

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*

São Paulo
- 2013 -

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*

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia 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 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!

EPIGRAFE

“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, japonês!!! 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 despreziosas 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.”

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 (Diaz-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 (isoflavanas 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, flavonóis

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 contém 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.

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, artepilina-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, artemillin-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 eugenol 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 heterolepis*. 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. & Guglielmo 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.
- Fernandes 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., Tropaia 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 methylenedioxyphenyl (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: UNIFEOP, 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 physico-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.