

## EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides*

**Jessica Jardim Machado<sup>(1)</sup>; Yasmin dos Santos Lourenço<sup>(2)</sup>; Gabriela Xavier Giacomini<sup>(3)</sup>; Daniel Lopes de Lima<sup>(4)</sup>; Luis Fernando Wolff<sup>(5)</sup>; Glauca de Figueiredo Nachtigal<sup>(5)</sup>**

<sup>(1)</sup>Graduanda; Universidade Federal de Pelotas (Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel); Pelotas, RS;

<sup>(2)</sup> Mestranda; Universidade Federal de Pelotas (Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel); <sup>(3)</sup>Doutoranda; Universidade Federal de Pelotas; <sup>(4)</sup> Assistente A; Embrapa Clima Temperado <sup>(5)</sup> Pesquisadores; Embrapa Clima Temperado.

### INTRODUÇÃO

Embora a goiabeira seja considerada uma espécie bastante rústica, alguns patógenos que incitam doenças são considerados relevantes para a região Sul do Rio Grande do Sul, como a antracnose, causada pelo fungo *C. gloeosporioides*, que ocorre tipicamente quando há condições de alta umidade, e agrava-se nas fases de florescimento, maturação e pós-colheita em pomares mal conduzidos. Esta doença também tem sua importância em condições de produção em que os agricultores utilizam o ensacamento dos frutos, pois estes geram acúmulo de umidade, o que favorece a infecção e disseminação do patógeno (ZAMBOLIM, 1996). O sintoma típico da doença é caracterizado por lesões arredondadas, grandes, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada podendo ocorrer uma podridão-mole nos frutos, prejudicando a sua comercialização (SILVA et al., 2006).

Atualmente o controle da doença se dá por meio de podas sistemáticas, eliminando os ramos infectados pela doença. Além deste controle manual, tem-se a aplicação preventiva com fungicidas cúpricos com o objetivo de reduzir o potencial de inóculo na área (JUNQUIRA et al.; 2001). Nota-se, assim, que para minimizar a infecção por este patógeno necessita-se de uma demanda significativa de mão de obra e aplicação de fungicidas sintéticos, de modo que o principal desafio da pesquisa, neste contexto, é a busca por produtos mais amigáveis e de menor impacto ao meio ambiente, à saúde humana e animal, o que gera uma oportunidade para a inovação quanto à fitoproteção.

O uso de insumos alternativos como a própolis tem se mostrado promissor, visto que é gerado a partir de uma complexa mistura de substâncias que as abelhas coletam de várias plantas, elaboram e depositam em seus ninhos, com o objetivo de vedar a colméia. Esta mistura é constituída por 47% de resina contendo vitaminas, sais minerais, compostos fenólicos como flavonóides, ácidos graxos, álcoois aromáticos e ésteres, 30% de ceras, 5% de pólen, 4-15% de substâncias voláteis e matérias estranhas e 13% de substâncias desconhecidas (Burdock, 1998). Dentre as substâncias presentes na própolis destacam-se os flavonóides, os quais são indicados como responsáveis pelas ações antiinflamatória, antimicrobiana e, em especial, pela antifúngica (SOMNEZ et al., 2005). Com base nesta premissa, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade fungitóxica de dois produtos comerciais de extrato de própolis, expressa pelo efeito inibitório *in vitro* no crescimento micelial e na esporulação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

### MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Biofábrica, unidade destinada ao desenvolvimento de pesquisas em insumos alternativos, localizada na Estação Experimental Cascata, Embrapa Clima Temperado. O isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* utilizado neste ensaio (CPACT 651) pertence à Coleção de Microrganismos de Interesse ao Controle Biológico de Pragas (CMIBIO), vinculada à Embrapa Clima Temperado. Os produtos comerciais utilizados foram da marca Veromed® Apicultura Orgânica, e são descritos a seguir: (A) Extrato padronizado “in natura” de própolis: 30% própolis e 11% de sólidos solúveis; (B) Extrato de própolis supreme “in natura”: 100% própolis verde, 11% sólidos solúveis, artepilin c (5,3 mg/ml), flavonóides (11,6 mg/ml) e ácido p-cumarico (0,88mg/ml).

Ambos os produtos a base de própolis foram previamente filtrados em membrana Millipore a 0,22µm. O produto (A) foi testado em sua concentração original enquanto o produto (B) teve acréscimo de água estéril para avaliação de diferentes concentrações (v/v): 1) 100% (puro); 2) 75% produto B + 25% água estéril; 3) 50% produto B + 50% água estéril; 4) 25% produto B + 75% água estéril; a testemunha foi composta somente por água estéril. Em todas as formulações foram acrescentados 20 µL de Tween 80 com o intuito de melhorar a homogeneização. Em placas de Petri de 9cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) solidificado, foi adicionado alíquota de 100 µL dos tratamentos e espalhada com auxílio de uma alça de Drigalski. Disco de 5mm de diâmetro do isolado fúngico foi repicado para o centro da placa de Petri. As placas foram vedadas com Parafilm® e incubadas em BOD, a 25°C e fotoperíodo diário de 12h.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de cinco repetições, sendo cada parcela representada por uma placa de Petri. As avaliações da interferência no crescimento micelial foram realizadas por meio de medições diárias do diâmetro das colônias fúngicas, com auxílio de régua milimetrada, em dois eixos ortogonais, iniciadas após 48 horas de incubação, e perduraram por quatro dias, momento em que ocorreu a colonização total da superfície do meio de cultivo no tratamento testemunha. Após 15 dias de incubação procedeu-se a estimativa da concentração de esporos. Três discos de micélio (5mm de diâmetro) foram retirados de cada repetição e transferidos para frasco do tipo penicilina, contendo 9ml de água estéril. Após homogeneização do conteúdo em agitador tipo vortex, alíquota de 20 µL foi imediatamente retirada, com auxílio de uma micropipeta, e transferida para câmara de Neubauer, a fim de proceder à contagem do número de esporos em microscópio ótico no aumento de 400X. Após a análise de variância e, no caso de haver significância ( $P < 0,05$ ), os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com os dados obtidos verificou-se que o extrato de própolis suprema “in natura” (B) se destacou quanto à inibição *in vitro* do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, sendo da ordem de 15% em relação ao tratamento testemunha a partir da diluição de 75% (Tabela 1). A atividade antifúngica dose-dependente aqui verificada está de acordo com trabalho de Albano et al. (2007) que avaliaram extrato de borra de própolis, a 25%, 50%, 75% e 100%, sobre fungos de armazenamento que incidem em sementes de feijão. Atribui-se a superioridade do produto em questão (B) devido à presença de própolis verde, diferentemente do produto (A). A própolis verde é originária da região do cerrado brasileiro, onde as abelhas *Apis mellifera* utilizam a planta *Baccaris dracunculifolia* (Asteraceae) como principal fonte para a produção da própolis. Decorre daí a coloração verde da própolis e a ocorrência de componentes no extrato etanólico derivados do ácido cinâmico, flavonóides, ácidos benzóicos e benzoatos, compostos aromáticos não hidroxilados, ácidos alifáticos e ésteres (CHANG et al., 2008). Em adição, são encontrados compostos como a drupanina, a bacarina, o kaempferide e o composto majoritário artepelin C (SLISZKA et al., 2013). O artepelin C é um composto fenólico, derivado hidroxilado e deprenilado do ácido cinâmico (PAULINO et al., 2008) com propriedades antimicrobianas conhecidas (AGA et al., 1994).

A análise das médias dos tratamentos no ensaio de esporulação demonstrou um comportamento errático expresso pela variabilidade da concentração de esporos entre as médias amostrais (Figura 1). Verificou-se, contudo, que a própolis a 30%, oriunda do produto A, proporcionou inibição da esporulação do patógeno da ordem de 61% em relação ao tratamento testemunha. A expressiva interferência na esporulação do patógeno, diferentemente do efeito inibitório no crescimento micelial do patógeno, tem implicações importantes na severidade da doença ao nível de campo, pois os conídios do patógeno são responsáveis pela disseminação da doença na parte aérea. Entende-se, desta forma, que extrato de própolis tem potencialidade para desenvolvimento como produto fitoprotetor, muito embora sejam necessários estudos posteriores, com diferentes origens da própolis, para comprovar esta premissa.

## CONCLUSÕES

Extrato etanólico de própolis apresenta ação fungitóxica *in vitro* a *C. gloeosporioides*, expresso pela expressiva interferência na esporulação do patógeno, diferentemente do efeito inibitório no crescimento micelial do patógeno.

## AGRADECIMENTOS

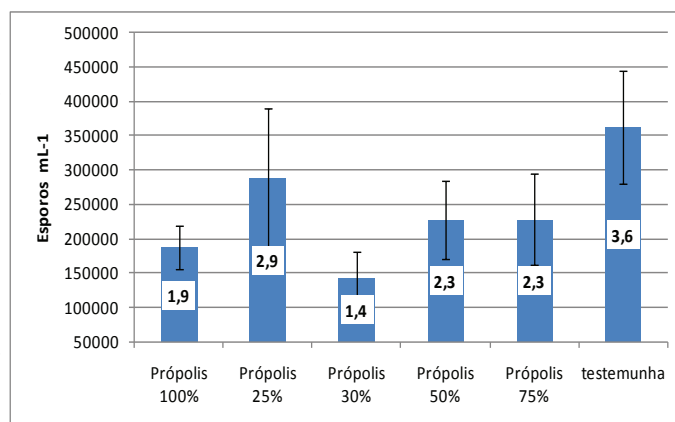
Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa PIBIC do primeiro autor.

**Tabela 1:** Efeito *in vitro* de produtos a base de própolis sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* após cinco dias de exposição.

Tratamentos	Diâmetro Colônia (cm)	
Testemunha	7,8	a
Própolis 30% (A)	7,3	ab
Própolis 50% (B)	7,2	abc
Própolis 25% (B)	7,2	abc
Própolis 100%(B)	6,7	bc
Própolis 75% (B)	6,6	c

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

**Figura 1:** Efeito *in vitro* de produtos a base de própolis sobre a esporulação de *C. gloeosporioides* após 15 dias de exposição.



## REFERÊNCIAS

- AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAGINA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Biosci Biotechnol Biochem** 58: 945-946, 1994.
- ALBANO, E.M.S.; ZAINA, T.C.; ZANIN, D.G.; GONÇALVES, R.A. Avaliação da ação do extrato da borra da própolis no controle de sanidade de sementes de feijão. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.147, 2007.
- CHANG, R.; PILÓ-VELOSO, D.; MORAIS, S. Analysis of a brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Rev Bras Farmacogn** 18: 549-556, 2008.
- JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela; ANDRADE, Leide Rovênia M; PEREIRA, Marcelo; et al.; **Doenças da Goiabeira no Cerrado**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Cerrados). Circular Técnica nº 15. ISSN 1517-0187. Planaltina, 2001.
- LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. P.; et al.; Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 17(3)2:388/395. Julho/Setembro de 2007. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/Selma\\_Obteno\\_de\\_extratos\\_de\\_prpolis\\_sob\\_diferentes\\_condies\\_e\\_avaliao\\_de\\_sua\\_atividade\\_antifngica](https://www.researchgate.net/Selma_Obteno_de_extratos_de_prpolis_sob_diferentes_condies_e_avaliao_de_sua_atividade_antifngica)>. Acesso em: agosto de 2016.
- PAULINO, N.; ABREU, S. R.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of bioavailable compound, artemelin c, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, V. 587, 2008.
- SZLISZKA, E.; KUCHARSKA, A.Z.; SÓKOL-LETOWSKA, A.; MERTAS, A.; CZUBA, Z.P.; KROL, W. Chemical composition and anti-inflammatory effects of ethanolic extract of Brazilian green propolis on actvated. **Evidence-Based Complementary and Alternative medicine**, Thousando Oaks, 2013. Article ID 976415.
- SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; LEMOS, O. L. Et al.; Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p.131-133, Jaboticabal-SP, 2006.
- SANTOS, P. H. D. **Produtos Alternativos no controle de Doenças Fúngicas em Folha e Fruto de Mamoeiro**. 2013. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, campo dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.uenf.br/posgraduação>>. Acesso em: agosto de 2016.
- ZAMBOLIM, L.; OLIVEIRA, R. R. Manejo Integrado das Doenças da Goiabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p.1-16, 1996.