dos grânulos de secreção que iriam compor o fluido espermático e o espermatóforo (SONENSHINE; ROE, 2014; SAMPIERI et al., 2015b), corroborando dados obtidos por Sampieri et al. (2015a), quando estudaram a ação de ésteres do ácido ricinoleico do óleo de rícino, sobre carrapatos *A. cajennense* s.l. Esses mesmos autores registraram a presença de significativa vacuolização citoplasmática nas células secretoras das glândulas acessórias dos indivíduos expostos à maior concentração do produto acaricida. A presença de intensa vacuolização citoplasmática em células de indivíduos que foram expostos a agente tóxicos, provavelmente isolaria organelas ou porções do citoplasma já danificadas pelos mesmos, o que de certa forma permitiria que a célula ainda conseguisse sobreviver e se manter biologicamente viável (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2012).

Outra alteração que estaria confirmando a ocorrência de sérios danos às células do complexo de glândulas acessórias, no caso dos indivíduos expostos ao extrato, seria a presença significativa de figuras mielínicas (estruturas membranosas derivadas da autodigestão celular) no citoplasma. Estas também já foram reportadas por Oliveira et al. (2009) em ovócitos de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* expostas ao fipronil. Além disso, Remedio et al. (2015) quando estudaram a ação do óleo de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) em concentrações conhecidas de azadiractina (200, 400 e 600 ppm) sobre o sistema reprodutor feminino de *R. sanguineus*, encontraram resultados semelhantes.

Além da intensa vacuolização citoplasmática das células do complexo de glândulas acessórias, os grânulos de secreção por elas produzidos estavam: a) menores, irregulares e com conteúdo desorganizado, b) fragmentados e c) até mesmo vacuolizados, sinalizando possível queda na síntese e na secreção de polissacarídeos, glicoproteínas, lipoproteínas, glicosaminoglicanos, elementos estes que compõem o fluido seminal. Isso provavelmente implicaria num prejuízo ao processo de capacitação dos espermatozóides no trato genital da

fêmea, inclusive inibindo a formação do espermátforo (envoltório das espermátides maduras) (GARCIA-FERNANDEZ; GARCIA; GARCIA, 1998; SONENSHINE; ROE, 2014). Essas alterações trariam consequências diretas para o processo de fecundação das fêmeas do carrapato, visto que a transferência do esperma e das espermátides do trato masculino para o feminino dar-se-ia por meio do espermátforo (SONENSHINE; ROE, 2014; ANHOLETO et al., 2015; SAMPIERI et al., 2015b). Estudos realizados por Oliver and Brinton (1972) com carrapatos *Dermacentor variabilis* e *Ornithodoros moubata* mostraram que a capacitação das espermátides no trato feminino seria ativada por um polipeptídio produzido pelas glândulas acessórias dos machos. Lomas and Kaufman (1992) em seus estudos observaram em *A. hebraeum* a presença de um fator químico também produzido nestas glândulas dos machos, que depois de liberados no fluído seminal teriam ação sobre o processo de degeneração das glândulas salivares das fêmeas dessa mesma espécie. Os mesmos autores sugeriram ainda que outros fatores químicos produzidos no trato masculino influenciariam na fase de ingurgitamento das fêmeas, porém a natureza química desses fatores ainda continua pouco esclarecida. Portanto, a alteração da ultraestrutura do complexo glandular do sistema reprodutor dos machos traria por consequência alterações no processo de síntese e secreção e conseqüentemente alteraria os processos de fecundação e de reprodução dos carrapatos (SAMPIERI et al., 2015a).

4. CONCLUSÃO

De maneira geral, os resultados aqui apresentados deixaram claro que o extrato etanólico de *A. oleracea* nas concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL teria ação tóxica e provocaria danos na ultraestrutura do complexo de glândulas acessórias dos testículos de carrapatos *A. cajennense*, dados esses que o elegem como uma alternativa acaricida para o controle de carrapatos *A. cajennense*, visto seu potencial de inibir a produção e a secreção dos fluidos seminais, bem como de modificar a ultraestrutura das espermátides maduras, conseqüentemente comprometendo o processo de reprodução dessa espécie. Esses achados vêm abrir a possibilidade do uso do extrato etanólico obtido a partir das flores, folhas e caule de *A. oleracea*, como uma estratégia de controle mais vantajosa se comparada àquelas oferecidas pelos químicos sintéticos.

5. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo nº 2015/01496-5) e CAPES/Brasil pelo suporte financeiro. Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna pela colaboração. À Sra. Monika Lamonte e aos Srs. Gerson de Melo Souza e Antônio Teruyoshi Yabuki pelo apoio técnico.

6. REFERÊNCIAS

ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 2014.

ANHOLETO, L. A.; NUNES, P. H.; REMÉDIO, R. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Testes of fed and unfed *Amblyomma cajennense* ticks (Acari: Ixodidae). First morphological data. **Acta Zoologica**, v. 96, n. 3, p. 375–382, 2015.

ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; SPINDOLA, C. S.; LABRUNA, M. B.; PIZANO, M. A.; et al. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017.

BARBOSA, A. F.; CARVALHO, M. G.; SMITH, R. E.; SABAA-SRUR, A. U. O. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 128–133, 2016.

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; BARBOSA, C. S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 20, n. 2, p. 89–96, 2011.

BRITES-NETO, J.; DUARTE, K. M. R.; MARTINS, T. F. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. **Veterinary World**, v. 8, n. 3, p. 301–315, 2015.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A Célula**. 3ª ed. Editora Manole, 2012.

CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; et al. Acaricide activity *in vitro* of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3697–701, 2014.

CHAGAS, A. C. S.; GEORGETTI, C. S.; CARVALHO, C. O.; OLIVEIRA, M. C. S.; RODRIGUES, R. A.; FOGGIO, M. A.; et al. *In vitro* activity of *Artemisia annua* L (Asteraceae) extracts against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 31–35, 2011.

CHENG, Y.; LIU, R.; HO, M.; WU, T.; CHEN, C.; LO, I.; et al. Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6970–6977, 2015.

CRAMPTON, A.; BAXTER, G.; BARKER, S. Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick,

- Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biol**, v.29, n.4, p.377-384, 1999.
- DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–133, 1973.
- ESTRADA-PEÑA, A.; TARRAGONA, E. L.; VESCO, U.; MENEGHI, D.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J.; et al. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 14, p. 1081–1089, 2014.
- FAVORETO, R.; GILBERT, B. Estado da Arte/State of the Art - *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v. 5, n. 1, p. 83–91, 2010.
- FELDMAN-MUHSAM, B.; BORUT, S. Further observations on spermatophore formation in argasid ticks. **Journal of Insect Physiology**, v. 24, n. 10–11, p. 693–697, 1978.
- FELDMAN-MUHSAM, B.; BORUT, S. On the spermatophore of ixodid ticks. **Journal of Insect Physiology**, v. 29, n. 5, p. 449–457, 1983.
- FELDMAN-MUHSAM, B.; FILSHIE, B. K. Scanning and transmission electron microscopy of the spermiophores of *Ornithodoros ticks*: an attempt to explain their motility. **Tissue & Cell**, v. 8, n. 3, p. 411–419, 1976.
- GARCIA-FERNANDEZ, C.; GARCIA, S. M. L.; GARCIA, R. N. The male genital accessory gland complex of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 3, p. 453–462, 1998.
- LOMAS, L. O.; KAUFMAN, W. R. The influence of a factor from the male genital tract on salivary gland degeneration in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Insect Physiology**, v. 38, n. 8, p. 595–601, 1992.
- MARTINEZ, S. S. **O Nim - *Azadirachta indica*: Natureza, usos múltiplos**. IAPAR, 2002.
- MONTASSER, A. A.; GADELHAK, G. G. G.; TARIQ, S. Impact of ivermectin on the ultrastructure of the testis of *Argas (Persicargas) persicus* (Ixodoidea: Argasidae). **Experimental & Applied Acarology**, v. 36, n. 1–2, p. 119–129, 2005.
- OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; MARIN-MORALES, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1255–1264, 2009.
- OLIVEIRA, P. R.; CALLIGARIS, I. B.; ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the nymphs *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Description of the testes, integument, Malpighian tubules, and midgut on the detachment day. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 6, p. 727–736, 2012.
- OLIVEIRA, P. R.; CASTRO, K. N. C.; ANHOLETO, L. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleracea* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 8, p. 744–753, 2016.
- OLIVEIRA, P. R.; ANHOLETO, L. A.; RODRIGUES, R. A. F.; BECHARA, G. H.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO MATHIAS, M. I. The potential of *Acmella oleracea* (Jambu) extract in the control of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female

ticks. **International Journal of Acarology**, v. 44, n. 4–5, p. 192–197, 2018.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.7, p.2459–2465, 2008.

OLIVER, J. H.; BRINTON, L. P. Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea). 7. Spermatogenesis in the Pacific Coast tick, *Dermacentor occidentalis* Marx (Ixodidae). **The Journal of Parasitology**, v. 58, n. 2, p. 365–379, 1972.

REGER, J. F. The fine structure of spermatids from the tick, *Amblyomma dissimili*. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 5, n. 6, p. 584–599, 1961.

REGER, J. F. The origin and fine structure of cellular processes in spermatozoa of the tick *Dermacentor andersoni*. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 48, n. 3, p. 420–434, 1974.

REMEDIO, R. N.; NUNES, P. H.; ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 431–444, 2015.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 208–12, 1963.

RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S.; SANTOS, A. S.; REHDER, V. L. G. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 368–372, 2006.

RODRÍGUEZ-MALLON, A. Developing anti-tick vaccines. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1404, p. 243–259, 2016.

ROMA, G. C.; OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M. A.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Determination of LC(50) of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 3, p. 269–272, 2009.

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

SAMPIERI, B. R.; MOREIRA, J. C. S.; PÁEZ, F. A. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Comparative morphology of the reproductive system and germ cells of *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae): A contribution to Ixodidae systematics. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 4, n. 2, p. 95–107, 2015b.

SOARES, H. S.; BARBIERI, A. R. M.; MARTINS, T. F.; MINERVINO, A. H. H.; LIMA, J. T. R.; MARCILI, A.; et al. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Experimental & Applied Acarology**, v. 65, n. 1, p. 125–140, 2015.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. 2^a ed. Oxford University Press, 2014.

TARRAGONA, E. L.; CICUTTIN, G. L.; MANGOLD, A. J.; MASTROPAOLO, M.; SALVO, M. N.; NAVA, S. *Rickettsia* infection in *Amblyomma tonelliae*, a tick species from the *Amblyomma cajennense* complex. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 173–177, 2015.