

## EFEITO ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS ALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS SOBRE PATÓGENOS DA VIDEIRA\*

D. Marini, R. Mensch, M.B. Freiberger, J. Dartora, G. Franzener, R.C. Garcia, J.R. Stangarlin

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, CP 91, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil.  
E-mail: denielemarini@yahoo.com.br

## RESUMO

Objetivou-se com este trabalho verificar a fungitoxicidade *in vitro* de extratos alcoólicos de própolis (EAP) sobre a germinação de esporos de *Phakopsora euvitis* e *Pseudocercospora vitis* e também sobre o crescimento micelial e esporulação de esporos de *Elsinoe ampelina*. Para o ensaio de inibição de germinação o EAP foi utilizado nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25 e 0,5%. Como testemunhas utilizaram-se água destilada, etanol 0,35% e fungicida azoxystrobin. No ensaio de crescimento micelial e esporulação foram utilizadas as concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 e 1,0% de EAP. As testemunhas foram o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), BDA + 0,7% de etanol e o fungicida azoxystrobin. Os resultados obtidos permitiram concluir que o EAP possui baixa atividade antifúngica *in vitro* contra *P. euvitis*, *P. vitis* e *E. ampelina*, para as concentrações testadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Phakopsora euvitis*, *Pseudocercospora vitis*, *Elsinoe ampelina*.

## ABSTRACT

ANTIFUNGAL EFFECT OF PROPOLIS ALCOHOLIC EXTRACTS ON GRAPEVINE PATHOGENS. The objective of this work was to verify the *in vitro* effect of alcoholic extracts of propolis (AEP) on the germination of spores of *Phakopsora euvitis* and *Pseudocercospora vitis*, and also on the mycelial growth and sporulation of *Elsinoe ampelina*. For the germination assay the AEP was used at concentrations of 0.025; 0.05; 0.1; 0.2; 0.25 and 0.5%. Distilled water, ethanol at 0.35% and the fungicide azoxystrobin were used as control treatments. For mycelial growth and sporulation the concentrations 0.05; 0.1; 0.2; 0.4; 0.5 and 1.0% of AEP were used. The control treatments were potato-dextrose-agar (PDA) medium, PDA + 0.7% ethanol and the fungicide azoxystrobin. The results showed that AEP has a low *in vitro* antifungal activity against *P. euvitis*, *P. vitis* and *E. ampelina*, for the tested concentrations.

KEY WORDS: *Phakopsora euvitis*, *Pseudocercospora vitis*, *Elsinoe ampelina*.

Entre as frutíferas cultivadas no Brasil, a videira é uma das mais importantes no aspecto econômico e social. Na uva, sobretudo a destinada a consumo *in natura*, a qualidade fitossanitária é de suma importância. As doenças que incidem sobre esta cultura reduzem a qualidade e produtividade dos frutos, além de promoverem a elevação dos custos de produção, sendo, em sua maioria, causadas por fungos que afetam a parte aérea das plantas, causando doenças como míldio, escoriose, oídio, antracnose, mancha da folha e ferrugem (AMORIM; KUNUYUKI, 2005).

A ferrugem é causada por *Phakopsora euvitis* Ono, a mancha da folha por *Pseudocercospora vitis* (Berk & Curtis) Sacc. e a antracnose por *Elsinoe ampelina* (De Bary) Shear (GALLOTTI *et al.*, 2002). O controle dessas doenças tem sido feito principalmente por meio da utilização de defensivos agrícolas. No entanto, o uso intensivo e indiscriminado de fungicidas sistêmicos a

longo prazo tem causado diversos problemas, como a seleção de patógenos resistentes aos princípios ativos mais utilizados, além de aspectos negativos para o ambiente, em função da poluição causada pelos resíduos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

Uma alternativa ao uso de agrotóxicos é o emprego do manejo integrado das doenças de plantas com foco agroecológico, o qual inclui o controle biológico, o controle cultural, o emprego de cultivares resistentes e o uso de produtos naturais com atividade indutora de resistência e/ou com atividade antimicrobiana direta. Nesta última forma de controle encaixa-se o uso de extratos vegetais e microbianos em plantas (STANGARLIN *et al.*, 2008).

A própolis é uma resina produzida por abelhas melíferas a partir de substâncias coletadas em diferentes partes das plantas (BURDOCK, 1998). A composição da própolis é extremamente complexa, com mais de 300

\*Programa de Pós-graduação em Agronomia.

substâncias diferentes já identificadas (BANKOVA *et al.*, 2000). Na literatura é relatada como uma substância composta de óleos voláteis e ácidos aromáticos (5 a 10%), ceras (30-40%), resinas, bálsamos, pólen e elementos essenciais como magnésio, níquel, cálcio, ferro e zinco, além de flavonoides, ácidos fenólicos, ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas, considerados importantes compostos antimicrobianos (WIESE, 1995; CASTALDO; CAPASSO, 2002).

Os estudos sobre as propriedades antibióticas da própolis têm sido conduzidos, sobretudo na área médica e veterinária, porém, segundo BIANCHINI; BEDENDO (1998), bactérias fitopatogênicas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Erwinia chrysanthemi* são sensíveis às substâncias antibióticas presentes na própolis. No entanto, pouco se conhece sobre seus efeitos contra fungos fitopatogênicos. Assim, objetivou-se com este trabalho verificar a fungitoxicidade *in vitro* de extratos alcoólicos de própolis sobre os patógenos da videira *P. euvitis*, *P. vitis* e *E. ampelina*.

Os ensaios foram realizados no mês de novembro e dezembro de 2007 no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Os uredósporos de *P. euvitis* e conídios de *P. vitis* foram removidos de folhas frescas, enquanto os esporos de *E. ampelina* foram obtidos a partir de frutos das plantas apresentando sintomas característicos da doença.

A própolis na sua forma bruta foi obtida de colmeias de *Apis mellifera*, da região Oeste do Paraná. As amostras de própolis foram trituradas em liquidificador e, posteriormente, preparou-se o extrato alcoólico de própolis (EAP), utilizando a proporção de 15 g de própolis para 35 mL de álcool etílico a 70%. O extrato permaneceu ao abrigo da luz, sendo agitado manualmente por 1 minuto duas vezes ao dia. Após 7 dias, ele foi filtrado em papel Whatman

n° 1 (GARCIA *et al.*, 2004).

Para o ensaio de inibição de germinação de esporos de *P. euvitis* e *P. vitis* foram utilizadas as concentrações 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,25 e 0,5% de EAP diluídas em água destilada esterilizada. Como testemunhas utilizaram-se: água destilada; etanol a 0,35%; e fungicida azoxystrobin (0,08 g.i. a. L<sup>-1</sup>). O ensaio foi realizado em lâmina de microscopia revestida por água-ágar a 2%, as quais foram incubadas no escuro a 25 °C sobre a bancada do laboratório por 18h (FRANZENER *et al.*, 2003). Ao final do ensaio foram avaliados a porcentagem de germinação de esporos e o tamanho dos tubos germinativos de *P. euvitis* e *P. vitis*.

Para o ensaio de inibição do crescimento micelial e da esporulação de *E. ampelina* foram utilizadas as concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 e 1,0% de EAP diluídas com caldo de batata (STANGARLIN *et al.*, 1999). As testemunhas foram: o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA); BDA + etanol 0,7%; e o fungicida azoxystrobin (0,08 g.i. a. L<sup>-1</sup>). As placas de Petri contendo micélio de *E. ampelina* foram mantidas em ambiente climatizado a 25° C, com fotoperíodo de 16 horas, por 7 dias. A esporulação foi avaliada após o término da avaliação do crescimento micelial, com auxílio de uma câmara de Neubauer ao microscópio ótico conforme metodologia descrita por FRANZENER *et al.* (2006).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Após a análise de variância e, no caso de haver significância ( $P < 0,05$ ), os fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), enquanto os fatores quantitativos foram submetidos à análise de regressão polinomial. Dados em porcentagem foram submetidos à transformação por raiz quadrada de  $x + 0,5$ . Utilizou-se o programa estatístico SISVAR para processamento dos dados.

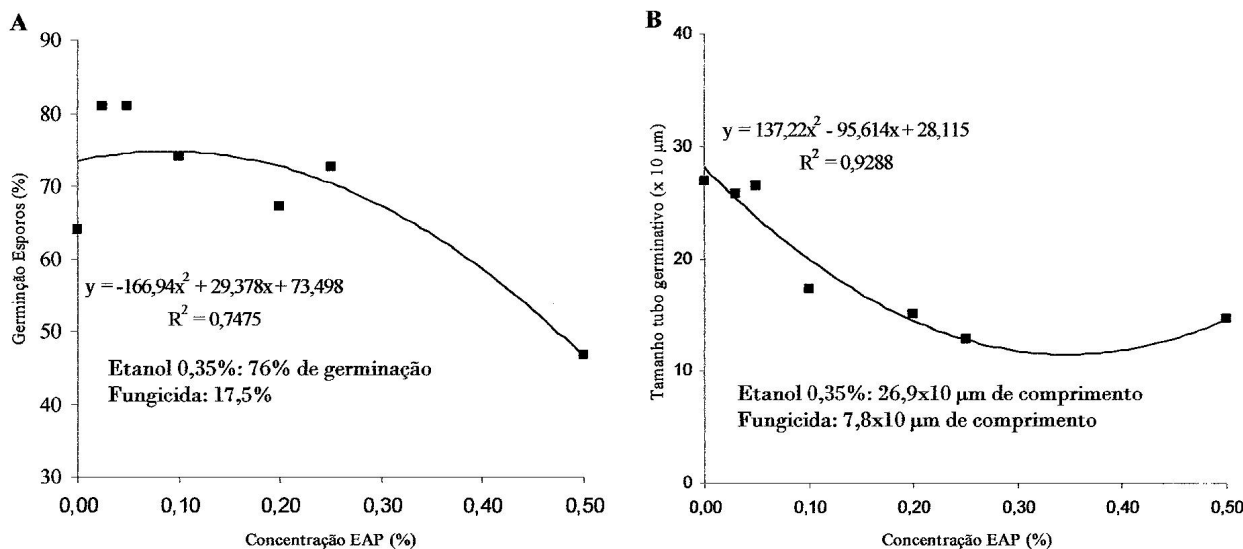


Fig. 1 - Germinação (A) e tamanho de tubo germinativo (B) de esporos de *Phakopsora euvitis* em presença de diferentes concentrações de extrato alcoólico de própolis (EAP).

Para germinação de esporos de *P. euvitis* (Fig. 1A) houve ajuste de um modelo de regressão quadrática ( $R^2=0,75$ ), com efeito dose-dependente e valor médio de inibição de 30,4%. Houve redução da germinação de *P. euvitis* para a concentração 0,5% de EAP. Para a avaliação de tamanho de tubo germinativo dos esporos (Fig. 1B) observou-se um modelo de regressão quadrática ( $R^2=0,92$ ), também apresentando efeito dose-dependente, com a concentração de própolis de maior eficiência ao redor de 0,35%.

No ensaio de inibição de germinação de esporos de *P. vitis* (Tabela 1), não se observaram diferenças significativas entre as concentrações de EAP e as testemunhas, exceto para o fungicida, que foi capaz de reduzir em apenas 15% a germinação de conídios desse fungo, dessa forma, não foi possível ajuste de nenhuma equação na regressão dos dados. Já para o ensaio de tamanho de tubo germinativo observa-se ajuste de um modelo de regressão linear ( $R^2=0,74$ ), que permite observar que mesmo não inibindo a germinação, o EAP na concentração de 0,5% reduziu o comprimento do tubo de *P. vitis* (Fig. 2).

A análise das médias dos tratamentos no ensaio de esporulação de *E. ampelina* demonstrou que o fungicida e a concentração de 0,5% de EAP apresentaram tendência de serem mais eficientes, porém, semelhantes às outras concentrações de EAP e à testemunha meio BDA + 0,7% de etanol (Tabela 2). A regressão para as concentrações de EAP não foi significativa, no entanto, o teste de médias mostra que o EAP tem efeito inibitório na esporulação, assim como o etanol. Para o ensaio de inibição de crescimento micelial (Fig. 3), observa-se um modelo de regressão linear ( $R^2=0,86$ ), onde o aumento das concentrações de EAP resultou em menor diâmetro das colônias de *E. ampelina*.

Na literatura encontram-se poucos trabalhos utilizando própolis em vegetais, principalmente para controle de doenças fúngicas. PIERMANN *et*

*al.* (2007) testaram extrato de própolis obtido de produto comercial na concentração de 10% em oito diferentes fitobactérias: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P. corrugata*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *X. translucens* pv. *undulosa*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. campestris* pv. *campestris*. Esses autores conseguiram inibir de forma acentuada a multiplicação das bactérias em estudo, ao contrário do que ocorreu neste trabalho com os fungos da videira, embora as concentrações de própolis aqui testadas tenham sido entre 10 e 20 vezes menores.

BIANCHINI; BEDENDO (1998) também estudaram o efeito antibiótico de extrato aquoso de própolis, nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10%, sobre cinco espécies de bactérias fitopatogênicas, e demonstraram que três espécies foram completamente inibidas em meio de cultura contendo 10% de extrato de própolis. Novamente, as maiores inibições ocorreram com elevadas concentrações de extrato de própolis. No presente estudo, as atividades antifúngicas não foram tão expressivas para as concentrações testadas, pois estas foram relativamente baixas já que em condições de campo normalmente se utilizam concentrações abaixo de 1%, para evitar problemas de fitotoxicidade.

ALBANO *et al.* (2007), em ensaio com sementes de feijão tratadas com extrato de borra de própolis a 25%, 50%, 75% e 100%, observaram inibição de patógenos comuns ao processo de armazenamento, tal efeito antifúngico dose-dependente coincide com o verificado neste trabalho.

Pode-se concluir com este trabalho que o EAP possui atividade antifúngica *in vitro*, embora baixa para as concentrações testadas, contra *P. euvitis*, *P. vitis* e *E. ampelina*. A fungitoxidade do EAP pode ser verificada na inibição de germinação de esporos, na tendência em reduzir o tamanho dos tubos germinativos e na inibição de crescimento micelial, de maneira dose-dependente.

Tabela 1 - Efeito *in vitro* de extrato alcoólico de própolis sobre a germinação de esporos de *Pseudocercospora vitis*.

Tratamentos	Germinação (%)
Água	96,00 b**
Etanol 0,35%	95,25 b
Fungicida (azoxystrobin 0,08 g.i.a. L <sup>-1</sup> )	80,75 a
Extrato alcoólico de própolis*	96,87 b

\*Média de todas as concentrações testadas;

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

Tabela 2 - Efeito de extrato alcoólico de própolis na esporulação *in vitro* de *Elsinoe ampelina*.

Tratamentos	Esporulação (esporos x 10 <sup>4</sup> mL <sup>-1</sup> )
Meio BDA	181,95 b**
Meio BDA + 0,7% de etanol	70,61 ab
Fungicida (azoxystrobin 0,08 g.i.a. L <sup>-1</sup> )	1,15 a
Extrato alcoólico de própolis*	30,68 ab
Extrato alcoólico de própolis 0,5%	10,84 a

\*Média de todas as concentrações;

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

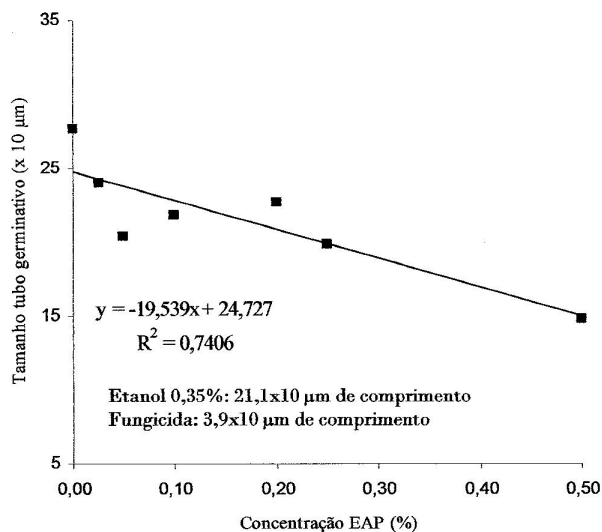


Fig. 2 - Tamanho médio de tubo germinativo de esporos de *Pseudocercospora vitis* em presença de diferentes concentrações de extrato alcoólico de própolis (EAP).

#### REFERÊNCIAS

- 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 sementes de feijão. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p.147, 2007. Suplemento.
- AMORIM, L.; KUNYUKI, H. Doenças da videira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A (Ed.). *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Ceres, 2005. p.639-651.
- BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v.31, p.3-15, 2000.
- BIANCHINI, L.; BEDENDO, I.P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Scientia Agrícola*, v.55, p.149-152, 1998.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, v.36, n.4, p.347-363, 1998.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, v.73, p.S1-S6, 2002. Supplement 1.
- FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. *Acta Scientiarum Agronomy*, v.25, n.2, p.503-507, 2003.
- FRANZENER, G.; FRANZENER, A.S.M.; STANGARLIN, J.R.; CZEPAK, M.P.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. *Semina Ciências Agrárias*, v. 28, p.29-38, 2006.
- GALLOTTI, G.J.M.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SONEGO, O.R. Controle das doenças da videira. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. (Ed.). *Controle de doenças de plantas: fruteiras*. Viçosa: os editores, 2002. p.939-1022.
- GARCIA R.C., SÁ M.E.P., LANGONI H. & FUNARI S.R.C. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* "in vitro". *Acta Scientiarum, Animal Sciece*, v.26, n.1, p.69-77, 2004.
- PIERMANN, L.; SILVA, I.T. da; OLIVEIRA, J.R.; FUJINAWA, M.F.; LIMA, H.E. de; PONTES, N. de C. Efeito de extratos vegetais e própolis sobre o crescimento *in vitro* de fitobactérias. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p.156, 2007. Suplemento
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.125-133.
- STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.2, n.11, p.16-21, 1999.
- STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.16, p.265-304, 2008.
- WIESE, H. *Novo Manual de apicultura*. Guaíba: Agropecuária, 1995. p.291

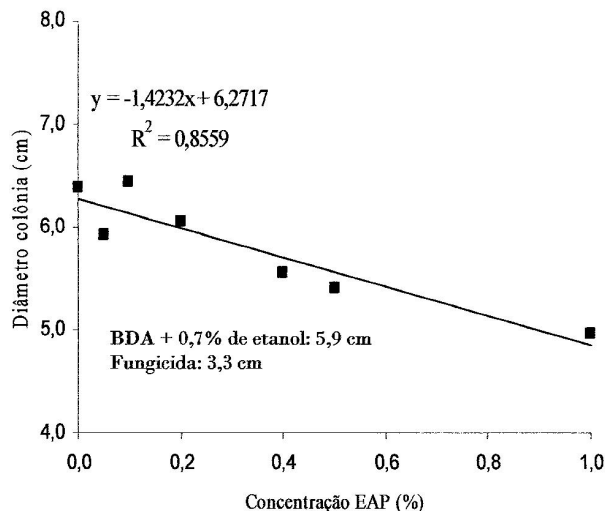


Fig. 3 - Crescimento micelial de *Elsinoe ampelina* em presença de diferentes concentrações de extrato alcoólico de própolis (EAP).

Recebido em 25/5/11

Aceito em 6/12/11