

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**CÂMPUS FRANCISCO BELTRÃO**  
**COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**  
**CURSO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

NAARA APARECIDA ALMEIDA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS CONTRA O FUNGO**  
***Botrytis* sp. ISOLADOS DE MORANGO**

TRABALHO DO CONCLUSÃO DE CURSO

FRANCISCO BELTRÃO

2014

NAARA APARECIDA ALMEIDA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS CONTRA O FUNGO**  
***Botrytis* sp. ISOLADOS DE MORANGO**

Trabalho de Conclusão de Curso da graduação, apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto Novello.

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabete Hiromi Hashimoto.

FRANCISCO BELTRÃO

2014

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

### **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS CONTRA O FUNGO *Botrytis* sp. ISOLADOS DE MORANGO**

Por

**Naara Aparecida Almeida**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, no Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

#### **BANCA AVALIADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabete Hiromi Hashimoto-  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -UTFPR

---

Prof.<sup>a</sup> Débora Giaretta  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –UTFPR

---

Prof. Dr. Cláudio Roberto Novello  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -UTFPR  
(Orientador)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cleusa Inês Weber  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -UTFPR  
(Coordenadora do curso)

Francisco Beltrão, dezembro de 2014.

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.”

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por mais uma vez cumprir a sua palavra na minha vida, e em todos os meus momentos de atribulação ter confortado o meu coração com a sua palavra.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim, me incentivando sempre a correr atrás dos meus sonhos, por todo apoio em momentos difíceis e por todas as suas orações que me ajudaram a chegar até aqui. Agradeço ao restante da minha família, meus irmãos, cunhadas, cunhados e sobrinhos, por todo apoio e amor e por entender meus momentos de ausência.

Agradeço ao Prof. Dr. Cláudio Roberto Novello, pela dedicação, pelo incentivo e por acreditar neste trabalho, sempre me auxiliando durante todo o tempo.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabete Hiromi Hashimoto, por todo apoio, ensinamentos e paciência durante esses anos de orientação.

Ao Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho e Rubens pela disponibilização da cepa do microrganismo.

Agradeço ao colega de laboratório Michel, por todo incentivo e ajuda e durante todo o desenvolver do trabalho, aos demais colegas, Josemarque, Luciana e Janice, pelos momentos de risadas e amizade.

Aos técnicos laboratoristas, Ronaldo, Magali, Sinara, Poliane e em especial ao João pelo auxílio nas análises.

Agradeço a Vivian que em todos os momentos esteve ao meu lado, por todos os conselhos e por me fazer parte da sua família.

Aos amigos da graduação Tatiane, Paola, Ingrid, Vanessa, Camilla, Juliane, Douglas e aos demais, obrigado por todo incentivo, não me deixando esmorecer durante toda a caminhada, e por fazerem parte de mais uma etapa da minha vida.

*“Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam e a prova das coisas que se não vêem”. (Hebreus. 11,01)*

## RESUMO

ALMEIDA, NAARA. **Atividade antifúngica de extratos da própolis contra o fungo *Botrytis* sp. isolados de morango.** 2014. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2014.

O desenvolvimento de doenças geradas por patógenos no morango causam a deterioração do produto, produzindo perdas econômicas significativas em diversos setores da economia. Dentre as doenças fitopatogênicas nesta cultura destaca-se o mofo cinzento, causado pelo fungo *Botrytis cinerea*. Atualmente tem-se buscado alternativas de controle de fitopatógenos menos agressivas ao meio ambiente. Neste contexto inclui-se a própolis, que apresenta ações como atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana, sendo a sua ação antimicrobiana relacionada pelos compostos flavonóides presentes na sua constituição. O presente trabalho teve como objetivo obter extratos de própolis *in natura* em diversos tipos de solventes com polaridade variada e avaliar a ação antifúngica destes sobre o fungo *Botrytis* sp. Para o estudo, foram utilizadas três amostras de morangos, sendo duas provenientes de cultivo convencional e uma de cultivo hidropônico, sendo que o fungo, do gênero *Botrytis* sp, foi isolado diretamente destas amostras, também foi utilizado uma cepa identificada de *Botrytis cinerea*. A partir da própolis foram preparados extratos com diferentes solventes extratores de polaridade diversas em diferentes concentrações com os quais foram realizadas as análises microbiológicas. Também foram realizadas análises físico-químicas para a caracterização e controle de qualidade da própolis *in natura* e extratos obtidos. Os resultados obtidos pelas análises físico- químicas para a caracterização da própolis apresentaram valores semelhantes ao da legislação para cada um dos parâmetros, nas análises microbiológicas os extratos testados no fungo *Botrytis cinerea* e no fungo do morango hidropônico, somente os extratos aquosos, hexânico, acetato de etila apresentaram efeito contra o crescimento de ambos os fungos testados. O fungo isolado do morango convencional se mostrou mais resistente a alguns extratos em relação aos demais microrganismos.

**Palavras- chave:** Própolis, Caracterização, Antifúngico, *Botrytis*.

## ABSTRACT

The development of diseases generated by pathogens in strawberry cause product deterioration, produce significant economic losses in several sectors of the economy. Among the pathogenic diseases in this culture highlights the gray mold, caused by the fungus *Botrytis cinerea*. Currently have tried to plant pathogens control alternatives that are less harmful to the environment. In this context include the propolis which has actions such as anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial, with its antimicrobial action is related to flavonoid compounds present in its constitution. This study aimed to obtain extracts of propolis in nature, in various types of solvents with varying polarity and evaluate the antifungal action of these on the *Botrytis* sp. fungus. For the study, three strawberry samples were used, two from conventional farming and hydroponic growing, and the fungus, *Botrytis* genus, was also used an identified strain of *Botrytis cinerea*, was isolated directly from these samples. The propolis extracts were prepared with different liquid extractors of different polarity at different concentrations with which the microbiological analyzes were performed. Were also carried out physico-chemical analysis for the characterization and quality control of propolis raw and obtained extracts. The results obtained by physicochemical analysis for the characterization of propolis had values similar to the legislation for each of the parameters, the microbiological analysis the extracts tested in the *Botrytis cinerea* fungus and the fungus hydroponic strawberry, only the aqueous extracts, hexane, ethyl for each of the parameters, microbiological analyzes in the extracts tested, and botrytis in strawberries hydroponic fungus, only the aqueous extracts, hexane, ethyl acetate showed growth effect against both tested fungi. The isolated fungus conventional strawberry was more resistant to some statements in relation to other microorganisms.

**Key words:** Propolis, Characterization, Antifungal, *Botrytis*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
3.1	MORANGO .....	16
3.2	DOENÇAS NA CULTURA DO MORANGO .....	17
3.2.1	Mofo Cinzento.....	18
3.3	AGROQUÍMICOS E CONTROLE BIOLÓGICO .....	19
3.4	PRÓPOLIS.....	20
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>23</b>
4.1	AMOSTRAS .....	23
4.1.1	Própolis .....	23
4.1.2	Morango .....	23
4.2	ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS DA PRÓPOLIS.....	23
4.2.1	pH.....	23
4.2.2	Cinzas .....	23
4.2.3	Umidade .....	24
4.2.4	Determinação do Teor de Ceras .....	24
4.2.5	Determinação do Teor de Flavonóides Totais.....	24
4.3	ISOLAMENTO FÚNGICO .....	25
4.3.1	<i>Botrytis sp.</i> .....	25
4.4	PREPARO DOS EXTRATOS DA PRÓPOLIS .....	25
4.5	DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO SECO DO EXTRATO DA PRÓPOLIS .....	26
4.6	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO .....	26
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27



<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
5.1	ANÁLISES FÍSICO- QUÍMICAS .....	28
5.2	PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA.....	31
5.3	ANÁLISE DO TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO .....	32
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1 - Estágio da doença causada pelo fungo <i>Botrytis cinérea</i> .....	19
Figura 2 - Própolis <i>in natura</i> .....	22

**LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1</b> - Crescimento do Fungo <i>Botrytis cinerea</i> do extrato Aquoso.....	33
<b>Gráfico 2</b> - Crescimento do Fungo <i>Botrytis cinerea</i> do extrato etanol 96% .....	34
<b>Gráfico 3</b> - Crescimento do Fungo <i>Botrytis cinerea</i> do extrato etanol 50 % .....	35
<b>Gráfico 4</b> - Crescimento do Fungo <i>Botrytis cinerea</i> do extrato hexânico.....	36
<b>Gráfico 5</b> - Crescimento do Fungo <i>Botrytis cinerea</i> do extrato Acetato de Etila. ....	37
<b>Gráfico 6</b> - Crescimento do Fungo <i>Botrytis cinerea</i> do extrato Metanólico .....	38
<b>Gráfico 7</b> - Crescimento do Fungo Morango Hidropônico do extrato aquoso.....	38
<b>Gráfico 8</b> - Crescimento do Fungo Morango Hidropônico do extrato etanol 96 % . ....	39
<b>Gráfico 9</b> - Crescimento do Fungo Morango Hidropônico do extrato etanol 50 % . ....	40
<b>Gráfico 10</b> - Crescimento do Fungo Morango Hidropônico do extrato hexânico .....	41
<b>Gráfico 11</b> - Crescimento do Fungo Morango Hidropônico do extrato Acetato de etila. ....	42
<b>Gráfico 12</b> - Crescimento do Fungo Morango Hidropônico do extrato Metanólico .....	42
<b>Gráfico 13</b> - Crescimento do Fungo Morango Convencional no extrato aquoso. ....	43
<b>Gráfico 14</b> - Crescimento do Fungo Morango Convencional no extrato etanol 96 %.....	44
<b>Gráfico 15</b> - Crescimento do Fungo Morango Convencional no extrato etanol 50 %.....	44
<b>Gráfico 16</b> - Crescimento do Fungo Morango Convencional no extrato hexânico. ....	45
<b>Gráfico 17</b> - Crescimento do Fungo Morango Convencional no extrato Acetato de etila. ....	46
<b>Gráfico 18</b> - Crescimento do Fungo Morango convencional no extrato metanólico.....	46

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 - Caracterização da amostra de própolis quanto aos seus parâmetros físico-químicos.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabela 2 - Valores da determinação do resíduo seco e pH dos extratos da própolis .....</b>	<b>30</b>
<b>Tabela 3 - Porcentagens testadas de Tween 80 .....</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 4 - Efeito do solvente sobre a microplaca de poliestireno.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 5 - Análise da presença de estruturas de <i>B. cinerea</i> através de lupa de aumento após 24h (10x).....</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 6 - Análise da presença de estruturas de <i>B. cinerea</i> através de lupa de aumento após 48 horas. (10x). .....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 7 - Análise da presença de estruturas de <i>B. cinerea</i> através de lupa de aumento após 72h. (10x). .....</b>	<b>49</b>
<b>Tabela 8 - Análise da presença de estruturas da cepa MH através de lupa de aumento após 24h (10x).....</b>	<b>49</b>
<b>Tabela 9 - Análise da presença de estruturas da cepa MH através de lupa de aumento após 48h (10x).....</b>	<b>50</b>
<b>Tabela 10 - Análise da presença de estruturas da cepa MH através de lupa de aumento após 72h (10x).....</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Devido a fácil adaptação dos cultivares de morango nos climas subtropicais a cultura vem apresentando um aumento da sua produção durante ao longo dos anos. (SPECHT e BLUME, 2009). A cultura apresenta grande importância econômica devido à necessidade de alta demanda de mão de obra em determinadas épocas do ano, principalmente para o plantio e colheita do fruto, que tem alto valor agregado em sua comercialização.

Um dos grandes problemas no cultivo do morango é o seu manejo, devido às condições climáticas do Brasil que é predominantemente tropicais, clima bastante propício ao aparecimento de doenças, que induzem a grandes perdas econômicas para a cultura (SANTOS e MEDEIROS, 2005).

A principal doença que predomina na cultura do morango é o mofo cinzento, causada pelo fungo *Botrytis cinerea*. O fungo causa a podridão do fruto, atacando as suas folhas, caules, pétalas entre outras partes da planta, na sua fase final de produção, causando grande perda na qualidade do fruto destinado ao consumo da população (FORTES, 2005).

Atualmente busca-se práticas menos agressivas na produção, de forma que os alimentos cheguem aos consumidores com mínimos índices de contaminação por agroquímicos (LORENZETTI, 2012). Nesta busca estão sendo utilizados os compostos de origem natural, que possuem menor grau de toxicidade e que apresentam os mesmos efeitos fungistáticos que os agroquímicos. (BAUTISTA- BAÑOS et al., 2006).

A própolis é uma resina produzida por abelhas melíferas (*Apis mellifera*) que usam materiais resultantes de uma variedade de processos botânicos, coletados em diferentes plantas (BURDOCK, 1998; BANKOVA, 2005). A composição química complexa da própolis é devido ao material vegetal utilizado como matéria- prima pelas abelhas, razão está para a ampla gama de compostos que são encontrados na própolis (MÃARGHITAS et al., 2013), dentre os seus constituintes então inclusos polifenóis como os: flavonoides , ácidos fenólicos e ésteres, terpenóides, esteroides e aminoácidos, proteínas, vitaminas (B1, B2, B6, C), açúcares, cetonas e diversos minerais (ZHU et al., 2011; MENEZES, 2005; BODINI, 2011). Dentre os constituintes da própolis a maioria dos flavonóides e fenólicos possuem atividade biológica comprovada. Dentre estas atividades podemos citar a antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória entre outras (PARK et al., 2002).

Há diversos estudos realizados para demonstrar as propriedades antibióticas da própolis em bactérias fitopatogênicas, segundo Rezende et al., (2006), a produção de extratos de própolis produzido no Brasil demonstrou atividade antimicrobiana contra cepas da levedura de gênero *Cândida*. No controle contra fungos fitopatogênicos pouco se conhece seus efeitos (MARINI et al., 2012).

Neste contexto, a própolis poderá vir a ser utilizados como métodos alternativos no controle de fungos fitopatogênicos da cultura de morangos, atuando como biocontrolador de doenças no campo e na pós-colheita, melhorando a qualidade do produto final.

Propõem-se neste trabalho, avaliar a ação antifúngica do extrato da própolis, visando à sua aplicação na melhoria da qualidade do morango produzido pelo cultivo convencional e hidropônico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antifúngica do extrato da própolis, visando à melhoria da qualidade do morango convencional e hidropônico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obter amostras de morango e própolis da região de Francisco Beltrão – PR,
- Isolar a partir das amostras de morango de cultivo convencional e hidropônico o fungo de gênero *Botrytis*;
- Obter o extrato da própolis em solventes de polaridades diversas;
- Avaliar a ação antifúngica dos extratos obtidos contra cepas de *Botrytis* isolados de morangos convencional e hidropônico;
- Comparar a eficácia do extrato da própolis de diferentes solventes sobre a ação antifúngica contra cepas de *Botrytis*.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 MORANGO

O morango (*Fragaria* sp) é uma planta herbácea, rasteira e perene da família Rosaceae, propagada por via vegetativa através de estolhos. Em geral, a cultura para produção de frutos é renovada anualmente. A parte comestível é um pseudofruto, originário do receptáculo floral que se torna carnoso e succulento, com cor vermelha e pontinhos pretos com forte aroma. Seu cultivo é bastante desenvolvido em vários países do mundo, especialmente o de climas temperados (FERLA et al., 2007).

A cultura encontra-se difundida em regiões de clima temperado e subtropical. No Brasil, a sua produção está concentrada nas regiões Sul e Sudeste, sendo os estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul os maiores produtores. A fruta é bastante consumida na região Sul do Brasil, onde seu consumo é frequente durante o inverno (ANTUNES et al., 2007; GIAMPIEREI et al., 2012).

Atualmente a América do Sul produz cerca de 318.686 toneladas de morango em 11.884 de hectares, sendo o Brasil, Chile e Argentina os maiores responsáveis por essa produção. Nos últimos anos esses países apresentaram um aumento significativo de área cultivada devido a adoção de novas tecnologias, elevando a qualidade e rendimento da fruta (VIGNOLO e GONÇALVES, 2013).

Segundo a EMATER/MG (2013), o Brasil tem uma produção estimada de aproximadamente de 145 mil toneladas em 3.928 hectares (VIGNOLO e GONÇALVES, 2013). Os principais cultivares plantadas no Brasil são: Campinas, Vila Nova, Santa Clara, Tangi e Osso grande, entre outras (SANTOS, 2005).

O fruto do morangueiro é bastante valorizado e muito apreciado pelos consumidores, não somente por suas características sensoriais, mas pelo seu alto teor nutricional, sendo rico em vitamina C e ácido fólico, compostos bioativos como polifenóis e betacaroteno, minerais e outras vitaminas como A, B1 e B2. Contêm ainda fibras insolúveis e solúveis. Dentre as substâncias presentes nesta fruta os flavonóides e as antocianinas atuam como antioxidantes, prevenindo doenças cardiovasculares, cânceres entre outras doenças (SIMARELLI, 2006; VENENCIO, 2010).

Os componentes químicos presentes no morango ajudam a reduzir o risco de infecções, auxiliam na cicatrização de ferimentos e contribui com o bom funcionamento do



sistema nervoso, cardíaco e digestor, além de fornecer resistência aos tecidos, ossos e dentes, sendo que a sua ingestão pode reduzir o colesterol e prevenir o escorbuto (ANTONIAZZI, 2011).

A fruta pode ser consumida de diferentes modos, sendo eles: *in natura*, geleias, caldas, sucos e polpa congelada, além de serem utilizados pelas indústrias de alimentos no preparo de produtos como sorvetes, iogurtes, bolos, entre outros.

O fruto é considerado não climatérico, pois não apresenta elevação na sua taxa respiratória no período final da maturação, e devido a sua alta perecibilidade deve ser estocado por curtos intervalos de tempo e necessidade de refrigeração para a redução de perda dos frutos. Devido a sua rápida deterioração causada pela alta taxa respiratória, senescência e doenças, a comercialização do fruto é restrita (CAMPO, 2012).

### 3.2 DOENÇAS NA CULTURA DO MORANGO

A qualidade e a produtividade dos frutos são influenciadas pelo fotoperíodo temperatura, pragas, variações de umidade do ar e solo. A má qualidade das mudas destinadas ao plantio é associada às práticas culturais inadequadas o que torna as doenças um dos principais fatores limitantes para a produção de morango no Brasil (SILVA et al., 2007; LORENZETTI, 2012).

O morango pode sofrer diversos danos, causados por fatores que podem agir isoladamente e/ou interagirem entre si. Dentre os fatores danosos à cultura do fruto podemos citar várias pragas como: insetos, ácaros, bactérias, vírus, nematoides e fungos, que podem aparecer em várias fases do ciclo da cultura, atacando o fruto desde a muda até os frutos na fase final de produção (REIS e COSTA, 2011; FORTES, 2005).

Os morangos são frutos bastante suscetíveis a doenças causadas por fungos, dificultando a manutenção da qualidade durante o armazenamento e comercialização, acarretando em grandes perdas nutritivas e econômicas (REIS et al., 2008)

### 3.2.1 Mofo Cinzento

O mofo cinzento é uma doença causada pelo fungo *Botrytis cinerea* (Figura 2), que leva a podridão dos frutos bem como ataca as folhas, pecíolos, caule, botões, florais e pétalas. A podridão pode iniciar-se em qualquer ponto da superfície do fruto, mas geralmente começa no lado em que este entra em contato com o solo ou no lado em que entrou em contato com frutos contaminados. A doença é favorecida principalmente por temperaturas amenas e alta umidade, sendo que chuvas frequentes podem induzir a ataques mais severos (SAEGER, 2007; KOIKE et al., 2014).

É uma doença bastante comum na cultura de morango, reduzindo cerca de 50 % ou mais do seu rendimento. É mais prejudicial aos morangos durante os períodos de chuva prolongada durante a floração e frutificação da temporada. A doença geralmente começa no início da temporada de produção, como uma praga na flor, mais tarde as perdas causadas pelo *Botrytis* sp. podem resultar na morte dos brotos e flores, e ainda apodrecimento de dos frutos verdes ou maduros, o fungo avança rapidamente para os caules e folhas matando-os (AVERRE et al., 2002).

As infecções primeiro aparecem com o enrolamento das folhas, seguindo de seca e queda. Surgem pequenas lesões marrons muitas vezes sobre o cálice, após o tamanho da lesão vai aumentando rapidamente formando uma camada cinzenta de esporos do fungo. Os esporos são capazes de germinar em água e pela mesma pode ocorrer a contaminação de frutos sadios (AVERRE et al., 2002; KRUGNER e AUER, 2005). Durante a estação de crescimento do fruto, o fungo está constantemente presente, geralmente sendo encontrado na forma latente no interior do receptáculo floral, permanecendo neste estado até a maturação do fruto (HELBIG, 2001).

Para o controle da doença causada pelo fungo *Botrytis cinerea*, são utilizadas medidas de controle como: o uso de cultivares resistentes ao patógeno e resistentes ao manuseio de colheita, limpeza de folhas, caules e folhas mortas, circulação de luz e ar, além do tratamento com fungicidas (SIMON et al., 2005; AVERRE et al., 2002; KOIKE et al., 2014).



**Figura 1** - Estágio da doença causada pelo fungo *Botrytis cinerea*  
Fonte: Blog Agromoeng, 2011.

### 3.3 AGROQUÍMICOS E CONTROLE BIOLÓGICO

O uso intensivo de agroquímicos para o controle de doenças, pragas e plantas invasoras na agricultura tem reconhecidamente promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação do solo, da água, dos animais e dos alimentos, além de provocar a intoxicação dos agricultores e a resistência de patógenos, pragas e plantas daninhas a certos princípios ativos dos agroquímicos utilizados. A sua utilização provoca o desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica, elimina organismos benéficos e reduz a biodiversidade, entre outros. É bastante utilizado devido a sua praticidade e simplicidade para a sua aplicação nos alimentos (MORANDI e BETTIOL, 2009).

Anualmente são utilizados no mundo aproximadamente 2,5 milhões toneladas de agroquímicos. O consumo de agroquímicos no Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas. Durante o passar dos anos o consumo de agroquímicos teve um aumento da ordem de 700 %, um valor elevado quando relacionado ao crescimento da agricultura no mesmo período que foi de cerca de 78 % (SPADOTTO e GOMES, 2011).

A constante preocupação com o meio ambiente e a saúde, vem impulsionando a sociedade a pressionar os setores de produção na direção do aumento da oferta de alimentos mais saudáveis, a exemplo dos protocolos estabelecidos pelo mercado europeu que estabelece o limite de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  para todos os agrotóxicos, visando á segurança alimentar do

consumidor. O Brasil e diversos outros países, que tem a agricultura como base de sua economia, sentem a necessidade da implantação de sistemas mais saudáveis de produção integrada, onde o controle biológico é uma ferramenta indispensável para a redução do uso de fungicidas (LOPES, 2009; ASSI, 2005).

O morango é uma das culturas em que a quantidade empregada de agroquímicos acumulados é cerca de 30% acima do limite permitido (RIVAS, 2013). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, em 2012, de 211 amostras analisadas, 125, ou seja, 59% das amostras estavam com concentrações acima do limite permitido (BRASIL, 2012).

Hoje em dia estudam-se alternativas para a redução de agroquímicos, uma das alternativas é o emprego de manejo integrado de doenças de plantas, qual inclui o controle biológico, o controle cultural, emprego de cultivares mais resistentes a doenças e pragas e o uso de produtos de origem natural, com atividade antimicrobiana direta. Deste modo a forma de controle microbiano se encaixa no uso de extratos vegetais e microbianos em plantas (STANGARLIN et al., 2008).

### 3.4 PRÓPOLIS

A própolis é uma resina elaborada por abelhas a partir de materiais retirados de tecidos vegetais (Figura 3), misturados com substâncias próprias como enzimas e transformada a fim de ser usada para selar diversos buracos e frestas na colmeia. A própolis é conhecida como uma “arma química” para a proteção da colmeia contra microrganismos patogênicos e animais (BANKOVA, 2005).

A própolis é uma substância rígida, sua coloração depende da vegetação presente que foi utilizada para produzi-la, apresenta uma coloração que varia de marrom escuro ao marrom avermelhado, sendo que esta variação depende da origem e da idade (SOUZA et al., 2007), além de que a sua composição química é diferente de região a região, sendo que esta variação influencia na ação farmacológica e toxicológica. Portanto, a origem geográfica da coleta é um fator importante para a sua efetiva aplicação (MORENO et al., 2000; BANSKOTA et al., 2000; PARK et al., 2002).

A composição química da própolis é complexa devido ao material vegetal recolhido pelas abelhas para a produção, também o motivo são as diversas substâncias encontradas em própolis em diferentes partes do mundo. Essa mistura é constituída de mais de 180 compostos

identificados, apresentando cerca de 47 % de resinas contendo sais minerais, vitaminas, compostos fenólicos como flavonóides, ácidos graxos e ésteres entre outros, bem como 30% de ceras, 10% de óleos voláteis e 5 % de pólen (MÃARGHITAS et al., 2013; BURDOCK, 1998; BANSKOTA et al., 2000; SOMNEZ et al., 2005; CUSHNIE, LAM, 2005).

Dentre as suas ações a apresenta potencial terapêutico, tendo aplicação nas indústrias farmacêutica e também alimentícia. Devido a sua alta composição de distintas substâncias a própolis é responsável por atividades biológicas, como antibacteriana, anti-inflamatória, anticâncer e em especial pela sua atividade antifúngica (SALOMÃO et al., 2008; MURAD et al., 2002; ORSATTI et. al., 2010; MISSIMA e SFORCIN et al., 2008; DOTA et al., 2011), sendo estas ações biológicas a responsável pela sua aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentícia.

Os flavonóides, juntamente com os ácidos fenólicos, ésteres e cetonas, são considerados as substâncias de maior importância presente na própolis, os quais são indicados como responsáveis pela ação antimicrobiana (SOMNEZ et al., 2005; CUSHNIE, LAM, 2005; ALENCAR et al., 2007).

A capacidade da própolis de inibir o crescimento de microrganismos vem sendo estudada e comprovadas cientificamente (SALOMÃO et al., 2007). Diversos pesquisadores realizaram estudos contra diversas cepas de bactérias patogênicas, comprovando e evidenciando a sua ação antimicrobiana (PARK et al., 1998; SILVA et al., 2006; LUSTOSA, 2007) e evidenciado a sua utilização em diversos alimentos para atuar com esta ação.



**Figura 2** - Própolis *in natura*  
Fonte: Tatiane Cavazinni, 2013.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 AMOSTRAS

#### 4.1.1 Própolis

A própolis *in natura* foi adquirida na feira do produtor da cidade de Francisco Beltrão-PR, de um produtor rural da região, proveniente da produção de abelhas do gênero *Apis mellifera*, colhida no mês de julho de 2014.

#### 4.1.2 Morango

Foram adquiridas três amostras de 200 gramas de morango, sendo duas amostras de morango convencional no comércio local, onde as bandejas com os morangos foram selecionadas, e coletadas em dois períodos distintos, sendo eles julho e agosto de 2014, e uma amostra de morango hidropônico de um produtor rural da cidade de Francisco Beltrão.

### 4.2 ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS DA PRÓPOLIS

#### 4.2.1 pH

A análise de pH foi realizada nos extratos da própolis e subproduto segundo a metodologia oficial descrita pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

#### 4.2.2 Cinzas

Um cadinho de porcelana foi previamente calcinado em mufla a 450 °C por 30 minutos e após o seu resfriamento em dessecador, seu peso (tara) foi determinado em balança analítica. Neste cadinho foram adicionados cerca de 3,0 g da própolis triturada, pesados em

balança analítica, os quais foram incinerados e, posteriormente, submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 450 °C por 2 h. Foi colocado em dessecador para arrefecimento e pesagem posterior (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

#### 4.2.3 Umidade

Em um cadinho de porcelana foram pesados cerca de 3 gramas de amostra em balança analítica, colocados em estufa a 105 °C e após 12 horas os cadinhos foram retirados e colocados em dessecador até a temperatura ambiente, onde depois foram pesados. A análise foi realizada em triplicata (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

#### 4.2.4 Determinação do Teor de Ceras

Aproximadamente 1 g de própolis triturada foi pesada em balança analítica e colocado em frasco de vidro, 10 mL de éter de petróleo foram adicionados sob agitação. Em seguida o conjunto foi levado a aquecimento até ebulição do solvente e mantido por 5 min. A fração etérea foi desprezada. Este processo foi repetido por outras duas vezes. Posteriormente, procedeu-se a secagem da amostra remanescente, sendo esta pesada após resfriamento do material (BRUSCHI, 2002).

#### 4.2.5 Determinação do Teor de Flavonóides Totais

Foram pesados cerca de 0,200 g da amostra de própolis triturada, em balança analítica, posteriormente foram colocados em balão de fundo redondo de 50 mL e foram acrescentados 0,5 mL de uma solução de hexametenotetramina 0,5% (p-p), 20 mL de acetona e 2 mL de ácido clorídrico 6% (v-v). Foram aquecidos sobre refluxo por trinta minutos a uma temperatura de 58 °C. A mistura foi filtrada para balão volumétrico de 50 mL através de algodão. O resíduo da própolis e o algodão foram lavados com duas porções de 20 mL de acetona, aquecendo-se à fervura sobre refluxo por 10 minutos em cada lavagem. Após o resfriamento à temperatura ambiente, procedeu-se uma nova filtração através do algodão para o balão volumétrico, completando-se o volume do balão com acetona. Exatamente 5 mL da solução acetônica foram transferidos para funil de separação, tratados com 10 mL de água,



e em seguida extraídos com 10 mL de acetato de etila, repetindo-se a operação por três vezes, com porções de 5 mL de acetato de etila. As fases de acetato de etila foram reunidas em funil de separação e lavadas com duas porções de 25 mL de água. A seguir, a fração em acetato de etila foi filtrada para um balão volumétrico de 25 mL, através de algodão e sulfato de sódio anidro e completou-se o volume. Exatamente 5 mL dessa fração foram colocados em balão volumétrico de 25 mL, juntando-se 0,5 mL da solução de cloreto de alumínio 2% (v/v) e completando-se com solução metanólica de ácido acético 5% (v/v). Ao mesmo tempo, 5 mL da fração de acetato de etila foram diluídos em balão volumétrico de 25 mL com solução metanólica de ácido acético 5% (v/v), formando a solução compensação. Após trinta minutos, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (425 nm) (DEUTSCHES, 1994).

### 4.3 ISOLAMENTO FÚNGICO

#### 4.3.1 *Botrytis sp.*

O isolamento do fungo *Botrytis sp.* foi realizado direto do fruto. O fruto foi incubado em frascos estéril a 25° C. A partir dos frutos selecionados os fungos desenvolvidos foram isolados em meio Agar Batata Dextrose (BDA) previamente acidificado com Ácido tartárico (pH 3,5), pelo método estria por esgotamento e incubados em estufa BOD a 25° C por 5 dias. O fungo isolado foi inoculado em tubos inclinados contendo o meio BDA, e armazenados sob-refrigeração para a utilização de futuras atividades (DIFCO MANUAL, 1984).

### 4.4 PREPARO DOS EXTRATOS DA PRÓPOLIS

Foram preparados extratos de própolis contendo 30% (m/m) de droga em relação aos seguintes líquidos extratores:

- a) álcool 96%;
- b) álcool-água 50 % (m/m);
- c) água ;
- d) metanol;
- e) acetato de etila;
- f) *n*-hexano.

Foi adicionada a própolis ao volume de solvente extrator, em recipiente adequado. O material foi submetido a três turbos extrações de 5 minutos, com dois intervalos de repouso de cinco minutos. Cada extrato foi submetido à filtração com funil de buchner, sob vácuo e acondicionado em frasco de vidro âmbar com batoque interno de vedação e tampa rosca (LIST e SCHMIDT, 1989).

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO SECO DO EXTRATO DA PRÓPOLIS

Utilizando-se balança analítica foram pesados em placas de Petri taradas, aproximadamente 3,000 g de amostra. A amostra foi levada a estufa e seca a 110 °C, até peso constante, calculando-se a porcentagem de resíduo seco em relação à massa inicial (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

#### 4.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Os testes de sensibilidade em antifúngicos foram realizados pelo método de microdiluição em caldo Sabouraud, onde foram suspensos  $1 \times 10^6$  dos esporos do fungo de gênero *Botrytis* isolados a partir do fruto, em 100 µL de Sabouraud na placa de microtitulação.

Foram preparadas concentrações dos extratos da própolis nas concentrações testadas de 250, 500 e 1000 µg/mL, alíquotas de cada diluição de cada extrato foi dispensada nos poços de placas de microtitulação de fundo chato (PIRES, 2010), juntamente com 1% da solução de Tween 80. Os inóculos foram preparados na solução de Tween 80 e suspensos um volume de 100 µL na placa. Foram adicionados aos poços 1 a 12 da placa de microdiluição 100 µL de água destilada estéril e 100 µL do inóculo (controle positivo de crescimento). Foram adicionado nos poços B ao G 100 µL do caldo Sabouraud, mais 100 µL do inóculo e cada diluição do antifúngico para atingir as concentrações finais tanto do inóculo quanto da droga. Ao poço de letra H foram adicionados 100 µL do inóculo, 100 µL de Sabouraud e o antifúngico Ciprodez (ciprofloxacino) (controle negativo de crescimento). Foi aplicado um

teste controle com todos os solventes utilizados para a preparação dos extratos com o fungo, sendo utilizadas as mesmas condições usadas como líquido extrator nos preparos dos extratos. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas em 24 horas, 48 horas e 72 horas de incubação a 25° C, sendo as leituras realizadas por espectrofotometria (RODRIGUEZ-TUDELLA et al., 2003; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2007) com leitor de microplacas a 630 nm (EUCAST-AFST, 2008).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos das análises físico-químicas e microbiológicas foram submetidos ao tratamento de média, desvio padrão e coeficiente de variação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES FÍSICO- QUÍMICAS

Os valores das análises da caracterização da própolis estão dispostos na tabela 1, para a discussão dos resultados foi realizado o tratamento de média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de própolis.

**Tabela 1 - Caracterização da amostra de própolis quanto aos seus parâmetros físico-químicos.**

<b>Experimento</b>	<b>Resultado</b>	<b>Desvio Padrão/ CV</b>	<b>Requisito da Legislação</b>
<b>Umidade</b>	7,45 %	± 0,06/ 0,85	Máximo de 8 %
<b>Cinzas</b>	2,04 %	± 0,02/ 1,23	Máximo de 5 %
<b>Ceras</b>	11,35 %	± 0,87/ 7,68	Máximo de 25 %
<b>Flavonóides</b>	0,26 %	±0,01/ 5,73	Mínimo de 0,25 %

Cv: coeficiente de variação

Os dados expressos na tabela 1, da análise de própolis da região de Francisco Beltrão foram comparados com a Instrução Normativa nº. 3 de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001). Pode-se observar que a amostra de própolis está de acordo com o limite estabelecido quanto ao percentual de umidade, cinzas, ceras e flavonóides.

A umidade e o teor de cinzas influenciam na qualidade do produto, através destas análises podem ser identificadas possíveis fraudes ao produto, e até mesmo as condições em que o produto foi armazenado (MARCUCCI, 2005).

O teor de umidade é mais elevado quando a própolis não é armazenada de maneira correta, onde vai causar a deterioração do produto mais rápido, se a mesma estiver com um alto índice de água, poderão ocorrer o crescimento de fungos que vão interferir na sua qualidade, onde o produto irá se tornar impróprio para o consumo (SALATINO, 1999; MARCUCCI, 2005).

Melo et al., (2012), avaliaram a umidade de amostras de própolis de várias regiões do Brasil, onde os resultados de umidade da região Nordeste foram semelhantes aos da região Sul, sendo respectivamente 4,59% e 4,48%, e o mesmo ocorreu na região Sudeste e região Oeste com 6,30% e 6,64%. Todas as amostras se encontraram nos limites estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2001).

Os autores ainda citam que as variações do teor de umidade podem estar relacionadas ao local onde a própolis é depositada na colmeia, pois quanto maior o contato com o ambiente externo, maior será o teor de água da própolis, atribuindo em maior ou menor umidade nas amostras. Silva (2009) avaliou a qualidade de dois tipos de própolis, a própolis verde e marrom, onde o teor de umidade foi de 7,77 % para própolis marrom e 8,63 % para a própolis verde. Os autores ainda atribuem o alto teor de umidade da própolis verde pelo acondicionamento incorreto do produto.

As cinzas são um constituinte natural da própolis, o material inorgânico em altas quantidades denunciam adulterações no produto, como adição de terra ao produto em pó ou até mesmo outros resíduos gerados de extração da própolis (WOISKY, 1996; MARCUCCI, 2005; SALATINO, 1999).

Segundo Franco et al. (2000), o alto teor de cinzas são provenientes contaminação por impurezas naturais do ambiente, uma vez que a colmeia estão expostas ao ar livre, onde contém diversas partículas de poeiras, insetos e folhas. Além de ainda pode ocorrer à adição intencionalmente de impurezas nas colmeias pelas abelhas.

Garcia et al. (2000), analisaram amostras de própolis provenientes do estado do Paraná e encontrou valores de cinzas de 3,56 % nas amostras coletadas no período do verão e 3,20 % no inverno, valores maiores do que os obtidos neste trabalho.

Silva et al. (2006), realizou a análise do teor de ceras de seis colheitas de própolis da região da Paraíba, constatou-se que os resultados obtidos para o teor de ceras das colheitas 2, 3, 4 e 5 não estavam de acordo com o limite estabelecido pela legislação, pois apresentaram respectivamente 38,55 %, 38,05 % e 30,49 % de ceras, que ultrapassam o limite de 25 % de ceras. Já as amostras de própolis das colheitas de 1, 4 e 6 apresentaram valores respectivamente de 2,25 %, 23,06 % e 15,69 %, se encontrando em acordo com a legislação vigente (BRASIL 2001). Silva et al. (2006), ainda citam que a variação dos dados obtidos pelo seu estudo, durante o período de colheita das amostras onde apresentaram um alto teor de ceras é devido ao período das colheitas, onde a medida em que as abelhas encontram escassez de resina no campo, começam a aumentar a proporção de ceras na própolis produzida durante o período de colheita.

Garcia et al. (2000), encontram altos teores de ceras do estado do Paraná, que correspondiam a 26,72 % da coleta de verão e 25,08 % da coleta de inverno.

A legislação classifica a própolis quanto ao seu teor de flavonóides como:baixo teor: até 1,0 %, médio teor: 1,0, 2,0 % e alto teor: superior à 2,0 %. Desta forma, o teor de flavonoides total encontrado no trabalho se caracteriza como baixo teor (BRASIL, 2001).

Nunes (2008), analisou o teor de flavonóides de 8 amostras de própolis provenientes de várias estados do Brasil, onde somente as amostras A7 (Minas Gerais) e A8 (Ceará) apresentaram o teor abaixo do exigido (0,25 %).

Dutra et al. (2008), avaliaram o teor de flavonoides em 7 amostras de onde 5 amostras eram provenientes do município de Arari no Estado do Maranhão, uma amostra do município de São João Batista e uma de São Bento, onde os teores de flavonóides variaram entre 0,17 a 2,76 %. Os autores constataram que as amostras do município de Arari apresentaram um alto teor de flavonóides e de acordo com a legislação amostras são consideradas de alto teor de flavonóides, duas amostras apresentaram baixo teor de flavonóides com 0,17 %, e por fim as duas últimas amostras apresentaram um teor médio de flavonóides com 0,61 %.

Assim como a composição da própolis varia de acordo com a região geográfica, podemos atribuir ao conteúdo de flavonóides de acordo com a flora, período da coleta, região coletada pelas abelhas entre outros fatores (BANKOVA, 2005; PARK et al., 2002).

A diferença entre a amostra estudada neste trabalho e as amostras analisadas pelos autores nos dados publicados, pode ser devido a ausência de flores na região de Francisco Beltrão na época da coleta, o que leva as abelhas a coletar outras substâncias fenólicas para a produção da própolis.

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos para a determinação do resíduo seco e pH dos extratos da própolis.

**Tabela 2 -Valores da determinação do resíduo seco e pH dos extratos da própolis**

	<b>Resíduo seco (%)</b>	<b>pH</b>
<b>Própolis c/ água</b>	15,08 ( $\pm 0,01$ )	5,03 ( $\pm 0,03$ )
<b>Própolis c/ álcool 96</b>	70,00 ( $\pm 0,06$ )	5,24 ( $\pm 0,08$ )
<b>Própolis c/ álcool 50</b>	17,58 ( $\pm 0,01$ )	5,02 ( $\pm 0,01$ )
<b>Própolis c/ hexano</b>	6,00 ( $\pm 0,53$ )	4,14 ( $\pm 0,16$ )
<b>Própolis c/ acetato</b>	84,00 ( $\pm 0,01$ )	3,93 ( $\pm 0,07$ )
<b>Própolis c/ metanol</b>	76,58 ( $\pm 0,02$ )	4,74 ( $\pm 0,11$ )

De acordo com a tabela 2 observamos as diferenças entre os resíduos secos que variaram de 6,00 a 76, 58 %, de acordo com cada solvente utilizado para a produção dos extratos.

Pode-se observar que os resíduos alcoólicos de própolis como o álcool 96, metanol respectivamente com 70 e 76, 58 %, apresentaram maiores valores do resíduo seco em relação

aos demais extratos, onde pode-se atribuir a este fenômeno à saturação do líquido extrator e ao fato do álcool solubilizar a resina melhor que os extratos que contém água, apresentando valores de 15,08 % e para o extrato de álcool 50 17,58 %, podemos conferir isto ao fato de a própolis ser um material resinoso insolúvel em água (LONGHINI, 2007)

O líquido extrator aqui apresentou menor resíduo seco foi o do hexano com 6 %, devido ao hexano ser apenas capaz de extrair apenas compostos mais apolares da própolis (PEREIRA, 2011).

O extrato com acetato de etila obteve um melhor valor comparado aos demais extratos com 84 %, este solvente é capaz de extrair diversos compostos da própolis como cumarinas e flavonoides (MARTINS et al., 2012).

Longhini et al. (2007), preparou seis extratos de própolis com dois tipos de líquidos extratores, onde três foram produzidos com álcool e os demais com glicólicos, uma mistura de glicol e água. Os extratos alcoólicos de própolis apresentaram maiores valores de resíduo seco com 14,90 %, sem apresentar o aumento no seu teor de flavonóides, já os extratos glicólicos apresentaram um resíduo seco de 1,85 %, devido a insolubilidade da própolis, além do seu teor de flavonóides também ter diminuído.

Os autores ainda analisaram o pH dos extratos preparados, onde a faixa de pH dos extratos alcoólicos variou de 5,46 a 5,82, enquanto para os extratos glicólicos variou entre 4,86 a 5,03. O pH é um dos parâmetros fundamentais para avaliara a qualidade do extrato, pois este é responsável por selecionar e determinar quais substâncias foram extraídas.

Os valores de pH dos extratos preparados à base de água e os extratos alcoólicos encontrados no trabalho são parecidos com o estudo realizado por Longhini et al. (2007). O extrato que obteve uma maior variação dos demais foi o produzido com acetato com um pH em torno de 3,93. Em geral todos os extratos apresentaram um pH de caráter ácido que evita a contaminação dos extratos por microrganismos.

## 5.2 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA

Durante o desenvolvimento do trabalho foram encontrados alguns dificuldades na padronização da metodologia, principalmente relacionados com a solubilidade dos extratos, ocasionado pela diversidade de polaridade dos solventes utilizados. Em geral os ensaios microbiológicos são desenvolvidos em meio aquoso, ou seja, polar. Como uma forma de se tentar resolver o problema de solubilidade, foi utilizado nos experimentos a adição do

surfactante Tween 80. Uma análise prévia foi realizada utilizando-se várias porcentagens de Tween 80 para verificar se este não inibia o crescimento do fungo e verificar a melhor porcentagem para se aplicar nos extratos.

**Tabela 3 - Porcentagens testadas de Tween 80**

Porcentagens	15%	10%	1%	0,1%	0,01%
Fungo <i>Botrytis</i> sp.	+	+	+	+	+

(+) crescimento positivo do fungo

O teste foi realizado em placa de Elisa e após o período de incubação do fungo (5 dias) a placa foi submetida a leitura visual a olho nu. Foi observado que nenhum dos percentuais de Tween utilizados inibiram o crescimento do fungo do gênero *Botrytis*. Desta forma, foram adotados o valor de 1 % de Tween 80 para os testes subsequentes.

### 5.3 ANÁLISE DO TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

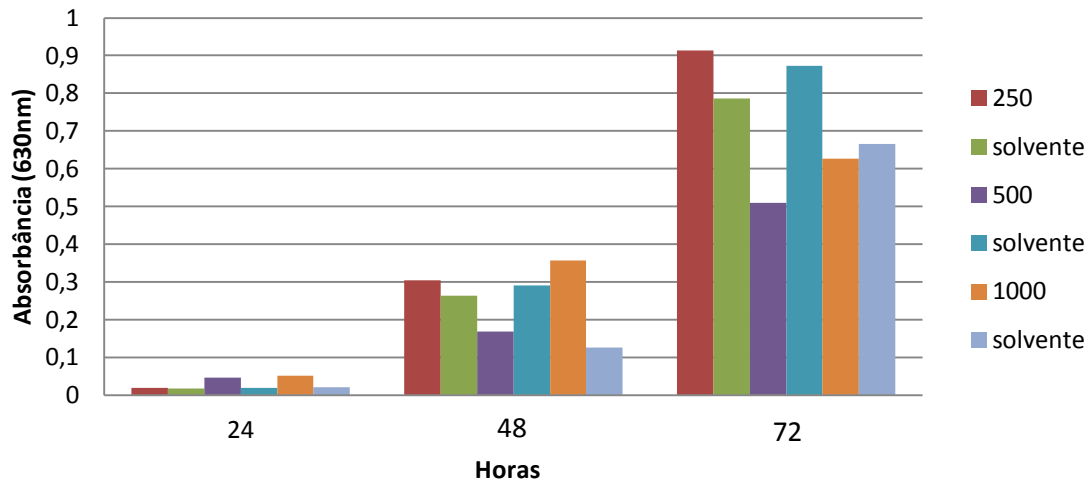
Para a melhor compreensão e interpretação dos resultados da ação antimicrobiana dos extratos, abaixo se encontra os gráficos com as leituras de absorbância da microplaca (630 nm).

No gráfico 1 está expresso o resultado da leitura da absorbância (630 nm) para o teste de controle de *Botrytis cinerea* com o extrato aquoso de própolis.

Podemos observar que as absorbâncias (630 nm) dos extratos aquosos de própolis (250 -1000 µg/mL) e dos controles com água variaram de acordo com as concentrações. Para a leitura de 24 horas observamos que *B. cinera* cresceu melhor nos poços tratados do que nos poços com o controle água na mesma concentração do extrato correspondente. Em 48 horas, nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg /mL, o fungo teve um crescimento gradual. Pode-se verificar que o extrato aquoso apresentou efeito contra o fungo na concentração de 500 µg/mL. na concentração de 1000 µg /mL *B. cinera* teve um maior crescimento nos poços tratados em relação à água, o dado indica um resultados falso positivo, pois se na concentração de 500 µg/mL o extrato teve ação, então na concentração de 1000 µg/mL o extrato deveria manter a atividade contra o fungo. Em 72 horas a concentração de 250 µg/mL continuou apresentando um maior crescimento de *B. cinera* em comparação ao solvente, nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL o extrato apresentou efeito contra crescimento do fungo



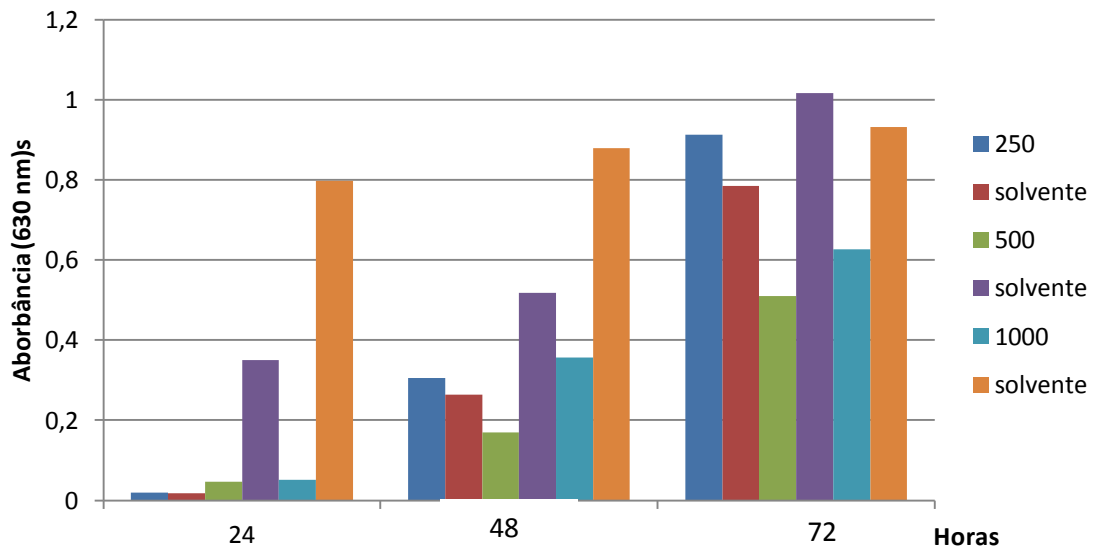
quando comparado ao controle. Sendo que na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  a inibição do extrato não é uma inibição dose- dependente, pois não apresenta ação inibitória parcial do fungo.



**Gráfico 1** - Crescimento do Fungo *Botrytis cinerea* do extrato Aquoso

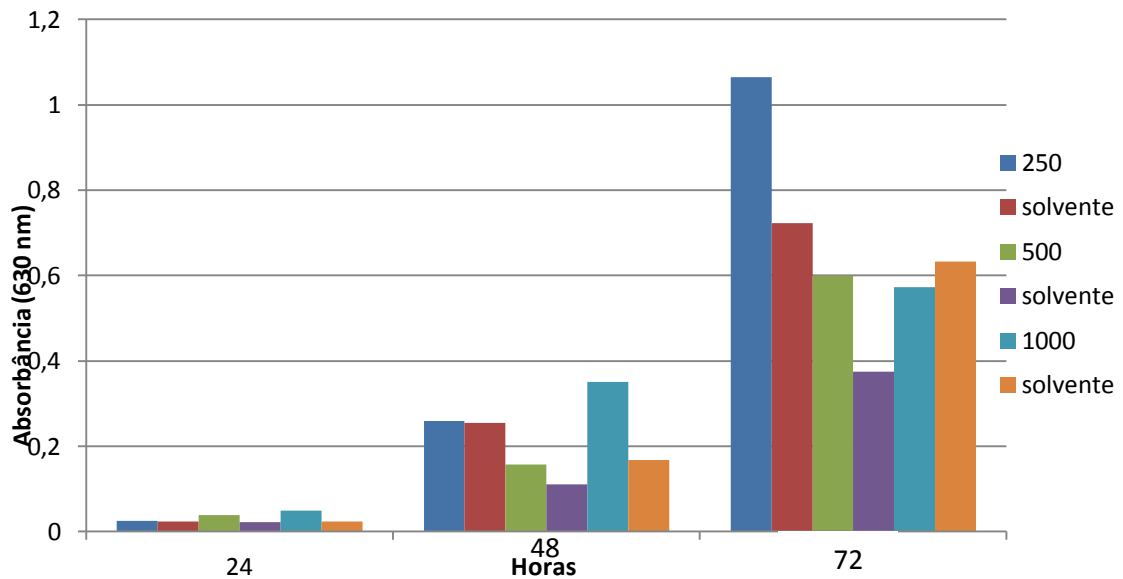
No gráfico 2 está expresso o resultado da leitura de absorbância para o fungo *B. cinerea* com o extrato de própolis em etanol 96%.

Em 24 horas os poços com o fungo tratado com o extrato etanólico de própolis tiveram um crescimento maior que em etanol à 96% na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ . Na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  *B. cinera* cresceu em pequena escala em relação ao solvente Na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  teve a mesma reação onde pode-se notar que houve efeito contra o fungo nas concentrações citadas a cima. Em 48 e 72 horas nota-se que o extrato etanólico de própolis nas concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  continuaram apresentando efeito no crescimento contra *B cinerea*.



**Gráfico 2** - Crescimento do Fungo *Botrytis cinerea* do extrato etanol 96%

No gráfico 3, o teste com o do extrato de própolis em etanol 50 % mostrou que em 24 horas o crescimento de *B. cinerea* se comportou do mesmo modo para a concentração de 250 µg/mL comparando-o com o solvente (etanol 50 %), nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL houve um crescimento maior do bolor nos extratos do que nos solventes. Em 48 horas, *B. cinerea* apresentou um crescimento parecido ao solvente na concentração de 250 µg/mL, nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL o fungo apresentou um maior crescimento nos poços tratados em relação ao solvente. Já em 72 horas, as concentrações de 500 e 1000 µg/mL apresentaram um alto crescimento fúngico em comparação ao solvente, não havendo a atividade no crescimento fúngico, porém na concentração de 1000 µg/mL, o extrato apresentou um baixo efeito contra *B. cinerea*, o fato se deve à coloração do extrato cuja concentração começou a interferir na leitura da absorbância à 630 nm.

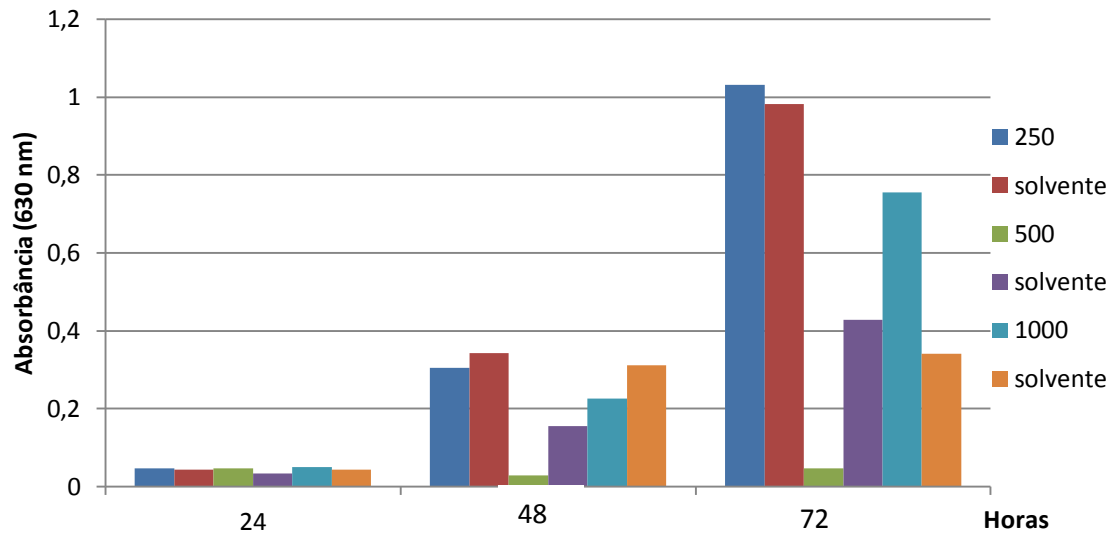


**Gráfico 3** - Crescimento do Fungo *Botrytis cinerea* do extrato etanol 50 %

No gráfico 4 nota-se que em 24 horas os poços com o tratado com extrato hexânico de própolis apresentou maior crescimento em relação ao solvente n-hexano.

Em 48 horas há indícios do efeito sobre o crescimento de *B. cinerea* na concentração de 250 µg/mL. Na concentração de 500 µg/mL observa-se efeito contra o *B. cinerea* pelo extrato hexânico de própolis E na concentração de 1000 µg/mL apresentou baixo inibição do fungo em relação ao solvente.

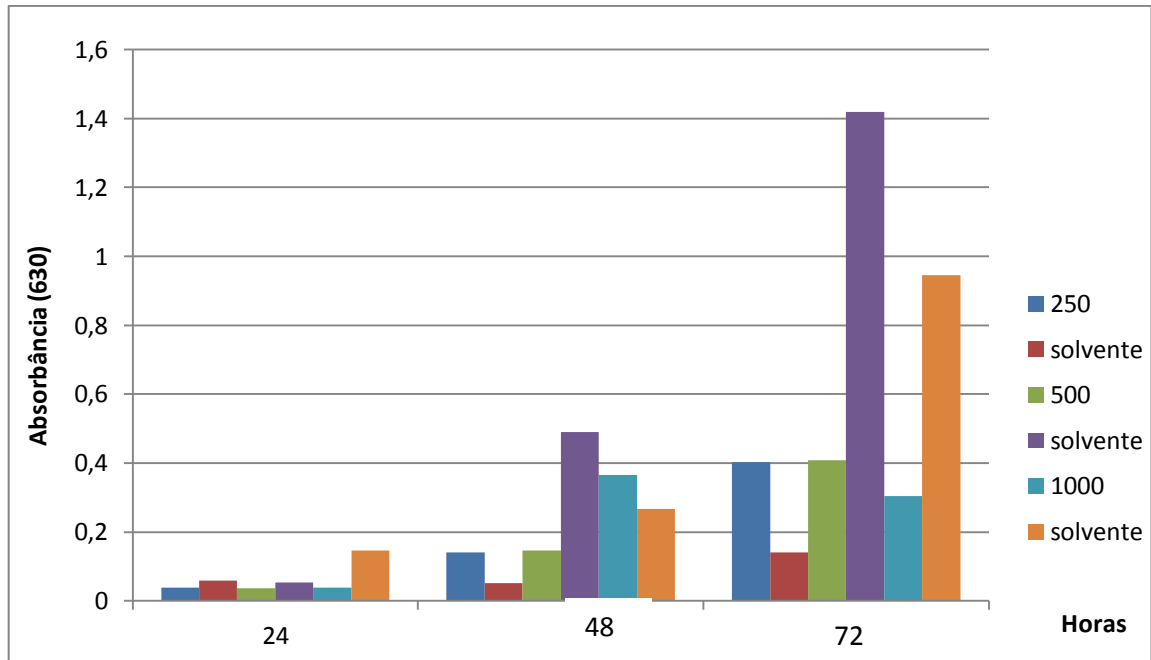
Já em 72 horas o extrato hexânico de própolis que em 48 h tinha exibido indícios de efeito sobre a inibição no crescimento não manteve esse efeito. Já a concentração de 500 µg/mL continuou apresentando efeito no crescimento de *B. cinerea*. O altos valores de absorbância na concentração de 1000 µg/mL em relação ao solvente, indica um resultado falso positivo da análise.



**Gráfico 4** - Crescimento do Fungo *Botrytis cinerea* do extrato hexânico

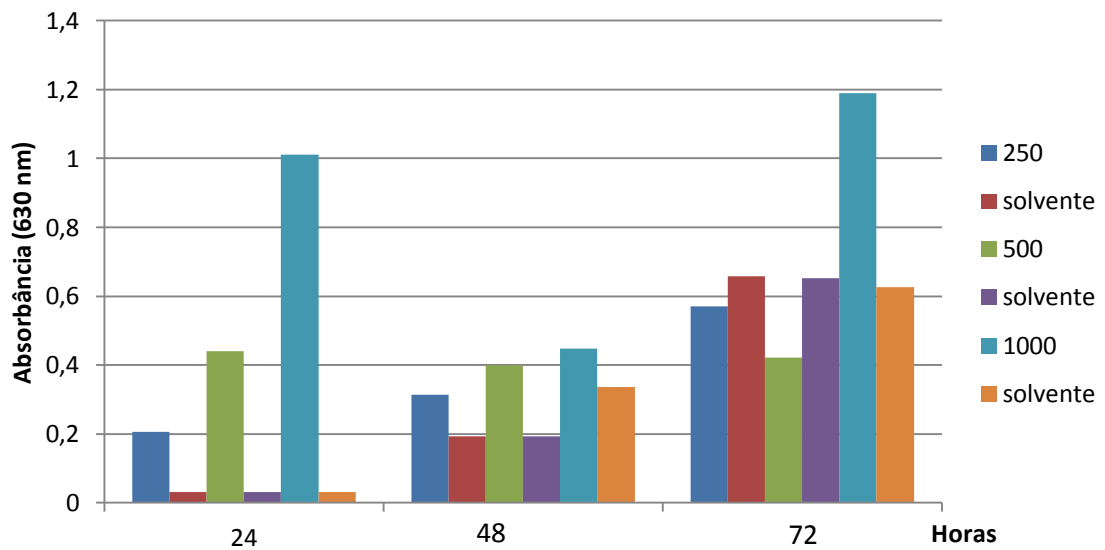
No gráfico 5 verificamos que em 24 horas o bolor testado em acetato de etila apresentou um maior crescimento de *B. cinerea* quando comparado aos tratados com os extratos de própolis neste solvente.

Em 48 horas pode ser observado na concentração de 500 µg/mL o efeito no crescimento fúngico do extrato acetato etílico de própolis ao fungo, em 72 horas a concentração continua apresentando efeito contra *B. cinerea*. Já na concentração de 1000 µg/mL em 48 horas não apresenta efeito sobre o crescimento fúngico do extrato acetato etílico de própolis, apresentando a ação somente em 72 horas.



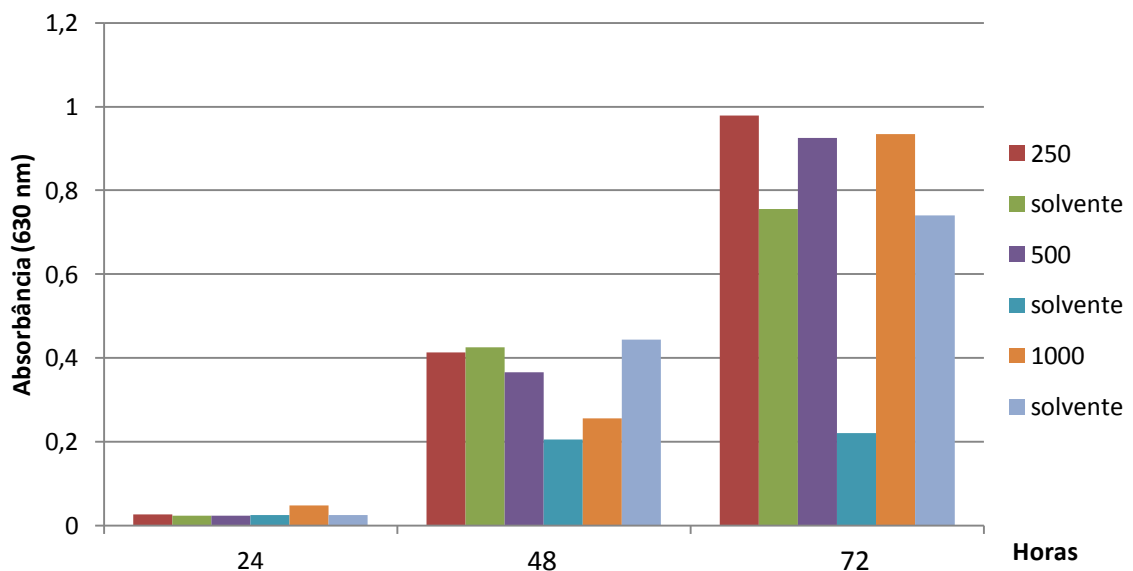
**Gráfico 5** - Crescimento do Fungo *Botrytis cinerea* do extrato Acetato de Etila.

No gráfico 6 observamos que a partir da concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  em 24 e 48 horas a leitura de absorbância (630 nm) devido a coloração do extrato etanólico de própolis acabou influenciando nas análises. Em 72 horas nota-se uma diminuição da leitura de absorbância nas concentrações de 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ , onde se poderia dizer que houve ação do extrato contra o fungo, mas analisando a concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  percebe-se que a coloração do extrato influenciou na absorbância resultando em um dado falso-negativo, pois não houve inibição do fungo.



**Gráfico 6 - Crescimento do Fungo *Botrytis cinerea* do extrato Metanólico**

No gráfico 7 estão expostos os resultados obtidos pela leitura de absorbância (630 nm) do teste com *Botrytis* sp (MH) isolado de morango hidropônico no extrato com água.



**Gráfico 7 - Crescimento do Fungo Morango Hidropônico do extrato aquoso**  
M.H: morango hidropônico

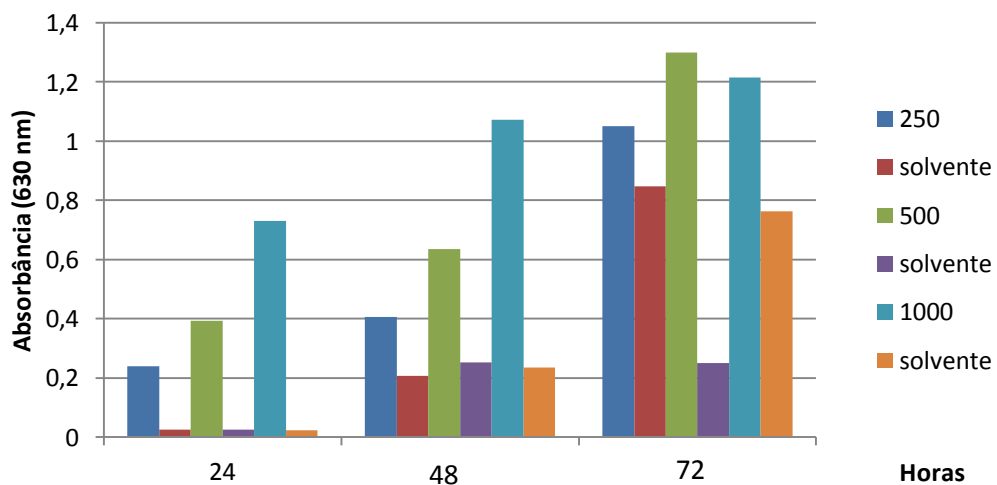
Observamos que nas concentrações de 250  $\mu\text{g/mL}$  em 24 horas a resposta do bolor ao tratamento apresentou uma pequena na leitura de absorbância entre o extrato e o solvente, já para a concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  houve um crescimento maior no solvente teste que o tratado com o extrato aquoso de própolis. Na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  o fungo teve um crescimento superior no extrato em relação ao solvente.

Em 48 horas nas concentrações de 250  $\mu\text{g/mL}$  o fungo teve um crescimento similar ao de 24 horas. Na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  houve um maior crescimento da cepa (MH) nos poços tratados que nos poços com o solvente somente, porém na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  o extrato apresentou efeito contra MH.

Em 72 horas houve um maior crescimento do da cepa MH nas concentrações testadas do extrato de própolis em relação ao solvente, sendo que na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  o crescimento do solvente foi muito baixo.

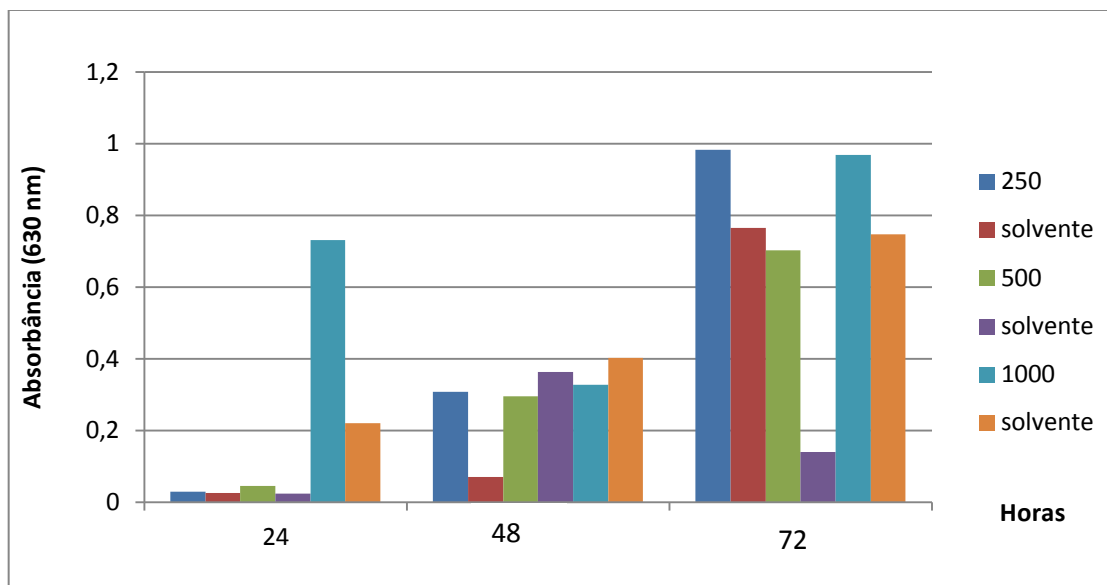
A concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  que em 48 horas apresentou efeito sobre o crescimento fungo, não manteve esse efeito em 72, apresentando um maior crescimento fúngico que no solvente. O extrato aquoso da própolis não apresentou inibição total contra a cepa isolada do morango hidropônico em nenhuma das concentrações testadas.

No gráfico 8 a coloração do extrato da própolis com o álcool 96 % teve interferência durante a leitura da absorbância, sendo assim não foi possível analisar o crescimento da cepa MH isolada do morango hidropônico.



**Gráfico 8** - Crescimento do Fungo Morango Hidropônico do extrato etanol 96 %.  
M.H: morango hidropônico

No gráfico 9 avaliação do efeito do extrato de própolis em etanol 50 % resultou em uma grande variação das leituras de absorbância.



**Gráfico 9** - Crescimento do Fungo Morango Hidropônico do extrato etanol 50 %.  
M.H: morango hidropônico

Em 24 horas observa um crescimento uniforme do bolor nos extratos e solventes, onde somente na concentração de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  houve um crescimento do fungo no extrato de própolis em etanol 50 % maior que em relação ao controle com etanol 50 % somente, atribuímos este fato à coloração do extrato.

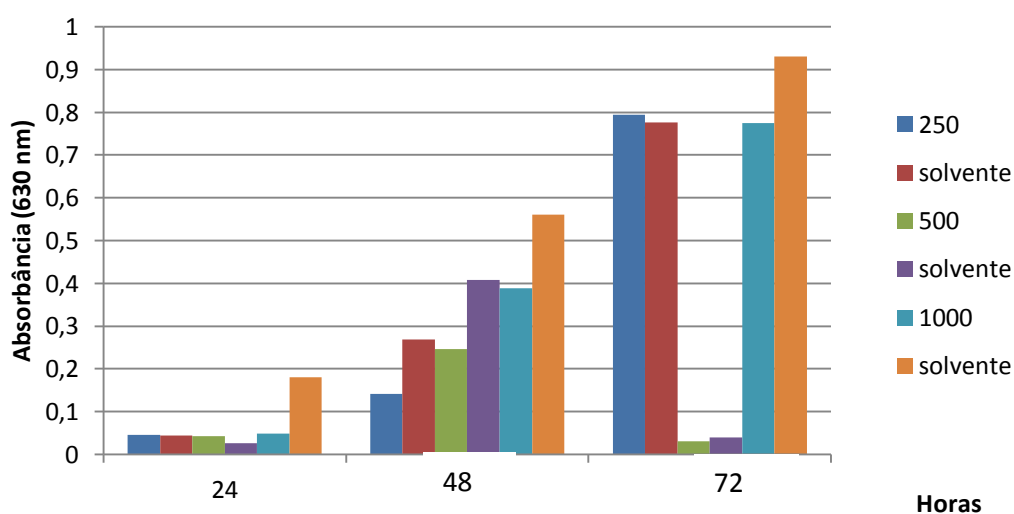
Em 48 horas temos um crescimento similar do microrganismo em todos os testes, verificando que em algumas o crescimento fúngico no controle só com o solvente foi maior em relação ao extrato etanoico 50% de própolis, (500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), apresentando efeito sobre o crescimento microrganismo.

Já em 72 horas é possível verificar a interferência da coloração dos extratos na leitura, onde os extratos de própolis apresentam um valor de absorbância maior que os solventes, percebe-se que nas concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o resultado da análise foi controverso em relação a leitura de 48 horas, pode-se dizer que a leitura apresentou um resultado falso positivo nas concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pela interferência da coloração.



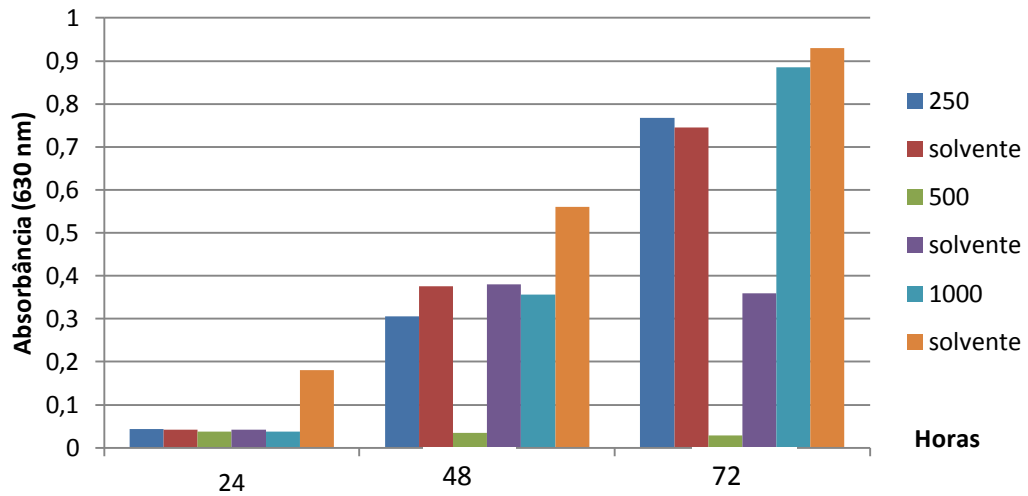
No gráfico 10 pode-se verificar os extratos de própolis afetou o crescimento onda cepa MH nos extratos hexanicos de própolis em 48h;

Em 72 horas a concentração de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  continuou inibindo porém efeito não foi tão eficiente quanto em 48 horas, para a concentração de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  houve uma diminuição drástica do crescimento fúngico no extrato e em hexano, resultado esse que pode ser atribuído à morte de algumas células, ou erro durante a leitura.



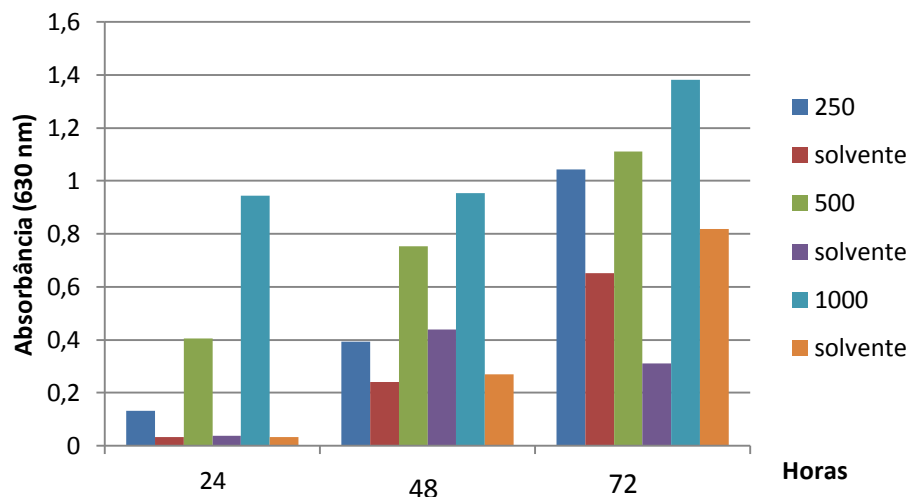
**Gráfico 10** - Crescimento do Fungo Morango Hidropônico do extrato hexânico  
M.H: morango hidropônico

Observa-se que no gráfico 11 as leituras do extrato de própolis em relação ao solvente acetato de etila. Em 24 horas não houve diferença entre o crescimento do fungo no extrato e no solvente, somente na concentração de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em acetato de etila houve um crescimento fúngico maior que ao teste com extrato de própolis em acetato de etila, sendo assim podemos inferir que o extrato inibiu o crescimento do fungo, em 48 horas as concentrações de 250, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresentaram efeito contra o fungo, sendo a concentração de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a mais efetiva, em 72 horas a concentração de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  continuou apresentando efeito contra o crescimento da cepa MH. Na a concentração de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresentou um absorbância menor do extrato em relação ao solvente a cepa, mas como valores acima de 0,8 de absorbância.



**Gráfico 11** - Crescimento do Fungo Morango Hidropônico do extrato Acetato de etila.  
M.H: morango hidropônico

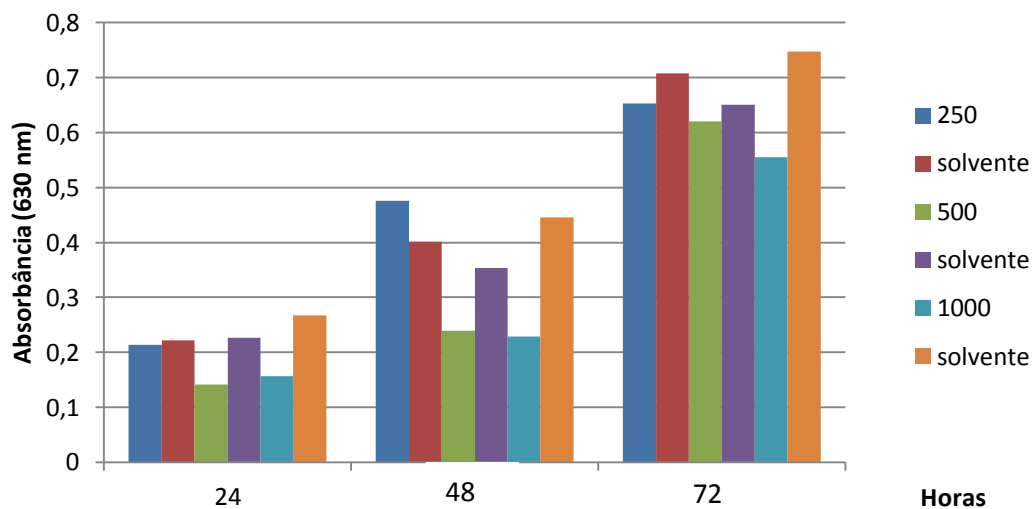
No gráfico 12 pode ser observado que a coloração do extrato metanólico de própolis influenciou na análise de leitura de absorbância, não sendo possível verificar os resultados das concentrações que inibição do fungo.



**Gráfico 12** - Crescimento do Fungo Morango Hidropônico do extrato Metanólico  
M.H: morango hidropônico

Os gráficos 13-18 apresentam as análises dos efeitos dos extratos de própolis sobre o crescimento da cepa de *Botrytis* sp isolada de morango convencional (MC).

No gráfico 13 nota-se que as concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de própolis em extrato aquoso apresentaram efeito no crescimento da cepa MC até 72 horas. A concentração de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em 48 horas apresentou um crescimento fúngico maior nos poços tratados com o extrato que nos poços com solvente aquoso, porém em 72 horas o extrato não foi capaz de apresentar efeito contra o fungo.



**Gráfico 13** -Crescimento do Fungo Morango Convencional no extrato aquoso.  
M.C: morango convencional.

No teste com extrato de própolis em etanol 96% novamente houve interferência da coloração do extrato de própolis nas absorbâncias analisadas, não sendo possível verificar o efeito do extrato contra a cepa MC.

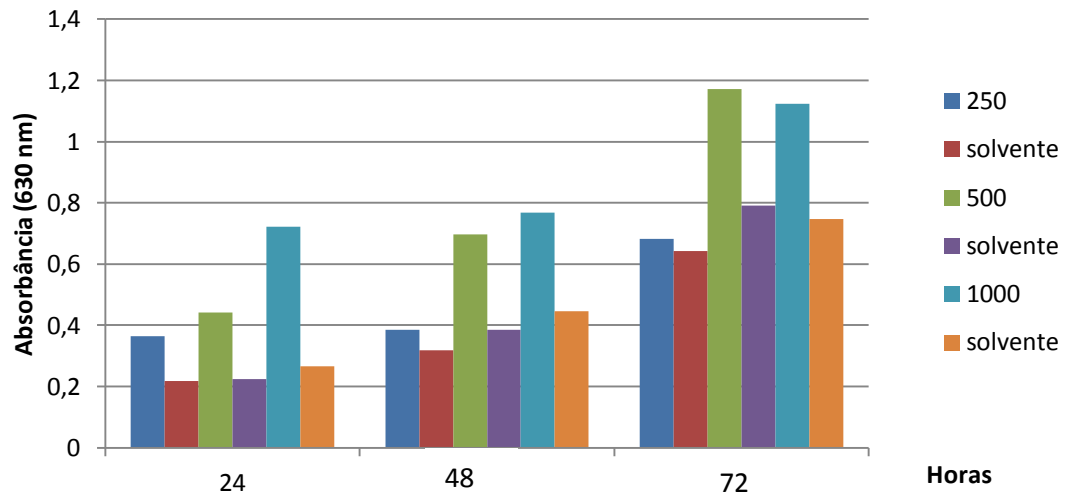


Gráfico 14 - Crescimento do Fungo Morango Convencional no extrato etanol 96 %.  
M.C: morango convencional.

No gráfico 15 percebe-se que as concentrações de 250, 500 e 1000 µg /mL no extrato de própolis em etanol 50 % em 24 horas apresentam efeito sobre o crescimento do fungo. Em 48 horas o extrato na concentração de 250 µg /mL teve baixo efeito sobre a cepa MC, já nas concentrações de 500 e 1000 µg /mL do extrato de própolis em etanol 50% permaneceram ativas contra o microrganismo, em 72 horas o extrato não foi capaz de manter o efeito.

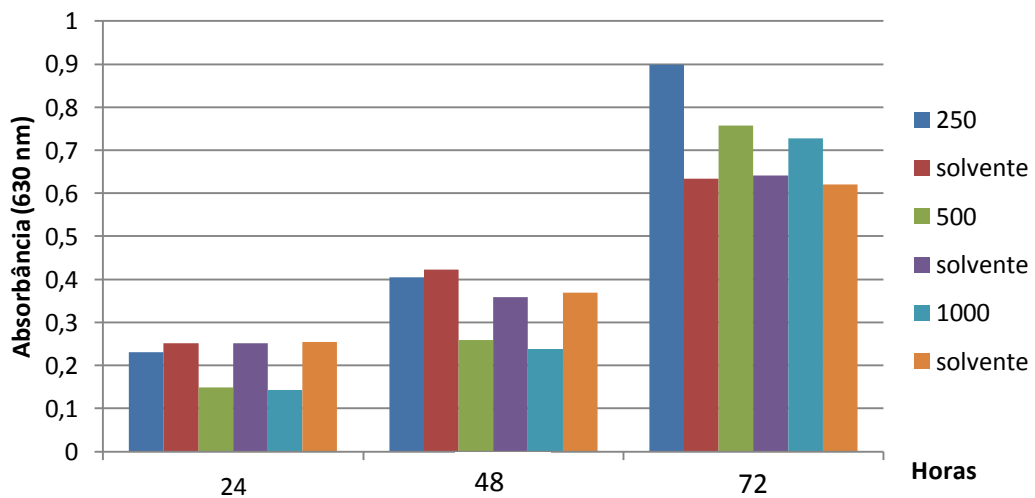
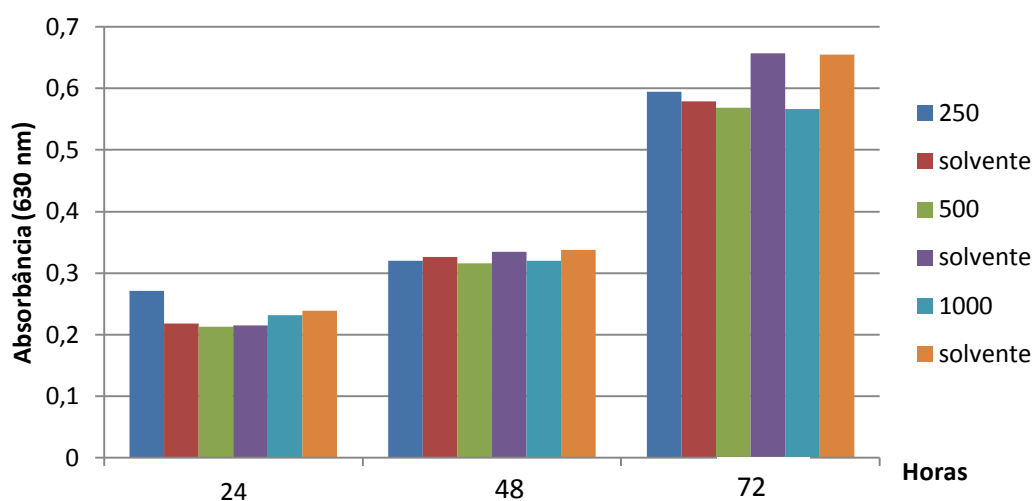


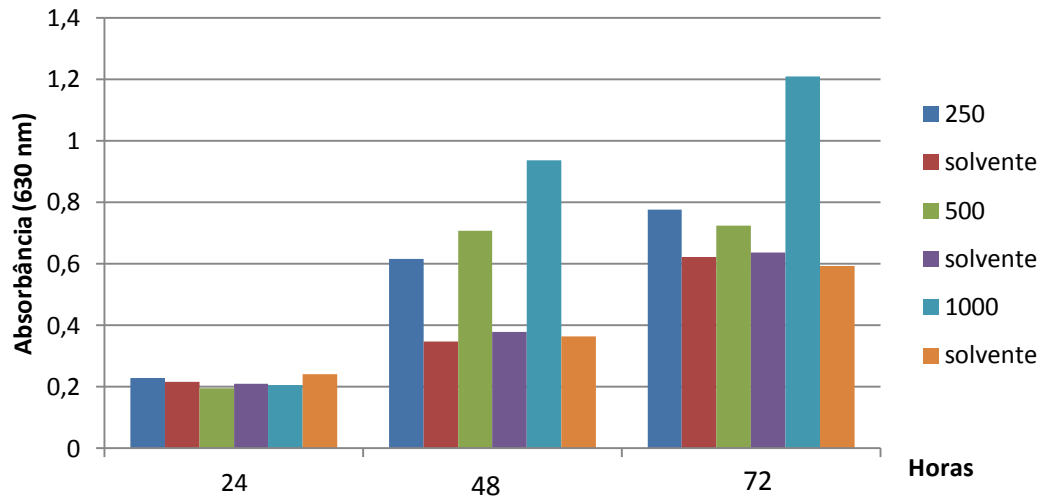
Gráfico 15 - Crescimento do Fungo Morango Convencional no extrato etanol 50 %.  
M.C: morango convencional.

Nota-se que no gráfico 16 com o extrato hexânico de propólis o crescimento da cepa MC de 24 a 72 horas foi constante, durante 48 horas o solvente da concentração de 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  apresentou um indício de efeito a cepa MC, nas concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  um leve efeito contra o microrganismo foi mantida em 72 horas.



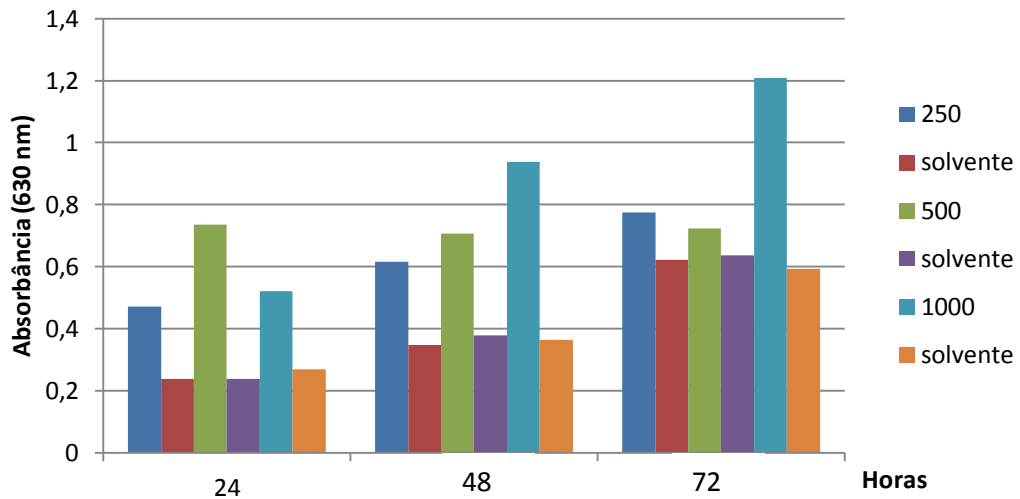
**Gráfico 16** - Crescimento do Fungo Morango Convencional no extrato hexânico.  
MC: morango convencional.

Analisando o gráfico 17 verifica-se que em 24 horas a concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  do extrato de propólis em acetato de etila apresentou leve efeito contra a cepa MC, porém após 48 horas pode-se certificar de que o extrato testado não apresentou efeito a cepa MC, uma vez que o seu crescimento nas concentrações do extrato foi elevado em relação ao controle.



**Gráfico 17** - Crescimento do Fungo Morango Convencional no extrato Acetato de etila.  
M.C: morango convencional.

O gráfico 18 expressa a influência da coloração dos extratos da própolis em metanol na leitura de absorbância, onde não foi possível notar a ação antifúngica dos extratos.



**Gráfico 18** - Crescimento do Fungo Morango convencional no extrato metanólico.  
M.C: morango convencional.

Foi realizado uma análise das placas de Elisa para verificar se os solventes utilizados para o preparo dos extratos iriam causar danos a placa. Estes resultados estão expostos na tabela 4 abaixo.

**Tabela 4 - Efeito do solvente sobre a microplaca de poliestireno**

Solvente	Alteração na cor da microplaca
Etanol 96 %	N.D
Etanol 50 %	N.D
Hexânico	N.D
Acetato de Etila	N.D
Metanol	Danificou a placa

N.D : não detectado.

Considerando a dificuldade de analisar através da leitura de absorvância o efeito dos extratos e seus solventes sobre o crescimento fúngico, foram testados o efeito do solvente sobre as microplacas de poliestireno, para verificar se o solvente danificaria a placa no teste com metanol observou-se que nas bordas dos poços da microplaca resultou em u uma mancha esbranquiçadas. Devido a este problema sugere-se a utilização de microplacas com outro material que não sofra a abrasividade é indicada. Ou confirmar os testes por métodos convencionais como meios de cultura em Placas de Petri ou tubos de vidro resistentes a estes solventes.

Devido ao problema da interferência da cor dos extratos nas leituras de absorvância dos poços da microplacas foi realizada uma análise das microplacas após 24 horas de tratamento, observando-se a presença de estruturas fúngicas do bolor testado em lupa de aumento 10 x.

Na tabela 5 encontra-se os resultados das análise 24 horas de *Botrytis cinerea* para os extratos com suas concentrações e controles do solventes.

Tabela 5 - Análise da presença de estruturas de *B. cinerea* através de lupa de aumento após 24h (10x).

	24 horas					
	250	Solvente	500	Solvente	1000	Solvente
<b>Controle +</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Própolis + água</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Própolis + álcool 96%</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Própolis + álcool 50%</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Própolis + hexano</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Própolis + acetato de etila</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Própolis + metanol</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Controle -</b>	-	-	-	-	-	-

Controle (+): água e microrganismo

+ : crescimento do fungo

Controle (-): microrganismo e antifungicida

-: não detectado

No tempo de 24 horas não foi detectado o crescimento do fungo *Botrytis cinerea*, em nenhuma das concentrações dos extratos, assim como no solvente.

Já em 48 horas como pode ser observado na tabela 6, é possível verificar que alguns extratos demonstrou efeito contra o crescimento de *B. cinerea*, como o extrato de própolis e hexano nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, e dos extratos de hexano, acetato de etila e metanol na concentração de 1000 µg/mL.

Comparando os resultados de 48 horas com as leituras de absorvância pode-se perceber que os resultados não foram mantidos para algumas das concentrações, como o extrato metanólico que na leitura da absorvância as concentrações de 500 e 1000 µg/mL apresentou efeito, e nas leituras de com lupa somente a concentração de 1000 µg/mL teve efeito contra a cepa do fungo.

**Tabela 6 - Análise da presença de estruturas de *B. cinerea* através de lupa de aumento após 48 horas. (10x).**

	48 horas					
	250	Solvente	500	Solvente	1000	Solvente
<b>Controle +</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Própolis + água</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Própolis + álcool 96%</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Própolis + álcool 50%</b>	+	+	+	+	-	-
<b>Própolis + hexano</b>	+	+	-	+	-	+
<b>Própolis + acetato de etila</b>	+	+	-	-	-	+
<b>Própolis + metanol</b>	+	+	-	-	-	+
<b>Controle -</b>	-	-	-	-	-	-

Controle (+): água e microrganismo      +: crescimento do fungo  
 Controle (-): microrganismo e antifungicida      -: não detectado

Analisando a tabela 7 visualizamos que em 72 horas o extrato de própolis e hexano manteve a inibição do fungo na concentração de 500 e 1000 µg/mL, assim como os extratos acetato de etila e metanol nas concentrações de 1000 µg/mL, o extrato de álcool 96 % apresentou efeito contra a cepa do microrganismo na concentração de 1000 µg/mL.

Relacionando com os resultados das leituras de absorvância de 72 horas, o extrato hexânico continuou exibindo efeito, já os extratos de álcool 96 % e acetato de etila somente apresentaram efeito nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL na leitura de absorvância, mantendo somente o efeito na concentração de 1000 µg/mL.



**Tabela 7 - Análise da presença de estruturas de *B. cinerea* através de lupa de aumento após 72h. (10x).**

	72 horas					
	250	Solvente	500	Solvente	1000	Solvente
Controle +	+	+	+	+	+	+
Própolis + água	+	+	+	+	+	+
Própolis + álcool 96%	+	+	+	+	-	+
Própolis + álcool 50%	+	+	+	+	-	-
Própolis + hexano	+	+	-	+	-	+
Própolis + acetato de etila	+	+	+	-	-	+
Própolis + metanol	+	+	-	+	-	+
Controle -	-	-	-	-	-	-

Controle (+): água e microrganismo  
 Controle (-): microrganismo e antifúngica

+: crescimento do fungo  
 -: não detectado

De acordo com a tabela 8 pode-se observar que em 24 horas nenhuma das concentrações dos extratos analisadas apresentaram ação antifúngica contra o fungo do morango hidropônico, onde o fungo não apresentou crescimento nas primeiras 24 horas.

**Tabela 8 - Análise da presença de estruturas da cepa MH através de lupa de aumento após 24h (10x).**

	24 horas					
	250	Solvente	500	Solvente	1000	Solvente
Controle +	-	-	-	-	-	-
Própolis + água	-	-	-	-	-	-
Própolis + álcool 96%	-	-	-	-	-	-
Própolis + álcool 50%	-	-	-	-	-	-
Própolis + hexano	-	-	-	-	-	-
Própolis + acetato	-	-	-	-	-	-
Própolis + metanol	-	-	-	-	-	-
Controle -	-	-	-	-	-	-

Controle (+): água e microrganismo  
 Controle (-): microrganismo e antifúngica

+: crescimento do fungo  
 -: não detectado



horas pode-se atribuir a um erro durante a leitura dos poços com o extrato da própolis e hexano. Os extratos de própolis e acetato continuaram a ter efeito contra o fungo nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL. Nas leituras de absorvância o extrato de acetato apresentou os mesmos efeitos que nas leituras com lupa.

Baldin et al.(2013), utilizaram as concentrações de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0% de extrato de própolis e álcool 70 % onde foram utilizadas para verificar o efeito sobre fungos fitopatogênicos como o *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola*, o extrato da própolis não afetou a germinação dos esporos em nenhuma das concentrações utilizadas, porém não permitiu o aumento da concentração microbiana.

Ozcan (1999), definiu o efeito inibitório de extratos da própolis aquosos nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3 e 4 % sobre os fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* e *A. parasiticus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium* ssp. e *Penicillium digitatum*, onde a concentração de 4 % foi a que apresentou melhor resultados e os fungos afetados foram a *Alternaria alternata* e *Penicillium digitatum*, os demais fungos apresentaram uma diminuição de cerca de 50 % do crescimento.

Da Silva et al. (2008), apuraram o efeito inibitório de extratos etanólico e aquoso da própolis (50, 93 e 99 %) nas concentrações de 2 e 3 % sob o crescimento dos microrganismos *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Lasiodiplodia theobromae*. Onde o extrato aquoso não apresentou ação inibitória contra os fungos analisados, já para o extrato etanólico apresentou uma inibição maior que 90 % no extrato etanólico com uma concentração de 2% de própolis e na concentração de 50 % do extrato etanólico. Os outros fungos apresentaram maior inibição na concentração de 3 % de própolis.

Na literatura são encontrados poucos trabalhos utilizando extratos de própolis contra fungos, principalmente o *Botrytis cinerea*, uma vez que as análises microbiológicas são contra bactérias patogênicas e leveduras do gênero *Cândida* ssp.

Marini et al. (2012), realizaram um ensaio de inibição dos fungos *P. vitis* e *P. euvitis*, foram utilizados extratos alcoólicos de própolis nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25 e 0,5 % diluídos em água destilada estéril, onde os extratos alcoólicos possuíram baixa atividade antifúngica contra os fungos *P. vitis* e *P. euvitis* para as concentrações analisadas.

De acordo com Alves et al (2011), a atividade antifúngica de própolis em fungos micotoxigênicos como: *A. niger*, *A. uniseriados*, *A. candidus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. tamarii* e *A. terreus* foram utilizados concentrações de 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL e 50 µL

dos extrato aquoso, extrato alcoólico e hidroalcoolicos de própolis, os fungos de gênero *Aspergillus* não apresentou inibição em nenhuma das concentrações dos extratos de própolis.

Araujo (2009), realizaram uma pesquisa onde testou o fungo *Aspergillus nidulans*, que inibiu o fungo por 60 % das amostras de própolis testadas, com halos entre 9,0 e 12,4 mm com a concentração de 750 µg dos extratos adicionados nos poços.

Segundo Da Silva et al. (2007), Metzner et al. (1997) e Burdock (1998), o efeito fungicida da própolis está relacionado a ocorrência de pinocembrina que pode inibir a produção da micotoxina ocratoxina produzida pelos fungos de gênero *Aspergillus*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das análises realizadas no trabalho pode-se ter as seguintes considerações.

- Apesar da coloração dos extratos de própolis ter influenciado na leitura da absorbância nos testes de microdiluição, principalmente nos testes realizados com maior concentração destes, os extratos aquosos, hexânico, acetato de etila e, apresentaram efeito contra o fungo *Botrytis cinerea* em 48 horas e 72 horas, além destes, o extrato alcoólico 96% na concentração de 500 e 1000 µg/mL também teve efeito contra a cepa.

- Os extratos hexânicos e acetato de etila demonstraram efeito contra o crescimento do fungo do morango hidropônico. A partir de teste preliminar da ação dos extratos a diferentes cepas do fungo *Botrytis*, a cepa do microrganismo isolado de morango convencional apresentou uma maior resistência as concentrações dos extratos testados, onde somente os extratos aquoso e hexânico nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL possuíram resultados contra o mesmo, no entanto deve se realizar o teste com diferentes cepas isoladas da amostra de morango convencional para se determinar a resistência aos extratos.

- Os parâmetros de controle de qualidade físico-químico da própolis, como o seu teor de ceras, umidade, cinzas, flavonóides, se apresentaram dentro dos padrões recomendados pela legislação vigente.

Conclui-se que uma das possibilidades do baixo efeito dos extratos de própolis contra as cepas testadas pode estar associados ao baixo teor de flavonóides, no entanto devem ser realizados mais testes para a confirmação da ação antifúngica dos extratos aquosos, etanol 96 %, hexânico e acetato de etila em relação ao fungo de gênero *Botrytis*.

## REFERÊNCIAS

ANTONIAZZI, R. C; RECH, R. **Creme de leite aromatizado**. Projeto de conclusão de curso. Universidade Tecnológica Federal Do Paraná. Francisco Beltrão, 2011.

ANTUNES, L. E. C; DUARTE FILHO; J. D; CALEGARIO; F.F; COSTA, H; REISSER JUNIOR, C.**Produção integrada de morango (PIMo) no Brasil**. Informe Agropecuário 28: p.34-39, 2007.

ALENCAR, S. M; OLDONI, T. L. C; CASTRO; M. L, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian própolis: red própolis. **Jour. of Ethno.**; 113(2):278–283, 2007.

ALVES, V. C.; LIMA. C. E.; OLIVEIRA, J. T.; CALVET, R. M. et al. Atividade antifúngica de *Morinda citrifolia* L. e própolis em *Aspergillus spp*. Isolados em rações comerciais para suínos, aves e cães. UFPI, 2011. Disponível em : <<http://www.ufpi.br/20sic/Documentos/RESUMOS/Modalidade/Vida/9da187a7a191431db943a9a5a6fec6f4.pdf>> Acesso em: 24/ 11/ 2014.

ARAÚJO, Y. L. F. M. Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de própolis da região da foz do Rio São Francisco- Brasil.(Dissertação de Mestrado), Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.

ASSI, L. Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L.ex Fr.). Marechal Cândido Rondon, 2005. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná UNIOESTE. Setembro, 2005.

AVERRE, C. W; JONES, R. K.; MILHOLLAND, R. D. Strawberry diseases and their control. **Fruit Disease Information**. Note n. 5, 2002.

BAUTISTA-BANÕS, S., et al., Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, London, v.25, p.108-118, 2006.

BALDIN, D.; SCAIOR. E.; TELAXKA, F. et al. Extrato etanólicos de própolis na indução de fitoalexinas em sorgo e na atividade antifúngica sobre *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Rev. Cad. de Agro.** Vol. 8, n.. 2, Nov 2013.

BANKOVA, V. Chemical diversity of própolis and the problem of standardization. **Jor. of Ethno.** 100(1-2):114–117, 2005.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L., MARCUCCI, M. C. Própolis: recent advances in chemistry and plant Origin. **Apidologie.** 31(1): 3–15, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro, 2001.

BRUSCHI, M.L, et al. Contribuição ao protocolo de controle de qualidade da própolis e de seus extratos. **Rev. Ciên. Farm,** São Paulo, v.23, n.2, p. 289-306, 2002.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee própolis (própolis). **Foo. And Chemi. Toxi.**, v.36, n.4, p.347-363, 1998.

CAMPO, C. Desidratação osmótica de morangos CV. Aromas. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Rio Grande do Sul, 2012.

CUSHNIE. T. P. T, LAMB. A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents.** 26: 343-356, 2005.

DA SILVA, A. F.; SILVA, JR.; G. J., SILVA, M. B. L., et al. Atividade antifúngica de diferentes extratos comerciais de própolis. In. 5º Congresso Brasileiro de Micologia, Recife, 2007.

DA SILVA, A. F.; CHAVES, J. B. P.; BATISTA, T. A. S. et al. Extratos de propóleos: uma alternativa para el control de hongos postcosecha. In. IV Congresso Latino Americano de Micologia. Mar del Plata: Argentina, 2008.

DEUTSCHES, Arzneibuch. 10. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1994.

DIFCO MANUAL. **Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10th. ed.** Detroit, Michigan, p. 689-691, 1984.

DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A. M. C.; MARQUES, R. R. O. et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da baixada maranhense, Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.118, n.4, João Pessoa, outubro/dezembro, 2008.

DOTA, K. F. D.; CONSOLARO, M. E. L.; SYIDZINSKI, T. I. E.; BRUSCHI, M. L. Antifungal activity of brazilian própolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**.p.8 pages. 201953, 2011.

EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).**Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, p. 398-405, 2008.

**FARMACOPEIA** Brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERLA, N. J, MARCHETTI, M. M, GONÇALVES, D. Ácaros predadores (Acari) associados à cultura do morango (*Fragaria* sp., Rosaceae) e plantas próximas no Estado do Rio Grande do Sul. **Biota Neotrop**, Campinas, v.7, n.2, 2007.

FRANCO, S. L.; BRUSCHI, M. L.; MOURA, L. P. P.; BUENO, J. H. P. Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Rev. Bras. de Farm.**, 9/10, p, 1-10, 2000.

FORTES, J. F. **Sistema de Produção do Morango**. Embrapa, 2005, disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap06.htm> > acesso em: 03/dez/2013.

GARCIA, J.; et al.**Produção de própolis em colônias de *Apis mellifera* africanizadas pelas técnicas convencional de raspagem e coletor de própolis inteligente**. Maringa, PR. Anuria 1999/2000.

GIAMPIERI, F. et al. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact in human health. **Jour. Nut.**, v.28, p.9-19, 2012.

HELLBIG, J. Biological Control of Botrytis cinerea Pers.ex Fr. In strawberry by Paenibacillus polymyxa (Isolate 18191).**Jour. of Phyto.**, Berlin, v.149, p.265- 273, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1:Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 27.

KOIKE, S. T.; BROWNE, G. T.; GORDON, T. R. Strawberry- diseases. **UC ANR** Publication n 3468, 2014.



KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2 : Doenças as plantas cultivadas, p.319-332.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**., Londres: Heyden & Son,p. 112–115, 1989.

LORENZETTI, E. R. Controle de doenças do morangueiro com óleos essenciais e *Trichoderma* ssp. (Tese de doutorado). Lavras, 2012.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P. et al.Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. Rev. bras. farmacogn.vol.17,no.3. João Pessoa, July/Sept. 2007.

LOPES, R. B. **A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microorganismo no Brasil**. Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas. Embrapa. 2009.

LUSTOSA, S. R. Padronização de extratos de própolis e avaliação da atividade antimicrobiana. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2007.

MARINI, D. et al.Efeito antifúngico de extratos alcoólicos de própolis sobre patógenos da videira. **Arq. Ins. Biologia**., São Paulo,v.79 , n.2,p.305.-308,abr-jun., 2012.

MARCUCCI, M. C. 2005. Controle de qualidade da própolis. **Mensagem Doce**, 48. Disponível em:< <http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: 18/11/2014.

MARTINS, T. V. F.; ALMEIDA, P. S. V. B.; OLIVEIRA, L. L. et al. Atividade bacteriana de *Brassica oleracea var. capitata* em modelos experimentais in vitro. Monografias Ambientais v(9), nº 9, p. 2088 – 2100, 2012.

MĂRHTAS, L. AL.; DEZMIREAN, D. S.; BOBIS, O. Important developments in Romanian própolis research. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2013.

MELO, A. A. M.; MATSUDA, A. H.; MURADIAN, L. B. A. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 71(3): 540-8, São Paulo, 2012.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Rev. Arq. Inst. Bio.**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

METZNER, J., SCHNEIDEWIND, E. M. e FRIEDERICH, E. Effect of propolis and pinocembrin on fungi. **Pharmazie**, 32, p. 730-732, 1977.

MISSIMA, F.; SFORCIN, J. M. Green Brazilian própolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. **Evi.-Bas. Com. and Alt. Med.** v.;5(1):71-75, 2008.

MORANDI, M. A. B., BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas no Brasil.** Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas. Embrapa. 2009.

MORENO, M. I. N et al. Comparison of the radical scavenging activity of própolis from several regions of Argentina. **Jour. of Ethno.**, Laussane v. 71, n-2 p. 109-114, jul. 2000.

MURAD, J. M.; CALVI, S. A.; SOARES, A. M. V. C.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. Effects of própolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Jour. of Ethno.** v.;79(3):331-334, 2002.

NUNES L. C. C. Própolis vermelhado litoralde Pernambuco: Caracterização, atividade biológica e proposta de gel vaginal. (Tese de Doutorado), UFP- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

ORSATTI, C. L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A. C. et al.. Própolis immunomodulatory action in vivo on toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. **Phy. Res.**; v.24(8):1141-1146, 2010.

OSWALDO CRUZ. Acetato de etila. Rev. Maio, 2003. Disponível em : <http://www.oswaldocruz.br/download/fichas/Acetato%20de%20etila2003.pdf>> Acesso em : 27/11/2014.

OZCAN, M. Antifungal properties of propolis. **Grasas y Aceites**, v. 50, n. 5, p. 395-398, 1999.

PARK, Y. K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciê. Rur.**, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PARK, Y. K.; IKEGARKL, M.; ABREU, J. A. S; ALCICI, N. M. F.. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciênc Tecnol Aliment**,v.18: 313-318 1998.

PEREIRA, I. N. Própolis: matéria- prima de potencial aplicação farmacêutica.Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia. Porto Alegre, 2011.

REIS, A., COSTA. H. **Principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle**. Circular Técnica. MAPA, Brasília, 2011.

REZENDE, G. P. S. R, Pimenta FC, Costa LRRS 2006. Antimicrobial activity of two Brazilian commercial própolis 454 Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia **Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.**v.18(3): Jul./Set. 2008.

REIS, K. C. et al. Efeito de diferentes sanitizantes sobrequalidade de morango cv. Oso Grande. **Ciê. e Agro..** Lavras, v. 32, n. 1, p. 196-202, jan./fev. 2008.

RIVAS, L. ANVISA: pelo menos 13 alimentos registram uso excessivo de agrotóxicos. 2013. Disponível em: < [http://www.agrolink.com.br/culturas/milho/noticia/anvisa--pelo-menos-13-alimentos-registram-uso-excessivo-de-agrotoxicos\\_185685.html](http://www.agrolink.com.br/culturas/milho/noticia/anvisa--pelo-menos-13-alimentos-registram-uso-excessivo-de-agrotoxicos_185685.html)> Acesso em: 10/09/2014.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; et al.,P. E and Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts.**Clin. Microbiol. Infect.**, v.9, p.I-VIII, 2003.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; et al.Statistical analyses of correlation between fluconazole MICs for *Candida* spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E.Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p.109-111, 2007.

SALATINO, A. (1999). **Controle de qualidade para a própolis brasileira**. Disponível em: < [http://www.usp.br/agen/bols/1998\\_2001/rede481.htm](http://www.usp.br/agen/bols/1998_2001/rede481.htm)>. Acesso em: 18/ 11/ 2014.

SANTOS, A. M. DOS; MEDEIROS, A. R. M. de Nutrição, adubação e calagem. **Sistemas de Produção**, 5 Versão Eletrônica 2005. Disponível em: <<http://sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap05.htm>> Acesso em 15 de julho de 2014.

SANTOS, P. E. T. Características básicas das principais cultivares de morango plantadas no Brasil. Sistema de Produção. **EMBRAPA**, 2005;

SAEGER, S. C. S. Avaliação da Ação de Vigilância Sanitária Quanto à Redução dos Níveis de Resíduos de Agrotóxicos em Morangos Produzidos na Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro. – Uma Contribuição para a Avaliação do Risco. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007 (Tese de Mestrado).

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R. S.; CAMPOS, L. C. et al. Brazilian própolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Evi.-Bas. Com. and Alt. Med.** v. 5(3):317–324, 2008.

SIMARELLI, M. Fruto na mesa: tempo de morango. **Rev. Fru. e Der., IBRAF**, ano 1, ed. 02, junho de 2006.

SILVA, R. F., PASCHOLATI, S. F., BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentimula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fit. Bra.**, Brasília, v. 32, p.189-196, 2007.

SILVA, A. F. Própolis: caracterização físico- química, atividade antimicrobiana e antioxidante. (Tese Doutorado), UFV- Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

SILVA, R. A.; EVANGELISTA, A. R.; RIBEIRO, M. C. M.; et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciênc. Rur.**, v36, n.6, Santa Maria, Nov/dez, 2006.

SIMON, N. et al., **Sistema de produção de morango para mesa na região da Serra Gaúcha encontra superior do Nordeste**. Disponível em:<[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes\\_HTML/Morango/MesaSerraGaucha/do\\_encas.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes_HTML/Morango/MesaSerraGaucha/do_encas.htm)>, Acesso em: 01/janeiro/2013, EMBRAPA, 2005.

SONMEZ.S, KIRILMAZ .L, YUCESOY. M, YUCEL. B, YLMAZ .B.The effect of bee própolis on oral pathogens and human gingival broblast.**J Ethno.** v.102; p:371-376, 2005.

SOUSA. J. P. B, FURTADO. N. A. J. C, JORGE. R, SOARES, A. E. E, BASTOS, J.K.. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Rev Bras Farmacogn** v.17, p: 85-93, 2007.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. Agrotóxicos no Brasil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMPRAPA, 2011.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **ver. Anu. de Pat. de Pla.**, v.16, p.265-304, 2008.

SPECHT, S.; BLUME, R. **Competitividade e segmento de mercado à cadeia do Morango: Algumas evidências sobre o panorama Mundial e Brasileiro.** In: 47º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL. Anais eletrônicos. Porto Alegre, 2009. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/13/1245.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2014.

VENENCIO, G. Avaliação da degradação de pelargonidina durante a secagem de morangos. (Trabalho de conclusão de graduação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

VIGNOLO, G. GONÇALVES, M. **ANUARIO HF.** Ver. Campo & Negocios HF., 2013.

ZHU, W.; CHEN, M.; SHOU, Q. LI-Y, H. F. Biological activities of Chinese própolis and Brazilian própolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in *rats* **Evi.-Bas. Com. and Alt. Med.**, v.:8 pages.468529, 2011.

WOISKY, R. G. do Rio. Métodos de controle químico de amostras de própolis. São Paulo. 1996. 74 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.