Adne Abbud Righi

EXTRATOS BRUTOS E CONSTITUINTES DE PRÓPOLIS
BRASILEIRAS: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NOS CARRAPATOS
RHIPICEPHALUS SANGUINEUS, *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* E
AMBLIOMMA CAJENNENSE

PROPOLIS EXTRACTS AND THEIR CONSTITUENTS:
EVALUATION OF THE EFFECTS AGAINST THE TICKS
RHIPICEPHALUS SANGUINEUS, *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*
AND *AMBLIOMMA CAJENNENSE*

São Paulo
- 2013 -

Adne Abbud Righi

EXTRATOS BRUTOS E CONSTITUINTES DE PRÓPOLIS
BRASILEIRAS: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NOS CARRAPATOS
RHIPICEPHALUS SANGUINEUS, *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* E
AMBLYOMMA CAJENNENSE

PROPOLIS EXTRACTS AND THEIR CONSTITUENTS:
EVALUATION OF THE EFFECTS AGAINST THE TICKS
RHIPICEPHALUS SANGUINEUS, *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*
AND *AMBLYOMMA CAJENNENSE*

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de
Título de Doutor em Ciências, na
Área de Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Salatino
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo
- 2013 -

FICHA CATALOGRÁFICA

Righi, Adne Abbud

Extratos brutos e constituintes de própolis brasileiras: avaliação dos efeitos nos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Amblyomma cajennense*. 149p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Própolis brasileiras 2. Carrapatos de importância econômica 3. Análises qualitativas I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Antonio Salatino
Orientador

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Alexandre: o homem que faz toda diferença na minha vida, que compartilha sonhos, que me apoia nas decisões mais importantes e em todos os sentidos me encoraja, se coloca ao meu lado para viver e superar desafios; meu parceiro, companheiro e maior amor do mundo!

EPÍGRAFE

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo.

E que posso evitar que ela vá a falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios pensamentos...

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um ‘não’.

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Sempre achei que este item da tese seria o mais fácil, mas por mais incrível que pareça este se tornou uma árdua tarefa... Não pela dificuldade em agradecer a todos que passaram pela minha vida neste período de formação acadêmica (esta é a parte mais gostosa!), mas pela dificuldade de me despedir de uma fase maravilhosa da minha vida! Não apenas do convívio diário com pessoas muito queridas que conheci neste caminho, mas também me despedir de um Instituto todo que me acolheu desde a infância...

O IB-USP representa muito mais do que uma simples graduação em Ciências Biológicas e pós-graduação em Botânica. Este lugar me remete às manhãs de sábados dissecando minhocas sob a lupa, me deslumbrando com a imensa jiboia na parede do prédio da Zoologia, à aranha caranguejeira (gigantesca sob o olhar de uma criança) em um aquário a devorar baratas, conchas e esqueletos de muitos animais no saguão de entrada, e ao corredor com inúmeras salas/laboratórios de pessoas incríveis (muitos dos quais tive o prazer de rever muitos anos depois durante a graduação)! Dentre essas salas, uma delas pertencia ao meu amoroso pai, Prof. Dr. Gilberto Righi, e que descobri o grande pesquisador e educador que foi apenas na graduação (*in memoriam*). Sem contar das lembranças da “guerra” de argila quando o prédio do Centro Didático estava em construção, e da linda paineira que ainda resplandece na já saudosa Rua do Matão e que me serviu com suas painas para fazer almofadinhas às minhas bonecas! Enfim, lembranças antigas e extremamente agradáveis de um Instituto e de uma Universidade inteira!

Mas não farei desse precioso espaço um relato de uma vida toda, mas sim a expressão em palavras, por vezes falha, de uma gratidão imensa que me enche de orgulho, paz e amor por esse lugar e pelas pessoas que ali conheci!

Pode parecer, mas não sou Poliana para afirmar que tudo foi um “mar de rosas”, mas agradeço muito por todos os encontros e desencontros que contribuíram (e muito!) para o

meu crescimento pessoal e profissional durante esses bons anos de pós-graduação junto ao Departamento de Botânica do IB-USP (minha segunda casa, meu segundo cantinho feliz!).

O meu projeto de doutorado começou não como uma mera continuação dos estudos desenvolvidos no mestrado, mas em um almoço em família! Após estudar um pouco mais sobre aplicação econômica de própolis na área agrícola e cogitando mudar o foco, surgiu a ideia de pensar novo com fins à saúde animal (na época uma das minhas cachorras estava infestada por carrapatos!!!). E essa ideia foi compartilhada em uma (dentre muitas outras) deliciosa conversa com minha “irmã” Fabiana e meu irmão Dario, ambos veterinários. Agradeço, sempre, pelos encontros barulhentos e divertidos da Família Abbud Righi. E agradeço a Deus fazer parte de uma família tão entusiasta e que agrega pessoas fantásticas! Não sei como seria a vida, e talvez nem queira saber (!!!), sem o apoio e carinho eterno da melhor mãe do mundo!!!! Mulher que me inspira confiança, amor, carinho, independência. Certamente um dos meus maiores orgulhos e admiração!!! E o que dizer dos meus irmãos?!!!! Os melhores do mundo, com suas singularidades apaixonantes, Alex, Bruno, Ciro e Dario!!!! E que me deram queridíssimas “irmãs”, Patricia M., Helena, Alessandra e Fabiana!!! E o meu querido e eternamente amado marido, Alexandre, me faltam palavras para expressar tudo que representa em minha vida! O melhor marido do mundo!!!! Especialmente nesse período do doutorado, ele muito me ajudou, não apenas com perguntas “engenheirísticas”, que me fizeram pensar e estudar a melhor forma de explicar meus resultados (o que no final contribuiu, e muito, para o esclarecimento dos meus próprios pensamentos). Mas também pelo raciocínio lógico intrínseco de engenheiros e, ainda mais, japoneses!!! Sua disciplina invejável e extrema dedicação, amor e companheirismo, sempre me acalentaram nas horas mais difíceis... E, além deles, não é pelo fato de ter abraços, sorrisos e gargalhadas somente em sonhos, agora, que deixaria de agradecer ao meu pai!! O melhor pai do mundo, sem dúvida!!!!!! E que, de certa forma, me influenciou, e ainda influencia, nas minhas escolhas, no meu caminho acadêmico. Foram poucos (poderia ter sido mais!) mas maravilhosos anos de companhia, amor, dedicação,

aprendizado e os melhores exemplos, e que ficarão para sempre, admiração eterna!!!!
Enfim, muitíssimo obrigada por todo amparo, carinho e amor. Alexandre, Papai, Mamãe, Roberto, Sonia, Manitos (Alex, Bruno, Ciro, Dario, Zé Luiz e Mauricio), Manitas (Patricia M., Helena, Alessandra, Fabiana, Patricia e Nina) e Sobrinhada (Daniela, Arthur, Carolina, Luisa e Lucas), muito obrigada por tornarem minha vida sempre mais alegre e feliz!

Surgida, então, a ideia foi a vez de convencer o Prof. Dr. Antonio Salatino a me orientar nessa nova empreitada! Foram alguns meses para mostrar-lhe que o projeto poderia ser interessante. E foi fundamental para o desenvolvimento do projeto inicial os testes piloto que meu orientador tanto almejava ver! E, com uma pitada de sorte, escolhi justamente a amostra ativa para iniciar os testes e mostrar ao professor que meu projeto de doutorado poderia ter sentido!!! Sou eternamente grata ao meu professor, meu Mestre, uma pessoa por quem sinto um imenso carinho, por todos os ensinamentos ao longo desses anos de convívio. Muito obrigada pela paciência em me ensinar, por me fazer rir quando eu estava tomada por muita raiva, por me ver choramingar e me mostrar um jeito diferente de enfrentar os obstáculos, por me ver ansiosa e rir (muito!), e por todos os conselhos e imensa contribuição ao meu aprendizado. É ainda mais gratificante e estimulante aprender com alguém que se admira (muito obrigada, Prof!).

Ainda no IB-USP, no Laboratório de Fitoquímica, muito obrigada a todos, alunos e funcionários, que de alguma forma me ajudaram. Obrigada pelas conversas despretensiosas e discussões científicas, pelos cafezinhos, pelas companhias nos congressos, pelas cantorias e por muitas risadas, de histórias e piadas! Aline Bertinatto Cruz, Ana Paula Savassi Coutinho, Anary P. M. Egydio, Alice Nagai, Armando Toshikatsu Tomomitsu, Augusto C. Tomba, Bruna S. Pimentel, Carmen E. Palacios Jara, Caroline C. Fernandes Silva, Cristiane Del Nero Rodrigues, Felipe Pacheco de Castro, Fernanda Mendes de Rezende, Janaína M. Meyer, João Paulo Naldi, Katia Pereira, Leandro Sales Santos, Liss M. M. Matos, Marco Aurélio S. Mayworm, Maxuel Andrade, Mourisa Ferreira Silva, Milena Timich, Milene C. Sampaio, Natália Ravanelli, Paula A. Jardim, Priscila Torres

e Sarah Soares. Muito obrigada à Profa. Dra. Maria Luiza F. Salatino pelas agradáveis conversas, sugestões, carinho, apoio e por me oferecer uma mesa em sua sala. Também à Profa Dra. Déborah Y. C. Santos um agradecimento especial pelo apoio constante, pelo carinho, pelas conversas, troca de experiências e sugestões. Muito obrigada por me acompanhar nesses anos todos, banca de qualificação e de defesa de mestrado, banca de qualificação e de defesa (espero que aceite!) de doutorado. Um agradecimento muito especial à Dra Lucimar Barbosa e à Profa. Dra. Claudia M. Furlan pelas conversas, inúmeras sugestões, colaborações, ideias compartilhadas, muitas risadas e deliciosa companhia (até mesmo do outro lado do mundo, né Claudinha?!!!) Duas pesquisadoras que já conhecia da época do mestrado, mas que descobri no doutorado, muito queridas! Muito obrigada pelo carinho! Foi realmente muito gostoso o convívio com todos do Laboratório de Fitoquímica nesses anos de pós-graduação! E também com todos os demais professores do departamento de Botânica, alunos e funcionários! Só tenho a agradecer, muito, muito obrigada a todos!

Mas como não foi apenas sobre química de própolis o meu objeto de estudo, também conheci pessoas incríveis que trabalham com carrapatos e me mostraram um mundo novo! A começar pelo meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna. Muito obrigada, Marcelo, por ter me aceitado e aberto as portas do seu laboratório na FMVZ-USP. Obrigada por todas as conversas, risadas (que foram inúmeras!!!) e muitos ensinamentos. Com você e todos do laboratório de Doenças Parasitárias aprendi a admirar o maravilhoso mundo dos carrapatos! E fiz grandes amizades que levarei para sempre! Muito obrigada pela oportunidade!!! Oportunidade de trabalhar com você, um professor admirável, e por me colocar em contato com um estudo que me faz brilhar os olhos! Ao longo da minha formação acadêmica toda (graduação e pós-graduação) busquei algo que me fizesse estudar sem cansar, que fosse extremamente prazeroso. Buscava algo que via no meu pai, uma fonte de prazer inesgotável, estudar com paixão! E encontrei (acho eu) a minha paixão ao aliar (ou

ao menos tentar) estudos de carrapatos e química de plantas (ou melhor, própolis). E neste mundo de “carrapatólogos”, muitas pessoas me ajudaram e me ensinaram muito.

Na FMVZ-USP, agradeço muito ao pessoal do Laboratório de Doenças Parasitárias que me recebeu e me ensinou a lidar com carrapatos e coelhos de um jeito menos sofrido e desesperador! Muito obrigada a todos pelos momentos de discussão de artigos, de muitas risadas, de cafezinhos e viagens a congressos! Aliny Pontes, Amália Barbieri, Andréa Borges, Arlei Marcili, Carlos Prudêncio, Danilo Saraiva, Diego Ramirez, Felipe Krawczak, Fernanda Nieri, Francisco Borges, João Fabio Soares, Jonas Filho, Herbert Soares, Maria Ogrzewalska, Mariana Spolidorio, Ricardo Arrais, Tatiana Ueno e Thiago Martins, muito obrigada pela companhia! Um agradecimento muito especial à Amália, Herbert e João, que por muitas vezes me auxiliaram na manutenção das colônias dos carrapatos *A. cajennense* e *R. sanguineus* e estavam sempre solícitos a tudo. Muito obrigada aos técnicos do biotério do VPS, Pedrinho e Marcos, por auxiliar nos cuidados aos coelhos. E, também, ao técnico do Laboratório de Doenças Parasitárias, Renato, por sempre ajudar no que era preciso e por toda gentileza. E sou especialmente grata a todos os coelhos utilizados ao longo desses anos para a manutenção das colônias de carrapatos, a eles meus sentimentos de estima e carinho. Por eles os finais de semana no biotério da FMVZ-USP tornavam-se mais alegres. Aprendi muito a ter ainda mais respeito e admiração pelos animais e a ser mais humana. Também sou muito grata a todos os carrapatos, pelo simples fato de existirem e por serem tão interessantes e lindos (nunca imaginei dizer isso algum dia!!!)!

Ainda na FMVZ-USP, muito obrigada à Profa. Dra. Silvia Ricci por permitir que utilizasse os cães do canil da faculdade para coleta de sangue para realização dos experimentos de alimentação artificial de carrapatos. Muito obrigada ao funcionário do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, Geraldo, por me auxiliar incontáveis vezes na coleta de sangue. MUITÍSSIMO obrigada, aos animados e carinhosos Bono e Bili, cães do canil da FMVZ-USP, pela simpatia, sapequice e meiguice, tornando cada coleta de sangue mais amena e divertida! E por todos os mililitros de sangue cedidos para alimentar os

carrapatos do cão! Muito obrigada também à vaca Mimosa, que também me concedeu muitos mililitros de sangue para alimentar os carrapatos do boi e estrela!

No ICB-USP, Laboratório de Bioquímica e Imunologia de Artrópodes, muito obrigada à Dra. Eliane Esteves por me apresentar à Dra. Paula C. Pohl, que por sua vez me ensinou a técnica da alimentação artificial em carrapatos e sempre esteve ao meu lado para discutir dados e ensaios. Obrigada por tudo, por ser a pessoa maravilhosa que é! Por intermédio da Dra. Paula C. Pohl recebia, sempre que necessário, fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Muito obrigada ao Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr. (UFRGS), pela gentileza da disponibilidade e manutenção de colônias de carrapatos do boi, bem como por conceder alguns indivíduos de *R. sanguineus* para que pudesse iniciar e manter uma colônia do carrapato vermelho do cão no biotério da FMVZ-USP. Muito obrigada também ao Dr. Guilherme M. Klafke, que me ensinou o protocolo do teste de imersão e teste de pacote de larvas, o qual foi utilizado até o final da tese para o tratamento dos carrapatos. Muito, muito obrigada pelas conversas, trocas de boas ideias e por todo incentivo nos momentos em que não via mais sentido algum nos resultados. Muito obrigada também à Camila D. Malossi e Larissa A. Martins pelas conversas, troca de experiências e boa companhia!

Ainda no ICB-USP, conheci pessoas incríveis que também se tornaram muito queridas, Profa. Dra. Andrea Fogaça, muito obrigada por todo carinho, apoio, conversas e sugestões durante todos esses anos! E à Dra. Maria Fernanda Galletti, muito obrigada pelas inúmeras sugestões, apoio, risadas, conversas deliciosas e experiência compartilhada!

Ainda por intermédio da Profa. Dra. Andrea Fogaça conheci o Dr. Pedro Ismael da Silva Jr., do Instituto Butantã, que permitiu que utilizasse o cromatógrafo líquido preparativo de alta eficiência para auxiliar na obtenção em maior quantidade das substâncias de interesse. Muito obrigada, Pedro, pelas conversas, sugestões e colaborações. É um prazer trabalhar com você.

Tenho muito a agradecer também à Dra. Giuseppina Negri, da Unifesp, pela colaboração na identificação das substâncias, interpretação dos resultados de ressonância

magnética nuclear e infravermelho, e pelo apoio ao meu trabalho, desde o mestrado. E por toda gentileza dispendida, além de estar sempre solícita a me ajudar no que era preciso. Muitíssimo obrigada, Gina!!!!

Também não poderia deixar de aqui mencionar a Comissão Organizadora do “Botânica no Inverno” (curso de extensão universitária desenvolvido por alunos da pós-graduação em Botânica do IB-USP). Participei da organização das duas primeiras edições desse curso e, apesar das muitas dificuldades enfrentadas, muito agregou em minha vida. Entrei em contato com burocracias nunca vistas, conheci pessoas maravilhosas, tive oportunidade de ter mais contato com a docência propriamente dita e tive a certeza de que meu investimento na vida acadêmica não será em vão. Esse curso me mostrou que, apesar das muitas dificuldades enfrentadas para dar aulas, angariar verba e divulgar o curso valeu cada sorriso e cada gesto de agradecimento dos alunos de outras instituições participantes! Muito obrigada aos meus colegas de departamento, com quem criei um lindo curso, do qual me orgulho muito!!! Aline S. Nunes, Aline T. Matsumura, André C. Lima, Augusto C. Crivellari, Cairo F. Figueiredo, Beatriz N. T. Silva, Carlos E. Amancio, Cintia Iha, Débora C. C. Leite, Emmanuelle S. Costa, Giuliano M. Locosseli, Guilherme M. Q. Cruz, Gustavo B. Ferreira, Janaina M. Meyer, Jenifer C. Lopes, Jonas W. Gaiarsa, José Hernandez L. Filho, Leonardo Hamachi, Paula M. Elb e Thalita B. C. Encarnação.

Um agradecimento também especial ao Dr. Fabio Pinheiro pelas conversas encorajadoras, apoio e sugestões. O meu marido Alexandre, o Dr. Fabio e a Profa Dra. Claudia foram muito importantes para que eu decidisse fazer o estágio de 4 meses na Universidade Estadual da Carolina do Norte (Carolina do Norte, EUA). Uma experiência incrível, pessoal e profissional.

Muito obrigada ao meu orientador norte-americano Prof. Dr. R. Michael Roe por me aceitar para o estágio e me dar a oportunidade não apenas de conhecer um país e cultura diferente, mas, principalmente, por permitir que conhecesse uma outra forma de fazer pesquisa, de pensar ciência. Foi uma experiência extremamente enriquecedora. Além disso,

conheci pessoas de vários lugares do mundo e estados dos EUA: Ann, Aggrey, Charles, Dhammi, Fred, Haley, István, Jaap, Jiwei Z, Robert, Sayed, Will, dentre muitos outros, obrigada pela receptividade e ajuda. E conheci também duas outras intercambistas que se tornaram grandes amigas até hoje, Avat Shekoofa e Manal Farouk M. Abdelall. Amigas queridas que tornaram minha estadia muito mais divertida e agradável. Muito obrigada pelas conversas, passeios e muitas gargalhadas! Além de me ensinarem muito sobre seus países (Irã e Egito, respectivamente) e culturas.

E, como não poderia deixar de ser, há sempre aqueles amigos que, às vezes longe, às vezes perto, fazem toda a diferença na vida da gente. Aline T. Matsumura, Amanda B. Teixeira, Anderson Pinheiro, Andréia Z. Chinaglia, Cecília G. C. Sigali, Cintia E. Yamashita, Christian J. Schallenmüller, Cristiane Lucchesi, Eduardo Macchione, Elaine Gasparello, Fábio K. Yamazoe, Flavio G. Silva, Gilson Murata, Joana R. Costa, João Luiz C. Souza, Larissa K. Rebello, Márcia N. Franceschini, Mariana M. Rubiano, Melissa M. Miyasaki, Pedro Alves, Renato Gaspula e Rita M. B. Alves. Obrigada por tornarem minha vida mais colorida e muito mais alegre! Adoro a singularidade de cada amizade cultivada.

E como não é apenas a amizade de pessoas que faz parte da minha vida, agradeço sempre a existência das minhas duas cachorras, já falecidas, mas sempre presentes, Mel e Filó, que sempre alegraram o meu coração e despertaram em mim um amor eterno! Além de sempre ensinarem muitas coisas, amor, companheirismo, alegria e muita coragem! Também sou muito grata ao Kiko, um periquito verde que o Alexandre e eu encontramos na porta do nosso prédio com uma das pernas amputada por um fio de pipa. Foram 3 meses de reabilitação até que se sentisse forte o suficiente para voltar ao seu habitat natural! Foram poucos meses de companhia, mas de intensa alegria e ensinamentos de coragem, determinação, adaptação e anseio de liberdade!!! Muito obrigada!

E, finalmente, esta pesquisa só pode ser desenvolvida graças à toda infraestrutura do Instituto de Biociências, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – muito obrigada! Bem como pelo

apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – muitíssimo obrigada! E um agradecimento especial à empresa de produtos apícolas Pronatu Ltda. pela gentileza de disponibilizar amostras de própolis verde de Minas Gerais, e à empresa Melnor Wenzel por ceder gentilmente amostra de própolis preta do Piauí.

E, assim, eu me despeço, à la Carlos Drummond de Andrade, de uma etapa doce da minha vida, mas para sempre guardada em meu coração, “... mas as coisas findas, muito mais que lindas, essas ficarão.”

SUMÁRIO

1 Introdução	18
2 Revisão de Literatura	21
2.1 Própolis: produto e propriedades	22
2.2 Composição química e origem botânica	23
2.3 Própolis brasileiras	25
2.4 Substâncias isoladas de própolis	27
2.5 Mercado nacional e internacional de própolis verde brasileira	28
2.6 Própolis e a saúde animal	29
2.6.1 O carrapato vermelho do cão - <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	30
2.6.2 O carrapato do boi - <i>Rhipicephalus microplus</i>	30
2.6.3 O carrapato estrela - <i>Amblyomma cajennense</i>	31
2.7 Controle de carrapatos	32
2.8 Produtos naturais, fontes de novas drogas	34
3 Objetivos	36
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 Material e Métodos	38
4.1 Amostras	39
4.1.1 Preparação dos extratos	39
4.2 Carrapatos	39
4.2.1 Procedência	39
4.2.2 Manutenção das colônias	40
4.3 Bioensaios <i>in vitro</i> para avaliação da eficácia biológica	40
4.3.1 Teste de Alimentação Artificial (TAA)	40
4.3.2 Teste de de Pacote de Larvas (TPL)	41

4.4 Isolamento biomonitorado de substâncias ativas	43
4.5 Análises cromatográficas	43
4.5.1 Análises por cromatografia gasosa	43
4.5.2 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência	44
4.6 Isolamento de substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa	44
4.7 Análise estatística	45
5 Resultados	46
5.1 Teste com adultos (TAA)	47
5.2 Teste com larvas (TPL)	49
6 Discussão	92
6.1 Teste com adultos (TAA)	93
6.2 Teste com larvas (TPL)	95
7 Conclusões	105
8 Resumo	107
9 Abstract	110
10 Referências bibliográficas	113
11 Anexo I: Valores dos extratos obtidos ao longo do isolamento biomonitorado da própolis verde de Lavras (MG)	135
12 Anexo II: Estudos preliminares sobre o mecanismo de ação da subfração ativa clorofórmio : acetato de etila da própolis de Lavras (MG)	137
12.1 Material e Métodos	138
12.1.1 Carrapatos	138
12.1.2 Procedência	138
12.1.3 Manutenção da colônia	138
12.1.4 Teste de Aplicação Tópica	138
12.1.5 Teste de Injeção	140

12.2 Resultados	141
12.3 Discussão	146
12.4 Conclusão	148
12.5 Referências Bibliográficas	148

1 Introdução

Própolis refere-se a um produto apícola resinoso, formado por substâncias coletadas de plantas e outras produzidas por abelhas. Nem todas as espécies de abelhas produzem própolis da mesma forma. Colônias de *Apis dorsata*, por exemplo, utiliza própolis para reforçar a colmeia, já *Apis cerana* não a utiliza para nenhuma finalidade. *Apis mellifera* é a espécie que utiliza a própolis para as mais diversas funções dentro da colmeia (Wieckiewicz *et al.*, 2013).

A cor da própolis varia do amarelo esverdeado ao marrom escuro, dependendo da fonte de coleta e do tempo após colheita do produto (Ghisalberti, 1979). A palavra “própolis” é derivada do grego: *pro* - em defesa de, em prol de; e *polis* – cidade. Assim, *própolis* é uma substância utilizada em defesa da cidade, ou seja, da colmeia (Ghisalberti, 1979). A própolis é usada pelas abelhas melíferas para diversas finalidades: vedar aberturas, reparar as células, deixar as bordas das células mais firmes e forrar a entrada da colmeia, de modo que fique mais facilmente defensável (Ghisalberti, 1979). A própolis também é empregada para envolver invasores que foram mortos na colmeia e que não são eliminados pelo fato de serem grandes demais para que as abelhas possam transportá-los. A própolis é o principal fator mantenedor de um ambiente quase estéril na colmeia (Marcucci, 1995; Lima, 2006).

Esse produto apícola, além de ser muito importante para a colmeia, é bastante utilizado e reconhecido para o tratamento de diversos males na medicina humana em virtude do amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas associadas. E, ultimamente, vem ganhando adeptos também na medicina veterinária e zootecnia. Dentre as diversas doenças que acometem os animais domésticos pouco se sabe sobre tratamentos à base de extratos de própolis. E no que se refere aos ectoparasitas de muitos animais, não há relatos de uso de própolis para o seu controle.

Os carrapatos são artrópodes sugadores e estão distribuídos em quase todas as regiões do mundo. Ao lado dos mosquitos, são os principais vetores de doenças que

acometem homens e animais domésticos (Colwell *et al.*, 2011). Os carrapatos constituem um grupo diverso de quase 900 espécies reconhecidas (Dantas-Torres *et al.*, 2012). Pertencem à classe Arachnida, Ordem Acari e estão classificados em três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae. De acordo com Guglielmone e colaboradores (2010), os argasídeos, também conhecidos como carrapatos moles, correspondem a aproximadamente 195 espécies descritas, os ixodídeos (carrapatos duros) a 702 espécies descritas e Nuttalliellidae é composta por apenas uma espécie, *Nuttalliella namaqua*, restrita ao continente africano. Esses artrópodes parasitam um amplo espectro de animais, dentre eles o homem, o qual é hospedeiro acidental para muitas espécies de carrapatos, tal como *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato vermelho do cão) e *Amblyomma cajennense* (carrapato estrela) (Dantas-Torres *et al.*, 2012). *Rhipicephalus microplus* (carrapato do boi), apesar de não haver relatos de parasitar o homem, é um parasita de grande importância veterinária nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, causando inúmeras perdas econômicas na produção de gado (De La Fuente & Kocan, 2006).

Atualmente o controle de carrapatos ocorre pela aplicação de acaricidas comerciais, porém esses produtos apresentam eficácia reduzida em função da crescente seleção de carrapatos resistentes (De La Fuente & Kocan, 2006). Esses mesmos autores apontam ainda problemas de contaminação do ambiente e toxicidade aos animais e ao homem com o uso dos produtos. Assim, o desenvolvimento de novos recursos para o controle dessa praga é estritamente necessária.

Portanto, o estudo de própolis visando o combate de ectoparasitas de animais domésticos, tais como os carrapatos do boi, o vermelho do cão e o estrela, deve ser visto como relevante, uma vez que outras estratégias para o controle dessas pragas são de grande importância mundial, além de valorizar o mercado nacional e internacional de própolis brasileira.

2 Revisão de Literatura

2.1 Própolis: produto e propriedades

O interesse e a aceitação dos produtos apícolas têm crescido consideravelmente nos últimos vinte anos, em especial no que se refere à própolis, dada à ação terapêutica de seus compostos e sua ampla aplicabilidade. O uso da própolis pelo homem remonta à Antiguidade (300 a.C.). Os egípcios sabiam que a própolis possuía atividade anti-putrefativa e a utilizavam como um dos constituintes do preparado usado para embalsamar cadáveres. Era, também, reconhecida por suas propriedades medicinais por antigos médicos gregos e romanos, como Aristóteles, Dioscórides, Plínio e Galeno. Utilizavam-na como anti-séptico e cicatrizante no tratamento de feridas e como desinfetante bucal (Castaldo & Capasso, 2002). Soldados romanos frequentemente faziam uso de produto à base de própolis como medicamento de emergência para as feridas de guerra (Matsuno *et al.*, 1997). Além do grande reconhecimento entre a civilização do Velho Mundo, os Incas também faziam uso de própolis como agente antipirético (Castaldo & Capasso, 2002).

Entre os séculos XVII e XX, a própolis tornou-se o remédio mais popular em toda a Europa. Herbalistas recomendavam seu uso pelas propriedades bactericida, antifúngica, antiviral, hepatoprotetora e antiinflamatória, bem como para aumentar a resistência natural do corpo contra infecções (Castaldo & Capasso, 2002). Muitas atividades farmacológicas de própolis foram corroboradas ao longo dos anos e novas atividades foram descobertas: citotóxica, anti-herpes, redução de radicais livre, atividade anti-HIV (Park *et al.*, 2004), antitumoral (Díaz-Carballo *et al.*, 2008), anti-inflamatória (Naito *et al.*, 2007; Araujo *et al.*, 2012) e antimicrobiana (Lustosa *et al.*, 2008). Outros autores apontam, ainda, atividades antiprotozoários (Marcucci, 1995), hepatoprotetora (González *et al.*, 1994), regeneradora de tecidos ósseos e da polpa dos dentes (Magro Filho & Perri de Carvalho, 1990) e combate às bactérias cariogênicas (Ishida *et al.*, 2011; Wieckiewicz *et al.*, 2013).

Nos últimos 40 anos, importantes descobertas foram feitas quanto à composição química da própolis, revelando a presença de flavonoides, ácidos fenólicos, terpenoides e compostos aromáticos com alto potencial antioxidante, cicatrizante e antibiótico (Ghisalberti, 1979), aminoácidos, vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C e E e minerais como Mn, Cu, Ca, Al, Si, V, Ni, Zn e Cr, somando mais de 300 constituintes identificados (Pereira *et al.*, 2002).

Recentemente, a própolis ganhou popularidade também na indústria alimentícia e vem sendo extensivamente utilizada como suplemento alimentar. Além disso, tem sido empregada a fim de melhorar a saúde humana e prevenir doenças, tais como inflamações, problemas cardíacos, diabetes e até câncer (Banskota *et al.*, 2001). A própolis é utilizada em medicina popular e encontra-se disponível na forma de cápsulas (pura ou combinada com rosa canina ou pólen), soluções (alcoólicas ou glicólicas), como enxaguante bucal, sabonetes, shampoos, pasta dental, pomadas, além de estar presente em alguns produtos cosméticos (Castaldo & Capasso, 2002).

Entretanto, vale lembrar que a atividade biológica da própolis deve-se, sobretudo, à sua composição química, quali- e quantitativamente, cujas substâncias são derivadas de plantas. Ou seja, apesar de a própolis ser um produto animal, uma parcela considerável de seus componentes, principalmente os que conferem atividade biológica, são derivados de plantas (Salatino *et al.*, 2005). Já é sabido, também, que algumas propriedades da própolis, como antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória, estão relacionadas à presença de substâncias de baixo peso molecular (flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres) (Bonvehí & Gutiérrez, 2012).

2.2 Composição química e origem botânica

Comparada a produtos derivados de plantas medicinais, a composição da própolis é muito mais variável, de tal modo que amostras da América do Sul e da Europa, por exemplo, possuem composição química totalmente distinta. A própolis contém, em proporções variáveis, resinas vegetais, cera das abelhas, substâncias voláteis, pólen e outros

constituintes minoritários como minerais e vitaminas (Wieckiewicz *et al.*, 2013). Os principais constituintes identificados em própolis são polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres), terpenoides, esteroides e aminoácidos (Mihai *et al.*, 2012). No entanto, sabe-se que os teores de compostos fenólicos, e, indiretamente, de ceras, são afetados pela origem geográfica, fonte botânica de resinas, características climáticas da região (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006) e fatores genéticos das abelhas (Salatino *et al.*, 2011). Tudo isso, portanto, dificulta a padronização da produção de própolis (Salatino *et al.*, 2011; Sforcin & Bankova, 2011).

Os metabólitos secundários de plantas encontrados em própolis não são os mesmos para as amostras de diferentes regiões do globo terrestre. O padrão químico-geográfico dos tipos de própolis refletem a distribuição geográfica das fontes vegetais para sua elaboração (Salatino *et al.*, 2011). A própolis de choupo, geralmente encontrada na Europa, América do Norte, Ásia e Nova Zelândia, tem como principal fonte de resina espécies de *Populus*, seção Aigeiros (Salicaceae), geralmente *P. nigra*. Nesse tipo de própolis são detectados principalmente flavonas, flavononas, ácidos cinâmicos e seus ésteres (Markham *et al.*, 1996; Bankova *et al.*, 2000). A própolis vermelha é encontrada no México, em Cuba e no Brasil, cuja principal fonte botânica são espécies de *Dalbergia*, e os constituintes majoritários são isoflavonoides (isoflavanos e pterocarpanos) (Lotti *et al.*, 2010; Righi *et al.*, 2011). Há, também, em Cuba e na Venezuela outro tipo de própolis vermelha, com origem botânica distinta das supra mencionadas. Essa própolis é produzida a partir de espécies de *Clusia* e apresenta principalmente benzofenonas polipreniladas (Cuesta-Rubio *et al.*, 2002; Trusheva *et al.*, 2004). A própolis mediterrânea, encontrada na Sicília, Grécia, Creta e Malta é elaborada a partir de resinas de espécies ainda não identificadas de Cupressaceae e apresentam principalmente diterpenos do tipo labdanos (Trusheva *et al.*, 2003; Popova *et al.*, 2010). A própolis do Pacífico, encontrada em Okinawa, Taiwan e Indonésia, são predominantemente produzidas a partir de *Macaranga tanarius*, cujos constituintes majoritários são flavanonas preniladas (Kumazawa *et al.*, 2008). A própolis verde é típica do

Brasil e produzida, predominantemente, a partir de exsudatos de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). Essa própolis contém majoritariamente fenilpropanoides prenilados, ácidos cafeoilquínicos e diterpenos (Salatino *et al.*, 2005; Fernandes-Silva *et al.*, 2013; Righi *et al.*, 2013b).

2.3 Própolis brasileiras

É importante ressaltar que no Brasil não há apenas um tipo de própolis, a própolis verde. Por ser um país extenso e com ampla biodiversidade, as amostras oriundas de diferentes regiões do país apresentam composições químicas muito diferentes (Park *et al.*, 2000; Righi *et al.*, 2013b). Além disso, amostras de própolis de regiões muito próximas, ou até mesmo de um mesmo apiário, podem apresentar diferenças no seu perfil químico (Salatino *et al.*, 2011). Mesmo entre amostras classificadas como própolis verde parece haver variação gradual na proporção de substâncias derivadas da via do acetato mevalonato (terpenoides, tais como sesqui- e triterpenos) e substâncias tipicamente derivadas da via do chiquimato (ácidos fenólicos, prenilados ou não) (Teixeira *et al.*, 2010). Por exemplo, na região característica de ocorrência de propolis verde brasileira (sudeste do Brasil), há amostras que apresentam coloração bastante verde, outras verde-escuro e outras quase pretas. Geralmente, as amostras mais esverdeadas contêm altos teores de substâncias fenólicas, enquanto as demais, de cores mais escuras, contêm principalmente triterpenos (Righi *et al.*, 2013b). Essa grande variação observada deve-se a diversos fatores, tais como variação genética entre as abelhas (Bankova *et al.*, 1998; Silici & Kutluca, 2005), variação sazonal (Bankova *et al.*, 1998; Jorge *et al.*, 2008; Puker *et al.*, 2010) e disponibilidade das principais fontes de resinas (Bankova *et al.*, 1998; Teixeira *et al.*, 2010).

Recente análise do perfil químico de amostras de várias regiões do Brasil demonstrou que há própolis com predomínio de flavonoides glicosilados, com um perfil distinto dos que vêm sendo publicados (Righi *et al.*, 2013b). Segundo esses mesmos autores, a amostra de Goiás (Pirenópolis) contém, além de flavonas C-glicosiladas, flavonois

prenilados e ramnetina. Na amostra da Bahia (Cabo Verde) há também derivados do ácido cafeoilquínico; amostras do Paraná (Ponta Grossa), São Paulo (Bauru) e Minas Gerais (Lavras) apresentam, além de flavonas e derivados do ácido cafeoilquínico, muitos fenilpropanoides. E outras amostras de São Paulo (Pariquera-Açu) e Minas Gerais (Mira Bela), bem como do Piauí (Picos) contêm grandes quantidades de derivados de ácido cafeico glicosilados, e flavonoides. Também foram detectados flavonoides (quercetina, o campferol e acacetina) e triterpenos (ácido canárico, lupeol, lupenona e germanicona) em uma amostra do Ceará (Alto Santo) (Albuquerque *et al.*, 2007). Outra amostra de própolis, da região sul do país (Santa Catarina) contém grandes quantidades de flavonoides típicos de amostras produzidas a partir de espécies de *Populus*, tais como pinocembrina e galangina (Gardana *et al.*, 2007), além de fenilpropanoides e triterpenos (Fernandes-Silva *et al.*, 2012).

Dentre as amostras de própolis brasileiras duas chamaram a atenção dada às diferenças químicas observadas. A própolis de Picos (PI) tem uma composição baseada em flavonoides, sendo alguns glicosilados (quercetina-O-ramnosídeo e metoxiquercetina-O-glicosídeo), além de fenilpropanoides prenilados e triterpenoides (Righi *et al.*, 2013b). A presença, em maior quantidade, de álcoois triterpênicos e de flavonoides sugere que a principal fonte botânica dessa própolis não seja *Baccharis dracunculifolia* (principal fonte de resina para a produção da própolis verde) (Salatino *et al.*, 2005). Por outro lado, uma amostra de própolis de Lavras (MG) apresenta grande diversidade química, com predominância do ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico, além de ácidos fenólicos derivados de ácido cinâmico, nos quais o anel aromático pode estar prenilado ou substituído em diferentes posições (Abu-Mellal *et al.*, 2012). Exemplos dessas substâncias são a bacarina, a artepilina C e o éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico, os dois últimos considerados marcadores químicos de própolis verde (Matsuda & Almeida-Muradian, 2008; Nascimento *et al.*, 2008). Portanto, para essa amostra *B. dracunculifolia* (popularmente conhecido como alecrim-do-

campo, Asteraceae) provavelmente seja a principal fonte de resina dessa amostra (Righi *et al.*, 2013b).

2.4 Substâncias isoladas de própolis

A química de própolis, bem como sua atividade farmacológica, são áreas de pesquisas relativamente novas e ganharam impulso apenas na década de 1990 (Salatino *et al.*, 2011). Entretanto, um grande número de compostos foi relatado primeiramente em própolis e só posteriormente detectados nas plantas que servem de fonte botânica para elaboração de tal resina. Inúmeras substâncias presentes nas plantas despertaram interesse apenas após a avaliação de suas atividades como constituintes de própolis (Salatino *et al.*, 2011). No entanto, vale lembrar que a variação dos constituintes de própolis pode afetar enormemente sua propriedade biológica (Nakamura *et al.*, 2010). Isso demonstra, portanto, a importância do isolamento de substâncias para avaliação das atividades biológicas. Contudo, devido à grande dificuldade de isolar quantidades suficientes de substâncias para os ensaios biológicos, apenas o éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE - *cafeic acid phenethyl ester*) e a artepilina C têm sido extensivamente estudados quanto às suas atividades biológicas (Salatino *et al.*, 2011). O CAPE, presente em própolis européia, foi primeiro detectada em *Baccharis* (Asteraceae) (Bohlmann *et al.*, 1981), e tem um amplo espectro de ação biológica, antibacteriana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e imunomodulador (Omene *et al.*, 2012; Bakir *et al.*, 2013). Também já foi descrito o efeito protetor dessa substância contra o estresse oxidativo causado por diferentes agentes biológicos em órgãos como, rins, fígado, coração, pulmões e cérebro (Bakir *et al.*, 2013).

A artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), presente em própolis verde brasileira, foi primeiramente identificada em *Flourensia heterolepsis* por Bohlmann & Jakupovic (1979), mas também está presente em outros gêneros, tais como *Baccharis* (Bohlmann *et al.*, 1981) e *Relhania* (Park *et al.*, 2005). Atualmente sabe-se que plantas de

Baccharis dracunculifolia contêm grandes quantidades de artepilina C (Kumazawa *et al.*, 2003). O interesse farmacológico por tal substância surgiu apenas após a revelação de sua alta atividade antitumoral (Matsuno *et al.*, 1993). Após isso, muitas outras atividades foram constatadas, como antibacteriana (Aga *et al.*, 1994), antiviral (Kujumgiev *et al.*, 1999), antitumoral (Kimoto *et al.*, 2001), antifúngica (Feresin *et al.*, 2003), antioxidante (Kumazawa *et al.*, 2004), anti-inflamatória (Park & Kahng, 1999) e antiangiogênica (Ahn *et al.*, 2007). Recentemente, a substância em questão foi avaliada quanto ao efeito inibitório das vias do processo inflamatório (inibição de prostaglandinas e óxido nítrico) (Tani *et al.*, 2010). Esses mesmos autores, sugerem ainda que a obstrução nasal pode ser prevenida pela utilização de extrato de própolis verde brasileira. Apesar das diversas propriedades farmacológicas atribuídas à artepilina C, e extratos de própolis verde que a contêm em grande quantidade, pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação (Estrada *et al.*, 2008).

Além dessas duas substâncias bastante estudadas, outras novas são relatadas para quase todos os tipos de própolis frequentemente.

2.5 Mercado nacional e internacional de própolis verde brasileira

A própolis verde brasileira merece especial atenção dada sua preferência no mercado internacional, sobretudo pelo Japão (Resende & Borges, 2008). Dados do Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior mostram que a comercialização da própolis no exterior com selo de Minas Gerais (MG) entre janeiro e maio de 2012 movimentou cerca de US\$1.5 milhão (www.agricultura.mg.gov.br). Da produção anual de própolis verde no Estado de MG, cerca de 29 mil toneladas em 2011 (estimativa da Emater – MG), aproximadamente 13 mil toneladas foram destinadas aos países asiáticos (Japão, Malásia, Hong Kong e China). A cotação média da própolis verde de Minas Gerais no exterior é, atualmente, R\$120,00 o quilo, o produto mais valorizado do agronegócio estadual (www.agricultura.mg.gov.br). Já no mercado interno, o preço médio do quilo de própolis verde é de R\$50,00, o que corresponde ao valor de 25 quilos de mel

(www.embrapa.br). Nota-se, portanto, que apesar de o mel ser o principal produto apícola, a própolis tem ganhado maior visibilidade a cada ano, constituindo-se em uma alternativa importante de renda ao apicultor.

2.6 Própolis e a saúde animal

Além do uso de própolis para a saúde humana, esse produto apícola vem ganhando espaço cada vez maior também nos cuidados da saúde animal, por exemplo, no tratamento de dermatofitoses em novilhos (Cam *et al.*, 2009). Segundo Fisher e colaboradores (2007), o extrato etanólico de própolis verde aumenta a potência da resposta humoral em gado quando associado à vacina contra herpesvírus tipo 5. Na produção animal, a implementação de própolis na dieta de galinhas submetidas ao estresse por calor aumenta a performance e a qualidade da carcaça desses animais (Tatli Seven *et al.*, 2008). Em cordeiros, o uso de própolis como suplemento alimentar também contribui para o aumento de peso (Ítavo *et al.*, 2011).

Apesar do crescente uso em medicina veterinária, pouco se sabe sobre a atividade de própolis em vetores de doenças que acometem animais que, por vezes, podem vir a se estabelecer em humanos, como é o caso de alguns ectoparasitas, tais como o carrapato do cão (*Rhipicephalus sanguineus*), do boi (*Rhipicephalus microplus*) e o carrapato-estrela (*Amblyomma cajennense*), vetor de inúmeras doenças em humanos.

Tradicionalmente, o interesse no tratamento de carrapatos em animais domésticos está relacionado à anemia e à transmissão de agentes de zoonoses. Esses ectoparasitas retiram grandes quantidades de sangue de seu hospedeiro e o excesso de água removida é devolvido na forma de saliva, contendo substâncias farmacologicamente ativas, incluindo anticoagulantes e imunomoduladores, cuja composição varia entre as espécies de carrapatos (Rugg & Hair, 2007). Algumas espécies excretam substâncias tóxicas na saliva, bem como alguns vetores de doenças (Needham & Teel, 1991), algumas delas espécie-específicas e outras de caráter zoonótico (Dryden & Payne, 2004). Dentre as doenças

específicas de cachorros, têm-se a babesiose causada por *Babesia canis* e a erlichiose monocítica, causada por *Ehrlichia canis*, transmitidas pelos carrapatos *Dermacentor* spp. e *Rhipicephalus sanguineus*, respectivamente. Dentre as infecções zoonóticas, têm-se a doença de Lyme, causada por *Borrelia burgdorferi*, transmitida por *Ixodes* spp. e a febre maculosa, causada por *Rickettsia rickettsia* e transmitida pelo carrapato-estrela, *Amblyomma cajennense* (Dryden & Payne, 2004).

2.6.1 O carrapato vermelho do cão - *Rhipicephalus sanguineus*

Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806), um carrapato cosmopolita, é o ixodídeo de mais ampla distribuição do mundo, sendo o cão seu hospedeiro habitual (Labruna & Campos Pereira, 2001; Szabó *et al.*, 2001). *R. sanguineus* é uma espécie trioxena, isto é, necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida, uma vez que as ecdises de larva para ninfa e ninfa para adulto ocorrem no ambiente (Dantas-Torres, 2008). Fêmeas de *R. sanguineus* ingurgitadas colocam cerca de 2000 ovos e morrem logo após a oviposição. Em condições favoráveis, o ciclo de vida desses animais pode ser completado entre 63 e 91 dias (Louly *et al.*, 2007). Estudos de outros países indicam que *R. sanguineus* pode completar duas ou mais gerações em um ano (Cruz-Vázquez & Garcia-Vázquez, 1999; Uspensky & Ioffe-Uspensky, 2002). No Brasil, alguns autores sugeriram que o carrapato vermelho do cão é capaz de completar mais de quatro gerações por ano (Dantas-Torres & Figueredo, 2006; Louly *et al.*, 2007).

2.6.2 O carrapato do boi - *Rhipicephalus microplus*

O gênero *Boophilus* foi recentemente sinonimizado com *Rhipicephalus* (Horak *et al.*, 2002). *R. microplus* (Canestrini, 1887) é uma das espécies mais importantes de carrapatos que parasitam bovinos nas regiões tropical e subtropical (Grisi *et al.*, 2002; Pirali-Kheirabadi *et al.*, 2009) e representa um dos grandes problemas para a pecuária (Ferrarini *et al.*, 2008; Reck Jr. *et al.*, 2009).

Diferentemente de *R. sanguineus*, esse ectoparasita é monoxeno, isto é, exige apenas um único hospedeiro, no qual realiza todas as mudas, e desprendem-se apenas na fase adulta após completo ingurgitamento (teleóginas) (Pereira *et al.*, 2008).

A infestação por parasitas, incluindo o carrapato bovino, afeta o comportamento e a saúde dos hospedeiros de forma direta ou indireta, reduzindo a produtividade dos animais. Uma das consequências negativas da infestação por carrapatos em animais de grande porte são, além da anemia, redução na produção de leite e carne (Jonsson, 2006) e na transmissão de doenças causadas por *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. (Cafrune *et al.*, 1995; Castro-Janer *et al.*, 2009), popularmente conhecidas por tristeza parasitária bovina.

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2004) as perdas econômicas mundiais na pecuária foram estimadas em sete bilhões de dólares por ano. Somente no Brasil, esse carrapato ixodídeo infesta aproximadamente 80% da população de bovinos, sendo responsável por enormes perdas econômicas, cerca de dois bilhões de dólares por ano (Grisi *et al.*, 2002). Apenas com vistas ao tratamento desses ectoparasitas, o Brasil gasta anualmente cerca de R\$ 800 milhões de reais em produtos químicos.

2.6.3 O carrapato estrela - *Amblyomma cajennense*

O gênero *Amblyomma* apresenta ampla distribuição geográfica, abrangendo todos os continentes (exceto Europa e Antártida) e possui aproximadamente 53 espécies no Continente Americano, sendo 33 delas em território brasileiro (Onofrio *et al.*, 2006). *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), popularmente conhecida como carrapato-estrela, é originária da região neotropical, tendo sido primeiramente descrita na cidade de Cayena (Guiana Francesa) (Guglielmone *et al.*, 2006). Seu ciclo de vida trioxeno é caracterizado pela necessidade de completar seu desenvolvimento em três hospedeiros diferentes. Os hospedeiros principais desse carrapato são grandes mamíferos como equinos, capivara e anta. Entretanto, pode ser encontrada em uma grande quantidade de espécies de

mamíferos e aves (Guimarães *et al.*, 2001; Labruna, 2009). Os humanos também são alvos de todas as fases parasitárias do carrapato, podendo ser atacados por centenas de larvas, dúzias de ninfas e/ou alguns adultos, especialmente no sudeste e centro-oeste brasileiro (Cabrera & Labruna, 2009; Labruna, 2009). A baixa especificidade desse carrapato acarreta o alto nível de transmissão de agentes zoonóticos já estabelecidos no Brasil, bem como patógenos que causam zoonoses emergentes (Barros - Battesti, 1998; Ribeiro & Guimarães, 1998; De Lemos *et al.*, 2001). Assim como as demais espécies de carrapatos já citadas, os prejuízos econômicos decorrentes da presença de *A. cajennense* são inúmeros. Essa espécie destaca-se como um dos principais ectoparasitas de equídeos (Labruna *et al.*, 2002), causando danos ao animal parasitado (espoliação sanguínea, dermatites, transmissão de patógenos) e gastos excessivos com produtos acaricidas. Além disso, é o principal vetor da febre maculosa, doença severa, altamente letal, causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*. Essa doença tem sido registrada nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Galvão *et al.*, 2002).

2.7 Controle de carrapatos

Atualmente, o controle de carrapatos nos hospedeiros é realizado pela aplicação tópica (por pulverizadores manuais ou motorizados, banhos de imersão, aplicação dorsal “pour on”) ou subcutânea de produtos sintéticos (Dryden & Payne, 2004; Rust, 2005). Os produtos veterinários mais aplicados são utilizados uma vez por mês. As classes de substâncias empregadas nesse controle incluem fenil-pirazol (ex: fipronil), piretróides sintéticos (ex: permetrina e deltametrina), lactonas macrocíclicas (ex: ivermectina), benzoil-fenil urea (ex: fluazuron) e organofosforados (ex: coumafós) e amidinas (ex: amitraz) (Rust, 2005; Lees & Bowman, 2007). A maioria desses acaricidas comerciais atuam no sistema nervoso central (singânglio) ou periférico dos carrapatos (Lees & Bowman, 2007). No entanto, apesar de agirem no sistema nervoso, há diferentes mecanismos de ação associados a cada droga. Por exemplo, o sítio alvo de ação da ivermectina são os canais de

cloro dependentes de glutamato; os piretróides, por sua vez, atuam principalmente nos canais de sódio voltagem-dependentes; o amitraz tem ação nos receptores de octopamina levando à hiperexcitabilidade neuronal; o fipronil é um antagonista dos canais de cloro dos receptores gabaérgicos; os organofosforados promovem ação inibitória das acetilcolinesterases causando paralisia muscular. E, ao que se sabe, o fluazuron é a única droga que atua na cutícula dos carrapatos, na formação da quitina (Lees & Bowman, 2007).

O quadro atual do controle químico do carrapato se caracteriza pelo aumento progressivo do número de cepas resistentes aos principais acaricidas utilizados e, conseqüentemente, por um aumento na frequência da aplicação (Rust, 2005; Klafke *et al.*, 2006; Furlong *et al.*, 2007; Dantas-Torres, 2008). De acordo com Furlong e colaboradores (2007), no Brasil a maioria dos acaricidas comerciais não tem eficiência maior que 70%. Além disso, essas classes de substâncias amplamente empregadas no combate às pragas apresentam efeitos geno- e citotóxico em células humanas (Ündeger & Basaran, 2005). Isso se deve ao fato de que a degradação de acaricidas sintéticos é muito longa, permanecendo como resíduos no ambiente, além de favorecer a seleção de populações de carrapatos resistentes (Pirali-Kheirabadi & Teixeira da Silva, 2010). Vale notar que a resistência em carrapatos é definida como um aumento significativo do número de indivíduos dentro de uma população que podem tolerar doses de droga(s) que, comprovadamente, são letais à maioria dos indivíduos da mesma espécie (FAO, 2004).

Assim como em outros países, a situação de resistência de *R. microplus* aos acaricidas no Brasil é bastante séria. Já foram constatadas populações de carrapatos resistentes a organofosforados, piretróides sintéticos, amitraz, e recentemente a ivermectina e fipronil (Klafke *et al.*, 2010). Ainda não foram detectados populações resistentes a fluazuron e spinosad (Klafke *et al.*, 2010).

Nos últimos anos a FAO classificou o Brasil como o terceiro maior usuário de pesticidas do mundo, e coincidentemente, o terceiro país com maior índice de mortalidade em decorrência de câncer (Monteiro *et al.*, 2009). Dessa forma, é um problema de saúde

pública de extrema importância o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de pragas, reduzindo a aplicação de pesticidas sintéticos. Além disso, é de suma importância o desenvolvimento de estudos no que tange ao potencial das plantas para o controle de inúmeras espécies de carrapatos (Monteiro *et al.*, 2009).

Substâncias de origem vegetal ativas contra carrapatos e outros artrópodes-praga têm sido reportadas por diversos autores. Além disso, têm sido consideradas como fonte alternativa ao uso de pesticidas sintéticos (Cetin *et al.*, 2010), uma vez que apresentam inúmeras vantagens: são substâncias que apresentam baixo risco ao ambiente, com impacto mínimo, tanto à saúde animal quanto humana; são obtidas a partir de fontes renováveis e rapidamente degradáveis; o desenvolvimento de pragas resistentes é um processo lento (geralmente são compostos pela associação de várias substâncias ativas); os agropecuários podem ter acesso mais fácil aos produtos, além de não deixarem resíduos nos alimentos ou provocarem danos aos ecossistemas; e por fim, apresentam baixo custo de produção (Monteiro *et al.*, 2010).

2.8 Produtos naturais, fontes de novas drogas

Produtos naturais vêm sendo empregados em escala crescente tanto em medicina humana quanto em veterinária e zootecnia, pois podem ser eficazes contra diversos males, além de representar uma alternativa frequentemente menos tóxica. E, acima de tudo, constituem uma fonte promissora de medicamentos e novas moléculas (Victorino *et al.*, 2007). Além disso, os extratos vegetais testados para o controle de carrapatos contêm substâncias que agem em diferentes vias metabólicas. Essa variedade de mecanismos de ação pode conter o desenvolvimento de cepas resistentes (Chagas, 2004). Muitos trabalhos com extratos vegetais têm sido descritos para o controle de carrapatos de interesse econômico: óleo essencial de *Lippia triplinervis* (Verbenaceae) (Lage *et al.*, 2013), extrato foliar de *Croton sphaerogynus* (Euphorbiaceae) (Righi *et al.*, 2013a), extrato de sementes de *Azadiracta indica* (Meliaceae) (Srivastava *et al.*, 2008) e *Annona squamosa* (Annonaceae)

(Magadum *et al.*, 2009), extrato do rizoma de *Acorus calamus* (Acoraceae) (Ghosh *et al.*, 2011), óleo essencial de *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) (Ribeiro *et al.*, 2010), óleo essencial de *Calea serrata* (Asteraceae) (Ribeiro *et al.*, 2011), extrato foliar de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) (Ghosh *et al.*, 2013), dentre muitos outros.

Nos últimos anos o uso de própolis tem chamado atenção dadas às inúmeras possibilidades de ação em medicina humana e veterinária (Damiani *et al.*, 2010). Estudos recentes sobre atividade biológica de própolis em veterinária demonstraram ação contra diversos endoparasitas, tais como giardia, amebas e tripanossomas (Freitas *et al.*, 2006; Topalkara *et al.*, 2007), bem como contra parasitas de abelhas, como o ácaro *Varroa destructor* (Garedew *et al.*, 2002; Damiani *et al.*, 2010) a traça da cera *Galleria mellonella* (Garedew *et al.*, 2004) e a bactéria *Paenibacillus larvae* (Antunez *et al.*, 2008). Segundo Garedew e colaboradores (2002), o contato da solução de própolis com o ácaro enfraquece sua cutícula, tornando-a permeável às substâncias ativas presentes na própolis. No entanto, até os dias atuais não se sabe ao certo o mecanismo de ação do extrato de própolis e seus constituintes de ação acaricida.

OBJETIVOS

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades acaricidas de extratos brutos de própolis preta (Picos - PI) e própolis verde (Lavras - MG) e seus constituintes através de isolamento biomonitorado.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliação da eficácia biológica *in vitro*

- * em carrapato vermelho do cão: *Rhipicephalus sanguineus*
- * em carrapato do boi: *Rhipicephalus microplus*
- * em carrapato-estrela: *Amblyomma cajennense*

3.2.2 Obtenção de substâncias isoladas do extrato ativo contra os carrapatos

3.2.3 Identificação das substâncias isoladas

MATERIAL E MÉTODOS

4 Material e Métodos

4.1 Amostras

Foram analisadas amostras fornecidas pelos produtores de própolis Pronatu Ltda. e Melnor Wenzel Ltda. das regiões de Lavras (MG) e Picos (PI), respectivamente. Ambas as amostras foram anteriormente analisadas quanto à sua composição química (Righi, 2008).

4.1.1 Preparação dos extratos

As amostras foram congeladas em freezer a -20°C e então pulverizadas sob nitrogênio líquido com gral e pistilo, até obtenção de fino pó. As amostras trituradas foram submetidas a extrações em Soxhlet durante 6 h, com clorofórmio (Righi, 2008). Os extratos foram concentrados até a secura em rotaevaporador e divididos em duas partes: uma parte foi utilizada para os ensaios de extrato bruto *in vitro* e a outra parte foi empregada no isolamento biomonitorado.

4.2 Carrapatos

Indivíduos de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887), *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) foram utilizados para a avaliação da atividade acaricida de extratos de própolis e seus constituintes.

4.2.1 Procedência

R. microplus cepa POA: originária de Porto Alegre (RS), cepa brasileira suscetível a acaricidas. Cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Itabajara Cruz Vaz Silva Jr., do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

R. sanguineus: originária de Porto Alegre (RS). Cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Itabajara Cruz Vaz Silva Jr., do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

A. cajennense: originária de Pedreira (SP). Cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

4.2.2 Manutenção das colônias

Colônias dos carrapatos *R. sanguineus* e *A. cajennense* foram mantidas em coelhos machos adultos brancos, linhagem Nova Zelândia, no biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (FMVZ-USP), com o aval do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-USP, processo número 1815/2009.

A colônia de *R. microplus* foi mantida pela equipe do Prof. Dr. Itabajara Cruz Vaz Silva Jr., no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS) e fêmeas ingurgitadas (teleóginas) foram gentilmente enviadas à USP sempre que necessário.

4.3 Bioensaios *in vitro* para avaliação da eficácia biológica

4.3.1 Teste de Alimentação Artificial

Foi realizado o teste de alimentação artificial (TAA) seguindo o método de Abel e colaboradores (2008). 25 animais partenógenos (fêmeas adultas em fase de alimentação) foram tratados com sangue bovino (ou canino de acordo com a espécie de carrapato) e própolis a 2 mg/mL para cada extrato preparado e redissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) 1%. Os carrapatos foram então incubados à temperatura de 27 – 28°C e umidade relativa de 85 – 90%. Observações e alimentação dos animais foram realizadas diariamente (figura 1).

Figura 1: Alimentação artificial via micro-capilar de *Rhipicephalus microplus*. Foto I: início da alimentação; Foto II: após 3 horas de alimentação.

As mortalidades percentuais de cada tratamento foram determinadas por meio da contagem de adultos mortos e vivos e computadas para a determinação da eficácia dos extratos de própolis. Os animais que permaneceram vivos foram colocados para postura de ovos e foi verificada a eficiência reprodutiva e taxa de eclosão (figura 2).

Figura 2: Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* fazendo a postura de ovos após o fim da alimentação artificial.

4.3.2 Teste de Pacote de Larvas

O teste de pacote de larvas (TPL) foi realizado seguindo o método de Ducornez e colaboradores (2005), com modificações. Com o intuito de determinar a concentração de

própolis necessária para levar as larvas de carrapatos a óbito, 6 diluições seriadas de extratos de própolis foram preparadas em tricloroetileno (TCE) e azeite de oliva na proporção de 2:1. A partir de cada diluição foram utilizados 0.67 mL para impregnar papéis de filtro Whatmann nº 1 (7.5 X 8.5 cm), devidamente identificados, em triplicata. Após a completa evaporação do solvente, por 24 horas em capela, foram colocadas aproximadamente 100 larvas entre 14 e 21 dias de eclosão por papelote (figura 3).

Figura 3: Colocação de aproximadamente 100 larvas de *R. microplus* (I) por papelote impregnado (II) previamente com extrato de própolis em tricloroetileno e azeite de oliva (2:1).

Os papelotes foram fechados com grampos e mantidos em BOD à temperatura de 27 – 28°C e umidade relativa de 85 – 90% por 24 horas (figura 4).

Figura 4: Papelotes em diferentes diluições de extrato de própolis, em triplicata, com as larvas de *R. microplus* prontos para serem mantidos em BOD por 24 horas antes da avaliação final.

As mortalidades percentuais de cada tratamento foram determinadas por meio da contagem de larvas mortas e vivas e computadas para a determinação da eficácia dos extratos de própolis.

4.4 Isolamento biomonitorado de substâncias ativas

Os extratos brutos concentrados de amostras que se revelaram ativas foram depositados, por via seca, no topo de uma coluna cromatográfica de gel de sílica e foram usados como eluentes os seguintes solventes: hexano; hexano : clorofórmio (1:1); clorofórmio; clorofórmio : acetato de etila (1:1); acetato de etila; acetato de etila : metanol (1:1); metanol. As frações obtidas foram concentradas e reservadas para testes *in vitro* em carrapatos, como descrito anteriormente. As frações e subfrações que apresentaram ação expressiva foram analisadas por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ambas acopladas à espectrometria de massas (EM), de acordo com os protocolos estabelecidos para as amostras em questão por Righi (2008) e descritas abaixo. Foram feitas tentativas de levar o fracionamento e verificação de atividade até a obtenção de substâncias ativas. Além disso, foi comparada a eficácia dos constituintes das própolis com fipronil técnico ((RS)-5-amino-1-(2,6-dicloro- α - α -trifluoro-*p*-tolyl)-4-trifluor metilsulfonilpirazol-3-carbonitrila, grau técnico 96%, BASF, Paulínia, São Paulo, Brasil. Lote FET321161). As substâncias que foram obtidas em elevado grau de pureza foram analisadas também por ressonância magnética nuclear (RMN) protônica e de ^{13}C e/ou infravermelho (IV).

4.5 Análises cromatográficas

4.5.1 Análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A identificação dos constituintes em extratos, frações ativas e subfrações ativas, obtidas de coluna cromatográfica, foi feita por CG/EM por impacto de elétrons, analisando-se 1 μL dos extratos. Foi usado cromatógrafo a gás 6850 Agilent, operando no modo

splitless, equipado com coluna capilar DB5 (30 m x 0.32 mm e 0.25 µm de espessura) e acoplado a espectrômetro de massas 5975C VL MSD Agilent, operando com voltagem de ionização de 70 eV, e ionização por impacto de elétrons (Negri *et al.*, 2003). As temperaturas do injetor e do detector foram de 300°C. Foi empregado hélio como gás arraste, com um fluxo de 1.5 mL/min. A coluna foi mantida a 100°C por 1 min e então aquecida até 300°C, a 8°C/min, temperatura na qual foi mantida por 10 min. O espectrômetro de massas estava programado para detecção de 40 a 700 unidades de massa atômica. A identificação dos constituintes foi feita por comparação dos respectivos espectros de massas com espectros da biblioteca Nist 08.

4.5.2 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)

A fim de identificar a(s) substância(s) com ação acaricida presentes nas subfrações ativas, obtidas de análises em coluna cromatográfica, foram feitas análises por CLAE/EM. 5 µL das soluções metanólicas dos extratos foram analisados em equipamento DAD SPD-M10 Avp Shimadzu, dotado de detector de arranjo de fotodiodo acoplado a espectrômetro de massas Esquire 3000 Plus, Bruker Daltonics via fonte de ionização por electrospray (ESI). Os espectros de UV foram obtidos na faixa de 270 a 450 nm. Foi utilizada coluna de fase reversa C18, Zorbax – 5B - RP-18 (4.6 × 250 mm, 5 µm, Hewlett Packard). A fase móvel consistiu do eluente A (HOAc 0.1%) e do eluente B (metanol). O gradiente linear de 45-100% de B (v/v) por 55 min, sob fluxo constante de 0.5 mL/min, foi desenvolvido da seguinte forma: 0 min – 45%; 55 min – 100%.

4.6 Isolamento de substâncias por cromatografia líquida preparativa de alta eficiência

Com o intuito de coletar as substâncias majoritárias presentes na subfração ativa, foi utilizado um cromatógrafo líquido preparativo de alta eficiência do Laboratório de Química Medicinal do Instituto Butantã, em colaboração com o Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Jr. 1

mL da solução metanólica do extrato a 50.25 mg/mL foi injetado em equipamento LC-6AD Semi-Preparative System Shimadzu, dotado de detector de arranjo de fotodiodo. Foi utilizada coluna semi-preparativa de fase reversa C18, Shimadzu – Shim-pack Prep-ODS (H)Kit (20 × 250 mm, 5 µm, 100 angström). A fase móvel consistiu do eluente A (HOAc 0.1%) e do eluente B (metanol). O gradiente linear de 55-100% de B (v/v) por 65 min, sob fluxo constante de 8 mL/min, foi desenvolvido da seguinte forma: 0 min – 55%; 55 min – 100%; 60 min – 100%; 65 min – 55%.

4.7 Análise estatística

Foi feita análise estatística descritiva para obtenção de médias, desvios padrões e taxas de mortalidade. Para a análise do bioensaio de dose-resposta do extrato ativo, foi utilizado o modelo de regressão Probit segundo Finney (1980), utilizando-se o programa Polo Plus (Leora Software, 2004). Os seguintes parâmetros foram determinados: concentração letal para 50% (CL₅₀) e 95% (CL₉₅), com intervalos de confiança de 95% (IC95%) e a inclinação da linha de regressão. Para os demais bioensaios foram realizadas análises de variância ANOVA com o auxílio do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, 2009). Para avaliação da significância das taxas de mortalidade observadas para cada extrato testado em cada espécie de carrapato separadamente, foi feita a análise one-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni de comparações múltiplas. Para a comparação entre as espécies estudadas frente aos diferentes extratos foi feita a análise two-way ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas. Todos os resultados obtidos que apresentaram $p \leq 0.05$ foram considerados significantes. Os resultados foram representados pela média e desvio padrão.

RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Teste com adultos (TAA)

No teste de alimentação artificial (TAA), fêmeas dos carrapatos *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* se alimentaram através de microtúbulos capilares ao longo dos seis dias de alimentação, como pode ser verificado nas figuras 5 a 7.

Figura 5: Incremento de peso de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* após alimentação artificial com extrato clorofórmico bruto da própolis de Lavras (MG).

Figura 6: Incremento de peso de carrapatos *Rhipicephalus microplus*, após alimentação artificial com extrato clorofórmico bruto da própolis de Lavras (MG).

Figura 7: Incremento de peso de carrapatos *Amblyomma cajennense*, após alimentação artificial com extrato clorofórmico bruto da própolis de Lavras (MG).

Após a alimentação artificial com extrato clorofórmico bruto da própolis de Lavras, as dez fêmeas de carrapatos estrela e do cão testadas foram a óbito, diferentemente do constatado para as fêmeas do carrapato do boi, entre as quais apenas uma fêmea ingurgitada sobreviveu e realizou postura. Porém, essa postura apresentou ovos inférteis (figura 8), sugerindo uma ação deletéria do extrato na fecundidade da fêmea de *R. microplus*.

Figura 8: Ovos de *Rhipicephalus microplus* após bioensaio de alimentação artificial: ovos do grupo controle à esquerda e ovos do grupo tratado com extrato bruto clorofórmico da própolis de Lavras (MG) à direita.

Apesar do resultado interessante obtido com o emprego da metodologia descrita, considera-se que há limitações para a detecção de potenciais drogas acaricidas a partir de extratos de própolis. Isso dado que não se pode saber a quantidade exata de material ingerido pelos carrapatos. Cada indivíduo se alimenta de forma desigual, impossibilitando assim a padronização e, conseqüentemente, a obtenção de uma dose letal e/ou tóxica acertiva.

5.2 Teste com larvas (TPL)

O bioensaio com larvas mostrou-se bastante promissor para a avaliação da ação acaricida de própolis. Dessa forma, o isolamento biomonitorado foi inteiramente realizado com base nessa metodologia (item 4.3.2).

De início, foram realizadas 6 diluições seriadas (0; 10; 20; 40; 80 e 160 mg/mL) com o propósito de verificar em qual concentração de extrato bruto seria observada maior taxa de mortalidade (figura 9). Nesse teste, à concentração de 160 mg/mL de extrato bruto da própolis de Lavras (MG), observou-se alto índice de letalidade das larvas testadas de carrapatos do cão, do boi e do carrapato estrela (79,5%, 93% e 27,69%, respectivamente). Os valores na maior concentração são estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) e indicativos de que a própolis de Lavras (MG) apresenta em sua composição uma ou mais substâncias que tenham ação acaricida. Por outro lado, a amostra de própolis de Picos (PI) não apresentou alta taxa de mortalidade às larvas das espécies de carrapatos em estudo. Como pode ser observado na figura 10, à concentração de 160 mg/mL o índice de letalidade foi de 3,61%, 3,51% e 1,12%, para *R. sanguineus*, *R. microplus* e *A. cajennense*, respectivamente, semelhante ao controle ($p > 0,05$).

Figura 9: Teste de pacote de larvas com extrato clorofórmico bruto da própolis de Lavras (MG) em *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense*. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($* p \leq 0,05$).

Após os testes com os extratos brutos, a avaliação biomonitorada da atividade acaricida foi prosseguida apenas com a própolis verde de Lavras (MG), que apresentou ação significativa. O extrato bruto dessa amostra, portanto, foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica e as sete frações obtidas foram testadas à concentração de 160 mg/mL com larvas das três espécies de carrapatos propostas nesse estudo. Observou-se que, para todas as espécies, a maior taxa de mortalidade das larvas ocorreu com a fração acetato de etila (figura 11). Além disso, nota-se que *R. sanguineus* é a espécie menos suscetível à ação dos extratos de própolis. Já *A. cajennense* também apresentou taxa de mortalidade significativa frente à fração clorofórmio : acetato de etila, assim como *R.*

microplus, que se mostrou suscetível aos extratos da fração clorofórmio, clorofórmio : acetato de etila e acetato de etila : metanol.

Figura 10: Teste de pacote de larvas com extrato clorofórmico bruto da própolis de Picos (PI) em *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense*. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($* p \leq 0,05$).

Figura 11: Teste de pacote de larvas com *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* frente às sete frações obtidas em coluna de sílica da própolis de Lavras (MG), a 160 mg/mL. Da esquerda para a direita: controle; fração hexânica; fração hexano clorofórmio; fração clorofórmica; fração clorofórmio acetato de etila; fração acetato de etila; fração acetato de etila metanol; fração metanólica. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p \leq 0,05$).

A fração acetato de etila, ativa contra todas as espécies, foi submetida à análise por CG-EM (figura 12). Os componentes foram identificados por meio dos padrões de fragmentação e comparação com espectros da literatura. Dados de tempo de retenção, quantidade relativa e espectrometria de massas estão na tabela 1.

Figura 12: Cromatograma obtido por CG-EM da fração acetato de etila da própolis de Lavras (MG).

De acordo com o cromatograma apresentado (figura 12), nota-se que as substâncias predominantes na fração de acetato de etila são: (1) 2-prenil-4-vinil fenol, (5) ácido 2,2-dimetil-cromeno-6-propenoico, (6) éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico e (10) éster *n*-nonadeceno-metil-metoxibenzeno.

Tabela 1: Constituintes identificados por CG-EM da fração de acetato de etila da própolis de Lavras (MG).

Pico	Tempo de Retenção (min)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
1	8.015	206 (55), 133 (100), 188 (55), 77 (13.1), 115 (13), 132 (11.8), 131 (11.2), 145 (10.9), 103 (9.9), 134 (9.9), 104 (9.7)	2-prenil-4-vinil fenol
2	11.761	230 (100), 91 (88.3), 145 (84.7), 115 (82.9), 175 (79.2), 69 (79.1), 77 (65.3), 55 (64), 201 (51.8), 117 (50.6)	deidrocostus lactona
3	11.962	256 (12), 73 (100), 60 (84.7), 55 (76.2), 57 (68.1), 69 (53), 71 (38.6), 129 (37.4), 83 (29.1), 85 (26.2), 97 (24.1)	ácido palmítico
4	12.203	256 (25), 73 (100), 60 (85.1), 55 (74.8), 57 (74.8), 149 (67.8), 71 (52.5), 69 (48.7), 129 (40.8), 83 (26.5), 85 (26.4)	não identificado
5	12.665	230 (12), 215 (100), 55 (20.6), 69 (17.1), 115 (15.4), 216 (14.6), 91 (14.3), 73 (13.0), 57 (12.9), 77 (12.5), 230 (12.0)	ácido 2,2-dimetil-cromeno-6-propenoico
6	12.796	256 (61.7), 145 (100), 185 (97.3), 201 (83.3), 256 (61.7), 157 (52.8), 115 (37.4), 69 (28.6), 91 (27.7), 128 (26.1), 77 (17.5)	éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico
7	15.568	259.1 (31.3), 185 (100), 129 (69.1), 57 (34.1), 259 (31.3), 157 (17.6), 139 (11.9), 186 (10.2), 56 (9.8), 111 (9.7), 112 (9.5)	éster etílico do ácido 2,2-dimetil-cromano-6-propenoico
8	22.628	416 (25), 151 (100), 416 (21.0), 150 (20.6), 191 (16.1), 152 (15.2), 55 (13.9), 57 (11.6), 69 (9.4), 107 (6.9), 417 (6.9)	estigmastanol
9	22.869	396 (30), 81 (100), 147 (99.7), 91 (86.5), 55 (80.6), 105 (79.9), 145 (70.5), 107 (61.1), 57 (60.1), 79 (57.8), 95 (57.6)	ergosterol
10	23.281	430 (30), 165 (100), 164 (31.2), 430 (30.2), 55 (14.7), 57 (12.2), 207 (11.9), 166 (11.3), 69 (10.5), 205 (10.2), 91 (9.3)	metil estigmastanol
11	24.586	414 (25), 55 (100), 81 (94.3), 105 (85.2), 57 (84.0), 95 (82.8), 107 (81.7), 145 (79.2), 91 (77.8), 69 (75.2), 79 (69.2)	β -sitosterol

A fim de continuar com o isolamento biomonitorado da própolis de Lavras, a fração acetato de etila foi submetida a novo fracionamento em coluna cromatográfica. Foram separados cinco novas subfrações com os seguintes solventes: clorofórmio, clorofórmio : acetato de etila (1:1), acetato de etila, acetato de etila : metanol (1:1) e metanol. Cada subfração foi testada por TPL, à concentração de 20 mg/mL, com as três espécies de carrapatos (figura 13).

Figura 13: Teste de pacote de larvas com *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* com as cinco subfrações obtidas em coluna de sílica da fração de acetato de etila da própolis de Lavras (MG), a 20 mg/mL. Da esquerda para a direita: controle, subfração clorofórmica, subfração clorofórmio : acetato de etila, subfração acetato de etila, subfração acetato de etila : metanol e subfração metanólica. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p \leq 0,05$).

Os valores relacionados à subfração clorofórmica não estão apresentados na figura acima para o TPL com *R. sanguineus* pois não havia extrato suficiente para a realização do bioensaio.

Os novos bioensaios realizados demonstraram que a subfração clorofórmio : acetato de etila apresentou atividade significativa (taxa de mortalidade de 18,96% e 78,83%) contra duas das espécies avaliadas (*R. sanguineus* e *R. microplus*, respectivamente). Além disso,

R. microplus também demonstrou ser suscetível à ação da subfração acetato de etila (10,78% de mortalidade).

Apesar do amplo espectro de dados relativos à ação acaricida de extratos vegetais, poucos relatam informações a cerca da sua composição química. Dessa forma, é difícil avaliar a eficiência dos compostos ativos naturais para o controle de carrapatos. Com o intuito de contribuir para tal conhecimento, a subfração clorofórmio : acetato de etila foi submetida à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas a fim de determinar seus componentes (figura 14). Dados de tempo de retenção, quantidade relativa e massas estão dispostos na tabela 2.

Figura 14: Cromatograma obtido por CG-EM da subfração clorofórmio : acetato de etila da fração de acetato de etila da própolis de Lavras (MG): (1) 2-prenil 4-vinil fenol, (2) éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico.

Tabela 2: Constituintes identificados por CG-EM da subfração clorofórmio : acetato de etila da fração de acetato de etila da própolis de Lavras (MG).

Pico	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	Íon Molecular	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
1	7,905	32,004	206 (56.4)	133 (100), 188 (56.4), 77 (13.4), 115 (13), 132 (12.6), 131 (11.6), 145 (10.5), 103 (10.4), 134 (9.6), 104 (10.4)	2-prenil-4-vinil fenol
2	12,694	37,524	256 (71.9)	185 (100), 145 (96), 201 (86.8), 256 (71.9), 157 (54.9), 115 (36.2), 69 (23.3), 91 (24.1), 128 (24.9), 77 (17.5)	éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico

Os dados obtidos sugerem que, talvez, o éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico e/ou o 2-prenil-4-vinil fenol sejam as substâncias ativas que confirmam ação acaricida ao extrato de própolis verde obtido. Assim, novas colunas foram desenvolvidas com a finalidade de isolar essas duas substâncias majoritárias.

Nas figuras 15 e 16 é possível observar os cromatogramas obtidos por CG-EM nos quais obteve-se o 2-prenil-4-vinil fenol e o éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico, ambos em elevado grau de pureza, respectivamente.

Figura 15: Cromatograma obtido por CG-EM da subfração da própolis de Lavras (MG) com o 2-prenil-4-vinil fenol em elevado grau de pureza.

Figura 16: Cromatograma obtido por CG-EM da subfração da própolis de Lavras (MG) com o éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico em elevado grau de pureza.

Com o intuito de reforçar as identificações proposta ambas amostras foram submetidas à análise por infravermelho. Na figura 17, observa-se uma banda em 3427.91 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo hidroxila do fenol; a banda em $2926.57 - 2853.49\text{ cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento C-H do grupo prenil e vinila; a banda em $1636.45 - 1601.39 - 1549.9 - \text{cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento C-H do grupo fenil; e a banda em $1387.23 - 1266.3\text{ cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-O do fenol. As análises, portanto, são consistentes com a proposta da identificação de 2-prenil-4-vinil fenol (figura 18).

Figura 17: Espectro de infravermelho do 2-prenil-4-vinil fenol isolado da própolis de Lavras (MG).

Figura 18: Estrutura do 2-prenil-4-vinil fenol.

Na figura 19, observa-se uma banda em $2920.1 - 2850.1 \text{ cm}^{-1}$, correspondente ao estiramento C-H do grupo prenila e alila; a banda em 1696.21 cm^{-1} corresponde ao grupo carbonila conjugado com dupla ligação; a banda em $1601.63 - 1464.64 \text{ cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento C-H do grupo fenil; e a banda em $1269.64 - 1178.44 \text{ cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento simétrico e assimétrico de uma ligação éster C-O. Dessa forma, os dados de espectroscopia de infravermelho são consistentes com a proposta de identificação do éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico (figura 20).

Figura 19: Espectro de infravermelho do éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico isolado da própolis de Lavras (MG).

Figura 20: Estrutura do éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico.

Com a finalidade de avaliar o efeito dos compostos isolados, foram realizados novos TPLs com a espécie que se mostrou mais suscetível dentre as avaliadas, *R. microplus*. Os testes foram desenvolvidos em concentrações crescentes, na tentativa de obter uma curva dose-resposta: 0,0 mg/mL; 1,25 mg/mL; 2,5 mg/mL; 5 mg/mL; 10 mg/mL e 20 mg/mL (figura 21).

Figura 21: Teste de pacote de larvas com *Rhipicephalus microplus* utilizando concentrações crescentes (1,25 mg/mL a 20 mg/mL), da subfração do éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico e do 2-prenil-4-vinil fenol, ambos isolados da própolis de Lavras (MG).

As larvas de *R. microplus* não apresentaram alta taxa de mortalidade com o uso dos compostos isolados ($p > 0,05$). Nos testes com o éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico verificou-se leve aumento da taxa de mortalidade (de 5,37% a 10,97%). Já nos testes com o 2-prenil-4-vinil fenol, as taxas de mortalidade decresceram com o aumento da concentração (de 9,26% a 4,89%). No entanto, os dados comportamentais obtidos em ambos os testes demonstraram que os carrapatos demoraram para se locomover, bem como estavam descoordenados, embora vivos. A baixa taxa de mortalidade aliada às observações comportamentais, indicaram um provável estado de intoxicação dos animais levando-se à hipótese de que a ação acaricida do extrato de própolis estaria relacionada ao sinergismo entre o éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico e o 2-prenil-4-vinil fenol. De forma a avaliar essa nova premissa, novo TPL foi realizado com a subfração na qual as duas substâncias estavam presentes em altas proporções (figuras 22 e 23).

Figura 22: Cromatograma obtido por CG-EM da subfração da própolis de Lavras (MG) contendo o 2-prenil-4-vinil fenol (1) e o éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico (2).

Figura 23: Testes de pacote de larvas com *Rhipicephalus microplus* utilizando concentrações crescentes (1,25 mg/mL a 20 mg/mL) da subfração contendo o éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico e o 2-prenil-4-vinil fenol.

Novamente, o TPL com a fração que contém as duas substâncias não apresentou ação acaricida significativa ($p > 0,05$) (de 3,49% a 7,74% de mortalidade; figura 23). A partir desses resultados uma nova hipótese foi levantada: o componente ativo do extrato da

própolis de Lavras não é volátil e análises por cromatografia líquida de alta eficiência devem ser empregadas para prosseguir com o isolamento biomonitorado.

Assim sendo, a subfração ativa clorofórmio : acetato de etila foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, a fim de verificar o perfil químico e comparar com as outras frações obtidas das colunas cromatográficas subsequentes (figura 24). A análise indicou que os picos mais abundantes correspondiam a misturas de substâncias. Assim, são apresentados cromatogramas para fins de comparação dos tempos de retenção até a fase em que se obteve um produto com grau suficiente de pureza para a identificação química por CLAE-EM. Os picos assinalados com números referem-se às substâncias que foram detectadas em quase todas as frações e subfrações ativas, como poderá ser observado ao longo do presente trabalho.

Figura 24: Análise por cromatografia líquida analítica de alta eficiência da subfração ativa clorofórmio : acetato de etila da própolis de Lavras (MG).

Buscando finalizar o isolamento da(s) substância(s) ativa(s) contra carrapatos, novas colunas cromatográficas foram desenvolvidas a partir do extrato clorofórmico bruto de modo

que até o fim do isolamento biomonitorado houvesse quantidade suficiente de material para as análises por CLAE e para os novos bioensaios com as três espécies em estudo.

Foram obtidas sete novas frações da própolis de Lavras. Das sete frações cinco foram objeto de ensaios por TPLs a concentração de 160 mg/mL com larvas de *R. sanguineus*, *R. microplus* e *A. cajennense*. Observou-se que para as espécies *R. microplus* e *A. cajennense* a maior taxa de mortalidade das larvas ocorreu com a fração metanólica, 73,3% e 18,67%, respectivamente (figura 25). Nos ensaios com *R. sanguineus*, as diferenças observadas entre as frações (clorofórmio : acetato de etila 4,83%; acetato de etila 1,09%; acetato de etila : metanol 0,43%; metanólica 2,04%) não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Os resultados revelaram baixa taxa de mortalidade e eficácia dos extratos contra o carrapato vermelho do cão. As frações hexano e hexano : clorofórmio não foram avaliadas, pois continham praticamente apenas ácidos graxos; ao se remover toda a cera não restou material suficiente para os testes na concentração previamente estabelecida.

Figura 25: Testes de pacote de larvas com *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* com as novas cinco frações obtidas em coluna de gel de sílica da própolis de Lavras (MG), a 160 mg/mL. Da esquerda para direita: controle; fração clorofórmica; fração clorofórmio : acetato de etila; fração acetato de etila; fração acetato de etila : metanol; fração metanólica. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p \leq 0,05$).

A fração metanólica foi submetida à análise por cromatografia líquida analítica de alta eficiência (figura 26). Nota-se que os constituintes majoritários dessa fração têm seus tempos de retenção correspondentes aos da subfração ativa clorofórmio : acetato de etila previamente analisada e testada (figura 24).

Figura 26: Análise por cromatografia líquida analítica de alta eficiência da fração ativa metanólica da própolis de Lavras (MG).

Por conseguinte, novo fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica foi desenvolvido. A partir da fração metanólica, foram obtidas cinco subfrações com os seguintes solventes: clorofórmio, clorofórmio : acetato de etila (1:1), acetato de etila, acetato de etila : metanol (1:1) e metanol. Cada subfração foi novamente testada por TPL, à concentração de 20 mg/mL, com *R. microplus* e *A. cajennense* (figura 27). Larvas de *R. sanguineus* não foram avaliadas nesse bioensaio, uma vez que não demonstraram ser suscetíveis aos extratos prévios.

Figura 27: Testes de pacote de larvas com *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma cajennense* com as cinco subfrações obtidas em coluna de gel de sílica da fração metanólica da própolis de Lavras (MG), a 20 mg/mL. Da esquerda para direita: controle, subfração clorofórmica, subfração clorofórmio : acetato de etila, subfração acetato de etila, subfração acetato de etila : metanol e subfração metanólica. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Os bioensaios realizados com as subfrações da fração metanólica demonstraram que a subfração acetato de etila : metanol (23,5%) e a subfração metanólica (12,3%) conferiram as maiores taxas de mortalidade para *R. microplus*. No entanto, apenas a subfração acetato de etila : metanol conferiu mortalidade significativa às larvas do carrapato do boi ($p \leq 0,05$). Já as larvas de *A. cajennense* demonstraram maior resistência a essas subfrações, com apenas 6,74% e 4,88% de mortalidade, respectivamente, apresentando taxa de mortalidade significativa frente à subfração clorofórmica (18,05%). Vale ressaltar que as análises por CLAE analítico das subfrações avaliadas (figura 28) apresentaram

algumas substâncias em comum, porém em proporções diferentes. Tal é o caso observado para os constituintes assinalados com os número 1, 3, 5, 6 e 7.

Figura 28: Análise por cromatografia líquida analítica de alta eficiência das subfrações clorofórmica, clorofórmio : acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila : metanol e metanólica, obtidas da fração ativa metanólica da própolis de Lavras (MG).

As duas subfrações mais ativas (subfração acetato de etila : metanol e subfração metanólica) foram, então, submetidas a nova separação em coluna cromatográfica com os mesmos sistema de solventes empregado anteriormente (clorofórmio, clorofórmio : acetato de etila 1:1, acetato de etila, acetato de etila : metanol 1:1 e metanol). Novos bioensaios foram conduzidos (figuras 29 e 30).

Figura 29: Testes de pacote de larvas com *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* com as cinco subfrações obtidas em coluna de gel de sílica da subfração acetato de etila : metanol da própolis de Lavras (MG), a 20 mg/mL: controle, sub-AM1 clorofórmio, sub-AM2 clorofórmio :acetato de etila, sub-AM3 acetato de etila, sub-AM4 acetato de etila : metanol e sub-AM5 metanol. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p \leq 0,05$).

Figura 30: Testes de pacote de larvas com *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* com as cinco subfrações obtidas em coluna de gel de sílica da subfração metanólica da própolis de Lavras (MG), a 20 mg/mL: controle, sub-1 clorofórmio, sub-2 clorofórmio : acetato de etila, sub-3 acetato de etila, sub-4 acetato de etila : metanol e sub-5 metanol. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p \leq 0,05$).

Os resultados dos bioensaios com as subfrações AM-1 a AM-5 (da subfração acetato de etila : metanol) apresentaram baixa taxa de mortalidade ($p > 0,05$) para as larvas de carrapatos (9,33% a 16,94% para *R. microplus* e 1,63% a 5,99% para *A. cajennense*) (figura 29). Já as subfrações 1 a 5 (da subfração metanólica) apresentaram maior variação nas taxas de mortalidade, 0,44% a 4,76% para *R. sanguineus*, 12,72 a 83,07% para *R. microplus* e 1,81% a 22,49% para *A. cajennense* (figura 30). Dentre estas subfrações obtidas, a maior atividade acaricida obtida, com valores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) para duas das espécies em estudo corresponde à sub-4 acetato de etila : metanol

(83,07% para *R. microplus* e 21,77% para *A. cajennense*). As análises por CLAE analítico das subfrações testadas (figuras 31 e 32) indicaram novamente que os constituintes de número 1, 3, 5, 6 e 7 estão presentes, em diferentes proporções, tanto na sub-3 acetato de etila (2,08%, 33,49% e 22,49% de mortalidade em *R. sanguineus*, *R. microplus* e *A. cajennense*, respectivamente) quanto na sub-4 acetato de etila : metanol (4,76%, 83,07% e 21,77% de mortalidade em *R. sanguineus*, *R. microplus* e *A. cajennense*, respectivamente). Vale ressaltar que mesmo nas subfrações AM-1 a AM-5, que não apresentaram atividade significativa, esses mesmos constituintes foram detectados (figuras 31).

Figura 31: Análise por cromatografia líquida analítica de alta eficiência das subfrações AM-1, AM-2, AM-3, AM-4 e AM-5 obtidas da subfração acetato de etila : metanol da própolis de Lavras (MG).

Figura 32: Análise por cromatografia líquida analítica de alta eficiência das subfrações sub-1, sub-2, sub-3, sub-4 e sub-5 obtidas da subfração metanólica da própolis de Lavras (MG).

A sub-4 acetato de etila : metanol foi submetida a novo fracionamento em coluna cromatográfica. Outras cinco subfrações foram obtidas com os mesmos solventes previamente mencionados (A-clorofórmio, B-clorofórmio : acetato de etila 1:1, C-acetato de etila, D-acetato de etila : metanol 1:1 e E-metanol). Novos bioensaios foram feitos com as sub-B, sub-C e sub-D, uma vez que as sub-A e sub-E não tinham material suficiente para a realização dos testes (figura 33).

Figura 33: Testes de pacote de larvas com *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* com as três subfrações obtidas em coluna de gel de sílica da sub-4 acetato de etila : metanol da própolis de Lavras (MG), a 20 mg/mL: controle, sub-B clorofórmio : acetato de etila, sub-C acetato de etila, sub-D acetato de etila : metanol. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p \leq 0,05$).

Como pode ser observado na figura 33 a sub-B apresentou 4,97%, 45,97% e 20,88% de atividade contra *R. sanguineus*, *R. microplus* e *A. cajennense*, respectivamente. A sub-C apresentou 34,92%, 99,51% e 34,37% de atividade contra *R. sanguineus*, *R. microplus* e *A. cajennense*, respectivamente. Por outro lado, a sub-D apresentou taxa de mortalidade de apenas 1,97%, 4,92% e 4,14% para *R. sanguineus*, *R. microplus* e *A. cajennense*, respectivamente. É interessante notar que as sub-B e sub-C apresentam perfis químico semelhantes (figuras 34), a não ser pelas proporções dos constituintes majoritários

(constituintes número 1, 3, 5, 6 e 7). No entanto, as larvas das três espécies de carrapatos apresentaram taxa de mortalidade significativa apenas frente ao extrato da sub-C.

Figura 34: Análise por cromatografia líquida analítica de alta eficiência da sub-A, sub-B, sub-C, sub-D e sub-E obtidas da sub-4 acetato de etila : metanol da própolis de Lavras (MG).

Dando continuidade ao isolamento biomonitorado, a sub-C acetato de etila foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica com o mesmo sistema de solventes

(C1-clorofórmio, C2-clorofórmio : acetato de etila 1:1, C3-acetato de etila, C4-acetato de etila : metanol 1:1 e C5-metanol). Com os extratos das subfrações sub-C2, sub-C3 e sub-C4, obtidos em maior quantidade, foram realizados novos bioensaios apenas com a espécie de carrapato mais suscetível aos extratos até então testados, *R. microplus* (figura 35).

Figura 35: Testes de pacote de larvas com *Rhipicephalus microplus* com as três subfrações obtidas em coluna de gel de sílica da sub-C acetato de etila da própolis de Lavras (MG), a 20 mg/mL: controle, sub-C2 clorofórmio : acetato de etila, sub-C3 acetato de etila, sub-C4 acetato de etila : metanol. O asterisco indica diferença significativa (* $p \leq 0,05$).

A sub-C2 e a sub-C3 apresentaram altas taxas de mortalidade para *R. microplus*, 99,51% e 97,19%, respectivamente ($p \leq 0,05$). Novamente, ambas subfrações apresentaram perfis cromatográficos semelhantes (figura 36), sugerindo que a substância ativa esteja dentre os compostos comuns às duas subfrações (constituintes números 1, 2, 3, 4, 5, 6 e/ou 7; tabela 3).

Figura 36: Análise por cromatografia líquida analítica de alta eficiência das sub-C2, sub-C3 e sub-C4 obtidas da sub-C acetato de etila da própolis de Lavras (MG).

Tabela 3: Dados de tempo de retenção, espectro de UV-visível, espectrometria de massas (m/z) e identificação proposta de constituintes da sub-C2 clorofórmio : acetato de etila da própolis de Lavras (MG), submetida à análise por CLAE-EM.

Pico	Tempo de retenção (min)	UV (nm)	$[M - H]^-$	MS/MS	Estrutura proposta
1	30.366	ND	745	699.5, 653.2, 641.1	ácido 4-hidroxi-3-prenil cafeoil cinâmico diglucoronídeo
2	31.847	ND	335	ND	ácido 3-metil cinamoil quínico
3	34.139	268, 314, 332 sh	733.8	480.8	ácido 2,2-dimetil cromeno-6-propenoico dicafeoil glucosídeo
4	39.271	314	315.1	ND	ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil cromeno-8-prenil-6-propenoico
5	44.241	314	298.6	ND	ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilina C)
6	48.864	282	363	187	ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxi cinâmico (bacarina)
7	50.568	270, 320	617	297.1	ácido 2,2-dimetil cromeno-8-prenil-6-propenoico

ND = não determinado

Após cinco fracionamentos sucessivos em coluna cromatográfica de gel de sílica (figura 37) e subsequentes bioensaios, a subfração ativa sub-C3 acetato de etila (obtida em

maior quantidade) foi utilizada para a construção de uma curva dose-resposta frente às larvas de *R. microplus* (figura 38). A concentração letal para matar 50% das larvas de carrapatos do boi (CL₅₀) é de 9,9 mg/mL de extrato da sub-C3, e 17,8 mg/mL para a CL₉₅.

Figura 37: Fluxograma do fracionamento sucessivo (I-V) ao qual foi submetido o extrato clorofórmico bruto da própolis de Lavras (MG) para o isolamento biomonitorado referente à atividade acaricida contra *R. microplus*, *R. sanguineus* e *A. cajennense*. Os retângulos coloridos referem-se aos extratos mais ativos, a partir dos quais o fracionamento foi desenvolvido até obtenção das substâncias I - IV isoladas por CLAE preparativo.

Figura 38: Efeito acaricida contra *Rhipicephalus microplus*, determinado pelo teste de pacote de larvas com a sub-C3 acetato de etila, obtida da própolis de Lavras (MG), em concentrações crescentes.

Com base nos dados obtidos, e nas análises cromatográficas desenvolvidas, concluiu-se que as substâncias correspondentes aos picos majoritários das últimas subfrações ativas (sub-C2 clorofórmio : acetato de etila e sub-C3 acetato de etila) seriam responsáveis pelo efeito acaricida do extrato de própolis de Lavras. Assim, com o intuito de finalizar o isolamento, as subfrações ativas foram submetidas à cromatografia líquida preparativa de alta eficiência para isolar as substâncias 3, 5, 6 e 7 (tabela 3). A substância majoritária (número 3 – agora denominada substância I) foi obtida em maior quantidade e foi possível desenvolver análises correntes em química de produtos naturais para elucidação estrutural.

A substância I (figura 39) isolada foi identificada por dados de espectrometria de massas, espectro de ultravioleta (UV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . No espectro de UV (figura 40) a substância apresentou absorção máxima em 314 nm, sugerindo tratar-se de um derivado do ácido cinâmico. No espectro de massas obtido por ESI-MS, a molécula deprotonada apresentou $[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z – 732.8 e sua posterior

fragmentação por ESI-MS/MS gerou fragmentos em m/z 480.8, m/z 228.9 e m/z 185.1 (figura 41). Os fragmentos m/z 228.9 e m/z 185.1 sugerem que a substância tenha um grupo carboxila em sua estrutura. O fragmento em m/z 480.8 e a molécula deprotonada em $[M - H]^-$ m/z 732.8 sugerem a presença de duas moléculas do ácido cafeico e uma de glicose como substituintes, provavelmente ligados à carboxila. Os dados são consistentes com a estrutura do ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenoico dicafeoil glucosídeo.

Figura 39: Estrutura da substância I, sugerida como ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenoico dicafeoil glucosídeo.

Figura 40: Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro de UV-visível da substância proposta como ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenoico dicafeoil glucosídeo (substância I).

Figura 41: Análise por infusão direta massa/massa da substância proposta como ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenoico dicafeoil glucosídeo (substância I).

No espectro de infravermelho obtido (figura 42), observa-se uma banda em 3653 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo hidroxila da glucose, sendo que o grupo hidroxila do ácido 2,2-dimetil cromeno-6-propenoico não aparece em função da presença dos substituintes ácido cafeico e glucose; a banda em 2972 cm^{-1} corresponde ao estiramento das ligações C-H dos grupos metilas; a banda em 1636 cm^{-1} corresponde ao estiramento das carbonilas conjugadas (C=C- CO) dos derivados do ácido cinâmico (ácido cafeico e do 2,2-dimetil cromeno-6-propenoico); as bandas em 1604 , 1557 e 1468 cm^{-1} correspondem ao estiramento das ligações (C=C-) do anel benzênico e das duplas ligações; as bandas em

1412 e 1364 cm^{-1} correspondem à vibração das ligações C-H dos grupos metilas da glucose; as bandas em 1265, 1206, 1156 e 1128 cm^{-1} correspondem ao estiramento da ligação C-O; a banda em 833 cm^{-1} corresponde ao estiramento do anel aromático. Todos os dados são coerentes ao ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenoico dicafeoil glucosídeo.

Figura 42: Espectro de infravermelho da substância proposta como ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenoico glicosídeo dicafeoil glucosídeo (substância I).

No espectro de RMN ^1H da substância I (figura 43), os principais deslocamentos químicos dos prótons foram observados em δ 1,3 e 1,4 ppm, atribuídos aos dois grupos metilas na posição 2 do anel. Os prótons da porção fenilpropanóide na posição 6 foram observados em δ 6,2 e 7,89 ppm. A presença do ácido cafeico como um dos substituintes foi detectada nos deslocamentos químicos dos prótons do anel benzênico em δ 7,1 – 7,3 ppm e também através dos deslocamentos químicos dos prótons atribuídos à porção fenilpropanóide do ácido cafeico em δ 6,2 e 7,4 ppm. A presença da glucose como substituinte foi detectada principalmente pelos deslocamentos químicos dos prótons encontrados entre δ 3,31 e 5,38 ppm.

Figura 43: Análise por RMN protônica da substância I, proposta como ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenoico dicafeoil glucosídeo.

No espectro de RMN ^{13}C da substância I (figura 44), os principais deslocamentos químicos dos átomos de carbono do ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenoico foram observados em δ 28,38 e 28,47 ppm, atribuídos aos dois grupos metilas na posição 2 do anel. Os átomos de carbono da porção fenilpropanoide na posição 6, foram observados em δ 117,60 e 154,0 ppm. A presença do ácido cafeico como um dos substituintes foi detectado nos deslocamentos químicos dos átomos de carbono do anel benzênico em δ 117,60 – 155.4 ppm, bem como através dos deslocamentos químicos dos prótons atribuídos à porção fenilpropanoide do ácido cafeico em δ 116,84 e 132,47 ppm. A presença da glicose como

substituente foi detectada principalmente pelos deslocamentos químicos dos átomos de carbono entre δ 71,49 e 77,93 ppm. A presença da carbonila é indicada em δ 180,1 ppm.

Figura 44: Análise por RMN de carbono 13 da substância I, proposta como ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenoico dicafeoil glucosídeo.

A substância de número 5 (agora denominada por substância II), sugerida como sendo o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilina C) (figura 45), foi identificada com base em espectrometria de massas, UV e infravermelho. No espectro de UV (figura 46) a absorvância máxima em 314 nm indica um derivado de ácido cinâmico. No espectro de massas obtido por ESI-MS (figura 47) a molécula deprotonada foi detectada em $[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z – 299.1.

Figura 45: Estrutura da substância II, proposta como ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilina C).

Figura 46: Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro de UV-visível da substância II, proposta como ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilina C).

Figura 47: Espectro de massas obtido por CLAE-EM da substância II, proposta como ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilina C).

Na análise por infravermelho da substância II (figura 48), a banda em 3447 cm^{-1} corresponde ao estiramento do grupo hidroxila da carboxila; as bandas em $2924 - 2863\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento das ligações C-H dos grupos prenilas; a banda em 1636 cm^{-1} corresponde ao estiramento das carbonilas conjugadas (C=C- CO); as bandas em $1600 - 1552\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento das ligações (-C=C-) do anel benzênico e duplas ligações; as bandas em 1474 e 1384 cm^{-1} correspondem à vibração das ligações C-H dos grupos prenilas; as bandas em $1270 - 1131\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento da ligação C-O em 4'; a banda em 982 cm^{-1} corresponde ao estiramento do anel aromático. Os dados são consistentes com a estrutura do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilina C).

Figura 48: Espectro de infravermelho da substância II, proposta como ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilina C).

A substância de número 6 (agora denominada por substância III), sugerida como sendo o ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico (bacarina) (figura 49), foi identificada com base nas análises por espectrometria de massas, espectro de UV e infravermelho. No espectro de UV (figura 50) a absorbância máxima em 280 nm indica tratar-se de um ácido

fenólico. No espectro de massas obtido por ESI-MS (figura 51) a molécula deprotonada foi detectada em $[M - H]^-$ m/z – 362.8 e o pico base em m/z 187.0.

Figura 49: Estrutura da substância III, proposta como ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico (bacarina).

Figura 50: Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro de UV-visível da substância III, proposta como ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico (bacarina).

Figura 51: Espectro de massas obtido da análise por CLAE-EM da substância III, proposta como ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico (bacarina).

A análise por infravermelho da substância III (figura 52) gerou banda em 3444 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo hidroxila da carboxila; as bandas em $2923 - 2853\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento das ligações C-H dos grupos prenilas; a banda em 1758 cm^{-1} corresponde à presença de uma carbonila não conjugada (CO) do grupo 4-diidrocinamoiloxi; a banda em 1686 cm^{-1} corresponde ao estiramento da carbonila conjugada (C=C- CO) do ácido cinâmico; as bandas em $1642 - 1567\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento das ligações (-C=C-) do anel benzênico e das duplas ligações; as bandas em 1420 e 1364 cm^{-1} correspondem à vibração das ligações C-H dos grupos prenilas e metilas; as bandas em $1206 - 1131\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento da ligação C-O. Assim, os dados são coerentes com a estrutura do ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico (bacarina).

Figura 52: Espectro de infravermelho da substância III, proposta como ácido 3-prenil-4-dihidrocinaomiloxicinâmico (bacarina).

A substância de número 7 (agora denominada por substância IV), sugerida como o ácido 2,2-dimetil cromeno-8-prenil-6-propenoico (figura 53), foi identificada com base nas análises por espectrometria de massas, espectro de UV e infravermelho. No espectro de UV (figura 54) a absorvância máxima em 320 nm indica tratar-se de um derivado de ácido cinâmico. No espectro de massas obtido por ESI-MS (figura 55) a molécula deprotonada foi detectada em $[M - H]^-$ m/z – 617.3 e o pico base em m/z 297.1.

Figura 53: Estrutura da substância IV, proposta como ácido 2,2-dimetil cromeno-8-prenil-6-propenoico.

Figura 54: Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro de UV-visível da substância IV, proposta como ácido 2,2-dimetil cromeno-8-prenil-6-propenoico.

Figura 55: Espectro de massas obtido por CLAE-EM da substância IV, proposta como ácido 2,2-dimetil cromeno-8-prenil-6-propenoico.

Na figura 56, correspondente ao espectro de infravermelho, observa-se uma banda larga em 3441 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo hidroxila da carboxila; as bandas em $2924 - 2853\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento das ligações C-H dos grupos prenila e metila; a banda em 1690 cm^{-1} corresponde ao estiramento da carbonila conjugada ($\text{C}=\text{C}-\text{CO}$); as bandas em $1632 - 1599\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento das ligações ($\text{C}=\text{C}$ -) do anel benzênico e duplas ligações; as bandas em 1464 e 1375 cm^{-1} correspondem à vibração das ligações C-H do grupo prenila e dos grupos metila; as bandas em $1270 -$

1149 cm^{-1} correspondem ao estiramento da ligação C-O. Os dados são consistentes com a estrutura do ácido 2,2-dimetil cromeno-8-prenil-6-propenoico.

Figura 56: Espectro de infravermelho da substância IV, proposta como ácido 2,2-dimetil cromeno-8-prenil-6-propenoico.

As quatro substâncias isoladas foram então submetidas ao bioensaio com *R. microplus* apenas. O TPL foi desenvolvido à concentração única de 0,8 mg/mL de cada substância, paralelamente ao ensaio com o fipronil técnico, o controle positivo (figura 57).

Figura 57: Testes de pacote de larvas com *Rhipicephalus microplus* e as substâncias isoladas, controle negativo e positivo à 0,8 mg/mL: controle negativo (TCE:OO), fipronil técnico (controle positivo), substância I (ácido 2,2-dimetil cromeno-6-propenoico dicafeoil glucosídeo), substância II (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico - artepilina C), substância III (ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico - bacarina), substância IV (ácido 2,2-dimetil cromeno-8-prenil-6-propenoico). O asterisco indica diferença significativa (* $p \leq 0,05$).

Como pode ser observado, as substâncias isoladas não exibiram atividade acaricida. As taxas de mortalidade foram de 6,6%, 7,5%, 7,6% e 8,0% para as substâncias I, II, III e IV, respectivamente. Com base nesses resultados, duas novas hipóteses são propostas: a substância que confere atividade acaricida à própolis de Lavras está em baixa abundância na subfração ativa e não foi possível o isolamento em quantidade suficiente para os bioensaios; ou as substâncias isoladas conferem atividade apenas se estiverem associadas (sinergismo). No entanto, não se obteve material suficiente para o desenvolvimento de testes com soluções combinadas (duas a duas, ou três a três ou mesmo as quatro substâncias juntas) para avaliar essa nova proposição.

6 Discussão

Atualmente o controle de carrapatos tornou-se um grande desafio para pesquisadores de todo o mundo na tentativa de descobrir um meio sustentável de controlar esses ectoparasitas. Dentre os produtos naturais conhecidos, até o presente momento este trabalho é o primeiro relato de que extratos de própolis verde brasileira podem auxiliar no combate aos carrapatos. Com o intuito, portanto, de identificar qual(is) substância(s) confere(m) ação acaricida à amostra estudada, teste mundialmente aceito para detecção de possíveis acaricidas, bem como de diagnóstico de resistência, foi adotado, o teste de pacote de larvas (TPL). Além do referido teste, o teste de alimentação artificial de adultos (TAA) foi empregado na tentativa de verificar se seria promissor ou não o estabelecimento desta metodologia.

6.1 Teste com adultos (TAA)

Os dados obtidos pelo TAA não apontaram diferenças estatísticas no ganho de peso das fêmeas parcialmente ingurgitadas submetidas aos tratamentos, isto é, as fêmeas não completaram o ingurgitamento total como se estivessem fixadas em um hospedeiro adequado, corroborando também a observação de Cunha e colaboradores (2010) para *R. sanguineus* e Abel e colaboradores (2008) para *A. cajennense*. Dessa forma, a oviposição foi prejudicada uma vez que o peso da massa de ovos está intrinsecamente relacionado ao ganho de peso da fêmea após alimentação (Cunha *et al.*, 2010).

Atualmente a técnica de alimentação artificial tem sido extensamente empregada para avaliar a infecção dos carrapatos com patógenos a fim de estudar o ciclo de vida de tais microrganismos em seu vetor. E, portanto, avaliar a transmissão de patógenos aos hospedeiros, o que contribui para futuros tratamentos das doenças transmitidas por carrapatos (Billeter *et al.*, 2012; Gonsioroski *et al.*, 2012). Esta técnica também é empregada na elucidação de mecanismos de defesa de cepas de carrapatos resistentes às drogas

sintéticas, como a ivermectina (Pohl *et al.*, 2011). Também é possível empregar a técnica de alimentação artificial em estudos de vacinas (Almazán *et al.*, 2005).

No que tange os testes de novas drogas acaricidas o TAA é viável, no entanto deve-se levar em consideração que para embasar a ação acaricidade de extratos e/ou drogas, protocolos já muito bem estabelecidos e aceitos mundialmente devem ser empregados. Além disso, a avaliação de substâncias e/ou extratos com ação acaricida são avaliados por testes que podem ser reproduzidos comercialmente para o controle de carrapatos. Consta que os acaricidas comerciais mais usados são aplicados por banhos, 'pour-on' ou aspersão dos animais domésticos (FAO, 2004). Isto é, a ação dos compostos acaricidas ocorre por contato direto das substâncias ativas com os carrapatos. Portanto, o uso de uma droga a base de própolis provavelmente não será empregada via intra-dérmica em animais infestados. Dessa forma, a continuação dos bioensaios pelo TAA para avaliação do efeito acaricida da própolis verde e seus constituintes não se justificou.

Além da implicação prática da metodologia testada, os dados obtidos não apresentaram diferenças significativas no ganho de peso entre as fêmeas que receberam o extrato de própolis e as que receberam apenas o controle. Contudo, acredita-se que alguma parcela de sangue com extrato foi ingerido pelas fêmeas das 3 espécies de carrapatos avaliados, uma vez que todos os indivíduos de *R. sanguineus* e *A. cajennense* foram a óbito. E apenas um indivíduo do grupo tratado de *R. microplus* sobreviveu e fez postura, porém inférteis. Apesar do resultado favorável ao uso do extrato de própolis verde no combate aos carrapatos através dessa metodologia, não foi possível saber qual concentração ingerida pelos animais culminou na morte dos indivíduos dos grupos tratados, bem como na postura infértil da única fêmea sobrevivente.

Portanto, notou-se que os bioensaios *in vitro* desenvolvidos com adultos das espécies propostas, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma cajennense*, não foram adequados para avaliar a ação acaricida dos extratos de própolis brasileira.

Por outro lado, os dados obtidos com o teste de pacote de larvas, descritos no item subsequente, comprovam a atividade acaricida dos extratos de própolis propostos nesse trabalho. Além disso, de acordo com a FAO (2004), o teste de pacote de larvas é uma das metodologias mais amplamente recomendadas para a avaliação da eficácia de produtos utilizados para o controle de carrapatos. Portanto, optou-se por desenvolver o isolamento biomonitorado dos constituintes de própolis brasileira apenas pelo teste de pacote de larvas.

6.2 Teste com larvas (TPL)

Os dados obtidos com os extratos bruto clorofórmico da própolis de Lavras (MG) e de Picos (PI) indicam que a própolis verde tem alta atividade acaricida (79,5%, 93% e 27,69% de mortalidade) contra as três espécies de carrapatos avaliadas (*R. sanguineus*, *R. microplus* e *A. cajennense*, respectivamente) à maior concentração testada, 160 mg/mL. Já o extrato bruto de Picos (PI) não apresentou diferenças significativas nas taxas de mortalidade dos carrapatos (3,61% para *R. sanguineus*, 3,51% para *R. microplus* e 1,12% para *A. cajennense*). Nota-se, apenas, a variação inter-específica, na qual *R. microplus* é mais suscetível à ação do extrato do que as demais espécies. Da mesma forma, essa variação de suscetibilidade das espécies de carrapatos é também verificada frente aos extratos da própolis de Lavras.

Segundo Righi e colaboradores (2013b), extrato clorofórmico da própolis de Picos (PI) apresenta em sua composição o éster metílico do ácido eicosadienóico e muitos terpenoides: α - amirinona, α - e β - amirina, betulina, lupenona, lupeol, α -amirinona, acetato de β - amirina, acetato de α - amirina. Já o extrato clorofórmico da própolis de Lavras (MG) observou-se a ocorrência de cromenos e outras substâncias derivadas de fenilpropanoides prenilados, além de triterpenos: 4-vinil fenol, éster metílico do ácido dihidrocinâmico, *p*-vinil-O-prenil fenol, 2-t-butilnafto-[2,3-b]-furan-4,9-diona, éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico, ácido palmítico, éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico, éster metílico do ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromeno-6-propenóico, éster metílico do ácido 4-hidroxi-3,5-

diprenilcinâmico, éster metílico do ácido 4-dihidrocinamoiloxi-3-prenilcinâmico e β -amirina. Diferentemente do observado na literatura, em que compostos terpênicos promovem ação acaricida, cromenos e/ou derivados de fenilpropanoides provavelmente contribuem para a alta atividade encontrada no controle de carrapatos.

Segundo Ribeiro e colaboradores (2008b), óleo essencial de *Drimys brasiliensis* (Winteraceae) apresenta alta toxicidade às larvas de *R. sanguineus* e *R. microplus*. O extrato avaliado nesse trabalho apontou predominância de sesquiterpenos, cerca de 66%, que podem conferir ação acaricida ao óleo de *D. brasiliensis*. Também foram verificados monoterpenos e sesquiterpenos nos óleos de *Cunila angustifolia*, *C. incana*, *C. microcephala* e *C. spicata* (Lamiaceae), cujos testes com larvas de *R. microplus* demonstraram alta letalidade (Apel *et al.*, 2009). Segundo esses mesmos autores, a atividade detectada em *Cunila spicata* provavelmente deve-se à presença de borneol e/ou limoneno. Isso, dado que o limoneno já é empregado na composição de pesticidas comerciais contra pulgas e carrapatos para cachorros e gatos, bem como para pesticidas utilizados em ambientes (Trumble, 2002). Atividades biocidas em fêmeas e larvas de *R. microplus* também foram observadas com monoterpenos oxigenados tais como a pulegona (Ribeiro *et al.*, 2010), o timol e o carvacrol (Gomes *et al.*, 2012; Lage *et al.*, 2013). Além disso, os sesquiterpenos também apresentam efeito sinérgico com drogas contra *R. microplus* (Ribeiro *et al.*, 2011). Óleos essenciais de coníferas da Nova Caledônia (*Araucaria columnaris*, *Callitris sulcata* e *Neocallitropsis pancheri*) também revelaram alta atividade acaricida contra *R. microplus*, e têm em comum sesquiterpenos em sua composição química (Lebouvier *et al.*, 2013).

Segundo Biswas e colaboradores (2002) o extrato de neen (*Azadiractha indica*) contém diterpenos tricíclicos, como os abietanos, e recentemente foi reportado que extratos dessa planta apresentam ação no controle de ectoparasitas (Giglioti *et al.*, 2011). Assim como o extrato de neen, extrato diclorometano de folhas de *Croton sphaerogynus*

apresentam atividade acaricida e contém em sua maioria diterpenos do tipo abietano, além de podocarpenos e clerodanos (Righi *et al.*, 2013a).

Além dos mono-, di- e sesquiterpenos propostos como prováveis causadores do alto índice de mortalidade de larvas de carrapatos, Ribeiro e colaboradores (2008a) detectaram o cromeno precoceno II no extrato de *Calea serrata* (Asteraceae) como provável determinante da atividade acaricida contra *R. microplus*.

Por outro lado, compostos prenitados C₆-C₃ apresentam atividade citotóxica, anti-inflamatória e antioxidante (Ma *et al.*, 2011; Zhuang *et al.*, 2013). A via biosintética dos fenilpropanoides (via do ácido chiquímico) também está relacionada à produção de outras substâncias fenólicas que auxiliam no combate ao ataque de patógenos (Ballester *et al.*, 2006), e deixam os frutos de citrus, por exemplo, mais resistentes à infecção por fungos (Ballester *et al.*, 2013), bem como em resposta a estímulos abióticos nas plantas (Cajuste & Lafuente, 2007). Alguns fenilpropanoides, tais como o safrol, isosafrol, eugenol, isoeugenol e metil-eugenol já foram relatados por serem tóxicos e/ou repelentes para muitas espécies de diferentes ordens de insetos (Yang *et al.*, 2003). Alguns compostos dessa classe de substâncias também já foram relacionadas à ação sinérgica com piretróides e carbamatos (Almeida *et al.*, 2009), aumentando, portanto, a eficiência desses pesticidas sintéticos. Outros fenilpropanoides como o dilapiol, isolado do óleo essencial de *Piper aduncum*, demonstrou ter atividade inseticida contra larvas e pupas do mosquito da dengue *Aedes aegypti* (Rafael *et al.*, 2008). Essa mesma substância também foi, posteriormente, reportada por Silva e colaboradores (2009) como responsável pela toxicidade do óleo dessa mesma espécie vegetal às larvas e adultos de *R. microplus*. Da mesma forma, Ferraz e colaboradores (2010) atribuem aos fenilpropanoides presentes nos óleos essenciais de três espécies de *Piper* (*P. amalago*, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides*) a atividade acaricida observada contra larvas de *R. microplus*.

Ainda com relação à atividade acaricida do extrato bruto de Lavras, vale ressaltar a diferença verificada entre as taxas de óbitos para as três espécies de carrapatos em estudo

(79,5%, 93% e 27,69% de mortalidade contra *R. sanguineus*, *R. microplus* e *A. cajennense*, respectivamente). Esses dados podem ser indicativos de que, talvez, *A. cajennense* seja mais resistente do que *R. sanguineus* e *R. microplus* para as substâncias presentes na própolis de Lavras (MG). Ao passo que o carrapato do boi é a espécie mais suscetível ao extrato de própolis verde avaliado. Porém, ao longo de todo isolamento biomonitorado larvas de *R. sanguineus* mostraram-se mais resistentes à todos os extratos mais purificados da própolis de Lavras avaliados do que as larvas de *A. cajennense*. Esta observação corrobora as análises de Daemon e colaboradores (2009), cujos dados demonstraram que larvas de *R. microplus* eram mais suscetíveis ao monoterpeno timol do que as larvas de *R. sanguineus*. Provavelmente, segundo esses mesmos autores, o fato de os carrapatos vermelho do cão serem provenientes de regiões xéricas (originários da África) conferiu-lhes maior resistência, com maior impermeabilidade da cutícula, mesmo em estágios imaturos.

Novamente, vale notar que *R. microplus* parece ser mais suscetível às frações obtidas do que *R. sanguineus* e *A. cajennense*. Além da fração de acetato de etila, que demonstrou altas taxas de mortalidade para as três espécies (98,93%, 91,38% e 51,76%, respectivamente), as frações clorofórmio, clorofórmio : acetato de etila e acetato de etila : metanol também apresentaram ação acaricida significativa contra o carrapato do boi (24,42%, 73,52% e 56,49%, respectivamente). As diferenças constatadas entre as diferentes espécies de carrapatos corrobora também observações de Freitas e colaboradores (2011), cujo estudo avaliou a suscetibilidade de adultos e larvas de *A. cajennense* a acaricidas sintéticos. Segundo esses mesmo autores, larvas de carrapato-estrela apresentaram estado de suscetibilidade parcial aos acaricidas cipermetrina e deltametrina, cujas doses administradas (recomendadas pelo fabricante) conferiram 77,6% e 76,3% de taxa de mortalidade, respectivamente. Por outro lado, esses mesmos acaricidas, quando empregados para o controle de *R. sanguineus* e *R. microplus*, conferiram o 'status de suscetibilidade', com 86,9% e 86,2% de taxa de mortalidade, respectivamente (Fernades, 2000 e 2001). Assim, nota-se que os dados apresentados com as subfrações obtidas da

fração de acetato de etila da própolis de Lavras estão de acordo com estudos prévios demonstrando a diferença de suscetibilidade das três espécies de carrapatos em questão (18,96%, 78,83% e 0,0% para *R. sanguineus*, *R. microplus* e *A. cajennense*, respectivamente).

Com a purificação dos extratos de própolis, seria esperado que houvesse incremento da atividade acaricida contra os carrapatos do boi, vermelho do cão e estrela. No entanto, como se observou, a obtenção em alto grau de pureza do éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico, bem como do 2-prenil-4-vinil fenol, não proporcionaram atividades acaricida significantes, tanto separadamente quanto juntos. Acreditava-se que essas substâncias contribuíam para a alta atividade do extrato de própolis verde. Segundo Barbosa e colaboradores (2012), o grupo alil de alguns fenilpropanoides contribuiriam para o aumento da atividade larvicida de mosquitos desses compostos. Por outro lado, o aumento de grupos hidroxilas previniriam as substâncias de penetrarem na cutícula das larvas de *Aedes aegypti* (Barbosa *et al.*, 2012). Da mesma forma, Harmatha & Nawrot (2002) também haviam relatado que grupamentos mais polares como as hidroxilas proporcionariam queda de atividade de algumas substâncias. De acordo com esses mesmos autores, fenilpropanoides com grupamentos piperonil (metil-ene-dioxi-fenil) proporcionam um efeito positivo na atividade das substâncias.

Assim sendo, levou-se em consideração a nova suposição de que o componente ativo do extrato da própolis de Lavras não fosse volátil. Novos extratos clorofórmicos brutos foram obtidos para o desenvolvimento de novas colunas cromatográficas, a fim de que houvesse material suficiente para o desenvolvimento do isolamento biomonitorado, agora com análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Como pôde ser observado nos novos bioensaios, a cromatografia em coluna de gel de sílica não forneceu separação dos constituintes idêntica aos das primeiras frações obtidas. Diferentemente do obtido para a primeira fase de experimentos, em que a fração acetato de etila mostrou-se mais ativa para o controle de carrapatos (98,93%, 91,38% e 51,76% para *R. microplus*, *R. sanguineus*

e *A. cajennense*, respectivamente), na segunda fase de experimentos a fração metanólica teve maior atividade acaricida (73,70%, 2,04% e 18,67% para *R. microplus*, *R. sanguineus* e *A. cajennense*, respectivamente). Nota-se ainda que a eficiência das frações foram menores e as diferenças verificadas são significantes. Justificava-se, por conseguinte, a importância do isolamento de substâncias ativas de produtos naturais como a própolis, que apresenta uma complexa mistura e grande diversidade de compostos (Salatino *et al.*, 2011). Além disso, a partir da fração metanólica suas subfrações apresentaram baixa toxicidade, sendo que a subfração acetato de etila : metanol levou a óbito 23,5% de *R. microplus* e a subfração clorofórmica foi responsável por 18,05% de mortalidade das larvas de *A. cajennense*. Porém, ao continuar com o fracionamento dos extratos ativos, os extratos obtidos da subfração metanólica, que não apresentou taxas de mortalidades significantes, apresentou as maiores atividades acaricidas para *R. microplus* e *A. cajennense* (sub-4: 83,07% e 22,49%, respectivamente). Vale ressaltar também que somente após o quarto fracionamento do extrato ativo (extrato sub-C) as larvas de *R. sanguineus* voltaram a apresentar significativa taxa de mortalidade, demonstrando, portanto, que indivíduos de *R. sanguineus* são mais resistentes aos extratos de própolis verde, e que talvez certas proporções entre as substâncias estejam conferindo atividade acaricida ao extrato. Assim, com a purificação dos extratos e o aumento proporcional da(s) substância(s) ativa(s) foi possível verificar a ação acaricida para o carrapato vermelho do cão (34,92% de mortalidade frente à sub-C).

Em função da quantidade restrita de material ao final dos fracionamentos, os últimos TPLs foram conduzidos apenas com a espécie mais suscetível aos extratos de própolis verde. Observa-se que tanto a sub-C2 quanto a sub-C3 apresentaram altas taxas de mortalidade para o carrapato do boi (99,51% e 97,19%, respectivamente) e cujos valores não diferem estatisticamente ($p > 0.05$). A partir da curva dose resposta desenvolvida para a sub-C3, observou-se que a CL_{50} é de 9,9 mg/mL e a CL_{95} é de 17,8 mg/mL, ambas com intervalo de confiança de 95%. Isto é, aproximadamente 1% do extrato ativo de própolis verde

brasileira mata 50% das larvas de *R. microplus* e aproximadamente 2% mata 100% dos indivíduos.

É interessante notar que 2% do extrato ativo foi totalmente efetivo contra carrapatos, valor esse bastante promissor em comparação com outros extratos vegetais que precisaram de concentrações de 2,5% a 20% do extrato para obter atividade acaricida (Ribeiro *et al.*, 2008a; Clemente *et al.*, 2010; Martinez-Velazquez *et al.*, 2011). Segundo Madzimure *et al.* (2011), 10% do extrato aquoso de folhas de *Lippia javanica* apresentou potente ação acaricida em carrapatos do boi. Essa espécie é rica em terpenoides, classe de metabólitos secundários bastante conhecida por apresentar propriedades acaricidas, dentre os quais os triterpenos se destacam (Pereira & Famadas, 2006; Fernandes & Freitas, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007 e 2010; Magadum *et al.*, 2009). Segundo Ribeiro e colaboradores (2008a), o extrato hexânico de *Calea serrata* a 50 mg/mL (isto é, 5% do extrato) apresentou 100% de mortalidade de larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* após 48 horas de exposição. Da mesma forma, o óleo volátil de *Drimys brasiliensis* também apresentou 100% de letalidade em larvas dos carrapatos *R. microplus* e *R. sanguineus* após 48 horas de exposição, à concentração de 25 µL/mL (Ribeiro *et al.*, 2008b). Apel e colaboradores (2009) também avaliaram a ação acaricida do óleo volátil de algumas espécies de *Cunila*: *C. angustifolia*, *C. incana* e *C. spicata*. Foi verificado que essas três espécies apresentaram alto índice de toxicidade às larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* (100% de mortalidade a 10 µL/mL de óleo volátil). Clemente e colaboradores (2010) avaliaram o óleo volátil de *Eucalyptus citriodora* e *Cymbopogon nardus* a 50% e observaram altas taxas de mortalidade em larvas de *Amblyomma cajennense* (53,1% e 61,1%, respectivamente) e *Anocentor nitens* (100% para ambos os óleos). Óleos voláteis de *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* e *Ocimum basilicum* também foram avaliados quanto à ação larvicida em carrapatos do boi, *R. microplus*, às concentrações de 1,25, 2,5, 5, 10 e 20% (Martinez-Velazquez *et al.*, 2011). Esses autores constataram que o óleo de *Cuminum cyminum* apresentou 100% de mortalidade nas 5 concentrações testadas. Já o óleo de *Pimenta dioica* apresentou 100% de

mortalidade das larvas na faixa de 2,5% a 20%, enquanto o óleo de *Ocimum basilicum* não apresentou nenhuma ação tóxica às larvas de carrapatos testadas em nenhuma concentração.

Os resultados obtidos até então parecem ser comparáveis com extratos de outras plantas. Fernandez-Sales e colaboradores (2011) reportaram o efeito de extratos preparados a partir de folhas de *Lysiloma latisiliquum* e *Piscidia piscipula*. Os valores da concentração letal para 50% dos carrapatos (CL₅₀) foram próximos a 6% e 2%, respectivamente. Ribeiro *et al.* (2007) descreveram 100, 96,7, 84,7 e 52,7% de mortalidade de larvas de *R. microplus* com extratos metanólicos de *Hypericum polyanthemum* às concentrações de 5, 2,5, 1,25 e 0,625%, respectivamente. Por outro lado, Silva e colaboradores (2009) observaram a taxa de mortalidade de 70,42% para a mesma espécie de carrapato, porém expostos a 20% de extrato hexânico de *Piper aduncum*. Rosado-Aguiar e colaboradores (2010) constataram 99% de mortalidade das larvas de *R. microplus* com extratos metanólicos de folhas e caules de *Petiveria alliaceae* a 12,2% e 16,5%, respectivamente.

Com base nas análise por CLAE-EM identificaram-se derivados do ácido cinâmico e cromenos no extrato ativo sub-C2, bem como na sub-C3. Com o uso do cromatógrafo líquido preparativo de alta eficiência, foi possível isolar quatro substâncias das sete identificadas em quantidades suficientes para novos bioensaios com *R. microplus* e análises correntes em química de produtos naturais para elucidação estrutural.

Muitos métodos têm sido descritos na literatura para a análise de polifenóis de própolis baseados em técnicas de espectrofotometria de UV-visível, ressonância magnética nuclear, e técnicas cromatográficas (CG e CLAE) (Pellati *et al.*, 2011; Sforcin & Bankova, 2011). Em comparação aos dados da literatura, foram feitas as identificação propostas para as quatro substâncias isoladas (ácido 2,2 dimetil-cromeno-6-propenoico-dicafeoil glucosídeo, artepilina C, bacarina e ácido 2,2-dimetil-cromeno-8-prenil-6-propenoico).

Dentre as substâncias isoladas, as mais amplamente estudadas são a artepilina C e a bacarina. Sabe-se que tanto a artepilina C quanto a bacarina exibem atividade antitumoral, levando à apoptose apenas das células cancerígenas (Akao *et al.*, 2003; Mishima *et al.*, 2005; Endo *et al.*, 2012). Essas substâncias têm sido muito estudadas e, especula-se que a estrutura terciária incluindo os grupamentos prenila estejam contribuindo para tal atividade (Akao *et al.*, 2003). Oliveira e colaboradores (2011) reportaram que a bacarina é responsável por prevenir a quebra e perda de cromossomo, bem como danos de DNA *in vivo*, além de não ter ação genotóxica às células do sangue e do fígado, devido principalmente à sua alta atividade antioxidante. Da mesma forma, a artepilina C também exibe alta atividade antioxidante, prevenção de cancer de cólon, ação antifúngica e antibacteriana (Estrada *et al.*, 2008).

Assim como os dois constituintes supracitados são típicos de propolis verde brasileira, bem como ocorrem em *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) (Akao *et al.*, 2003), os cromenos também são comuns em própolis (Righi *et al.*, 2013b). No entanto, até o momento nenhuma atividade biológica associada ao ácido 2,2 dimetil-cromeno-6-propenóico dicafeoil glucosídeo e ao ácido 2,2-dimetil-cromeno-8-prenil-6-propenóico foi relatada.

Os bioensaios com as substâncias isoladas foram conduzidos de acordo com os valores obtidos por Castro-Janer e colaboradores (2009), em que a CL_{99,9} frente ao fipronil para *R. microplus* (cepa MOZO) foi de 0,04%. Segundo a FAO (2004) a dose discriminatória corresponde a duas vezes a CL_{99,9}, assim adotou-se a dose de 0,8 mg/mL para os testes das substâncias isoladas, bem como do controle positivo (fipronil técnico). Constatou-se, porém, que as larvas dos carrapatos do boi não foram intoxicadas por nenhuma das substâncias à concentração de 0,8 mg/mL. Talvez, aumentando-se a concentração das substâncias se conseguissem taxas de mortalidade significativas. Mas, não havia quantidade suficiente de material para que novos testes fossem realizados com concentrações maiores, tampouco com combinações das substâncias para verificar se ocorria algum efeito de sinergismo entre elas no extrato ativo sub-C2 e sub-C3. O

sinergismo entre moléculas é um efeito bastante plausível para justificar a atividade do extrato ativo de própolis verde estudado. Segundo Wojtyczka e colaboradores (2013), a propriedade antimicrobiana associada ao extrato de propolis está intimamente relacionada ao sinergismo entre seus constituintes.

CONCLUSÕES

7 Conclusões

1. a própolis preta de Picos (PI) não apresenta atividade acaricida sobre as espécies avaliadas (*Rhipicephalus microplus*, *R. sanguineus* e *Amblyomma cajennense*);
2. a própolis verde de Lavras (MG) apresenta alta atividade acaricida sobre as espécies avaliadas, tanto no que se refere ao extrato clorofórmico bruto quanto às subfrações decorrentes do isolamento biomonitorado;
3. uma subfração composta por sete substâncias tem atividade acaricida;
4. o ácido 2,2-dimetil-cromeno-6-propenoico-dicafeoil glucosídeo, a artepilina C, a bacarina e o ácido 2,2-dimetil-cromeno-8-prenil-6-propenoico figuram entre os componentes da subfração com atividade acaricida;
5. isoladamente, os quatro componentes não têm atividade acaricida;
6. provavelmente há efeito sinérgico entre as substâncias da subfração ativa da própolis verde.

RESUMO

8 Resumo

Própolis é uma substância resinosa produzida por *Apis mellifera*, contendo principalmente resinas vegetais e cera das próprias abelhas. É usada na colmeia para diversas finalidades, como vedar aberturas, reparar as células e envolver invasores que foram mortos na colméia, além de contribuir para a quase constância da temperatura dentro da colmeia (28 - 30°C). A própolis é importante para as abelhas, pois é responsável pela manutenção de um ambiente quase estéril, agindo contra bactérias, fungos e até larvas invasoras. Em virtude do amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas associadas a esse produto, a própolis vem sendo extensivamente utilizada em medicina alternativa, bem como na indústria cosmética e alimentícia. Apesar dos numerosos estudos já realizados com própolis, os poucos que foram feitos visando ao uso em veterinária relacionavam-se a combate de endoparasitas. Muitas doenças de animais vêm acometendo o homem atualmente, tais como as transmitidas pelos carrapato vermelho do cão (*Rhipicephalus sanguineus*) e carrapato-estrela (*Amblyomma cajennense*). Problemas de saúde para o gado e queda da produtividade pecuária é causada pelo carrapato do boi (*Rhipicephalus microplus*). Além disso, é crescente o interesse de profissionais veterinários pelo uso de produtos naturais, sobretudo em relação aos animais domésticos. Vale lembrar que o uso indiscriminado de acaricidas levou à seleção de carrapatos resistentes, de modo que outras estratégias para o controle dessas pragas são de grande importância. Com isso, o intuito do presente projeto foi a determinação da atividade de extratos brutos de própolis brasileira e seus constituintes no controle de carrapatos específicos e generalistas.

Foram preparados extratos clorofórmicos de amostras de própolis verde de Lavras (MG) e própolis preta de Picos (PI), anteriormente analisadas quimicamente. Os extratos foram concentrados à secura e redissolvidos para administração a carrapatos mantidos em laboratório. Os ensaios com extratos brutos foram realizados *in vitro* para avaliar seu efeito nos artrópodos, empregando-se o teste de pacote de larvas. Foram realizados isolamentos

biomonitorados, na tentativa de obtenção de substâncias ativas presentes nas própolis analisadas. O extrato bruto de Picos não revelou atividade acaricida. Por outro lado, o extrato bruto de Lavras mostrou-se bastante ativo e, então, foi fracionado por cromatografia em coluna de gel de sílica. As frações resultantes foram novamente avaliadas em ensaios *in vitro* em carrapatos. Novo fracionamento e novos bioensaios foram realizados, e foi identificada uma subfração com atividade acaricida. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram desenvolvidas e quatro substâncias majoritárias (ácido 2,2-dimetil-cromeno-6-propenoico-dicafeoil glucosídeo, artemilina-C, bacarina e ácido 2,2-dimetil-cromeno-8-prenil-6-propenoico) dessa subfração ativa foram isoladas em CLAE-preparativo. As substâncias obtidas foram identificadas por meio de análises espectroscópicas correntes em química de produtos naturais (IV, UV, massas e RMN). Por fim, novos bioensaios foram realizados com a espécie de carrapato mais suscetível, *Rhipicephalus microplus*, porém não se observou atividade acaricida significativa para as substâncias isoladas. Assim sendo, talvez a alta atividade acaricida constatada na subfração ativa seja decorrente do sinergismo entre substâncias.

Palavras-chave: própolis brasileiras, atividade acaricida, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma cajennense*.

ABSTRACT

9 Abstract

Propolis is a resinous substance produced by bees *Apis mellifera*, containing mainly plant exudates and bee waxes. It is used in the hive to close holes, repair cells and involve intruders that are killed inside the hive. Propolis is important to the bees, as it is responsible for the maintenance of the hive as a sterile environment, acting against bacteria, fungus and even invading larvae. Because of the wide range of biological and pharmacological activities of propolis, it has been extensively used in alternative medicine, as well as in cosmetic and food industries. However, few studies have been developed concerning the use of propolis to animal health. Nowadays, many animal diseases have affected humans, such as those transmitted by ticks, the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*) and the star tick (*Amblyomma cajennense*). Cattle health problems and decrease of livestock productivity is caused by the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*). In addition, the interest of veterinary professionals toward the use of natural products to animal health is increasing, mainly for the treatment of domestic animals. It is worth remembering that the indiscriminate use of acaricides leads to resistance selection. Thus, new strategies are of great importance for tick control. Hence, the aim of this project was to determine the activity of crude extracts of Brazilian propolis and their constituents for the control of specific and generalist ticks.

Chloroform extracts were prepared from samples of green propolis from Lavras (state of Minas Gerais) and black propolis from Picos (state of Piauí), previously analyzed chemically. The extracts were concentrated to dryness and redissolved for ticks administration in laboratory. The bioassays were carried out *in vitro* to verify the effectiveness of the extracts using the larval package test. Bioassays-guided isolations were carried out to obtain active constituents presented in the studied samples. The crude extract of propolis sample from Picos did not show any acaricide activity. On the other hand, the sample propolis from Lavras showed high activity, and then was fractionated by column chromatography in silica gel. The fractions obtained were tested, and a subfraction with

acaricide activity was obtained. Analyses by high performance liquid chromatography (HPLC) were developed and four compounds (2,2-dimethyl-cromene-6-propenoic-dicafeoyl glucoside acid, artepillin-C, baccarin and 2,2-dimethyl-cromene-8-prenyl-6-propenoic acid) of the active subfraction were isolated using preparative HPLC. These compounds were identified by means of current spectroscopic analysis in chemistry of natural products (IR, UV, mass and NMR). Finally, new bioassays were carried out with the most susceptible tick specie, *Rhipicephalus microplus*, but no effect was observed testing the isolated compounds. Thus, probably the high acaricidal activity observed in the active subfraction was due to a synergism among the subfraction constituents.

Keywords: Brazilian propolis, acaricidal activity, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma cajennense*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10 Referências bibliográficas

- Abel I., Corrêa F.N., Castro A.A., Cunha N.C., Madureira R.C. & Fonseca A.H. (2008) Artificial feeding of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) fasting females through capillary tube technique. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** **17** (3): 128-132.
- Abu-Mellal A., Koolaji N., Duke R. K., Tran V. H. & Duke C. C. (2012) Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. **Phytochemistry** **77**: 251-259.
- Aga H., Shibuya T., Sugimoto T., Kurimoto M. & Nakajima S. (1994) Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** **58** (5): 945-946.
- Ahn M. R., Kunimasa K., Ohta T., Kumazawa S., Kamihira M., Kaji K., Uto Y., Hori H., Nagasawa H. & Nakayama T. (2007) Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits *in vitro* tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters** **252**: 235-243.
- Akao Y., Maruyama H., Matsumoto K., Ohguchi K., Nishizawa K., Sakamoto T., Araki Y., Mishima S. & Nozawa Y. (2003) Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biological Pharmaceutical Bulletins** **26** (7): 1057-1059.
- Albuquerque I. L., Alves L. A., Lemos T. L. G. & Monte F. J. Q. (2007) Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em propolis do Ceará. **Química Nova** **30** (4): 828-831.
- Almazán C., Blas-Machado U., Kocan K. M., Yoshioka J. H., Blouin E. F., Mangold A. J. & De la Fuente J. (2005) Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. **Vaccine** **23**: 4403–4416.
- Almeida R. R. P., Souto R. N. P., Bastos C. N., Silva M. H. L. & Maia J. G. S. (2009) Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. **Chemical Biodiversity** **6**: 1427–1434.

- Antunez K., Harriet J., Gende L., Maggi M., Eguaras M. & Zunino P. (2008) Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. **Veterinary Microbiology** **131 (3-4)**: 324-331.
- Apel M. A., Ribeiro V. L. S., Bordignon S. A. L., Henriques A. T. & von Poser G. (2009) Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research** **105**: 863-868.
- Araujo M. A. R., Libério S. A., Guerra R. N. M., Ribeiro M. N. S. & Nascimento F. R. F. (2012) Mechanism of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** **22(1)**: 208-219.
- Bakir S., Ozbay M., Gun R., Yorgancilar E., Kinis V., Keles A., Abakay A., Gokalp O. & Topçu I. (2013) The protective role of caffeic acid phenethyl ester against streptomycin ototoxicity. **American Journal of Otolaryngology-Head and Neck Medicine and Surgery** **34**: 16-21.
- Ballester A. R., Lafuente M. T. & González-Candelas L. (2006) Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. **Postharvest Biology and Technology** **39(2)**: 115–124.
- Ballester A. R., Lafuente M. T. & González-Candelas L. (2013) Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part II: gene expression and metabolite accumulation in the response of fruits to *Penicillium digitatum* infection. **Food Chemistry** **136 (1)**: 285-291.
- Bankova V., Boudourova-Krasteva G., Popov S., Sforcin J. M. & Funari S. R. C. (1998) Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie** **29 (4)**: 361-367.
- Bankova V., Castro S. L. & Marcucci M. C. (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie** **31**: 3-15.

- Banskota A. H., Tezuka Y. & Kadota S. (2001) Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytoterapy Research** **15** (7): 561-571.
- Barbosa J. D. F., Silva V. B., Alves P. B., Gumina G., Santos R. L. C., Sousa D. P. & Cavalcanti S. C. H. (2012) Structure-activity relationships of euganol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science** **68**: 1478-1483.
- Barros-Battesti D. M. (1998) Estudos de carrapatos e pequenos mamíferos silvestres naturalmente infectados com espiroquetas semelhantes à *Borrelia*, no Município de Itapevi, Estado de São Paulo. 142 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Billeter S. A., Kasten R. W., Killmaster L. F., Breitschwerdt E. B., Levin M. L., Levy M. G., Kosoy M. Y. & Chomel B. B. (2012) Experimental infection by capillary tube feeding of *Rhipicephalus sanguineus* with *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhofii*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** **35**: 9-15.
- Biswas K., Chattopadhyay I., Baerjee R. K. & Bandyopadhyay U. (2002) Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science** **82**: 1336–1345.
- Bohlmann F. & Jakupovic J. (1979) New sesquiterpene acids, sesquiterpene diol, flavones and other aromatic-compounds from *Flourensia heterolepsis*. Naturally occurring terpene derivatives. **Phytochemistry** **18**: 1189-1194.
- Bohlmann F., Zdero C., Grenz M., Dhar A. K., Robinson H. & King R. M. (1981) Naturally-occurring terpene derivatives: 5 diterpenes and other constituents from 9 *Bacharis* species. **Phytochemistry** **20**: 281-286.
- Bonvehí J. S. & Gutiérrez A. L. (2012) The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (North Spain). **World Journal of Microbiology and Biotechnology** **28**: 1351-1358.

- Cabrera R. R. & Labruna M. B. (2009) Influence of photoperiod and temperature on the larval behavioral diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology** **46** (6): 1303-1309.
- Cafrune M. M., Aguirre D. H., Mangold A. J. & Guglielmone A. A. (1995) Experimental studies of the rate of infection of *Boophilus microplus* eggs with *Babesia bovis*. **Research in Veterinary Science** **58** (3): 284-285.
- Cajuste J. F. & Lafuente M. T. (2007) Ethylene-induced tolerance to non-chilling peel pitting as related to phenolic metabolism and lignin content in 'Navelate' fruit. **Postharvest Biology and Technology** **45**(2): 193–203.
- Cam Y., Koc A. N., Silici S., Günes V., Buldu H., Onmaz A. C. & Kasap F. F. (2009) Treatment of dermatophytosis in young cattle with propolis and Whitfield's ointment. **The Veterinary Record** **165**: 57-58.
- Castaldo S. & Capasso F. (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia** **73**(1): S1-S6.
- Castro-Janer E., Rifran L., Piaggio J., Gil A., Miller R. J. & Schumaker T. T. S. (2009) *In vitro* tests to establish LC₅₀ and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. **Veterinary Parasitology** **162** (1-2): 120-128.
- Cetin H., Cilek J. E., Oz E., Aydin L., Deveci O. & Yanikoglu A. (2010) Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and γ-terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology** **170**: 287-290.
- Chagas A. C. S. (2004) Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** **13**: 156-160.
- Clemente M. A., Monteiro C. M. O., Scoralik M. G., Gomes F. T., Prata M. C. A. & Daemon E. (2010) Acaricidal activity of the essential oils from *Eucalyptus citriodora* and

- Cymbopogon nardus* on larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research** **107**: 987-992.
- Colwell D. D., Dantas-Torres F. & Otranto D. (2011) Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. **Veterinary Parasitology** **182**: 14–21.
- Cruz-Vázquez C. & Garcia-Vázquez Z. (1999) Seasonal distribution of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) on dogs in an urban area of Morelos, Mexico. **Experimental and Applied Acarology** **23**: 277–280.
- Cuesta-Rubio O., Frontana-Uribe B. A., Ramirez-Apan T. & Cardenas J. (2002) Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis: biological activity of nemorosone. **Zeitschrift fur Naturforschung C** **57**: 372-378.
- Cunha N. C., Rangel C. P., Piranda E. M., Rezende J., Teixeira R. C. & Fonseca A. H. (2010) Assessment of weight gain and biological parameters of *Rhipicephalus sanguineus* females fed artificially via capillary tubes. **Ciência Rural** **40** (4): 928-933.
- Daemon E., Monteiro C. M. O., Rosa L. S., Clemente M. A. & Arcoverde A. (2009) Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research** **105**: 495-497.
- Damiani N., Fernández N. J., Maldonado L. M., Álvarez A. R., Eguaras M. J. & Marcangeli J. A. (2010) Bioactivity of propolis from different geographical origins on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). **Parasitology Research** **107**: 31-37.
- Dantas-Torres F. & Figueredo L. A. (2006) Canine babesiosis: a Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology** **141**: 197–203.
- Dantas-Torres F. (2008) The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary Parasitology** **152**: 173-185.
- Dantas-Torres F., Chomel B. B. & Otranto D. (2012) Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology** **28** (10): 437-446.

- De La Fuente J. & Kocan K. M. (2006) Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. **Parasite Immunology** **28**: 275-283.
- De Lemos E. R. S., Alvarenga F. B. F., Cintra M. L., Ramos M. C., Paddock C. D., Ferebee T.L., Zaki S. R., Ferreira F. C. C., Ravagnani R. C., Machado R. D., Guimarães M. A. A. & Coura J. R. (2001) Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **65** (4): 329-334.
- Diaz-Carballo D., Malak S., Bardenheuer W., Freistuehler M. & Reusch H. P. (2008) The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. **Bioorganic Medicinal Chemistry** **16**: 9635-9643.
- Dryden M. W. & Payne P. A. (2004) Biology and control of ticks infesting dogs and cats in North America. **Veterinary Therapy** **26**: 2-16.
- Ducornez S., Barré N., Miller R. J. & de Garine-Wichatitsky M. (2005) Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. **Veterinary Parasitology** **130**: 285-292.
- Endo S., Matsunaga T., Kanamori A., Otsuji Y., Nagai H., Sundaram K., El-Kabbani O., Toyooka N., Ohta S. & Hara A. (2012) Selective inhibition of human type-5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) by baccharin, a component of Brazilian propolis. **Journal of Natural Products** **75**: 716-721.
- Estrada G. O. D., Silva J. M. & Antunes O. A. C. (2008) Artepillin C: a review. **Letters in Drug Design & Discovery** **5**: 88-92.
- FAO (Food and Agriculture Organization) (2004) Resistance management and integrated parasite control in ruminants – Guidelines; Module 1-Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention. **Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome** pp 53.
- Feresin G. E., Tapia A., Gimenez A., Ravelo A. G., Zacchino S., Sortino M. & Schmeda-Hirschman G. (2003) Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis*

- grisebachii* and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology** **89** (1): 73-80.
- Fernandes F. F. (2000) *In vitro* activity of permethrin, cipermethrin and deltamethrin on larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** **52**: 621-626.
- Fernades F. F. (2001) Toxicological effects and resistance to pyrethroids in *Boophilus microplus* from Goiás-Brazil. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** **53**: 538-543.
- Fernandes F. F. & Freitas E. P. S. (2007) Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology** **147**: 150-154.
- Fernandes-Silva C. C., Salatino A., Negri G. & Salatino M. L. F. (2012) Chemical characterization of three samples of Brazilian propolis by NMR and GC/MS. **Pharmaceutical Biology** **50** (5): 593-593.
- Fernandes-Silva C. C., Salatino A., Negri G., Breyer E. & Salatino M. L. F. (2013) Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. **Química Nova** (*in press*).
- Fernandez-Sales A., Alonso-Diaz M. A., Acosta-Rodriguez R. , Torres-Acosta J. F. J., Sandoval-Castro C. A. & Rodriguez-Vivas R. I. (2011) *In vitro* acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology** **175**: 113-118.
- Ferrarini S. R., Duarte M. O., da Rosa R. G., Rolim V., Eifler-Lima V. L., von Poser G. & Ribeiro V. L. S. (2008) Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and β -amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology** **157**: 149-153.

- Ferraz A. B. F., Balbino J. M., Zini C. A., Ribeiro V. L., Bordignon S. A. L. & von Poser G. (2010) Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. **Parasitology Research** **107**: 243-248.
- Finney D. J. (1980) Probit Analysis. 3rd ed. **Cambridge University Press**.
- Fisher G., Cleff M. B., Dummer L. A., Paulino N., Paulino A. S., Vilela C. O., Campos F. S., Storch T., Vargas G. D., Hubner S. O. & Vidor T. (2007) Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. **Veterinary Immunology and Immunopathology** **116 (1-2)**: 79-84.
- Freitas E. P. S., Zapata M. T. A. G. & Fernandes F. F. (2011) Monitoring of resistance or susceptibility of adults and larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) to synthetic acaricides in Goiás, Brazil. **Experimental and Applied Acarology** **53**: 189-202.
- Freitas S. F., Shinohara L., Sforcin J. M. & Guimarães S. (2006) In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine** **13**: 170–175.
- Furlong J., Martins J. R. & Prata M. C. A. (2007) O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária** **159**: 26-32.
- Galvão M. A., Lamounier J. A., Bonomo E., Tropia M. S., Rezende E. G., Calic S. B., Chamone, C. B., Machado M. C., Otoni M. E., Leite R. C., Caram C., Mafra C. L. & Walker D. H. (2002) Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do estado de Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública** **18**: 1593-1597.
- Gardana C., Scaglianti M., Pietta P. & Simonetti P. (2007) Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** **45**: 390-399.
- Garedew A., Lamprechet I., Schmolz E. & Schricker B. (2002) The varroacidal action of propolis: a laboratory assay. **Apidologie** **33 (1)**: 41-50.

- Garedew A., Schmolz E. & Lamprecht I. (2004) Effect of the bee glue (propolis) on the calorimetrically measured metabolic rate and metamorphosis of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Thermochimica Acta** **413** (1-2): 63-72.
- Ghisalberti, E.L. (1979) Propolis: a review. **Bee World** **60**: 59-84.
- Ghosh S., Sharma A. K., Kumar S., Tiwari S. S., Rastogi S., Srivastava S., Singh M., Kumar R., Paul S., Ray D. D., Chaudhuri P., Rawat A. K. S. (2011) *In vitro* and *in vivo* efficacy of *Acorus calamus* extract against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research** **108**: 361– 370.
- Ghosh S., Tiwari S. S., Srivastava S., Sharma A. K., Kumar S., Ray D. D. & Rawat A. K. S. (2013) Acaricidal properties of *Ricinus communis* leaf extract against organophosphate and pyrethroids resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology** **192**: 259-267.
- Giglioti R., Forim M. R., Oliveira H. N., Chagas A. C. S., Ferrezini J., Brito L. G., Falcoski T. O. R. S., Albuquerque L. G. & Oliveira M. C. S. (2011) *In vitro* acaricidal activity of Neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology** **181** (2–4): 309–315.
- Gomes G. A., Monteiro C. M. O., Senra T. O. S., Zeringota V., Calmon F., da Silva M. R., Daemon E., Gois R. W. S., Santiago G. M. P. & de Carvalho M. G. (2012) Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research** **111** (6): 2423-2430.
- Gómez-Caravaca A.M., Gomez-Romero D., Arráez-Román M., Segura-Carretero A. & Fernandez-Gutiérrez A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis** **41**: 1220-1234.
- Gonsioroski A. V., Bezerra I. A., Utiumi K. U., Driemeier D., Farias S. E., Vaz Jr I. S. & Masuda A. (2012) Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in

- Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females. **Experimental Parasitology** **130**: 359-363.
- González R., Corcho I., Ramirez D., Rodriguez S., González A., Ancheta O., Merino N. & Pascual C. (1994) Hepatoprotective effects of propolis extract on paracetamol-induced liver damage in mice. **Phytotherapy Research** **8** (4): 229-232.
- GraphPad Software (2009) **GraphPad Prism 5** versão 5.03 para Windows.
- Grisi L., Massard C. L., Moya Borja G. E. & Pereira J. B. (2002) Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária** **125**: 8-10.
- Guglielmone A. A., Szabó M. P. R., Martins J. R. de S. & Estrada-Peña A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal *In*: Barros-Battesti, D.M., Arzua, M. & Bechara, G.H. (2006) Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, p 115-138.
- Guglielmone A. A., Robbins R. G., Apanaskevich D. A., Petney T. N., Estrada-Peña A., Horak I., Shao R. & Barker S. C. (2010) The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa** **2528**: 1-28.
- Guimarães J. H., Tucci E. C. & Barros-Battisti D. M. (2001) Ectoparasitos de importância veterinária. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 218 p.
- Harmatha J. & Nawrot J. (2002) Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxiphenyl (piperonyl) structure moiety. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **104**: 51-60.
- Horak I. G., Camicas J-L. & Keirans J. E. (2002) The Argasidae, ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology** **28**: 27-54.
- Ishida V. F. C., Negri G., Salatino A., Bandeira M. F. C. L. (2011) A new type of propolis: prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. **Food Chemistry** **125**: 966-972.

- Ítavo C. C. B. F., Morais M. G., Costa C., Ítavo L. C. V., Franco G. L., da Silva J. A. & Reis F. A. (2011) Addition of propolis or monensin in the diet: behavior and productivity of lambs in feedlot. **Animal Feed Science and Technology** **165**: 161-166.
- Jonsson N. N. (2006) The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology** **137 (1-2)**: 1-10.
- Jorge R., Furtado N. A. J. C., Sousa J. P. B., da Silva-Filho A. A., Gregorio L. E., Martins C. H. G., Soares A. E. E., Bastos J. K., Cunha W. R. & Silva M. L. A. (2008) Brazilian propolis: Seasonal variation of the prenylated *p*-coumaric acids and antimicrobial activity. **Pharmaceutical Biology** **46 (12)**: 889-893.
- Kimoto T., Miyata S. K., Hino K., Micallef M. J., Hanayay T., Arai S., Ikeda M. & Kurimoto M. (2001) Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. **Virchows Archiv – An International Journal of Pathology** **438 (3)**: 259-270.
- Klafke G. M., Sabatini G. A., Albuquerque T. A., Martins J. R., Kemp D. H., Miller R. J., Schumaker T. T. S. (2006) Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology** **142**: 386–390.
- Klafke G. M., Albuquerque T. A., Miller R. J. & Schumaker T. T. S. (2010) Selection of an ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Veterinary Parasitology** **168**: 97-104.
- Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R. & Popov S. (1999) Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology** **64**: 235-240.
- Kumazawa S., Yoneda M., Shibata I., Kaneda J., Hamasaka T. & Nakayama T. (2003) Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee

- behavior and phytochemical analysis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** **51** (6): 740-742.
- Kumazawa S., Hamasaka T. & Nakayama T. (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry** **84** (3): 329-339.
- Kumazawa S., Nakamura J., Murase M., Miyagawa M., Ahn M. R. & Fukumoto S. (2008) Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. **Naturwissenschaften** **95**: 781-786.
- Labruna M. B. & Campos Pereira M. (2001) Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária** **30**: 24-32.
- Labruna M. B., Kasai N., Ferreira F., Faccini J. L. H. & Gennari S. M. (2002) Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São paulo Brazil. **Veterinary Parasitology** **105**: 65-77.
- Labruna M. B. (2009) Ecology of Rickettsia in South America. **Rickettsiology and Rickettsial diseases-Fifth International Conference** **1166**: 156-166.
- Lage T. C. A., Montanari R. M., Fernandes S. A., Monteiro C. M. O., Senra T. O. S., Zeringota V., Calmon F., Matos R. S., Daemon E. (2013) Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research** **112** (2): 863-869.
- Lebouvier N., Hue T., Hnawia E., Lesaffre L., Menut C. & Nour M. (2013) Acaricidal activity of essential oils from five endemic conifers of New Caledonia on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research** **112**: 1379-1384.
- Lees K. & Bowman A. S. (2007) Tick neurobiology: recent advances and the post-genomic era. **Invertebrate Neuroscience** **7**(4): 183-198.
- Leora Software (2004) **Polo Plus Probit and Logit Analysis**: User's Guide. Berkeley, CA, USA. 36 p.
- Lima M.G. (2006) A produção de própolis no Brasil. São João da Boa Vista: UNIFEOB, v. 1, 120 p.

- Lotti C., Campo Fernandez M., Piccinelli A. L., Cuesta-Rubio O., Marquez-Hernandez I. & Rastrelli L. (2010) Chemical constituents of red Mexican propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **58**: 2209-2213.
- Louly C. C. B., Fonseca I. N., Oliveira V. F., Linhares G. F. C., Menezes L. B. & Borges L. M. F. (2007) Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiânia, Goiás, Brazil. **Ciência Rural** **37**: 464–469.
- Lustosa S. R., Galindo A. B., Nunes L. C. C., Randau K. P. & Rolin Neto P. J. (2008) Propolis: Updates on chemistry and pharmacology. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** **18**: 447-454.
- Ma S. G., Tang W. Z., Liu Y. X., Hu Y. C., Yu S. S., Zhang Y., Chen X. G., Qu J., Ren J. H., Liu Y. B., Xu S., Liu J., Liu Y. Y., Li Y., Lü H. N. & Wu X. F. (2011) Prenylated C₆-C₃ compounds with molecular diversity from the roots of *Illicium oligandrum*. **Phytochemistry** **72**: 115-125.
- Madzimure J., Nyahangare E. T., Hamudikuwanda H., Hove T., Stevenson P. C., Belmain S. R. & Mvumi B. M. (2011) Acaricidal efficacy against cattle ticks and acute oral toxicity of *Lippia javanica* (Burm F.) Spreng. **Tropical Animal Health Production** **43**: 481-489.
- Magadum S., Modal D. B. & Ghosh S. (2009) Comparative efficacy of *Annona squamosa* and *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus* Izatnagar isolate. **Parasitology Research** **105**: 1085-1091.
- Magro Filho O. & Perri de Carvalho A. C. (1990) Application of propolis to dental sockets and skin wounds. **Journal of Nihon University School of Dentistry** **32**: 4-13.
- Marcucci M.C. (1995) Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie** **26**: 83-99.
- Markhan K. R., Mitchell K. A., Wilkins A. L., Daldy J. A. & Lu Y. (1996) HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis. **Phytochemistry** **42**: 205-211.

- Martinez-Velazquez M., Castillo-Herrera G. A., Rosario-Cruz R., Flores-Fernandez J. M., Lopez-Ramirez J., Hernandez-Gutierrez R. & Lugo-Cervantes E. C. (2011) Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum brasiliensis* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research** **108**: 481-487.
- Matsuda A. H. & Almeida-Muradian L. B. (2008) Validated method for the quantification of artepillin-C in Brazilian propolis. **Phytochemical Analysis** **19** (2): 179-183.
- Matsuno T., Jung S. K., Matsumoto Y., Santo M., Monkawa I. (1993) Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5,-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. **Anticancer Research** **17**: 3565-3568.
- Matsuno T., Matsumoto Y., Saito M. & Morikawa J. (1997) Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences** **52** (9-10): 702-704.
- Mihai C. M., Marghitas L. A., Dezmirean D. S., Chirila F., Moritz R. F. A. & Schluns H. (2012) Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology** **110**: 68-72.
- Mishima S., Ono Y., Araki Y., Akao Y. & Nozawa Y. (2005) Two related cinnamic acid derivative from Brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induced growth inhibition in allografted sarcoma S-180 in mice. **Biological Pharmaceutical Bulletins** **28** (6): 1025-1030.
- Monteiro C. M. O., Daemon E., Clemente M. A., Rosa L. S. & Maturano R. (2009) Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research** **105**: 1093-1097.
- Monteiro C. M. O., Daemon E., Silva A. M. R., Maturano R. & Amaral C. (2010) Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research** **106**: 615-619.

- Naito Y., Yasumuro M., Kondou K. & Ohara N. (2007) Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research** **21**: 452-456.
- Nakamura R., Nakamura R., Watanabe K., Oka K., Ohta S., Mishima S. & Teshima R. (2010) Effects of propolis from different areas on mast cell degranulation and identification of the effective components in propolis. **International Immunopharmacology** **10 (9)**: 1107-1112.
- Nascimento E. A., Chang R., Morais S. A. L., Piló-Veloso D. & Reis D. C. (2008) An easily detectable chemical marker for the *Baccharis dracunculifolia* propolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **18 (3)**: 379-386.
- Needham G. R. & Teel P. D. (1991) Off-host physiological ecology of ticks. **Annual Review of Entomology** **36**: 659-681.
- Negri G., Salatino M. L. F. & Salatino A. (2003) Unusual chemical composition of a sample of Brazilian propolis, as assessed by analysis of a chloroform extract. **Journal of Apicultural Research** **42**: 53-56.
- Oliveira P.F., Monteiro Neto M.A.B., Leandro L.F., Bastos J.K., da Silva Filho A.A. & Tavares D.C. (2011) *In vivo* antigenotoxicity of baccharin, an important constituent of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology** **109**: 35-41.
- Omene C. O., Wu J. & Frenkel K. (2012) Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells. **Investigation of New Drugs** **30**: 1279-1288.
- Onofrio V. C., Venzal J. M., Pinter A. & Szabó M. P. Família Ixodidae: características gerais, comentários e chave para gêneros In: Barros-Battesti D. M., Arzua M. & Bechara G. H. (2006) Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, p 29-39.

- Park E. H. & Kahng J. H. (1999) Supressive effects of propolis in rat adjuvante arthritis. **Archives of Pharmacal Research** **22(6)**: 554-558.
- Park Y. K., Ikegaki M. & Alencar S. M. (2000) Classificação das própolis brasileiras a partir das suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce** **58**: 3-11.
- Park Y. K., Paredes-Guzman J. F., Aguiar C. L., Alencar S. M. & Fujiwara F. Y. (2004) Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **52**: 1100-1103.
- Park Y. K., Fukuda I., Ashida H., Nishiumi S., Yoshida K. I., Dausch A., Sato H. H. & Pastore G. (2005) Supressive effects of ethanolic extracts from propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **53 (26)**: 10306-10309.
- Pellati F., Orlandini G., Pinetti D. & Benvenuti S. (2011) HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** **55**: 934-948.
- Pereira A. S., Seixas F. R. M. S. & Aquino Neto F. R. (2002) Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova** **25 (2)**: 321-326.
- Pereira J. R. & Famadas K. M. (2006) The efficiency of extracts of *Dahlstedtia pentaphylla* (Leguminosae, Papilionoidae, Millettiedae) on *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) in artificial infested bovines. **Parasitol Research** **142**: 192-195.
- Pereira M. C., Labruna M. B., Szabó M. J. P. & Klafke G. M. (2008) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência. 1ed. São Paulo: **Editora MedVet**, vol. 1, 192 p.
- Pirali-Kheirabadi K., Razzaghi-Abyaneh M. & Halajian A. (2009) Acaricidal effect of *Pelargonium roseum* and *Eucalyptus globulus* essential oils against adult stage of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* in vitro. **Veterinary Parasitology** **162**: 346-349.

- Pirali-Kheirabadi K. & Teixeira da Silva J. (2010) *Lavandula angustifolia* essential oil as a novel and promising natural candidate for tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) control. **Experimental Parasitology** **126**: 184-186.
- Pohl P. C., Klafke G. M., Carvalho D. D., Martins J. R., Daffre S., Vaz Jr I. S. & Masuda A. (2011) ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **International Journal of Parasitology** **41**: 1323-1333.
- Popova M., Graikou K., Chinou I. & Bankova V. (2010) GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **58**: 3167-3176.
- Puker A., Abot A. R., Matias R., Rodrigues S. R. & Pinto A. M. (2010) Propolis produced by Africanized honeybees in the Cerrado-Pantanal ecotone: effects of seasonality in production and physic-chemical characteristics. **Sociobiology** **56** (1): 149-162.
- Rafael M. S., Hereira-Rojas W. J., Roper J. J., Nunomura S. M. & Tadei W. P. (2008) Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. **Genetic Molecular Research** **7**: 772-781.
- Reck Jr. J., Berger M., Terra R. M. S., Marks F. S., da Silva Vaz Jr. I., Guimarães J. A. & Termignoni C. (2009) Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Research in Veterinary Science** **86**: 56-62.
- Resende R. B. & Borges L. F. H. (2008) Exportações março/2008. **Coordenação Nacional da rede APIS** - UAGRO - Sebrae Nacional.
- Ribeiro M. F. B. & Guimarães A. M. (1998) Encephalitozoon-like microsporidia in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology** **35** (6): 1029-1033.

- Ribeiro V. L. S., Toigo E., Bordignon S. A. L., Gonçalves K. & von Poser G. (2007) Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hipericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology** **147**: 199-203.
- Ribeiro V. L. S., Avancini C., Gonçalves K., Toigo E. & von Poser G. (2008a) Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology** **151**: 351-354.
- Ribeiro V. L. S., Rolim V., Bordignon S., Henriques A. T., Dorneles G. G., Limberger R. P. & von Poser G. (2008b) Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitology Research** **102**:531-535.
- Ribeiro V. L. S., dos Santos J. C., Bordignon S. A. L., Apel M. A., Henriques A. T. & von Poser G. L. (2010) Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bioresource Technology** **101**: 2506-2509.
- Ribeiro V. L. S., dos Santos J. C., Martins J. R., Schripsema J., Siqueira I. R., von Poser G. L. & Apel M. F. A. (2011) Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology** **179**: 195–198.
- Righi A. A. (2008) Perfil químico de amostras de própolis brasileiras. **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Instituto de Biociências para obtenção do título de Mestre em Ciências; 102p.
- Righi A. A., Alves T. R., Negri G., Marques L. M., Breyer H. & Salatino A. (2011) Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidante and antimicrobial activities. **Journal of the Science and Food Agricultural** **91**: 2363-2370.
- Righi A. A., Motta L. B., Klafke G. M., Pohl P. C., Furlan C. M., Santos D. Y. C., Salatino M. L. F., Negri G., Labruna M. B. & Salatino A. (2013a) Chemical composition and efficacy

- of dichloromethane extract of *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae) against the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology** **192**: 292-295.
- Righi A. A., Negri G. & Salatino A. (2013b) Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** <http://dx.doi.org/10.1155/2013/267878>.
- Rosado-Aguilar J. A., Aguillar-Caballero A. J., Rodriguez-Vivas R. I., Borges-Argaez R., Garcia-Vazques Z. & Mendez-Gonzalez M. (2010) Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) **Veterinary Parasitology** **168**: 299-303.
- Rugg D. & Hair J.A. (2007) Dose determination of a novel formulation of metaflumizone plus amitraz for control of cat fleas (*Ctenocephalides felis felis*) and brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) on dogs. **Veterinary Parasitology** **150**: 203-208.
- Rust M. K. (2005) Advances in the control of *Ctenocephalides felis felis* (cat flea) on cats and dogs. **Trends Parasitology** **21**: 232-236.
- Salatino A., Teixeira E. W., Negri G. & Message D. (2005) Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** **2**: 33-38.
- Salatino A., Fernandes-Silva C. C., Righi A. A. & Salatino M. L. F. (2011) Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Products Report** **28**: 925-936.
- Sforcin J. M. & Bankova V. (2011) Propolis: Is there a potencial for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology** **133**: 253-260.
- Silici S. & Kutluca S. (2005) Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology** **99** (1): 69-73.
- Silva W. C., Martins J. R. S., de Souza H. E. M., Heinzen H., Cesio M. V., Mato M., Albrecht F., de Azevedo J. L. & de Barros N. M. (2009) Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales:

- Piperaceae) from the Amazon Forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology** **164**: 267-274.
- Srivastava R., Ghosh S., Mondal D. B., Azhahianambi P., Singhal P. S. D., Pandey N. N., Swarup D. (2008) Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. **Parasitology Research** **104**: 149-153.
- Szabó M. P. J., Cunha T. M., Pinter A. & Vicentini F. (2001) Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology** **25 (10-11)**: 909-916.
- Tani H., Hasumi K., Tatefuji T., Hashimoto K., Koshino H & Takahashi S. (2010) Inhibitory activity of Brazilian green propolis components and their derivatives on the release of cys-leukotrienes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** **18**: 151-157.
- Tatli Seven P., Seven I., Yilmaz M. & Simsek U. G. (2008) The effects of Turkish propolis on growth and carcass characteristics in broilers under heat stress. **Animal Feed Science and Technology** **146**: 137-148.
- Teixeira E. W., Message D., Negri G., Salatino A. & Stringheta P. C. (2010) Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** **7 (3)**: 307-315.
- Topalkara A., Vural A., Polat Z., Toker M.I., Arici M.K., Ozan F. & Cetin A. (2007) *In vitro* amoebicidal activity of propolis on *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics** **23 (1)**: 40-45.
- Trumble J. T. (2002) Caveat emptor: safety considerations for natural products used in arthropod control. **American Entomologist** **48**: 7-13.
- Trusheva B., Popova M., Bankova V., Tsvetkova I., Naydenski H. & Sabatini A. G. (2003) A new type of European propolis, containing bioactive labdanos. **Rivista Italiana E.P.P.O.S.** **36**: 3-7.

- Trusheva B., Popova M., Naydenski H., Tsvetkova I., Rodriguez J. G. & Bankova V. (2004) New polyisoprenulated benzophenones from Venezuelan propolis. **Fitoterapia** **75**: 683-689.
- Ündeger Ü. & Basaran N. (2005) Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes *in vitro*: induction of DNA damage. **Archives of Toxicology** **79**: 169-176.
- Uspensky I. & Ioffe-Uspensky I. (2002) The dog factor in brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) infestations in and near human dwellings. **International Journal of Medical Microbiology** **291** (Suppl.): 156–163.
- Victorino F. R., Franco S. L., Svidzinski T. I. E., Ávila-Campos M. J., Cuman R. K. N., Hidalgo M. M. & Bersani-Amado C. A. (2007) Pharmacological Evaluation of propolis solutions for endodontic use. **Pharmaceutical Biology** **45** (9): 721-727.
- Wieckiewicz W., Miernik M., Wieckiewicz M. & Morawiec T. (2013) Does propolis help to maintain oral health? **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** vol **2013**: 8 páginas. DOI: 10.1155/2013/351062.
- Wojtyczka R. D., Kepa M., Idzik D., Kubina R., Kabala-Dzik A., Dziedzic A. & Wasik T. J. (2013) *In vitro* antimicrobial activity of ethanolic extract of Polish propolis against biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* strain. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/590703>.
- www.agricultura.mg.gov.br
- www.embrapa.br
- Yang Y. C., Lee S. H., Lee W. J., Choi D. H. & Ahn Y. J. (2003) Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **51**: 4884–4888.
- Zhuang P. Y., Zhang G. J., Wang X. J., Zhang Y., Yu S. S., Ma S. G., Liu Y. B., Qu J., Li Y., Xu S., Lü H. N., Chen X., Li L., Si Y. K. & Zhang D. (2013) Prenylated C₆-C₃ compounds from the roots of *Illicium henryi*. **Phytochemistry** **86**: 176-183.

11 Anexo I

Valores dos extratos obtidos ao longo do isolamento biomonitorado da própolis verde de Lavras (MG)

Com o intuito de mostrar as quantidades dos extratos das frações e subfrações obtidas ao longo do isolamento biomonitorado referente à atividade acaricida contra *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma cajennense*, o fluxograma a seguir (figura 1) foi elaborado.

Figura 1: Fluxograma do fracionamento sucessivo (I-V) ao qual foi submetido o extrato clorofórmico bruto da própolis verde de Lavras (MG) para o isolamento biomonitorado. Os retângulos coloridos referem-se aos extratos mais ativos, a partir dos quais (números coloridos) o fracionamento foi desenvolvido até a obtenção das substâncias I – IV isoladas por CLAE preparativo.

12 Anexo II

Estudos preliminares sobre o mecanismo de ação da subfração ativa clorofórmio : acetato de etila da própolis de Lavras (MG)

De forma a contribuir para o conhecimento da ação acaricida da própolis de Lavras foi realizado estágio de 4 meses na Universidade Estadual da Carolina do Norte (Raleigh, Carolina do Norte - EUA), sob a orientação do Prof. Dr. R. Michael Roe. O objetivo foi desenvolver estudos preliminares para compreender o mecanismo de ação da subfração ativa clorofórmio : acetato de etila.

12.1 Material e Métodos

12.1.1 Carrapatos

Indivíduos de *Dermacentor variabilis* (Say, 1821) foram utilizados para o estudo preliminar do mecanismo de ação do extrato ativo de própolis verde brasileira.

12.1.2 Procedência

Dermacentor variabilis: originária da Virgínia - EUA. Cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Daniel E. Sonenshine, da Old Dominion University, Virgínia, EUA.

12.1.3 Manutenção da colônia

A colônia de *D. variabilis* foi mantida pela equipe do Prof. Dr. Daniel E. Sonenshine, na Old Dominion University (Virgínia, EUA) e gentilmente enviados à North Caroline State University (Carolina do Norte, EUA) sempre que necessário.

12.1.4 Teste de Aplicação Tópica

Indivíduos machos adultos não alimentados de carrapato americano do cão, *Dermacentor variabilis*, foram submetidos ao teste de aplicação tópica, de acordo com a

metodologia descrita por MacAllister & Adams (2010) com modificações. Nesse bioensaio, cinco tratamentos e um controle foram empregados, a fim de se obter dados comportamentais dos animais, bem como verificar a taxa de mortalidade. O extrato da subfração ativa (clorofórmio : acetato de etila), previamente avaliado com os TPLs para *A. cajennense*, *R. sanguineus* e *R. microplus*, foi empregado. Seis diluições seriadas do extrato foram preparadas em TCE e azeite de oliva na proporção de 2:1. Após completa evaporação do solvente, em capela, 1 µL de cada solução de extrato foi aplicada na região ventral dos carrapatos (figura 1). Foram utilizados cinco indivíduos de *D. variabilis* por tratamento: 0,0 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,5 mg/mL, 2 mg/mL, 2,5 mg/mL e 3 mg/mL.

Figura 1: Teste de aplicação tópica da subfração clorofórmio acetato de etila em TCE e azeite de oliva (2:1) na região ventral de *D. variabilis*.

Observações comportamentais relacionadas à capacidade de escalar (figura 2) e refúgio da luz (figura 3), bem como a taxa de mortalidade, foram avaliadas após 30 minutos, 24 e 48 horas do início da aplicação do extrato, de acordo com a metodologia descrita por Weldon e colaboradores (2011).

Figura 2: Avaliação da capacidade de escalar de *D. variabilis* após a exposição ao extrato de própolis de Lavras-MG, subfração clorofórmio : acetato de etila.

Figura 3: Avaliação da busca de refúgio à luz de *D. variabilis* após a exposição ao extrato de própolis de Lavras-MG, subfração clorofórmio : acetato de etila.

12.1.5 Teste de Injeção

O teste de injeção em carrapatos foi realizado em indivíduos machos adultos não alimentados de *D. variabilis*, de acordo com a metodologia descrita por Thompson e colaboradores (2005). O extrato da subfração ativa (clorofórmio : acetato de etila), previamente avaliado com os TPLs para *A. cajennense*, *R. sanguineus* e *R. microplus*, foi

empregado. Cinco diluições seriadas do extrato foram preparadas em TCE e azeite de oliva na proporção de 2:1. Após completa evaporação do solvente, em capela, 1 µL de cada solução de extrato foi injetada na região ventral dos carrapatos entre o terceiro e o quarto pares de pernas (figura 4) com auxílio de uma seringa de insulina. Foram utilizados cinco indivíduos de *D. variabilis* por tratamento: 0,0 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,35 mg/mL e 0,5 mg/mL.

Figura 4: Teste de injeção do extrato de própolis de Lavras-MG, subfração clorofórmio : acetato de etila, em indivíduos machos adultos não alimentados de *D. variabilis*.

Dados comportamentais, capacidade de escalada, busca de abrigo da luz e taxa de mortalidade foram observados após 30 minutos do início do bioensaio.

12.1.6 Análise estatística

Foi feita análise estatística descritiva para obtenção de médias, desvios padrões e taxas de mortalidade. Foram realizadas análises não paramétricas com o auxílio do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, 2009). Para avaliação da significância das taxas de mortalidade observadas para cada tratamento, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Todos os resultados obtidos que apresentaram $p \leq 0.05$ foram considerados significantes. Os resultados foram representados pela média e desvio padrão.

12.2 Resultados

Dados comportamentais e toxicológicos foram observados após a aplicação tópica da subfração ativa clorofórmio : acetato de etila, como pode ser constatado nas figuras 5 a 8, a seguir. Nota-se que nos primeiros 30 minutos de observação os carrapatos tratados ficaram mais expostos à luz; isto é, 40% dos animais não buscaram refúgio. Porém, não foi constatada diferenças comportamentais entre os tratamentos. Com relação à capacidade de escalar, durante esse intervalo de tempo todos os animais do experimento (controle e tratamentos) estavam aptos (figura 5).

Figura 5: Teste de aplicação tópica da subfração clorofórmio : acetato de etila em indivíduos machos adultos de *Dermacentor variabilis*: T I 0,5 mg/mL; T II 1,5 mg/mL; T III 2 mg/mL; T IV 2,5 mg/mL; T V 3 mg/mL. Dados comportamentais obtidos após 30 minutos da aplicação.

No entanto, nas 24 horas subsequentes ao início do experimento os indivíduos tratados apresentaram alterações comportamentais (figuras 6). Constatou-se mortalidade de 20, 20, 40 e 60% nos indivíduos tratados com 1,5 mg/mL, 2 mg/mL, 2,5 mg/mL e 3 mg/mL de extrato (T II, T III, T IV e T V, respectivamente). E, dentre os animais que permaneceram vivos nos tratamentos II e III apenas 40% conseguiram escalar, os carrapatos dos demais tratamentos (T IV e T V) perderam completamente tal habilidade. Além disso, vale ressaltar que os carrapatos do tratamento I (1,5 mg/mL) mesmo não apresentando nenhuma taxa de mortalidade nas primeiras 24 horas de experimento, perderam consideravelmente a

habilidade de escalar (apenas 60% dos indivíduos tinham coordenação motora para exercer tal atividade).

Figura 6: Teste de aplicação tópica da subfração clorofórmio : acetato de etila em indivíduos machos adultos de *Dermacentor variabilis*: T I 0,5 mg/mL; T II 1,5 mg/mL; T III 2 mg/mL; T IV 2,5 mg/mL; T V 3 mg/mL. Dados comportamentais obtidos após 24 horas da aplicação.

Na figura 7 é possível verificar que após 48 horas do início do experimento de aplicação tópica os carrapatos avaliados estavam ainda mais intoxicados pelo extrato ativo da própolis de Lavras. A taxa de mortalidade dos tratamentos II, III, IV e V aumentaram para 40, 40, 60 e 100%, respectivamente. Além disso, os indivíduos remanescentes destes tratamentos ficaram completamente expostos à luz e perderam completamente a habilidade de escalar, exceto um indivíduo do T II. É interessante notar que os indivíduos tratados com a menor concentração (T I 1,5 mg/mL) perderam consideravelmente a habilidade de escalar, porém não foram a óbito nas 48 horas subsequentes ao início do tratamento.

Na figura 8 nota-se a evolução da taxa de mortalidade após 0,5, 24 e 48 horas do início do experimento de aplicação tópica em *Dermacentor variabilis*. Os dados obtidos são indicativos da ação tóxica do extrato de própolis verde brasileira em mais uma espécie de carrapato. Vale ressaltar que o extrato provavelmente não age na cutícula do animal uma vez que nenhuma alteração foi constatada após as 48 horas do bioensaio. Por outro lado, observou-se que os animais apresentaram dificuldade de locomoção bem como de

coordenação dos movimentos. Sugerindo, portanto, que a ação do extrato seja no sistema nervoso do carrapato.

Figura 7: Teste de aplicação tópica da subfração clorofórmio : acetato de etila em indivíduos machos adultos de *Dermacentor variabilis*: TI 0,5 mg/mL; TII 1,5 mg/mL; TIII 2 mg/mL; TIV 2,5 mg/mL; TV 3 mg/mL. Dados comportamentais obtidos após 48 horas da aplicação.

Figura 8: Taxa de mortalidade 30 minutos, 24 horas e 48 horas após o teste de aplicação tópica da subfração clorofórmio : acetato de etila em indivíduos machos adultos de *Dermacentor variabilis*: TI 0,5 mg/mL; TII 1,5 mg/mL; TIII 2 mg/mL; TIV 2,5 mg/mL; TV 3 mg/mL.

A fim de obter novos dados comportamentais para entender o mecanismo de ação do extrato ativo em estudo, o teste de injeção foi empregado nos carrapatos americano do cão. Na figura 9 é possível constatar que os indivíduos que permaneceram vivos após os

tratamentos ainda apresentaram habilidade de escalar e se esconder da exposição à luz. No entanto, 20% do carrapatos tratados com a menor dose (T I: 0,05 mg/mL) foram a óbito. Nos tratamentos subsequentes (T II: 0,2 mg/mL, T III: 0,35 mg/mL e T IV: 0,5 mg/mL) a mortalidade aumentou para 40, 100 e 100%, respectivamente.

Figura 9: Teste de injeção da subfração clorofórmio : acetato de etila em indivíduos machos adultos de *Dermacentor variabilis*: T I 0,05 mg/mL; T II 0,2 mg/mL; T III 0,35 mg/mL; T IV 0,5 mg/mL. Dados comportamentais obtidos após 30 minutos da injeção.

Vale ressaltar, portanto, que a menor dose empregada para esse bioensaio, 0,05 mg/mL, matou o carrapato americano do cão e a taxa de mortalidade aumentou com o incremento da concentração utilizada (figura 10). Comparando-se a dose de 0.5 mg/mL utilizada para o teste de aplicação tópica e para o teste de injeção, nota-se que no primeiro bioensaio tal concentração não causou efeito algum aos carrapatos tratados. Por outro lado, o teste de injeção com a mesma dose levou a óbito 100% dos indivíduos tratados. Esses dados sugerem que a ação do extrato ativo da própolis de Lavras ocorra no sistema nervoso (singanglio) dos carrapatos (figura 11).

Figura 10: Taxa de mortalidade 30 minutos após o teste de injeção da subfração clorofórmio : acetato de etila em indivíduos machos adultos de *Dermacentor variabilis*: T1 0,05 mg/mL; TII 0,2 mg/mL; TIII 0,35 mg/mL; TIV 0,5 mg/mL.

Figura 11: Indivíduo macho adulto de *D. variabilis* dissecado para observação do singanglio (na ponta da seta).

De acordo, ainda, com os dados comportamentais avaliados ao longo dos bioensaios, notou-se que o efeito do extrato de própolis ocorre de forma supressora do sistema nervoso. Isto é, dificuldade de locomoção, descoordenação dos movimentos, perda da capacidade de escalar, bem como maior exposição à luz.

12.3 Discussão

Os dados comportamentais obtidos a partir dos testes de aplicação tópica da subfração ativa clorofórmio : acetato de etila obtida na primeira fase de experimentos demonstram que houve intoxicação dos animais. Em condições naturais, os carrapatos

buscam abrigo da luz, e permanecem parados no ambiente (Prullage *et al.*, 2011). No entanto, observações comportamentais indicaram que os indivíduos de *D. variabilis* expostos ao extrato de própolis estavam desorientados e perderam consideravelmente a habilidade de escalar. Além disso, após 48 horas do início do experimento, houve incremento na mortalidade dos animais tratados, chegando a 100% de mortalidade no tratamento com 3 mg de extrato. A aplicação tópica de pesticidas comerciais em mosquitos (*Anopheles gambiae*) resultou em altas taxas de mortalidade, segundo McAllister & Adams (2010), mas nenhum dado comportamental foi descrito.

Por outro lado, o desenvolvimento do teste de injeção demonstrou que os indivíduos tratados apresentaram descoordenação motora, perda de habilidade de escalar, bem como alta taxa de mortalidade após 48 horas do início do experimento. Segundo Stumpf e colaboradores (2007), larvas do quarto ínstar de *Spodoptera exigua* exibiram sintomas de intoxicação (paralisia, tremores, diurese, movimentos descoordenados e morte) após a injeção de 10 µg de compostos nicotínicos, indicando que a nova droga age no sistema nervoso, de forma semelhante aos nicotinóides típicos (Stumpf *et al.*, 2007).

A aparente supressão de atividades do sistema nervoso assemelha-se, portanto, à ação de alguns pesticidas usados atualmente, tal como o fipronil (Lees & Bowman, 2007; Islam & Lynch, 2012). De acordo com Islam & Lynch (2012), o alvo do fipronil já é bem conhecido, sendo um antagonista dos canais de cloro dos receptores gabaérgicos. Outros pesticidas comerciais, como a ivermectina e piretróides, apesar de agirem também de forma inibitória do sistema nervoso dos carrapatos e de outros insetos, agem em diferentes sítios, como sugerem estudos eletrofisiológicos (Corbel *et al.*, 2006; Lees & Bowman, 2007; Islam & Lynch, 2012). Contudo, métodos eletrofisiológicos devem ser desenvolvidos para confirmar o mecanismo de ação do extrato ativo da própolis verde. Alternativamente, testes com as substâncias isoladas poderiam promover atividade acaricida se aplicadas diretamente no singânglio e dados eletrofisiológicos monitorados serviriam para demonstrar tal ação.

12.4 Conclusão

- ✓ a(s) substância(s) que confere(m) atividade acaricida à subfração ativa provavelmente agem de forma supressora no sistema nervoso dos carrapatos.

12.5 Referências Bibliográficas

- Corbel V., Stankiewicz M., Bonnet J., Grolleau F., Hougard J. M. & Lapied B. (2006) Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. **Neurotoxicology** **27** (4): 508-519.
- GraphPad Software (2009) **GraphPad Prism 5** versão 5.03 para Windows.
- Islam R. & Lynch J.W. (2012) Mechanism of action of the insecticides, lindane and fipronil, on glycine receptor chloride channels. **British Journal of Pharmacology** **165**: 2707-2720.
- Lees K. & Bowman A. S. (2007) Tick neurobiology: recente advances and the post-genomic era. **Invertebrate Neuroscience** **7**(4): 183-198.
- McAllister J.C. & Adams M.F. (2010) Mode of action for natural products isolated from essential oils of two trees is different from available mosquito adulticides. **Journal of Medical Entomology** **47**(6): 1123-1126.
- Prullage J.B., Tran H.V., Timmons P., Harriman J., Chester S.T. & Powell K. (2011) The combined mode of action of fipronil and amitraz on the motility of *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology** **179**: 302-310.
- Stumpf C.F., Comins D.L., Sparks T.C., Donohue K.V. & Roe R.M. (2007) Insecticidal activity and mode of action of novel nicotinoids synthesized by new acylpyridinium salt chemistry and directed lithiation. **Pesticide Biochemistry and Physiology** **87**: 211-219.
- Thompson D. M., Khalil S. M. S., Jeffers L. A., Ananthapadmanaban U., Sonenshine D. E., Mitchell R. D., Osgood C. J., Apperson C. S. & Roe R. M. (2005) In vivo role of 20-hydroxyecdysone in the regulation of the vitellogenin mRNA and egg development in the

American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Insect Physiology** **51** (10): 1105-1116.

Weldon P.J., Carroll J.F., Kramer M., Bedoukian R.H., Coleman R.E. & Bernier U.R. (2011) Anointing chemicals and hematophagous arthropods: responses by ticks and mosquitos to *Citrus* (Rutaceae) peel exudates and monoterpene components. **Journal of Chemical Ecology** **37**: 348-359.