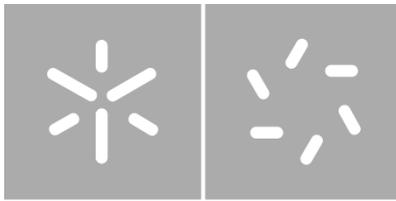




Universidade do Minho
Escola de Ciências

Leonor Tunes Pereira

**Própolis português como agente de
biocontrolo de doenças da maçã**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Leonor Tunes Pereira

**Própolis português como agente de
biocontrolo de doenças da maçã**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e
Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho realizado sob a orientação de

Prof. Ana Cristina Gomes da Cunha

Prof. Cristina Alexandra de Almeida Aguiar

março 2021

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço às minhas orientadoras, as Professoras Ana Cunha e Cristina Aguiar, pela orientação, disponibilidade e dedicação que demonstraram ao longo de todo o processo.

Um agradecimento especial ao incansável Engenheiro José Pereira que disponibilizou as macieiras e maçãs utilizadas, para além dos inúmeros ensinamentos que me passou. Agradeço também à BeeCaramulo e, em especial, à Doutora Sandra Barbosa pela disponibilização da amostra de própolis. Também à DRAP Norte por todo o material dispensado.

Às minhas colegas de laboratório, em especial à Ana Sofia e à Andreia, por toda a ajuda, companheirismo, amizade e carinho. Também a todos os outros colegas e técnicos do Departamento de Biologia e IB-S, que se mostraram sempre prontos para ajudar. Ainda à Doutora Manuela, à Doutora Inês e à Doutora Cristina por toda a paciência e disponibilidade.

Nunca será possível agradecer o suficiente à peça mais fundamental de tudo isto, o meu Pai, por acreditar em mim, por estar sempre presente e me ouvir e ajudar irrefutavelmente. Um enorme obrigada à minha Mãe por tornar também isto possível.

Por último, e definitivamente não menos importante, ao melhor que esta academia me trouxe, às melhores amigas que podia pedir, Ana e Bruna, por me aturarem os desvanios, celebrarem as vitórias comigo, por serem o ombro que muitas vezes precisei e por não me deixarem desistir. À minha Bea, por continuar, mesmo longe, a vibrar comigo e a torcer por mim, passados todos estes anos. A todos os outros que embarcaram mais tarde neste meu percurso, mas que nunca duvidaram do meu trabalho e me apoiaram sempre. Estarei eternamente grata pela vossa amizade e amor incondicionais.

***Hold fast to dreams, for if dreams die,
life is a broken-winged bird that cannot fly.***

Langston Hughes

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Universidade do Minho, 19 de março de 2021

Leonor Tunes Pereira

(Leonor Tunes Pereira)

Própolis português como agente de biocontrolo de doenças da maçã

RESUMO

O própolis, um produto natural da colmeia, é uma mistura resinosa elaborada pelas abelhas a partir de plantas, à qual juntam secreções salivares, cera de abelha e pólen para utilizar como material de construção e defesa das colmeias. Usado desde tempos ancestrais para fins terapêuticos devido às suas múltiplas propriedades e bioatividades, nomeadamente antioxidante e antimicrobiana, o própolis tem, desde então, sido alvo de estudo e aplicação em diversas outras áreas e, mais recentemente, na agricultura. A cultura da maçã é, atualmente, uma das mais importantes a nível global e são vários os desafios à sua produção e comercialização, como é o caso das doenças provocadas por fungos que levam a graves perdas económicas, para além de contribuírem para o agravamento do desperdício alimentar. Estas doenças podem ocorrer antes e/ou após a colheita dos frutos e o seu controlo é realizado maioritariamente pela aplicação de produtos químicos de síntese, que garantem bons resultados em pouco tempo. Contudo, o uso persistente destes produtos acarreta riscos para o ambiente e para os seres vivos, além de contribuir para o aparecimento de estirpes resistentes, que requerem a aplicação de maiores quantidades destes produtos, ou até de novos pesticidas, pelo que não só é necessário como urgente desenvolver produtos igualmente eficazes, mas mais sustentáveis e seguros. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antifúngico de extratos etanólicos e hidroalcoólicos de própolis português - Cr18.EE e Cr18.EE₇₀, respetivamente - no controlo de fungos da maçã, antes e após a colheita, nomeadamente *Venturia inaequalis*, *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*. *In vitro*, os extratos revelaram-se ativos contra *B. cinerea* e *P. expansum*, mas principalmente *B. cinerea*, cujo crescimento do micélio foi inibido em 45, 60 e 61 %, após quatro dias, com concentrações de 500, 1000 e 2000 µg/ml de Cr18.EE, respetivamente, e em 36, 49 e 63 % com as mesmas concentrações de Cr18.EE₇₀. Os resultados *in vivo* mostraram uma redução do tamanho da lesão provocada por *P. expansum* em maçãs Golden Delicious até 67 % quando tratadas com uma solução de 5 % de Cr18.EE₇₀, após 14 dias, sem efeitos fitotóxicos relevantes nos tecidos dos frutos. Pode concluir-se, portanto, que os extratos de própolis português têm potencial como biofungicidas na cultura da maçã após a colheita, sendo uma alternativa mais ecológica e segura, com vista a travar o desperdício alimentar e rentabilizar as explorações, valorizando ainda o setor apícola português.

Palavras-chave: Antifúngico, bioconservante, biocontrolo, maçã, própolis

Portuguese propolis as a biocontrol agent in apple diseases

ABSTRACT

Propolis, a natural product of the hive, is a resinous mixture manufactured by bees from plants to which salivary secretions, beeswax and pollen are added to use as a building and defense material in the hives. This product has been used since ancient times for therapeutic purposes due to its multiple properties and bioactivities, namely antioxidant, and antimicrobial. Since then, propolis has been studied and used in several areas other than medicine, and more recently in agriculture. The apple culture is currently one of the most important globally, and there are several challenges to its production and marketing, such as the fungal diseases that lead to serious economic losses, in addition to contributing to food waste. These diseases can occur pre and/or post fruit harvest and their control is done mainly by the application of synthetic fungicides that guarantee good results in a short period of time. However, the persistent use of these products entails risks to the environment and living beings, in addition contributing to the emergence of resistant pathogen strains, which require the application of greater quantities of these products, or even new pesticides. So, it is not only necessary, but also urgent to develop equally effective products, but safer and more sustainable. Thus, the aim of this work was to evaluate the antifungal potential of ethanol and hydroalcoholic extracts of Portuguese propolis - Cr18.EE and Cr18.EE₇₀, respectively - in the control of apple fungi, pre- and/or post-harvesting, namely *Venturia inaequalis*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *In vitro*, the extracts proved to be active against *B. cinerea* and *P. expansum*, but mainly *B. cinerea*, which mycelium growth was inhibited by 45, 60 and 61 % after four days, with concentrations of 500, 1000 and 2000 µg/ml of Cr18.EE, respectively, and in 36, 49 and 63 % with the same concentrations of Cr18.EE₇₀. The *in vivo* results showed a reduction in lesion size caused by *P. expansum* up to 67 % in Golden Delicious apples treated with 5 % Cr18.EE₇₀, after 14 days, without relevant phytotoxic effects on fruit tissues. These results suggest that Portuguese propolis extracts have potential as bio-fungicides in apple culture post-harvest, being an environmentally friendly and safer alternative to reduce food waste and making farms more profitable, while also valuing the beekeeping sector in Portugal.

Keywords: Apple, antifungal, biocontrol, biopreservative, propolis

ÍNDICE

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS	i
AGRADECIMENTOS	ii
DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
CAPÍTULO I - ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS DO TRABALHO	1
1. O própolis: da origem às aplicações	2
1.1. Origem	2
1.2. Caracterização e composição química	3
1.3. Bioatividades e aplicações	7
1.4. Parâmetros de qualidade	9
2. A cultura da maçã: produção e desafios	12
3. Objetivos do trabalho	15
CAPÍTULO II - POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS PORTUGUÊS NA CULTURA DA MAÇÃ	16
1. O Própolis português	17
1.1. Introdução	17
1.2. Materiais e métodos	19
1.2.1. Amostra de própolis do Caramulo	19
1.2.1.1. Determinação do teor de humidade	19
1.2.1.2. Determinação do teor de cinzas	20
1.2.1.3. Determinação do teor de cera	20
1.2.1.4. Conteúdo balsâmico	21
1.2.2. Obtenção dos extratos de própolis	21
1.2.2.1. Análise química dos extratos de própolis do Caramulo	22
1.2.2.2. Determinação da capacidade antioxidante dos extratos de própolis do Caramulo	24
1.2.3. Análise estatística	24
1.3. Resultados e Discussão	25

1.3.1. O própolis do Caramulo cumpre parâmetros de qualidade	25
1.3.2. O própolis do Caramulo é rico em compostos fenólicos	28
1.3.3. O própolis do Caramulo possui elevada capacidade antioxidante	31
2. Potencial do própolis do Caramulo no controlo da doença do pedrado da macieira	33
2.1. Introdução	33
2.1.1. Ciclo de vida de <i>Venturia inaequalis</i>	35
2.1.2. Condições de desenvolvimento da doença	36
2.1.3. Controlo da doença.....	38
2.2. Materiais e métodos.....	41
2.2.1. Potencial do extrato de própolis do Caramulo no combate do pedrado da macieira - ensaio de campo	41
2.2.1.1. Preparação do extrato.....	41
2.2.1.2. Material biológico e desenho experimental	41
2.2.1.3. Avaliação da atividade antifúngica	42
2.2.2. Análise estatística	43
2.3. Resultados e discussão.....	44
2.3.1. Tratamento do pedrado da macieira com própolis do Caramulo: uma primeira avaliação.....	44
2.3.2. Própolis do Caramulo e o pedrado da macieira: potencialidades e desafios	46
3. Potencial antifúngico do própolis do Caramulo no controlo de doenças pós-colheita da maçã	51
3.1. Introdução.....	51
3.1.1. Doenças pós-colheita na cultura da maçã	52
3.1.2. Conservação pós-colheita	55
3.2. Materiais e métodos.....	56
3.2.1. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos de própolis do Caramulo	56
3.2.1.1. Material biológico e preparação das suspensões de esporos	56
3.2.1.2. Ensaio <i>in vitro</i> para avaliação da atividade antifúngica	56
3.2.2. Atividade antifúngica <i>in vivo</i> dos extratos de própolis do Caramulo – ensaio de armazenamento	57
3.2.2.1. Otimização do protocolo de infeção de maçãs e avaliação da patogenicidade.....	57
3.2.2.2. Ensaio <i>in vivo</i> para determinação da atividade contra <i>P. expansum</i> em maçãs	58
3.2.2.3. Avaliação da fitotoxicidade do extrato de própolis do Caramulo em maçãs	59
3.2.3. Análise estatística	59

3.3. Resultados e discussão.....	60
3.3.1. Os extratos de própolis do Caramulo possuem atividade antifúngica contra <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Penicillium expansum</i>	60
3.3.2. O extrato de própolis do Caramulo reduz substancialmente o tamanho das lesões provocadas por <i>P. expansum</i> em maçãs.....	65
3.3.3. Possíveis efeitos adversos da aplicação do extrato de própolis do Caramulo em maçãs	69
3.3.4. Um extrato de própolis de mais fácil obtenção é eficaz no controlo de <i>P. expansum</i> sem efeitos tóxicos nas maçãs	71
CAPÍTULO III - CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS.....	76
CAPÍTULO IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
CAPÍTULO V - APÊNDICES	96
CAPÍTULO VI - ANEXOS	102
ANEXO 1- Estados fenológicos da macieira.....	103
ANEXO 2 - Critérios de Mills para identificação dos períodos de risco para infeção por <i>V. inaequalis</i>	104

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Cr18.EE - Extrato de própolis do Caramulo elaborado com etanol absoluto (e seco)

Cr18.EE₇₀ - Extrato de própolis do Caramulo elaborado com etanol a 70 % (v/v) (e seco)

Cr18.EEf₇₀ - Extrato de própolis do Caramulo elaborado com etanol a 70 % (v/v) (e filtrado)

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EA - Extrato Aquoso

EAG - Equivalentes de Ácido Gálico

EC₅₀ - Concentração à qual uma substância induz metade do seu efeito máximo, do inglês, *Half Maximal Effective Concentration*, uma medida da sua potência.

EE - Extrato Etanólico (elaborado com etanol absoluto)

e.f. - Estado Fenológico

EHA - Extrato Hidroalcoólico (elaborado com % etanol ≤ 70 , v/v)

EQ - Equivalentes de Quercetina

etOH₇₀ - Etanol a 70 % (v/v)

EU - União Europeia

PAL - Fenilalanina amónia-liase

PDA - *Potato Dextrose Agar*

POD - Peroxidase

PPO - Polifenoloxidase

ROS - *Reactive Oxygen Species*

RTL - Redução do Tamanho da Lesão

TFT - Teor de Flavonoides Totais

TOD - Teor de Orto-difenóis

TPT - Teor de Polifenóis Totais

↑ - Aumento

↓ - Diminuição

× - Inibição

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos apiários e das colónias em Portugal Continental em 2019 (adaptado de DGAV, 2019).	17
Figura 2 - Camadas formadas após aquecimento da amostra de própolis com água desionizada e arrefecimento posterior, sendo possível distinguir a cera (A), água (B) e o própolis livre de cera (C).	21
Figura 3 - Amostra de própolis do Caramulo (Cr18) antes (A) e após fragmentação (B) e limpeza (C).	25
Figura 4 - Extratos de própolis do Caramulo - Cr18.EE e Cr18.EE ₇₀ - obtidos, respetivamente, com etanol absoluto (A) ou etOH ₇₀ (B).	29
Figura 5 - Percentagem (%) de redução do radical DPPH por Cr18.EE e Cr18.EE ₇₀ . Os valores são apresentados como a média ± desvio padrão (n=3), sendo que a diferença entre os valores pertencentes à mesma coluna é significativa (*) (0,01 < p ≤ 0,05), muito significativa (**) (0,001 < p ≤ 0,01) ou altamente significativa (***) (p ≤ 0,001).	32
Figura 3 - Amostra de própolis do Caramulo (Cr18) antes (A) e após fragmentação (B) e limpeza (C).	32
Figura 6 - Sintomas de pedrado nas folhas (A e B) e nos frutos (C) de macieira (fotos da autora).	34
Figura 7 - Ciclo biológico da doença do pedrado (adaptado de Gauthier, 2018).	35
Figura 8 - Classes de resistência após inoculação de <i>V. inaequalis</i> . A: Classe 0 - sem sintomas; B: Classe 1 - manchas <i>pinpoint</i> sem esporulação (hipersensibilidade); C: Classe 2 - lesões cloróticas e necróticas irregulares sem esporulação; D: Classe 3a - lesões cloróticas e necróticas irregulares com eventual esporulação leve; E: Classe 3b - lesões cloróticas e necróticas irregulares com esporulação; F: Classe 4 - lesões com esporulação abundante (suscetibilidade completa); G e H: necrose (adaptado de Gessler <i>et al.</i> , 2006).	38
Figura 9 - Desenho experimental do ensaio conduzido no campo com as dimensões dos diferentes talhões referentes às modalidades aplicadas: tratamento com Cr18.EE ₇₀ 5 % (15), tratamento com enxofre (21) e controlo com etanol a 35 % (v/v) (25).	42
Figura 10 - Sintomas de pedrado observados em folhas: esporulação abundante (A), lesões cloróticas com esporulação (B) e necrose (C).	46
Figura 11 - Folhas de macieira com sintomas de <i>Black rot</i> (A) e ataque de piolho verde (B).	47
Figura 12 - Folhas com sintomas de aparente fitotoxicidade de Cr18.EE ₇₀	48
Figura 13 - Sintomas da infeção por <i>Botrytis cinerea</i> em maçãs: podridão na polpa (A); focos de esporulação (B); “ninhos” de podridão observados em condições de conservação (C) (adaptado de Sanhueza, 2004).	53
Figura 14 - Sintomas de uma infeção causada por <i>Penicillium expansum</i> em maçã, à superfície (A) e na polpa (B) (adaptado de Sanhueza, 2004).	55

- Figura 15** - Esquema ilustrativo dos procedimentos de preparação e inoculação das maçãs para avaliar a atividade de Cr18.EE₇₀ contra *P. expansum* (•: fermento; +: fermento inoculado com fungo; -: fermento inoculado com água).....**59**
- Figura 16** - Crescimento do micélio de *B. cinerea* ao longo do tempo na presença de Cr18.EE₇₀ (A) ou Cr18.EE (B), respetivos solventes e apenas em meio PDA. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).**60**
- Figura 17** - Efeito inibitório de Cr18.EE₇₀ (A) e Cr18.EE (B) no crescimento de *B. cinerea* ao longo do tempo, em comparação com o controlo de solvente. Os valores são apresentados como a média ± desvio padrão (n=3), sendo que a diferença entre os valores de inibição de todas as concentrações é, todos os dias, altamente significativa (***) ($p \leq 0,001$), com exceção do dia 2, onde não é significativa (ns).**61**
- Figura 18** - Crescimento do micélio de *P. expansum* ao longo do tempo na presença de Cr18.EE₇₀ (A) ou Cr18.EE (B), respetivos solventes e apenas em meio PDA. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).**63**
- Figura 19** - Efeito inibitório de Cr18.EE₇₀ (A) e Cr18.EE (B) no crescimento de *P. expansum* ao longo do tempo, em comparação com o controlo de solvente. Os valores são apresentados como a média ± desvio padrão (n=3), sendo que a diferença entre os valores de inibição de todas as concentrações é significativa (ns) ($p > 0,05$), é muito significativa (**) ($0,001 < p \leq 0,01$) ou altamente significativa (***) ($p \leq 0,001$) (todos os não apresentados).....**64**
- Figura 20** - Patogenicidade de *P. expansum* em maçãs Golden Delicious inoculadas com água desionizada estéril (A), 5×10^4 esporos/ml (B) e 5×10^6 esporos/ml (C), após 1, 4 e 8 dias (da esquerda para a direita).**66**
- Figura 21** - Diâmetro da lesão provocada pela inoculação de *P. expansum* (5×10^6 esporos/ml) em maçãs Golden Delicious tratadas com concentrações de 2,5, 5 e 10 % de Cr18.EE₇₀ e na situação controlo (solvente). Os valores são apresentados como a média ± desvio padrão (n=3). As diferenças entre os valores de inibição de todas as concentrações são não significativas ($p > 0,05$) mas relativamente ao controlo são altamente significativas (***) ($p \leq 0,001$).**67**
- Figura 22** - Lesão provocada por *P. expansum*, após 14 dias, em maçãs Golden Delicious tratadas com Cr18.EE₇₀ na concentração de 2,5 (B), 5 (C) e 10 % (D), em comparação com o controlo (A), e respetiva profundidade (F, G, H e E).**68**
- Figura 23** - Efeito fitotóxico do extrato de própolis em fermentos de maçãs Golden Delicious não inoculados com fungo, após 14 dias do tratamento com 2,5 (C), 5 (D) e 10 % (E) de Cr18.EE₇₀, em comparação com o controlo de água (A) e de etOH₇₀ (B), e respetiva profundidade (H, I, J, F, G).**69**
- Figura 24** - Danos provocados pelo extrato de própolis na polpa de maçãs Golden Delicious introduzido em fermentos, após 14 dias do tratamento com 2,5 (C), 5 (D) e 10 % (E) de Cr18.EE₇₀, em comparação com os controlos de água (A) e de etOH₇₀ (B). Fotografias a olho nu (I) e à lupa ampliação de 10x (II).....**70**
- Figura 25** - Diâmetro da lesão provocada pela inoculação de *P. expansum* (5×10^6 esporos/ml) em maçãs Golden Delicious tratadas com concentrações de 2,5, 5 e 10 % de Cr18.EE₇₀ e na situação controlo (solvente). Os valores são apresentados como a média ± desvio padrão (n=3).

As diferenças entre os valores de inibição de todas as concentrações são significativas (*) ($0,01 < p \leq 0,05$), muito significativas (**) ($0,001 < p \leq 0,01$) ou altamente significativas (***) ($p \leq 0,001$).....**71**

Figura 26 - Lesão provocada por *P. expansum*, após 14 dias, em maçãs Golden tratadas com Cr18.EEf₇₀ na concentração de 2,5 (B), 5 (C) e 10 % (D), em comparação com o controlo (A), e respetiva profundidade (F, G, H e E).**72**

Figura 27- Danos provocados pelo extrato de própolis na polpa de maçãs Golden Delicious em ferimentos não inoculados com fungo, após 14 dias do tratamento com 2,5 (A), 5 (B) e 10 % (C) de Cr18.EEf₇₀. Observação a olho nu (I) e à lupa com ampliação de 10x (II).....**73**

Figura AN1 - Estados fenológicos da macieira, segundo Fleckinger (1953). (A): Gomo dormente; (B) Pré-abrolhamento; (C) e (C3) Abrolhamento; (D) e (D2) Ponta verde; (E) Botão verde; (E2) Botão rosa; (F) Início da floração; (F2) Plena floração; (G) Queda das primeiras pétalas; (H) Queda das últimas pétalas; (I) Vingamento; (J) Desenvolvimento dos frutos (adaptado de DRAPN, 2013).
..... **103**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de própolis reconhecidos de diferentes origens geográficas, respetivas fontes botânicas e compostos característicos (adaptado de Silva-Carvalho <i>et al.</i> , 2015).	5
Tabela 1 - Tipos de própolis reconhecidos de diferentes origens geográficas, respetivas fontes botânicas e compostos característicos (adaptado de Silva-Carvalho <i>et al.</i> , 2015) (cont.).....	6
Tabela 2 - Valores médios para os parâmetros de qualidade de própolis do tipo europeu (<i>Populus</i> spp.) e do tipo verde (adaptado de Bogdanov, 2011).	10
Tabela 3 - Parâmetros de qualidade para os tipos I e II de própolis português (adaptado de Falcão <i>et al.</i> , 2013).	18
Tabela 4 - Parâmetros determinados para o própolis do Caramulo, em comparação com valores aceitáveis estabelecidos pela TRPIQ, os descritos por Bogdanov (2011) para o própolis europeu e os propostos por Falcão (2013) como referência para própolis português do tipo I e II. Os resultados da amostra Cr18 são apresentados como a média \pm desvio-padrão (DP) (n=3).	26
Tabela 5 - Teores de polifenóis totais, flavonoides e orto-difenóis dos extratos Cr18.EE e Cr18.EE ₇₀ . Os TPT e TOD foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g) e o TFT em miligramas de quercetina por grama de extrato (mg EQ/g). Os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n=3), sendo que os valores que apresentarem * são significativamente diferentes daquele pertencente à mesma coluna ($p \leq 0,05$).	29
Tabela 6 - Dados meteorológicos da estação de Merelim (Braga) cedidos pela Estação de Avisos de Entre Douro e Minho - Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte (DRAPN), respetivo risco de infeção segundo os critérios de Mills (Anexo 2) e datas previstas de aplicação de tratamentos.	45
Tabela 7 - Percentagem (%) de folhas com sintomas de pedrado em cada uma das condições experimentais: Cr18.EE ₇₀ 5% (15), enxofre (21) e etanol a 35 % (25). Os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n=10), não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p > 0,05$).	46
Tabela AP1 - Efeito de extratos de própolis contra microrganismos fitopatogénicos em frutos.	97
Tabela AP1 - Efeito de extratos de própolis contra microrganismos fitopatogénicos em frutos (cont.)	98
Tabela AP1 - Efeito de extratos de própolis contra microrganismos fitopatogénicos em frutos (cont.)	99
Tabela AP2 - Efeitos de extratos de própolis contra microrganismos fitopatogénicos em vegetais.	100
Tabela AP2 - Efeitos de extratos de própolis contra microrganismos fitopatogénicos em vegetais (cont.)	101
Tabela AN1 - Tempo de humectação (horas) para existência de infeção de pedrado (leve, moderada e acentuada) e o tempo de incubação (dias necessários para aparecimento de lesões e	

desenvolvimento de conídios), mediante diferentes temperaturas médias (adaptado de Gauthier, 2018). **104**

CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS DO TRABALHO

1. O própolis: da origem às aplicações

Apesar de não ser o produto apícola mais conhecido, o própolis é, sem dúvida, um dos mais complexos e fascinantes produzidos pelas abelhas. Entende-se por própolis o produto com origem em substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas recolhidas pelas abelhas (principalmente *Apis mellifera* L.) de gomos, flores e exsudados de plantas, às quais acrescentam secreções salivares, cera e pólen (Ghisalberti, 1979; Alencar, 2009). Algumas espécies de abelhas (*Mellipona* spp.) podem incorporar também partículas de solo, originando um produto conhecido como geoprópolis (Fokt *et al.*, 2010; Pazin *et al.*, 2017).

Etimologicamente, a palavra “própolis” deriva do grego e significa “defesa” (pro) “da cidade” (polis) (Ghisalberti, 1979), aludindo a uma função de proteção da colmeia. De facto, tal como alguns compostos bioactivos produzidos e secretados pelas plantas servem para sua proteção (Pagare *et al.*, 2015), também as abelhas tiram partido das propriedades desses metabolitos (Bankova *et al.*, 2016), utilizando o própolis para reduzir a incidência de fungos e bactérias nas colmeias, impedir a decomposição de cadáveres de invasores e, ainda, para manter assépticos os locais onde a rainha põe os ovos. Para além de um agente de proteção contra microrganismos, o própolis é também um material de construção, usado no fortalecimento dos favos e na reparação de fendas, assumindo um papel fundamental na estabilização da temperatura e da humidade das colmeias (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1996; Quiroga *et al.*, 2006; Bankova, 2009; Fokt *et al.*, 2010; Simone-Finstorm e Spivak, 2010; Falcão *et al.*, 2012).

1.1. Origem

A recolha de resinas de plantas pelas abelhas para produção de própolis foi confirmada pela primeira vez por Rosch, em 1927 (Casaca, 2010). A evolução das abelhas ao longo do tempo permitiu que estas pudessem seleccionar da natureza as substâncias que melhor respondessem às suas necessidades, o que se pensa estar na origem de algumas atividades biológicas comuns do própolis. Deste modo, mesmo em localizações distintas onde as abelhas têm de recorrer a espécies botânicas diferentes para obtenção de resina, a seleção é feita de modo que o própolis produzido mantenha um conjunto de propriedades idênticas (Falcão *et al.*, 2013).

Em regiões temperadas (como na maior parte do continente europeu), a principal fonte de resina são os choupos (*Populus* spp.) (Bankova *et al.*, 2009; Falcão *et al.*, 2013; Coelho *et al.*, 2017), existindo algumas exceções, como a Rússia e zonas mediterrânicas, onde as espécies

usadas são *Betula verrucosa* e várias da família Cupressaceae, respetivamente (Falcão, 2013). Ao contrário do que acontece nas regiões temperadas da Europa, onde predomina o própolis do tipo europeu (oriundo maioritariamente de *Populus nigra*), nas regiões tropicais são identificados vários tipos de própolis diferentes, derivados de várias espécies vegetais, mas sobretudo de *Baccharis* spp. (principalmente *B. dracunculifolia*), *Dalbergia* spp. e *Clusia* spp. (*C. rosea* e *C. minor*) (Falcão *et al.*, 2010; Ristivojevića *et al.*, 2015; Silva-Carvalho *et al.*, 2015), sendo utilizada em algumas ilhas do pacífico *Macaranga tanarius* (Falcão, 2013). Menos frequentemente, são também fontes de resina *Acacia* spp., *Aesculus hippocastanum*, *Alnus* spp., *Araucaria angustifolia*, *Azadirachta indica*, *Betula pubescens*, *B. pendula*, *Castanea sativa*, *Cistus* spp., *Conifer* spp., *Dalbergia ecastaphyllum*, *Eucalyptus* spp., *Fagus* spp., *Ferrula* spp., *Mangifera indica*, *Musa schweinfurthii*, *Picea* spp., *Pinus* spp., *Populus tremula*, *Quercus* spp., *Salix alba*, *Tetragonula carbonaria* e, ainda, *Ulmus* spp. (Falcão *et al.*, 2010, 2013; Toreti *et al.*, 2013; Ristivojevića *et al.*, 2015; Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

Embora não seja ainda claro como é que as abelhas reconhecem as espécies com a resina apropriada às funções do própolis, presume-se que a seletividade esteja relacionada com as propriedades antimicrobianas da resina ou com a presença de determinados compostos (tóxicos, por exemplo) que fazem com que as abelhas não as recolham (Isidorov *et al.*, 2016). A preferência por uma dada espécie botânica em determinada região não exclui a possibilidade que outras espécies poderem ser usadas como fonte de resina, embora se admita que as abelhas não mudam a sua fonte caso as principais espécies estejam presentes (Falcão *et al.*, 2013). Ainda assim, quando várias fontes de resina estão disponíveis, a composição do própolis raramente corresponde a apenas uma espécie, sendo que esta diversidade pode ser muito benéfica na proteção contra vários agentes patogénicos, devido a sinergias entre os componentes das várias plantas utilizadas (Isidorov *et al.*, 2016).

1.2. Caracterização e composição química

A composição química do própolis é extremamente complexa e são vários os fatores que a determinam, bem como às atividades biológicas atribuídas a este produto (Pereira *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2018). Uma vez que nem todas as espécies são fontes de resina, a especificidade da flora local é o principal fator determinante da composição química do própolis, sendo este normalmente tipificado segundo a sua origem botânica e os seus principais constituintes (Bankova *et al.*, 2000, 2009; Falcão *et al.*, 2013) (Tabela 1). Para além das

características fitogeográficas (flora local e estado fenológico das plantas, altitude e exposição solar), climáticas e sazonais existentes no local da colmeia, também o método e a altura da colheita, a presença de possíveis contaminantes e a espécie de abelha e a sua preferência por espécies botânicas específicas influenciam a composição do própolis e, conseqüentemente, as suas propriedades físico-químicas e biológicas (Woisky e Salatino, 1998; Bankova, 2009; Fokt *et al.*, 2010; Curifuta *et al.*, 2012; Falcão *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015; Pazin *et al.*, 2017; Nascimento *et al.*, 2018).

Independentemente da composição química, o própolis é geralmente constituído por cerca de 50 % de resinas vegetais, 30 % de materiais cerosos, 10 % de óleos aromáticos e 5 % de pólen (Burdock, 1998; Fokt *et al.*, 2010; Toreti *et al.*, 2013; Ristivojević *et al.*, 2015; Anjum *et al.*, 2018), podendo ainda apresentar cerca de 5 % de materiais insolúveis, como matéria orgânica e restos de tecidos vegetais (Pereira *et al.*, 2015) e, ainda, outras substâncias em quantidades residuais como aminoácidos, vitaminas e sais minerais (Falcão *et al.*, 2010).

No geral, o própolis apresenta um odor intenso bastante característico e a sua cor pode variar entre bege, amarelo, vermelho, verde, castanho-claro ou escuro e preto, dependendo da altura da colheita da resina (Martini *et al.*, 2017), das plantas que lhe deram origem e das condições de conservação (Lopes *et al.*, 2017). Quanto à consistência, esta é altamente influenciada pela temperatura, sendo flexível e pegajosa acima de 30 °C e dura e quebradiça abaixo de 15 °C. O ponto de fusão situa-se entre os 80 e os 105 °C e a densidade entre 1,11 e 1,14 (Bogdanov, 2011).

Tabela 1 - Tipos de própolis reconhecidos de diferentes origens geográficas, respectivas fontes botânicas e compostos característicos (adaptado de Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

Tipo de própolis	Origem geográfica	Fonte botânica	Compostos característicos
Europeu	Europa, América do Norte, Nova Zelândia, zonas temperadas da Ásia	<i>Populus</i> spp. (<i>P. nigra</i>)	Pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina, ácido cafeico, ácido ferrúlico, ácido cinâmico e seus ésteres
Russo	Rússia	<i>Betula</i> spp. (<i>B. verrucosa</i> , <i>B. pendula</i> e <i>B. pubescens</i>)	Ácidos cinâmicos, sesquiterpenóides, fenilpropanoides, acetina, apigenina, ermanina, ramnocitrina, campferide, α -acetoxibetulenol
Verde	Brasil	<i>Baccharis</i> spp. (<i>B. dracunculifolia</i>)	Fenilpropanoides prenilados, ácidos fenólicos, ácido <i>p</i> -coumárico prenilado, acetofenonas, ácidos diterpênicos, ácidos cafeoilquínicos, campferide, isosakuranetina e campferol
Vermelho	Brasil	<i>Dalbergia ecastaphyllum</i>	Formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina e biochanina A
	Cuba, Venezuela	<i>Clusia</i> spp. (<i>C. rosea</i> e <i>C. minor</i>)	Benzofenonas polisopreniladas (nemorosona, chantoquimol e gutiferona E)
	Grécia	<i>Conifer</i> spp.	Flavonoides, ácidos diterpênicos (isocuprêssico, pimárico e comúncio), isoagatolal, agatadiol, ferruginol e totarol
Mediterrânico	Suíça	<i>P. tremula</i>	Benzil <i>p</i> -cumarato, benzil ferulato, e glicerídeos fenólicos
	Malta	<i>Ferula</i> spp. (<i>F. communis</i>)	Ácidos diterpênicos (isocuprêssico, comúncio, pimárico e ácido imbricatoloico), totarol e 13-epitorulosal
	Turquia	<i>Populus</i> spp., <i>Eucalyptus</i> spp., <i>Castanea sativa</i>	Pinocembrina, pinobanksina e seu acetato, prenil ésteres do ácido cafeico, ácidos ferúlicos, ácidos diterpênicos (pimárico, isopimárico, abiético, dihidroabiético, cinamil-cinamato e oleato de etilo), ésteres de ácidos aromáticos (cinamato de benzila, ácido benzenodicarboxílico) e flavonóis (benzopireno e crisina)
	Argélia	<i>Populus</i> spp., <i>Cistus</i> spp.	Pinocembrina, pinobanksina e seu acetato, crisina, apigenina, pectolinarigenina, pilosina, ladaneina, galangina, naringenina, tectocrisina, metoiycrisina, prenil ésteres de ácido cafeico, ácidos ferúlicos, ácidos diterpênicos (ácido hidroxiditerpênico, lábdano e clerodano)

Tabela 1 - Tipos de própolis reconhecidos de diferentes origens geográficas, respectivas fontes botânicas e compostos característicos (adaptado de Silva-Carvalho *et al.*, 2015) (cont.).

Australiano	Austrália	<i>Acacia paradoxa</i>	Xantorreol, pterostilbeno, sacuranetina, pinostrobin, estilbenos, tetrahydroestilbenos prenilados, ácidos cinâmicos prenilados, flavanonas, flavonóis, chalconas
	Nigéria, Quênia, Camarões, Congo	<i>Musa schweinfurthii</i>	Isoflavonoides, isoflavonoides prenilados e estilbenóides, triterpenos, lignanas do tipo arilnaftaleno, geranilestilbenos e geranilflavona, derivados de amirina, lupeol e flavonoides di-prenilados
Africano	Omã	<i>Azadirachta indica</i> , <i>Acacia</i> spp., <i>Mangifera indica</i>	Triterpenos, flavononas preniladas, chalconas, cardanol, cardol e ácidos anacárdicos
	Etiópia	<i>Acacia</i> spp.	Triterpenóides (α - e β -amirinas, α - e β -amiril e lupeol)
	Tailândia	<i>Styrax</i> spp.	(E)cinamil-(E)cinamilidenato
Pacífico	Havai, Taiwan, Okinawa	<i>Macaranga tanarius</i>	Flavonoides prenilados (isonimfaeol-B, nimfaeol-A, nimfaeol-B, nimfaeol-C, propolinas e 3-geranil naringenina)
	Indonésia, Birmânia	<i>Mangifera indica</i>	Alc(en)resorcinóis, triterpenos do tipo cicloartano e flavanonas preniladas

A primeira publicação sobre as propriedades e composição química do própolis foi feita por Helfenberg, em 1908 (Pereira *et al.*, 2015) e, desde então, mais de 800 componentes foram já identificados em várias amostras (Šturm e Ulrih, 2020). O maior grupo é o dos compostos fenólicos, em especial os flavonoides, que têm sido os mais investigados e considerados como os responsáveis por várias das atividades biológicas descritas em própolis (Burdock, 1998; Fokt *et al.*, 2010; Falcão *et al.*, 2010, 2013). Neste produto natural encontram-se ainda ácidos fenólicos, benzoicos, alifáticos, aromáticos e cinâmicos e seus ésteres, sesquiterpenos e terpenos, derivados de benzaldeído, hidrocarbonetos, açúcares, aminoácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, vitaminas, minerais, estilbenos, proteínas e até enzimas (Woisky e Salatino, 1998; Bankova *et al.*, 2000; Fokt *et al.*, 2010; Toreti *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2016; Bogdanov, 2017; Martini *et al.*, 2017; Šturm e Ulrih, 2020). Foram ainda descobertos glicosídeos, alcaloides e taninos e mencionada a presença de esteroides (Woisky e Salatino, 1998; Fokt *et al.*, 2010; Šturm e Ulrih, 2020).

1.3. Bioatividades e aplicações

A grande variedade de compostos presentes faz do própolis uma fonte de diversas moléculas biologicamente ativas (Bankova, 2009). No entanto, não foi ainda provado que um único componente seja o responsável pela atividade do extrato (Agüero *et al.*, 2010), pelo que o potencial biológico do própolis não residirá num único composto, mas sim em sinergismos entre diferentes componentes da mistura (Kujumgieva *et al.*, 1999). Apesar da variabilidade na composição química e, à partida, um pouco inesperadamente, amostras de própolis de locais distintos possuem propriedades semelhantes (Fokt *et al.*, 2010), demonstrando sempre atividade biológica considerável, especialmente antimicrobiana (Bankova, 2009, 2016).

Devido às suas propriedades nutracêuticas e farmacológicas, o própolis tem sido usado desde tempos ancestrais na medicina popular em várias partes do mundo (Coelho *et al.*, 2017), sendo o seu uso descrito por várias civilizações antigas para diversos fins, como no embalsamamento de cadáveres, como medicamento e como cicatrizante (Pereira *et al.*, 2015). Nos últimos anos, a literatura científica tem vindo a relatar e a consolidar as propriedades farmacológicas do própolis, tais como a atividade antimicrobiana, nomeadamente antibacteriana e antifúngica, antiviral (Fokt *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2015; Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Anjum *et al.*, 2018) e antiprotozoária (Burdock, 1998; Fokt *et al.*, 2010). São também descritas outras atividades como antioxidante e anti-radicalar (Burdock, 1998; Fokt *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2015; Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Cruz *et al.*, 2016; Anjum *et al.*, 2018), anti-tumoral (Bankova,

2009; Fokt *et al.*, 2010; Valença *et al.*, 2013; Silva-Carvalho *et al.*, 2014, 2015; Pereira *et al.*, 2015; Anjum *et al.*, 2018), anti-genotóxica (Cruz *et al.*, 2016), cicatrizante (Ghisalberti, 1979; Anjum *et al.*, 2018), anestésica (Burdock, 1998), anti-inflamatória (Burdock, 1998; Bankova, 2009; Fokt *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2015; Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Bogdanov, 2016; Anjum *et al.*, 2018), anti-úlceras e anti-séptica (Fokt *et al.*, 2010), radioprotetora, citotóxica, hepatoprotetora, cardioprotetora e neuroprotetora (Fokt *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2016; Anjum *et al.*, 2018) e, ainda, imunomoduladora (Bankova, 2009; Fokt *et al.*, 2010; Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

Por todas as suas bioatividades, nos anos 80, o própolis tornou-se um produto importante na medicina complementar sendo, desde então, comercializado em suplementos alimentares e alimentos funcionais, surgindo também, nas últimas décadas, em cosméticos, dermocosméticos e em produtos dentários (Pereira *et al.*, 2015; Bankova *et al.*, 2016, 2019; Zuhendri *et al.*, 2021). Verifica-se, portanto, um crescente interesse dos consumidores por este produto e uma exigência igualmente crescente da indústria, que reconhece nas diversas propriedades do própolis a potencialidade para agregar valor a diversos produtos (Archaina *et al.*, 2016).

No que respeita à exploração comercial de própolis, o maior entrave é o custo deste produto natural e a sua baixa produção, que não acompanham a procura (Rubira, 2008). Os principais países produtores de própolis são a China, a França, a Espanha, a Itália, a Alemanha e a Bulgária (Casaca, 2010). No entanto, e apesar do seu potencial biológico, este produto é ainda, em muitos países, ignorado e, conseqüentemente, descartado pelos produtores de mel. Outras razões para o não aproveitamento do própolis são o desconhecimento do seu potencial económico como um co-produto (Cruz *et al.*, 2016), das suas propriedades biológicas e das técnicas para a sua produção, bem como sobre o mercado de produtos apícolas para além do mel, pelo que os apicultores não rentabilizam o potencial dos seus apiários (GPP, 2016). Paralelamente, a atividade apícola representa também um serviço de extrema importância para a agricultura - a polinização - que contribui para a preservação da biodiversidade, manutenção do equilíbrio ecológico e para o aumento e qualidade da produção agrícola. Em Portugal, a utilização de colmeias para este fim é ainda pouco usual, mas a apicultura é, no nosso país e no resto da União Europeia (UE), uma atividade tradicionalmente ligada à agricultura, sendo normalmente encarada como um complemento ao rendimento das explorações (GPP, 2016). Assim, torna-se necessário um estudo macroeconómico para entender a cadeia de produção e comercialização do própolis, o qual contribuirá para a sua valorização, otimização da sua produção e incentivo para a associação de

mais apicultores. Será igualmente importante estudar e divulgar este produto junto dos consumidores, para além dos próprios apicultores, de modo a valorizá-lo e a promover a sua produção e consumo, contribuindo para o fortalecimento do setor apícola (Fonte *et al.*, 2017).

1.4. Parâmetros de qualidade

Dada a existência de diferentes tipos de própolis, e uma vez que estes possuem perfis químicos distintos, a definição de critérios de qualidade uniformes torna-se difícil, sendo que não existe, até ao momento, uma regulamentação internacionalmente reconhecida para este produto da colmeia (Silva, 2017). Paralelamente, não se encontram ainda estabelecidas as metodologias de análise deste produto natural, utilizando-se uma variedade de métodos, muitas vezes não comparáveis diretamente (Bankova *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2017).

Na maioria dos casos, a comercialização do própolis não é ainda uma realidade dada a ausência de padronização (Bankova *et al.*, 2016), um verdadeiro desafio face à elevada heterogeneidade das amostras ao nível da composição química (Gardini *et al.*, 2018), por sua vez intimamente ligada às suas propriedades biológicas (Pereira *et al.*, 2015). Uma vez que, e embora possíveis, não tenham sido ainda estabelecidos testes de controlo de qualidade do própolis (Pereira *et al.*, 2015), os estudos sobre qualquer aplicação deste produto deverão ser sempre acompanhados de uma caracterização química ou, pelo menos, da determinação do tipo de própolis (Bankova *et al.*, 2016; Gardini *et al.*, 2018). Segundo a *International Honey Commission* (IHC), a harmonização das metodologias de análise da qualidade do própolis é fundamental e estas devem incluir parâmetros que possam ser aceites como universais, tais como o conteúdo balsâmico após extração, o teor em cinzas, cera e água e, ainda, a presença ou não de impurezas (Lopes *et al.*, 2017). Para além destes, outros critérios de qualidade das amostras podem ser avaliados, como as propriedades físico-químicas (densidade, ponto de fusão e solubilidade em etanol) e sensoriais (consistência à temperatura ambiente e granulometria, odor, sabor e cor) (Funari e Ferro, 2006).

No geral, uma amostra de própolis de qualidade elevada deve estar livre de contaminantes, conter elevado teor de bálsamo e baixas percentagens de cera e cinzas (Tabela 2). Deve ainda ser conhecida a origem botânica principal por forma a definir os compostos bioativos que, por sua vez, deverão estar presentes em quantidades elevadas (Silva, 2017). Note-se, no entanto, que, embora a composição química de qualquer exsudado de uma dada planta seja relativamente constante, existe uma variação significativa na percentagem dos constituintes individuais quando

se comparam populações de localizações distintas ou mesmo entre diferentes partes de uma mesma planta (Popova *et al.*, 2007), refletindo-se na composição do própolis e, conseqüentemente, na sua qualidade.

Tabela 2 - Valores médios para os parâmetros de qualidade de própolis do tipo europeu (*Populus* spp.) e do tipo verde (adaptado de Bogdanov, 2011).

Parâmetro	Tipo europeu (g/ 100 g)	Tipo verde (g/ 100 g)
Bálsamo	Min. 45	Min. 35
Compostos fenólicos totais	Min. 21	Min. 7
Flavanonas e flavonóis totais	Min. 5	-
Flavanonas e dihidroflavonois totais	Min. 4	-
Flavonóides totais	Min. 9	Min. 1
Cera de abelha	Máx. 25	Máx. 25
Matéria insolúvel	Máx. 5	Máx. 5
Conteúdo em cinza	Não especificado	Máx. 5

O conteúdo balsâmico é um dos indicadores importantes da qualidade de uma amostra de própolis e determina o seu valor comercial (Silva, 2017). Este parâmetro é avaliado através da extração fenólica e, por norma, uma percentagem elevada de bálsamo resulta numa baixa percentagem de cera e materiais insolúveis e, em consequência, num maior teor de compostos biologicamente ativos (Falcão, 2013). O processo de extração permite ainda analisar a fração mais estudada do própolis, os compostos fenólicos, removendo o material inerte e permitindo que possam ser também avaliadas as suas bioatividades (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006). A análise da composição fenólica pode ser feita através da quantificação de fenóis totais, flavonas, flavonóis, flavanonas e dihidroflavonóis (Lopes *et al.*, 2017), sendo que quanto maior for a fração nestes compostos, mais pura e de melhor qualidade será a amostra (Archaina *et al.*, 2016).

Para a qualidade do extrato obtido de própolis, são fatores importantes o solvente e o método de extração usados (Gardini *et al.*, 2018), este último determinante para a quantidade de extrato obtido (Archaina *et al.*, 2016). As técnicas clássicas para extração de compostos de matrizes naturais, como é o caso do própolis, baseiam-se no uso de solventes com agitação e/ou aquecimento. Entre as mais utilizadas destacam-se a extração em soxhlet, a maceração, a extração assistida por ultrassons e micro-ondas e, ainda, a extração supercrítica (Wang e Weller, 2006). Quanto aos solventes, podem ser utilizados solventes orgânicos apolares (acetato de etilo, clorofórmio, *n*-hexano e *n*-butanol) ou polares (água, metanol, etanol e acetona) (Miguel *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2015; Zin *et al.*, 2018). O método e solvente utilizados influenciam não só o

rendimento da extração, mas também a composição química do extrato (Cunha *et al.*, 2004), obtendo-se produtos diferentes com atividades distintas (Kubiliene *et al.*, 2018). Por sua vez, o rendimento do processo, que parece não ser influenciado pela presença ou ausência de luz (Cunha *et al.*, 2004) nem pela renovação do solvente (Sawaya *et al.*, 2011), ao contrário da temperatura e do tempo de maceração (Cunha *et al.*, 2004; Sawaya *et al.*, 2011; De Carvalho *et al.*, 2020), influencia o potencial bioativo do extrato obtido e, conseqüentemente, a viabilidade do processo de extração (Devequi-Nunes *et al.*, 2018). No que diz respeito ao própolis, vários procedimentos têm sido descritos utilizando diferentes solventes e em diferentes concentrações (Pereira *et al.*, 2016), sendo o procedimento mais comum, no entanto, a extração por maceração com renovação de solvente, usando etanol ou uma mistura de etanol e água (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

Como referido, embora possam ser usados outros solventes, o mais comum é o etanol (Marcucci, 1995; Albuquerque *et al.*, 2013), uma vez que permite maior extração dos compostos bioativos do própolis, que apresentam solubilidades distintas, permitindo, assim, obter maior quantidade de compostos fenólicos (Cunha *et al.*, 2004; Devequi-Nunes *et al.*, 2018; Zin *et al.*, 2018). Apesar de resultar num odor e sabor fortes, daqui decorrendo limitações de aplicação nas indústrias farmacêutica e cosmética, a extração com etanol é simples, eficaz e permite obter extratos com baixos conteúdos de cera e ricos em compostos bioativos e, por isso, de boa qualidade (Kubiliene *et al.*, 2015). As percentagens mais utilizadas deste solvente são 70 e 80 %, embora etanol a 95 % (v/v) e etanol absoluto sejam também utilizados (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006). Quanto ao rendimento da extração, Archaina e colaboradores (2016) afirmam que concentrações mais elevadas de etanol permitem rendimentos maiores, embora outros autores aleguem que o rendimento estabiliza com etanol a 70 % (v/v) (etOH₇₀) (Cunha *et al.*, 2004). De uma maneira geral, a extração hidroalcoólica (mistura de etanol e água), em vez da etanólica, resulta em extratos (ou tinturas) livres de cera e com maior quantidade de compostos fenólicos, embora sem diferenças significativas no teor em flavonoides (Woisky e Salatino, 1998). Um estudo de Gonçalves (2017) com própolis português corrobora esta observação, reportando um teor de fenóis totais significativamente superior em etanol absoluto relativamente a 70 %, mas um teor de flavonoides idêntico em ambos os extratos.

Para aplicações na agricultura, são frequentemente usados etanol ou água como solventes (Pereira *et al.*, 2016). No entanto, e embora a possibilidade de extração aquosa de amostras de própolis seja conseguida por algumas empresas de produtos apícolas japonesas, existem poucos estudos publicados sobre esta técnica (Albuquerque *et al.*, 2013). Porém, sabe-se que, apesar de

mais seguro por se tratar de um solvente biocompatível, os extratos aquosos de própolis possuem cerca de dez vezes menos quantidade de compostos ativos quando comparados a extratos etanólicos (Kubiliene *et al.*, 2015, 2018), uma vez que os constituintes do própolis são, na sua maioria, lipofílicos (Jug *et al.*, 2014; Kubiliene *et al.*, 2018). Nesta medida, e sabendo que as bioatividades do própolis, nomeadamente a antimicrobiana, advêm de um sinergismo entre os ácidos fenólicos, flavonoides e seus derivados (Davequi-Nunes *et al.*, 2018), os extratos etanólicos possuirão *a priori* maior atividade antimicrobiana do que extratos obtidos com água (Robertson, 1990; Jug *et al.*, 2014).

A quantidade, a composição e consequentemente a qualidade do extrato obtido são ainda influenciadas pelo método de colheita do própolis, sendo a técnica de recolha em rede a mais eficiente e a da raspagem a pior, por conduzir a uma maior presença de impurezas. Assim, o papel dos apicultores é também crucial para a qualidade deste produto, relacionando-se diretamente com os métodos de recolha, armazenamento e conservação das amostras (Casaca, 2010), tornando-se fundamental a otimização destes procedimentos (Archaina *et al.*, 2016). Más práticas apícolas propiciam amostras com teores elevados de cera e materiais insolúveis, embora estes possam estar também relacionados com a origem da amostra, quando esta provém de uma região onde as abelhas não conseguiram obter quantidades satisfatórias de resina. Em ambos os casos, a quantidade de compostos bioativos extraíveis será inferior (Falcão, 2013). Adicionalmente, a presença de contaminantes tóxicos é uma das maiores preocupações no que diz respeito ao controlo de qualidade do própolis, como é o caso de metais pesados, tinta proveniente da pintura das colmeias e resíduos de acaricidas usados em muitos países para controlar parasitas nas colmeias (Woisky e Salatino, 1998; Bogdanov, 2011).

2. A cultura da maçã: produção e desafios

Há muito tempo que a fruta assume um papel importante na nutrição humana, mas a sua produção tem vindo a aumentar desde o século passado. Anualmente produzem-se cerca de 868 milhões de toneladas de fruta em todo o mundo, sendo a China o maior produtor (Statista, 2020a). Na UE, 1,3 milhões de hectares de terra estavam ocupados por árvores de fruto em 2017 (Eurostat, 2019a), estimando-se uma produção de 37,4 milhões de toneladas de frutos no ano seguinte (excluindo uvas, morangos, bagas, azeitonas e frutos secos). A nível europeu, as principais culturas frutícolas são as da maçã, laranja e pêsego (Eurostat, 2019b).

Em Portugal, a fruticultura tem sido um dos setores mais dinâmicos da economia (Duarte, 2019). De acordo com os últimos dados disponibilizados pelo Eurostat (2019c), em 2017 ocupava o quarto lugar no *ranking* dos países membros produtores de fruta tendo a sua produção ultrapassado as 926 mil toneladas em 2018 (INE, 2019a). Neste setor, a competitividade tem aumentado significativamente nos últimos anos, com empresas capazes de competir nos mercados interno e externo e com o reconhecimento da qualidade da fruta portuguesa no estrangeiro, o que contribui para o aumento das exportações (Duarte, 2019). Contudo, não somos ainda um país autossuficiente uma vez que as importações são, no geral, superiores às exportações (Eurostat, 2019c).

A macieira cultivada, *Malus domestica* Borkh., pertence à família das rosáceas (Rosaceae) e à sub-família das pomóideas (Pomoideae), e é a quarta cultura frutícola mais importante a nível mundial (depois dos citrinos, das uvas e da banana) e uma das principais nas regiões temperadas (Embaby *et al.*, 2019). Desde o início do século que a produção mundial de maçã tem vindo a aumentar, tendo-se produzido, em 2018, mais de 86 milhões de toneladas em todo o mundo, segundo os dados mais recentes da *Food and Agriculture Organization* (FAO) (FAOSTAT, 2020). Na Europa, esta cultura representa cerca de 50 % da produção total de fruta (Wenneker, 2019) e o mercado europeu de maçã é o segundo maior do mundo (depois da China), registando-se, em 2018, uma produção de 13,8 milhões de toneladas de maçãs (Eurostat, 2019b). Em Portugal, embora a produção de maçã seja mais baixa comparativamente a outros países europeus, esta é a cultura com maior expressão: em 2018, os pomares de macieira ocupavam mais de 14 mil hectares e produziram mais de 267 mil toneladas de maçã (FAOSTAT, 2020). Adicionalmente, Portugal é o segundo país da UE com maior consumo diário de fruta, acima da média comunitária (Eurostat, 2019d), sendo a maçã um dos frutos de eleição dos portugueses (INE, 2019b).

O cultivo da macieira enfrenta problemas fitossanitários relacionados com o ataque de pragas e doenças causadas por microrganismos patogénicos que podem causar danos nas plantas, refletindo-se na quantidade e qualidade dos frutos produzidos e que, dependendo do nível de danos, conduzem à depreciação do seu valor comercial (Quiroga *et al.*, 2006). Algumas das principais doenças que atingem a cultura da maçã são o pedrado da macieira, o oídio, o bichado, o cancro e o fogo bacteriano causadas, respetivamente, por *Venturia inequalis*, *Podosphaera leucotricha*, *Cydia pomonella* e *Erwinia amylovora*. Verificam-se também vários tipos de podridões causadas por fungos (Wenneker, 2019) como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium* spp. e *Alternaria alternata*.

Cerca de 16 % das perdas nas culturas agrícolas são provocadas por microrganismos, sendo os fungos os principais agentes causais (Moore *et al.*, 2019). Para além das repercussões económicas, estas perdas intensificam a problemática do desperdício alimentar que alcança, por sua vez, em todo o mundo, 30 % dos frutos e vegetais (Yu *et al.*, 2020). Adicionalmente, assiste-se ao aumento contínuo da população mundial (que já triplicou desde 1950), inevitavelmente acompanhado por uma maior necessidade de alimentos (em quantidade e qualidade) (Statista, 2020b).

O controlo das doenças fúngicas da cultura da maçã depende, atualmente, de múltiplas aplicações de vários fungicidas sintéticos (Araújo, 2011). Contudo, o uso excessivo destes produtos acarreta danos para o meio ambiente, para os seres vivos e saúde dos consumidores, que se têm tornado cada vez mais conscientes no que concerne à segurança alimentar. Por outro lado, também o surgimento de estirpes patogénicas resistentes, que obrigam ao uso de maiores quantidades de pesticidas, e as legislações cada vez mais restritivas e rigorosas na UE no que respeita à homologação de pesticidas, ao seu uso e aos resíduos mínimos tolerados (Wenneker, 2019), conduzem a uma maior procura de alternativas aos fungicidas sintéticos, igualmente eficazes, mas mais ecológicas e seguras. Neste sentido, a produção integrada e a agricultura biológica têm recebido bastante atenção nos últimos anos, impulsionadas pela maior segurança para os consumidores e para o meio ambiente, e também pela existência de incentivos à adoção destes modos de produção (Duarte, 2019). Na UE, a área dedicada a este modo de produção aumentou 25 % entre 2012 e 2017, representando 7 % da totalidade da área agrícola utilizada em 2017 (Eurostat, 2019b). Paralelamente, têm também sido feitos esforços consideráveis para identificar produtos naturais capazes de controlar doenças de várias culturas agrícolas, nomeadamente agentes antagonistas, substâncias naturais com propriedades antimicrobianas derivadas de microrganismos, plantas e/ou animais, tratamentos físicos e, ainda, sais orgânicos ou inorgânicos, por serem vistas como alternativas mais seguras (Lara e Barreiro, 2012).

O própolis tem sido usado desde há séculos pelas suas propriedades antimicrobianas amplamente testadas em bactérias, leveduras e fungos, particularmente contra microrganismos patogénicos para o Homem (Castaldo e Capasso, 2002). Mais recentemente, o seu uso como antifúngico na agricultura tem também ganhado atenção (Quiroga *et al.*, 2006; Curifuta *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2016). Porém, são ainda muitas as barreiras ao uso do própolis em vários setores, nomeadamente na agricultura, devido à elevada heterogeneidade química das amostras, escassez de produção, ausência de tecnologias de aplicação, desconhecimento dos compostos

bioativos, particularmente, daqueles com efeito fungicida e, ainda, da sua eficiência nas culturas agronômicas. No entanto, dadas as suas propriedades antimicrobianas, o própolis parece poder ser uma alternativa no combate a fungos fitopatogénicos, uma vez que foi já comprovada a sua atividade *in vitro* e/ou *in vivo* contra fungos fitopatogénicos como *Hemileia vastatrix* (Pereira *et al.*, 2001), *Botrytis cinerea* (Baldin *et al.*, 2013; Moura *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2016; Loebler *et al.*, 2018), *Colletotrichum* spp. (Sánchez *et al.*, 2016; Loebler *et al.*, 2018), *C. gloeosporioides* (Meneses *et al.*, 2009; Zahid *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014; Mattiuz *et al.*, 2015); e, ainda, *Penicillium italicum* (Yang *et al.*, 2010), *P. digitatum* (Yang *et al.*, 2010; Matny, 2015), *P. expansum* (Sánchez *et al.*, 2016), *Botryodiplodia theobromae* (Meneses *et al.*, 2009), *Stemphylium vesicarium* (Loebler *et al.*, 2020) e *Alternaria alternata* (Embaby *et al.*, 2019) (Tabelas AP1 e AP2, Apêndice 1). Para além da sua ação contra agentes nefastos para as culturas, o própolis revelou possuir ainda outros efeitos benéficos para as plantas como a redução de sintomas de stresse hídrico (Pereira *et al.*, 2016) e a estimulação do seu crescimento (Rowe *et al.*, 1994), que se configuram também mais-valias para as culturas.

3. Objetivos do trabalho

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de uma amostra de própolis português do Caramulo contra fungos fitopatogénicos da cultura da maçã, nomeadamente *Venturia inaequalis* (pré-colheita), *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* (pós-colheita), com o propósito de encontrar tratamentos fitossanitários alternativos mais seguros para o meio ambiente e para os consumidores e, idealmente, igualmente eficazes na redução ou eliminação dos danos causados por alguns dos agentes que mais perdas causam nesta cultura. Para tal, após preparação de extratos de própolis, sua caracterização e avaliação de parâmetros de qualidade, avaliou-se o potencial antifúngico *in vitro* dos extratos etanólico e hidroalcoólico de própolis contra as várias espécies estudadas, selecionando posteriormente as mais promissoras para ensaios *in vivo*. A par do desenvolvimento e implementação de um protocolo de infeção da maçã com o fungo selecionado, bem como da avaliação dos efeitos fitotóxicos dos extratos, implementou-se também um ensaio no campo. Paralelamente, considera-se importante a divulgação e aproveitamento de produtos naturais pouco ou nada explorados, como é o caso do própolis, com vista à sua valorização como co-produto e para a expansão da sua utilização em diversas áreas para além daquelas ligadas diretamente à saúde do Homem.

**CAPÍTULO II - POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS PORTUGUÊS
NA CULTURA DA MAÇÃ**

1. O Própolis português

1.1. Introdução

Embora o mercado dos produtos da colmeia se encontre em plena expansão na UE, em Portugal, a oferta de outros produtos apícolas para além do mel é ainda reduzida, abastecendo-se a indústria sobretudo através da importação (Casaca, 2010). Em 2015, existiam em Portugal cerca de 11 mil apicultores registados (GPP, 2016) e, em 2019, eram mais de 42 mil os apiários e quase 800 mil as colónias, concentrados principalmente na região Norte e Centro do país (DGAV, 2019) (Figura 1).

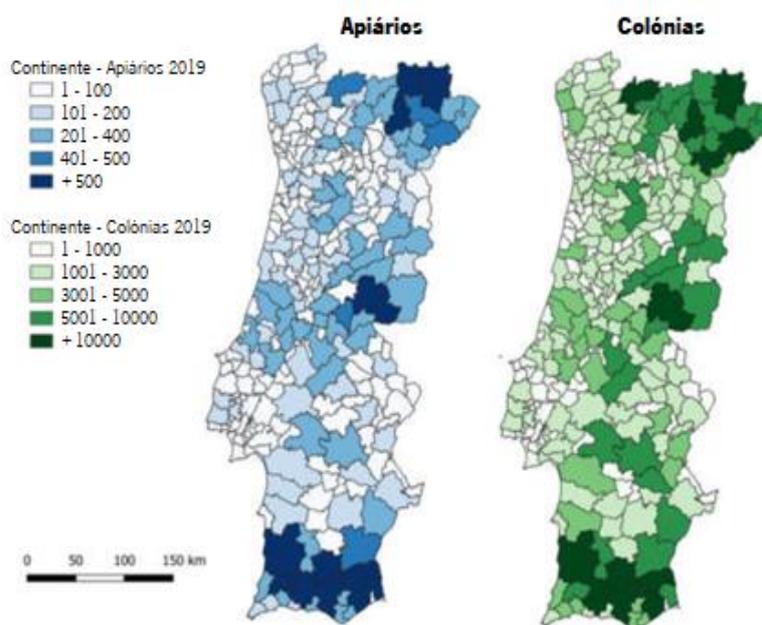


Figura 1- Distribuição dos apiários e das colónias em Portugal Continental em 2019 (adaptado de DGAV, 2019).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos sobre os produtos apícolas nacionais com vista à sua valorização, em particular o mel (Henriques *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2017) e o própolis (Miguel e Antunes, 2011; Falcão *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2016), assistindo-se a um interesse crescente na sua exploração e utilização devido à potencial aplicação em diversas áreas (Casaca, 2010; Albuquerque *et al.*, 2013; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Simultaneamente, a par da evolução nas técnicas aplicadas para o isolamento e análise dos componentes do própolis, observa-se, atualmente, uma diversificação do mercado para os produtos da colmeia, o que poderá trazer novos nichos de mercado e novas oportunidades de desenvolvimento da apicultura nacional (Albuquerque *et al.*, 2013).

No que respeita ao própolis português, este apresenta diversidade, observada nos parâmetros físico-químicos e no conteúdo fenólico total e que pode ser explicada pela grande variedade botânica nacional, que faz com que as abelhas procurem outras fontes de resina quando as espécies de *Populus* não estão presentes (Falcão *et al.*, 2012). Assim, e embora a localização de Portugal (zona temperada) indique um própolis do tipo europeu ou “choupo”, o própolis português pode ser também recolhido de *Cistus ladanifer*, espécie característica de zonas mediterrânicas (Falcão, 2013). Considera-se, portanto, a existência de dois tipos de própolis em Portugal: o tipo I e o tipo II (Tabela 3), este último significativamente diferente do própolis proveniente de *Populus* spp. (tipo I), apresentando maior teor de cera e menor conteúdo em compostos fenólicos, consequentemente de valor comercial inferior. Em termos de coloração, enquanto o própolis do tipo I exhibe tonalidades alaranjadas, o tipo II é mais escuro, de tom acastanhado (Falcão *et al.*, 2013).

Tabela 3 - Parâmetros de qualidade para os tipos I e II de própolis português (adaptado de Falcão *et al.*, 2013).

Parâmetro	Própolis Tipo I	Própolis Tipo II
Cinzas (%)	Máx. 2	Máx. 4
Cera (%)	Máx. 25	Máx. 31
Humidade (%)	Máx. 5	Máx. 5
Bálsamo (%)	Mín. 65	Mín. 45
Fenóis totais (% própolis bruto)	Mín. 18	Mín. 6
Flavonas/Flavonóis (% própolis bruto)	Mín. 3	Mín. 2
Flavononas/hidro-flavonóis (% própolis bruto)	Mín. 5	Mín. 3
EC ₅₀ DPPH (mg/ml extrato)	Máx. 0,02	Máx. 0,06

Nos últimos anos, o própolis português tem captado a atenção da comunidade científica e, para além da análise da sua composição química, nomeadamente a composição fenólica (Moreira *et al.*, 2008; Falcão *et al.*, 2009, 2010; Miguel *et al.*, 2010;) e em compostos voláteis (Miguel *et al.*, 2013), outros trabalhos exploram algumas atividades biológicas, nomeadamente a capacidade antioxidante (Miguel *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2016), a anti-genotóxica (Cruz *et al.*, 2016), a antitumoral (Silva-Carvalho *et al.*, 2014), a supressão da proliferação de células renais cancerígenas (Valente *et al.*, 2011) e do cancro do colo retal (Valença *et al.*, 2013), a ação neuroprotetora (Cardoso *et al.*, 2011), anti-inflamatória, imunomoduladora e antiviral (Silva-Carvalho *et al.*, 2015) e, também, antimicrobiana (Silva *et al.*, 2012; Lourenço *et al.*, 2014; Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Freitas *et al.*, 2019).

A atividade de extratos de própolis português foi comprovada contra diversas bactérias e fungos fitopatogénicos de interesse agronómico, inclusive pelo nosso grupo de investigação, evidenciando o potencial de extratos de própolis de várias regiões do país como biofungicida, nomeadamente contra *B. cinerea*, estudando também o seu efeito fitotóxico *in vitro* em culturas de alface (Cruz P., comunicação pessoal) e de linho (Passão C., comunicação pessoal). A eficácia de extratos etanólicos, hidroalcoólicos e aquosos de própolis português foi também verificada por vários outros autores, *in vitro* e *in vivo*, no controlo de *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* spp. em morangos (Loebler *et al.*, 2018), *Stemphylium vesicarium*, agente causal da estenfiliose da pereira, diminuindo o diâmetro das lesões e a incidência da doença (Loebler *et al.*, 2020), e, ainda, de *Penicillium expansum* em pera Rocha (Sánchez *et al.*, 2016). Assim, estas evidências parecem indicar que o própolis português tem potencial para ser usado como biofungicida no controlo de várias doenças em diversas culturas.

1.2. Materiais e métodos

1.2.1. Amostra de própolis do Caramulo

Uma amostra de própolis cedida pela empresa BeeCaramulo, através da Doutora Sandra Barbosa da Mel Montesino, foi usada no presente trabalho. Trata-se de própolis colhido no ano de 2018 (18) de um apiário situado na região do Caramulo (Cr), cujas coordenadas não foram possíveis obter. Esta amostra foi considerada imprópria para comercialização por apresentar algumas contaminações, nomeadamente bolores devido a um mau armazenamento, tendo por isso sido rejeitada. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi não só avaliar o potencial do produto para aplicação agronómica, mas também aproveitar este “resíduo” que, de outra forma, teria sido descartado. A amostra Cr18 apresentava-se bastante compacta, pelo que foi fracionada em pedaços mais pequenos, manualmente e com o auxílio de um martelo, sendo posteriormente limpa à lupa. Já limpa e desagregada, a amostra foi armazenada em frascos de vidro fechados, ao abrigo da luz e a 4 °C, até ser utilizada.

1.2.1.1. Determinação do teor de humidade

O teor em água foi determinado através do método descrito por Woisky e Salatino (1998). Num gobelé forrado e tapado com papel de alumínio, colocaram-se 4 g de própolis (H0) aquecendo-se numa estufa a 105 °C, durante 5 horas. Após este tempo, colocou-se num exsiccador

durante a noite, pesando-se posteriormente (H1). A análise foi feita em triplicado e o teor de água expresso em percentagem (%) e calculado através da *equação 1*:

$$\% \text{ Água} = \frac{H_0 - H_1}{H_0} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

1.2.1.2. Determinação do teor de cinzas

O teor em cinzas foi determinado de acordo com o método descrito por Lopes e colaboradores (2017), com alterações. Em cadinhos previamente calcinados e pesados (A1), incinerou-se 1 g de própolis (A2) numa mufla a 550 °C, durante 3 horas, até obtenção de cinzas de cor branca ou cinzenta. Após incineração, os cadinhos foram colocados num exsiccador até arrefecerem, determinando-se de seguida o peso do conjunto. Fez-se uma incineração adicional de 30 minutos, repetindo-se o procedimento até obter um peso constante (A3). A análise foi feita em triplicado e a quantidade de cinzas expressa em percentagem (%), calculada através da *equação 2*:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{A_3 - A_1}{A_2} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

1.2.1.3. Determinação do teor de cera

O teor em cera foi determinado com base na diferença de densidade específica, através do método descrito por Hogendoorn e colaboradores (2013). Num falcon, adicionaram-se 2,5 ml de água desionizada a 2 g de própolis. O tubo foi colocado verticalmente num micro-ondas, aquecendo, à potência média, até a temperatura se aproximar de 100 °C, mas sem deixar ferver a água. Arrefeceu-se a amostra à temperatura ambiente, observando-se a formação de três camadas (Figura 2). Com a ajuda de uma espátula morna, retirou-se a camada cera e pesou-se. A análise foi feita em triplicado e o teor de cera calculado em percentagem (%) através da *equação 3*.

$$\% \text{ Cera} = \frac{\text{Peso da cera (g)}}{\text{Peso da amostra (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

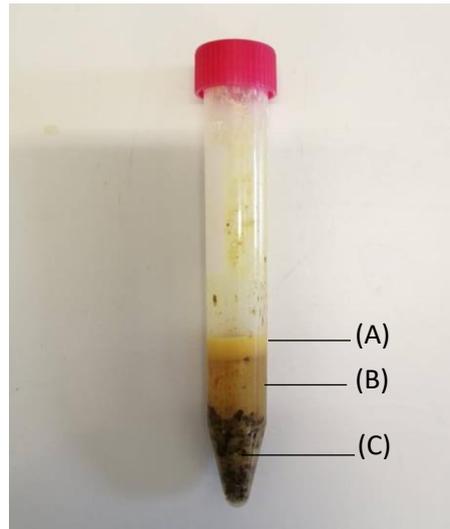


Figura 2 - Camadas formadas após aquecimento da amostra de própolis com água desionizada e arrefecimento posterior, sendo possível distinguir a cera (A), água (B) e o própolis livre de cera (C).

1.2.1.4. Conteúdo balsâmico

O conteúdo balsâmico da amostra Cr18 foi avaliado através do método descrito por Popova e colaboradores (2007). Para tal, pesaram-se 0,5 g de própolis, às quais se adicionaram 15 ml de etOH₇₀, incubando-se a mistura no escuro, a 25 °C e com agitação mecânica a 125 rpm (Orbital Shaker SO1), durante 24 horas. A mistura foi filtrada, armazenando-se o filtrado a 4 °C, e o resíduo foi re-extraído nas mesmas condições. Após segunda filtração, os filtrados foram combinados, perfazendo-se o volume final da solução para 50 ml com etOH₇₀. Para avaliação do conteúdo balsâmico, retirou-se uma alíquota de 2 ml desta mistura e evaporou-se o solvente à secura através de fluxo de azoto e posterior liofilização (Bioblock Scientific Christ Alpha 2-4 LD Plus). Este procedimento foi realizado duas vezes, com 3 réplicas cada, e o valor do teor balsâmico calculado como a fração solúvel em etanol e expresso em percentagem (% p/p) de bálsamo.

1.2.2. Obtenção dos extratos de própolis

Para extração dos compostos bioativos da amostra Cr18 procedeu-se à extração etanólica por maceração com renovação de solvente usando dois tipos de solvente: etanol absoluto (Carlo Erba Reagents) e etOH₇₀. Para tal, pesaram-se 15 g da amostra limpa para um balão de Erlenmeyer, adicionando-se 90 ml de solvente. Os balões foram tapados com uma rolha de borracha e incubados no escuro, a 24 °C e com agitação constante de 125 rpm (Orbital Shaker SO1), por 24

horas. Para cada um dos extratos, foi realizada uma primeira filtração através de papel de filtro Macherey-Nagel em funil de Büchner e Kitasato acoplado a bomba de vácuo (600 milibar), sendo o filtrado posteriormente transferido para um balão volumétrico (previamente identificado e pesado) e conservado a 4 °C. Ao resíduo sólido adicionaram-se 80 ml de solvente, incubando-se nas mesmas condições. Após 24 horas repetiu-se a filtração e os filtrados obtidos foram combinados e submetidos ao rotavapor (Büchi Rotavapor RE 121) a 100 rpm, em banho a 40 °C, para remoção do solvente. Os dois extratos foram posteriormente ultracongelados a -80 °C e liofilizados (Bioblock Scientific Christ Alpha 2-4 LD Plus), por 3 dias, para sublimação da água remanescente. Os extratos resultantes - Cr18.EE e Cr18.EE₇₀ - foram guardados a 4 °C, ao abrigo da luz, até serem utilizados. O rendimento final da extração (% p/p) foi calculado através da equação 4:

$$\text{Rendimento (\%, p/p)} = \frac{\text{massa final extrato seco (g)}}{\text{massa inicial própolis (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

1.2.2.1. Análise química dos extratos de própolis do Caramulo

Determinação do Teor de Polifenóis Totais

O teor de polifenóis totais (TPT) de Cr18.EE e Cr18.EE₇₀ foi determinado através do método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Kumazawa *et al.*, 2004). Na presença de carbonato de sódio (Na₂CO₃), o reagente Folin-Ciocalteu (Folin-C) reage com os polifenóis mudando a sua coloração de amarela para azul, com uma absorvância proporcional ao teor de polifenóis, que pode ser medida a 760 nm (Magalhães *et al.*, 2008).

Em microplacas de 96 poços foram colocados, em cada um, 10 µl de cada extrato de modo a obter concentrações de 10, 25, 50, 100, 150 e 200 µg/ml. Posteriormente, foram adicionados às amostras 50 µl de reagente Folin-C (Sigma-Aldrich) (1:10) e 40 µl de Na₂CO₃ (Merck) (7,5 %; p/v) procedendo-se, após 1 hora de incubação no escuro e à temperatura ambiente, à leitura da absorvância num leitor de microplacas (Spectra Max Plus 384). Por cada concentração de extrato testada foi utilizado um branco elaborado com igual volume de extrato e solvente e, ainda, um controlo, apenas com o solvente e os reagentes. Como padrão utilizou-se o ácido gálico (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 30 e 50 µg/ml, sendo os resultados comparados com a curva de calibração e o TPT expresso em equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g extrato). As soluções foram feitas frescas e o ensaio feito em triplicado, com 3 réplicas cada.

Determinação do Teor de Flavonoides Totais

O teor de flavonoides totais (TFT) de Cr18.EE e Cr18.EE₇₀ foi determinado espectrofotometricamente, segundo o método descrito por Woisky e Salatino (1998), em que a adição de cloreto de alumínio (AlCl₃) resulta na alteração de cor das amostras para amarelo quando na presença de flavonoides, cuja absorvância medida a 420 nm varia proporcionalmente com a concentração de flavonóides.

Em microplacas de 96 poços foram colocados, em cada um, 50 µl de soluções de cada extrato por forma a obter concentrações de 200, 400, 800, 1000, 1200 e 1400 µg/ml. A cada amostra foram adicionados 50 µl de solução de AlCl₃ (Acrós Organics) (2 %) e incubou-se à temperatura ambiente, durante 1 hora no escuro, procedendo-se posteriormente à leitura da absorvância num leitor de microplacas (Spectra Max Plus 384). Por cada concentração de extrato utilizou-se um branco elaborado com igual volume de extrato e solvente e, ainda, um controlo, apenas com o solvente e o reagente. Como padrão utilizou-se a quercetina (Sigma-Aldrich) numa gama de concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 µg/ml, sendo os resultados comparados com a reta de calibração e o TFT expresso em equivalentes de quercetina (mg EQ/g extrato). As soluções foram feitas frescas e o ensaio realizado em triplicado, com 3 réplicas cada.

Determinação do Teor de Orto-difenóis

O teor de orto-difenóis (TOD) de Cr18.EE e Cr18.EE₇₀ foi determinado espectrofotometricamente pelo método do Molibdato de Sódio (Na₂MoO₄) descrito por Garcia e colegas (2012), com modificações, que se baseia no facto de os orto-difenóis possuírem capacidade de formar quelatos com diversos metais, como o molibdénio. Os grupos hidroxilos dos orto-difenóis formam complexos com o ião molibdato originando um produto de cor alaranjada (Del Carlo *et al.*, 2012), permitindo a sua deteção e quantificação através da leitura da absorvância a 370 nm.

Em placas de 96 poços foram colocados, em cada um, 160 µl de soluções de cada extrato por forma a obter concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 300 µg/ml. Às amostras adicionaram-se 40 µl de solução de Na₂MoO₄ (Merck) (50 000 µg/ml, preparada com etanol a 50 %) e a absorvância foi lida (Spectra Max Plus 384) após 15 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente. Foi utilizado um branco por cada concentração de extrato testada, elaborado com igual volume de extrato e etanol 50 % (v/v), e, ainda, um controlo, apenas com etanol a 50 % (v/v) e o reagente. Como padrão utilizou-se o ácido gálico (Sigma-Aldrich) nas

concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 µg/ml, sendo os resultados comparados com a reta de calibração e o TOD expresso em equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g extrato). As soluções foram feitas frescas e o ensaio realizado em triplicado, com 3 réplicas cada.

1.2.2.2. Determinação da capacidade antioxidante dos extratos de própolis do Caramulo

A capacidade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis do Caramulo foi determinada pelo método da redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•), um radical estável que, quando reduzido, altera a sua cor de roxo para amarelo. As substâncias responsáveis por esta redução, consideradas como sequestradoras de radicais livres, fazem com que a absorvância diminua de um modo proporcional à sua concentração, podendo ser lida a 517 nm, e, assim, avaliar sobre a capacidade antioxidante dos compostos testados (Mitra e Uddin, 2014).

Para avaliar a capacidade de redução ou sequestro do DPPH pelos extratos Cr18.EE e Cr18.EE₇₀, misturaram-se 50 µl de soluções de cada extrato, preparadas por forma a obter concentrações de 0,5, 1, 5, 10, 25 e 50 µg/ml, com 100 µl de solução de DPPH• (Sigma-Aldrich) (0,004 %; p/v). A absorvância foi lida (Spectra Max Plus 384) após 20 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços utilizando um branco por cada concentração, elaborado com igual volume de extrato e o solvente, e, ainda, um controlo, apenas com o solvente e o reagente. Como padrão utilizou-se o ácido gálico (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0,2, 0,35, 0,5, 0,75, 1 e 1,5 µg/ml, sendo os resultados comparados com a reta de calibração. As soluções foram feitas frescas e o ensaio realizado em triplicado, com 3 réplicas cada. A capacidade antioxidante dos extratos foi expressa como a percentagem (%) de redução do radical, calculada através da *equação 5*:

$$\% \text{ redução} = \frac{\text{abs do controlo} - (\text{abs da amostra} - \text{abs do branco})}{\text{abs do controlo}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Com os valores obtidos foi possível calcular, através da equação da reta, o valor do EC₅₀, isto é, a concentração de extrato necessária para sequestrar 50 % de DPPH•, sendo assim também possível aferir sobre a capacidade antioxidante dos extratos.

1.2.3. Análise estatística

Em todos os ensaios foram usados triplicados (n=3) de cada condição, salvo indicação em contrário, e os resultados apresentados como a média ± desvio padrão (DP). As diferenças dos

teores de polifenóis totais, flavonoides totais e orto-difenóis, bem como da atividade antioxidante entre os dois extratos de própolis (Cr18.EE e Cr18.EE₇₀) foram analisadas estatisticamente com recurso ao GraphPad Prism Software v5.04 (GraphPad Software, California, USA). Uma vez que só foram comparados dois extratos, os dados relativos aos TPT e EC₅₀ foram submetidos a um *t-test* bicaudal com intervalo de confiança de 95 %, enquanto aqueles referentes à percentagem de redução do radical DPPH• em cada uma das concentrações de extrato foram analisados através da análise de variância *Two-way* ANOVA, com o teste de comparação múltipla de Bonferroni. A notação relativa à significância estatística dos resultados dos testes realizados foi: ns - não significativo ($p > 0,05$), * - significativo ($0,01 < p \leq 0,05$), ** - muito significativo ($0,001 < p \leq 0,01$) e *** - altamente significativo ($p \leq 0,001$).

1.3. Resultados e Discussão

1.3.1. O própolis do Caramulo cumpre parâmetros de qualidade

A amostra de própolis em estudo, proveniente da região do Caramulo, apresentava-se bastante aromática e muito compacta (Figura 3A), evidenciando partes mais secas e outras mais resinosas e “elásticas” (Figura 3B), possivelmente devido ao armazenamento prolongado e inadequado indicado pelo fornecedor. A presença de bolores não foi detetada, observando-se apenas algumas impurezas a olho nu, tais como fios provenientes das redes de raspagem, pedaços de madeira e, ainda, restos de abelhas e outros insetos.

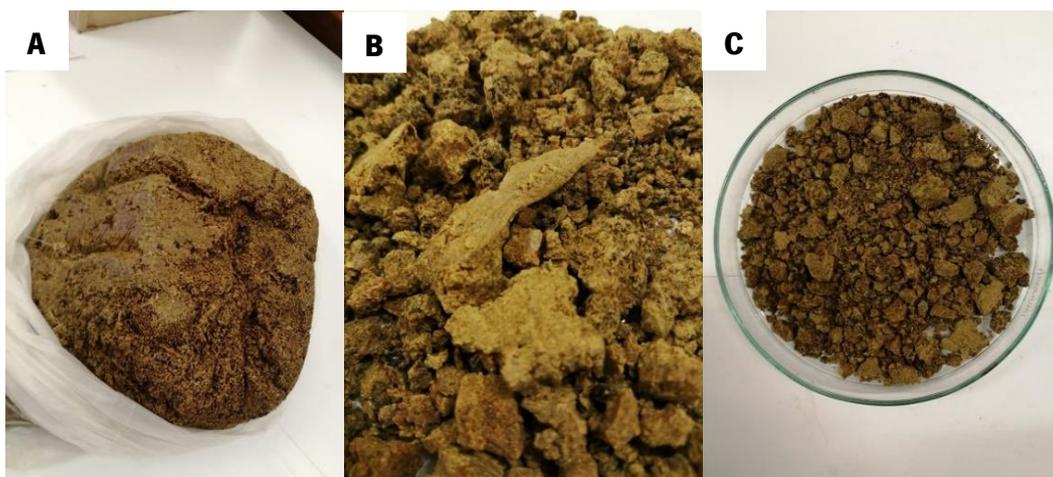


Figura 3 - Amostra de própolis do Caramulo (Cr18) antes (A) e após fragmentação (B) e limpeza (C).

A amostra possuía uma cor castanha-dourada e brilho ceroso (Figura 3), como descrito para amostras oriundas do interior centro e sul de Portugal continental e também da ilha da Madeira,

de tonalidades de castanho a castanho-escuro (Falcão *et al.*, 2013). Embora a cor do própolis não seja um parâmetro frequentemente referido pela literatura e não exista um método oficial para a sua identificação, esta é usada para descrever o produto comercialmente, variando consoante as plantas que lhe deram origem e sua idade que, por sua vez, determinam a composição química da amostra (Falcão, 2013).

Como já referido, a análise da qualidade do própolis deve incluir, para além da presença ou não de impurezas mecânicas, parâmetros como o teor de humidade, cinzas e cera (Lopes *et al.*, 2017), sendo os valores máximos admitidos pela *Technical Regulation of Propolis Identity and Quality* (TRPIQ) de 8, 5 e 25 %, respetivamente (Pereira *et al.*, 2020). Os valores referentes a estes parâmetros obtidos para a amostra Cr18 situam-se dentro dos limites máximos descritos na literatura (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros determinados para o própolis do Caramulo, em comparação com valores aceitáveis estabelecidos pela TRPIQ, os descritos por Bogdanov (2011) para o própolis europeu e os propostos por Falcão (2013) como referência para própolis português do tipo I e II. Os resultados da amostra Cr18 são apresentados como a média \pm desvio-padrão (DP) (n=3).

Parâmetro	Cr18	TRPIQ	Europeu	Português tipo I	Português tipo II
Humidade (% m/m)	1,02 \pm 0,17	Máx. 8	-	Máx. 5	Máx. 5
Cinzas (% m/m)	0,47 \pm 0,12	Máx. 5	-	Máx. 2	Máx. 4
Cera (% m/m)	25,92 \pm 1,08	Máx. 25	Máx. 25	Máx. 25	Máx. 31
Bálsamo (% m/m)	37,50 \pm 13,61	-	Mín. 45	Mín. 65	Mín. 45

A quantidade de água presente (1,02 \pm 0,17 %) foi bastante inferior ao limite máximo considerado aceitável pela TRPIQ e por Falcão (2013) para própolis português (Tabela 4), sendo inferior aos referidos por este último para amostras provenientes de várias regiões do interior centro do nosso país (3,6 a 4,5 %) (Falcão *et al.*, 2013). Sabendo que o teor de humidade depende das condições de manipulação e do tempo de armazenamento (Falcão *et al.*, 2013), este valor tão baixo poderá estar relacionado com um dos ou ambos os fatores, uma vez que Cr18 esteve armazenada durante um longo período de tempo, face às restantes amostras, que possivelmente foram analisadas frescas ou após conservação a 4 °C, podendo, por isso, apresentar-se mais seca.

Outro parâmetro avaliado é a presença de cinzas no própolis, que reduz o conteúdo deste produto em substâncias biologicamente ativas. A sua presença deve-se à agregação, por parte das abelhas, de outros materiais que não resinas, nomeadamente solo, conduzindo a um elevado teor de cinzas (Pereira *et al.*, 2020). O valor obtido para a amostra do Caramulo (0,47 \pm 0,12 %) foi também bastante inferior aos limites máximos propostos (Tabela 4) e também aos mencionados

para outras amostras de própolis português proveniente de várias regiões do interior centro de Portugal, com valores entre 1,3 e 4,2 % (Falcão, 2013). O teor de cinzas de Cr18 foi, contudo, semelhante ao encontrado por Bonvehí e Gutiérrez (2011) em 19 amostras do nordeste de Espanha, cujas percentagens de cinza se situavam entre 0,31 e 0,81 %.

Tal como as cinzas, também o teor de ceras no própolis pode afetar o seu valor comercial, uma vez que um elevado teor indica, por norma, uma baixa percentagem de compostos bioativos. A amostra Cr18 apresentou $25,92 \pm 1,08$ % de cera, um valor que se situa no limiar máximo considerado aceitável para própolis europeu e própolis português do tipo I, assemelhando-se também a valores descritos por outros autores em amostras diversas (Bonvehí e Gutiérrez, 2011; Falcão *et al.*, 2013). Estes componentes advêm da cera de abelha que é adicionada durante a sua produção, ou mesmo das plantas de onde provém a resina recolhida e que depende, por sua vez, da época de produção e do método de colheita (Falcão *et al.*, 2013), pelo que o valor obtido pode estar relacionado com as espécies botânicas existente ao redor do apiário (cujas coordenadas não foram possíveis obter).

O conteúdo balsâmico é provavelmente dos mais importantes parâmetros para aferir sobre a qualidade do própolis. O bálsamo do própolis diz respeito à fração solúvel em etanol (Burdock, 1998; Bankova *et al.*, 2016; Bogdanov, 2017), onde se encontram os compostos fenólicos e outros componentes deste produto como ésteres, cetonas e álcoois (Bogdanov, 2017), e a sua análise assemelha-se ao processo de extração para obtenção do extrato de própolis. Assim, seria esperado que o teor de bálsamo se aproximasse do rendimento em extrato obtido para Cr18.EE₇₀ (61,4 %), discutido na secção seguinte, uma vez que o solvente e as condições experimentais foram iguais nos dois procedimentos e o processo de extração é dependente das condições experimentais, como a temperatura ou diferenças de polaridade do solvente (Silva, 2017). No entanto, o valor de bálsamo de Cr18 obtido ($37,50 \pm 13,61$ %) foi bastante inferior, aproximando-se dos descritos para própolis verde do Brasil, onde o conteúdo balsâmico deverá ser no mínimo de 35 % (Bogdanov, 2011; Sawaya *et al.*, 2011). Não obstante, a quantidade de bálsamo obtida para a amostra em estudo pode ter sido influenciada pela dificuldade de homogeneidade entre réplicas, dada a heterogeneidade da amostra. Se considerando a geografia, a amostra em estudo se deveria incluir no tipo I de própolis português, quanto ao teor balsâmico parece aproximar-se mais do tipo II, do tipo mediterrânico, o que parece algo incoerente. Contudo, Falcão e colegas (2013) também obtiveram valores semelhantes numa amostra de Boticas (que fica no extremo norte de Portugal), 37 % de bálsamo e 20 ± 4 % de ceras, parecendo estes resultados sugerir que poderá haver

variações à pequena escala. Assim, tal poderá dever-se, mais uma vez, às espécies disponíveis e utilizadas pelas abelhas, uma vez que a complexidade do bálsamo se relaciona com a diversidade de espécies vegetais ao redor das colmeias das quais são recolhidas as resinas (Silva, 2017). Poderá ainda argumentar-se que os resultados terão sido influenciados pela quantidade bastante reduzida de amostra utilizada na análise (0,5 g), não sendo fácil garantir a sua homogeneidade quanto aos diferentes componentes do própolis, e mais ainda numa amostra tão heterogénea como Cr18, contendo partes mais resinosas do que outras, traduzindo-se tudo isto no elevado desvio padrão estimado.

Dado que praticamente todos os parâmetros de qualidade avaliados para Cr18 vão de encontro aos valores considerados aceitáveis para um própolis de boa qualidade, pode considerar-se que, apesar da sua rejeição para outros fins, se trata de uma amostra de qualidade com potencial de aplicação. Este resultado reveste-se de particular relevância para nós, visto se pretender avaliar simultaneamente o potencial de própolis considerado inapropriado por algumas indústrias.

1.3.2. O própolis do Caramulo é rico em compostos fenólicos

Através do método de extração utilizado, foram obtidos rendimentos de 73 e 61,4 % para os extratos realizados com etanol absoluto e etOH₇₀, respetivamente. Estes resultados encontram-se dentro da gama de valores obtidos por outros elementos do grupo de investigação para extratos etanólicos e hidroalcoólicos de própolis do Gerês, Beira Alta e Beja em diferentes anos, que variaram entre 66,2 e 86 % (Gonçalves, 2016; Marques, 2016; Moreira, 2017; Carvalho, 2019; Sousa, S. – comunicação pessoal). Sabe-se que o rendimento e a composição dos extratos etanólicos de própolis são influenciados pela concentração de etanol usada (Sawaya *et al.*, 2011), tendendo o rendimento de extração a aumentar com o aumento da concentração de etanol (Sun *et al.*, 2015; Archaina *et al.*, 2016), por extrair mais compostos hidrofílicos (Rafińska *et al.*, 2019). Assim, poder-se-á explicar o rendimento inferior em Cr18.EE₇₀ pela concentração mais baixa de etanol utilizada ou, ainda, e apesar de ambos os extratos terem sido liofilizados, pelo facto de se ter obtido um extrato em pó com Cr18.EE₇₀, devido ao maior conteúdo de água, em oposição a Cr18.EE, cujo resultado foi um extrato com a habitual consistência pastosa (Figura 4). Embora a liofilização permita secar amostras a temperaturas que mantêm as amostras congeladas, evitando a degradação de compostos, esta deve ser usada com precaução uma vez que pode diminuir o rendimento em compostos instáveis ou voláteis, a capacidade antioxidante ou até a

quantidade de amostra (Cronin *et al.*, 1995), podendo explicar também o rendimento inferior obtido. Ainda assim, este procedimento tem sido descrito como um método que preserva as propriedades antimicrobianas do produto, desconhecendo-se, no entanto, os seus efeitos no armazenamento a longo prazo dos extratos resultantes (Bogdanov, 2011).

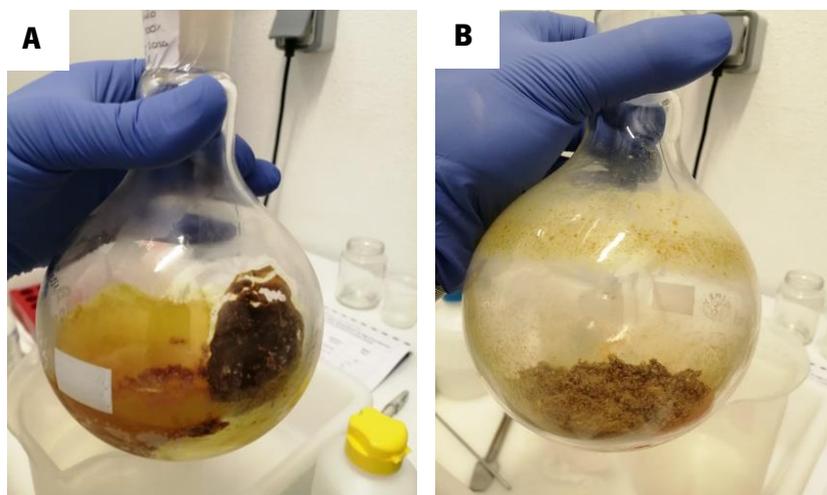


Figura 4 - Extratos de própolis do Caramulo - Cr18.EE e Cr18.EE₇₀ - obtidos, respetivamente, com etanol absoluto (A) ou etOH₇₀ (B).

A proporção de etanol:água no solvente está também relacionada com os teores de polifenóis e de flavonoides totais (Sun *et al.*, 2015). De uma maneira geral, os extratos elaborados com etanol possuem uma grande quantidade destes compostos (Cunha *et al.*, 2004; Devequi-Nunes *et al.*, 2018; Zin *et al.*, 2018), aos quais se têm atribuído as bioatividades do própolis, particularmente a capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana (Devequi-Nunes *et al.*, 2018). A composição fenólica é, portanto, um dos parâmetros mais importantes para a valorização comercial do própolis e os compostos fenólicos (polifenóis totais, flavonoides e orto-difenóis) determinados em Cr18.EE e Cr18.EE₇₀ encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Teores de polifenóis totais, flavonoides e orto-difenóis dos extratos Cr18.EE e Cr18.EE₇₀. Os TPT e TOD foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g) e o TFT em miligramas de quercetina por grama de extrato (mg EQ/g). Os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n=3), sendo que os valores que apresentarem * são significativamente diferentes daquele pertencente à mesma coluna ($p \leq 0,05$).

Extrato	TPT (mg EAG/g)	TFT (mg Q/g)	TOD (mg EAG/g)
Cr18.EE	150,39 ($\pm 6,29$)	65,44 ($\pm 1,61$)	314,17 ($\pm 13,09$)
Cr18.EE ₇₀	166,31* ($\pm 5,42$)	69,33 ($\pm 4,60$)	353,87 ($\pm 19,86$)

O teor de polifenóis foi significativamente superior em Cr18.EE₇₀ (Tabela 5), ao contrário do encontrado em anos anteriores por outros elementos do grupo de investigação para amostras de outras regiões de Portugal (Gonçalves, 2016; Marques, 2016; Moreira, 2017). Apesar da maior eficácia atribuída ao etanol absoluto enquanto solvente para extração destes compostos (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006; Miguel *et al.*, 2010), o etOH₇₀ demonstrou extrair mais compostos fenólicos que o primeiro ($166,31 \pm 5,42$ e $150,39 \pm 6,29$ mg EAG/g extrato, respetivamente). O mesmo foi verificado por Sun e colaboradores (2015), ao encontrarem maior TPT em extratos de própolis realizados com etanol a 75 % comparativamente a percentagens superiores deste solvente. Estes resultados aparentemente contraditórios poderão ser explicados por esta ser uma amostra especialmente rica por compostos mais polares, traduzindo-se isso num TPT mais baixo no extrato etanólico (Woisky e Salatino, 1998; Sawaya *et al.*, 2011).

Os valores de polifenóis totais obtidos para Cr18.EE (Tabela 5) foram semelhantes aos encontrados em amostras também do interior centro de Portugal (151 mg EAG/g) (Moreira *et al.*, 2008). Já o TPT de Cr18.EE₇₀ mostrou ser bastante superior ao encontrado num extrato de própolis de Águeda e Mealhada/Buçaco, elaborado com a mesma percentagem de etanol, cujos valores variaram entre 70 e 141 mg EAG/g (Maia, 2014). No entanto, Falcão e colaboradores (2013), verificaram que a maioria das amostras portuguesas de várias regiões do continente e ilhas apresentam TPT entre 200 e 400 mg/g de extrato, bastante superiores aos obtidos para Cr18.EE e Cr18.EE₇₀. Conjuntamente, estes resultados mostram que dentro de um mesmo país, os teores de compostos fenólicos do própolis podem ser quantitativamente muito variáveis, sugerindo que as grandes categorias de própolis podem conter uma ampla variabilidade de tipos, provavelmente ligado à existência de uma diversidade botânica mais rica em espécies utilizadas pelas abelhas para recolha das resinas. Ainda assim, cerca de 85 % dos diferentes própolis portugueses têm um perfil fenólico semelhante, ainda que os compostos estejam em diferentes proporções (Falcão *et al.*, 2010).

Tal como para o teor de polifenóis, também no teor de flavonoides se verificou uma tendência de aumento com a diminuição da percentagem de etanol no solvente, ainda que os valores não sejam estatisticamente diferentes (Tabela 5). O teor de água no solvente etanólico também exerce um grande efeito na quantidade de flavonoides (Cottica *et al.*, 2011). No entanto, Gonçalves (2017), num estudo com própolis português, descreveu que o teor de flavonoides estabilizou com etOH₇₀, sendo igual ao obtido com etanol absoluto. Não obstante, ambos os valores encontrados são bastante superiores aos mencionados num extrato de própolis da Beira Alta obtido com etanol

absoluto (30,21 mg EQ/g extrato) (Cruz *et al.*, 2016), sugerindo a riqueza dos extratos em estudo em compostos fenólicos. De qualquer forma, os teores obtidos para Cr18.EE e Cr18.EE₇₀, no que diz respeito a polifenóis totais e flavonoides, encontram-se dentro da gama obtida para extratos de própolis de 14 origens geográficas espalhadas pelo globo, variando entre 31,2 e 299 mg EAG/g de extrato e entre 2,5 e 176 mg EQ/g de extrato, respetivamente (Kumazawa *et al.*, 2004).

O teor de orto-difenóis é um parâmetro que não tem sido reportado na literatura para própolis. No entanto, estes compostos parecem ter um papel importante na proteção contra danos oxidativos (Del Carlo *et al.*, 2012), sendo frequentemente mencionados para o azeite pelo seu papel particularmente ativo como antioxidante (Gouveia *et al.*, 2009). Assim, considerou-se importante avaliar também este parâmetro em Cr18.EE e Cr18.EE₇₀, tendo-se obtido valores de 314,17 e 353,87 mg EAG/g, respetivamente (Tabela 5). Estes valores encontram-se no limite superior da gama registada para amostras do Gerês de 2018 e 2019 (variando entre 206,66 e 368,75 mg EAG/g extrato (Ana Freitas – comunicação pessoal), confirmando uma vez mais a sua riqueza em compostos fenólicos.

No caso do método espectrofotométrico com cloreto de alumínio (AlCl₃), é importante ter em conta que este contabiliza essencialmente flavonas e flavonois, subestimando as classes de flavanonas e dihidroflavonois (Cruz *et al.*, 2016), pelo que outro método poderia contribuir para uma quantificação mais rigorosa do teor destes compostos. Tendo em conta que o própolis de regiões temperadas possui um grande teor de diferentes classes de flavonoides, nomeadamente daqueles tipos, os valores obtidos poderão estar subestimados. Assim, o ensaio poderia beneficiar também da utilização de outros compostos como padrão, nomeadamente aqueles mais representativos do própolis aqui em análise ou, uma vez que se desconhece a sua composição, do própolis português do tipo I.

1.3.3. O própolis do Caramulo possui elevada capacidade antioxidante

A formação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) provoca a oxidação dos produtos alimentares resultando na sua deterioração, além de estarem envolvidas em várias patologias humanas. Uma das bioatividades atribuídas ao própolis é a capacidade antioxidante (Burdock, 1998; Fokt *et al.*, 2010; Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Anjum *et al.*, 2018), também comprovada por vários autores em amostras de própolis português (Moreira *et al.*, 2008; Valente *et al.*, 2010; Vila-Boas *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2019). Esta bioatividade pode também ser usada para aferir a influência da composição química e da diversidade botânica

existente no local da colmeia na qualidade do própolis (Falcão, 2013) e foi avaliada em Cr18.EE e Cr18.EE₇₀, verificando-se uma percentagem de redução do radical DPPH• dependente da concentração de extrato (Figura 5), como já descrito na literatura (Moreira *et al.*, 2008). Ambos os extratos demonstraram atividade anti-radicalar significativa, determinando-se valores de EC₅₀ de $9,58 \pm 0,66$ e $10,90 \pm 0,57$ µg/ml para Cr18.EE e Cr18.EE₇₀, respetivamente.

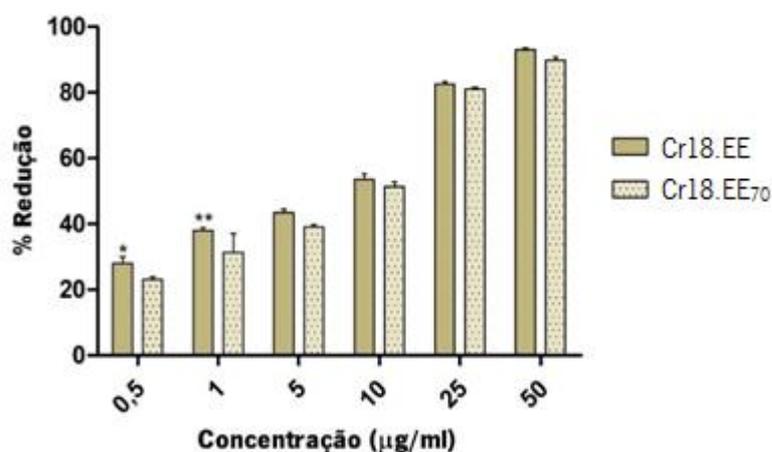


Figura 5 - Percentagem (%) de redução do radical DPPH por Cr18.EE e Cr18.EE₇₀. Os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n=3), sendo que a diferença entre os valores pertencentes à mesma coluna é significativa (*) ($0,01 < p \leq 0,05$), muito significativa (**) ($0,001 < p \leq 0,01$) ou altamente significativa (***) ($p \leq 0,001$).

Supor-se-ia existir uma relação entre a composição fenólica e a capacidade antioxidante dos extratos (Woo *et al.*, 2015; Zin *et al.* 2018), uma vez que os compostos fenólicos são capazes de doar hidrogénios e sequestrar radicais livres, interagindo ou evitando a formação de ROS responsáveis pelo stresse oxidativo e danos nos tecidos (Zin *et al.* 2018). De facto, alguns autores afirmam que extratos de própolis elaborados com etanol a 75 % exibem atividade antioxidante mais forte do que extratos com percentagens mais elevadas de etanol (Sun *et al.*, 2015), resultados obtidos também no nosso grupo em trabalhos realizados em anos anteriores com amostras de própolis de várias regiões de Portugal (Gonçalves, 2016; Marques, 2016). Porém, Cr18.EE exibe valores de TPT inferiores e um maior potencial antioxidante aos de Cr18.EE₇₀ (Tabela 5). Não obstante, e ainda que estatisticamente significativa ($p = 0,0311$), a diferença entre os valores de EC₅₀ de Cr18.EE e Cr18.EE₇₀ não é elevada, o que parece também corroborar com o descrito por Archaina e colaboradores (2016), que afirma que a capacidade antioxidante de extratos de própolis parece não estar diretamente relacionada com a concentração de etanol usada no solvente. De qualquer modo, e apesar da atividade antioxidante do própolis ser principalmente atribuída aos polifenóis (Kumazawa *et al.*, 2004), pode também estar relacionada com a presença

de outros compostos, nomeadamente a vitamina C (Ramnath e Venkataramgowda, 2016), o que pode explicar os resultados obtidos, uma vez que solventes diferentes extraem compostos distintos dependendo da sua polaridade, mas a presença ou não de tais compostos teria de ser averiguada para confirmar esta hipótese. Ainda, enquanto a amostra em estudo foi extraída com cada um dos solventes (etanol absoluto ou etOH₇₀), aquelas aqui em comparação foram extraídas com etanol absoluto e depois re-extraídas em diferentes solventes, o que poderá também explicar as diferenças encontradas.

Os resultados obtidos para os extratos de própolis do Caramulo são semelhantes aos obtidos pelo grupo de Valente (2010) para uma amostra do Fundão ($10,4 \pm 2,7 \mu\text{g/ml}$), uma região do interior centro tal como Cr18, e situam-se no limite mínimo da gama de valores referidos para amostras de várias regiões de Portugal (8 a $93 \mu\text{g/ml}$) (Falcão *et al.*, 2013). Outras amostras portuguesas exibiram valores de EC₅₀ mais elevados, como os obtidos para própolis do Gerês em vários anos (variando de 14,41 a $20,10 \mu\text{g/ml}$) (Freitas *et al.*, 2019) e também do sul de Portugal (27 a $31 \mu\text{g/ml}$) (Miguel *et al.*, 2010), sugerindo que o própolis do Caramulo tem elevado poder antioxidante. Ainda assim, todos estes trabalhos comprovam que o própolis português tem excelente poder antioxidante comparativamente a própolis de outras localizações do globo onde se obtiveram valores de EC₅₀ entre 43,4 e $269 \mu\text{g/ml}$ extrato (própolis coreano) e entre 73,8 e $179,0 \mu\text{g/ml}$ de extrato (própolis australiano, brasileiro e chinês) (Wang *et al.*, 2016).

2. Potencial do própolis do Caramulo no controlo da doença do pedrado da macieira

2.1. Introdução

A cultura da macieira é suscetível a várias pragas e doenças, sendo necessário recorrer a 15 a 20 tratamentos por ano (MacHardy, 1996 citado por Araújo, 2011) para evitar perdas significativas. Em regiões temperadas e húmidas, as doenças causadas por fungos são o principal problema na produção da maçã (Belete e Boyra, 2017).

Uma das principais doenças desta cultura é o pedrado da macieira, a qual começou a receber atenção por parte dos fruticultores no início do século XX, com o início da intensificação da fruticultura (Vieira, 2009). O agente causal desta doença é *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter, um fungo ascomiceta que ataca apenas espécies do género *Malus* (MacHardy, 1996 citado por Araújo, 2011). Embora esteja presente em todas as regiões do mundo onde existe a espécie *M. domestica* (MacHardy, 1996 citado por Araújo, 2011), o pedrado da macieira tem mais expressão em regiões

de clima temperado e húmido (MacHardy, 1996 citado por Jamar, 2011), como é o caso de Portugal, onde a conjugação de temperaturas favoráveis à doença durante a maior parte do período vegetativo e a ocorrência de chuvas levam a uma elevada incidência da doença. Nestas regiões, as perdas económicas devidas a *V. inaequalis* podem ultrapassar os 70 % em variedades suscetíveis (Vieira, 2009; Belete e Boyraz, 2017) como é o caso das Fuji, Gala e Golden Delicious (Anónimo, 2015), refletindo-se a nível da quantidade e qualidade dos frutos (Jamar, 2011).

Os primeiros sintomas da doença aparecem cerca de duas semanas após incubação, dependendo da suscetibilidade da variedade (Jamar, 2011) e, embora o fungo ataque todas as partes verdes da planta, os sintomas são mais frequentes nas folhas e nos frutos (Vieira, 2009; Jamar, 2011) (Figura 6). Nestes, as lesões têm inicialmente uma tonalidade acastanhada a verde olivácea e margens irregulares que, com o tempo, ficam mais marcadas e as lesões mais escuras e com textura aveludada, devido à produção de esporos (Vieira, 2009). Pode ainda observar-se o fendilhamento dos frutos, levando à perda parcial ou total do seu valor comercial para consumo em fresco (Coutinho, 2011).

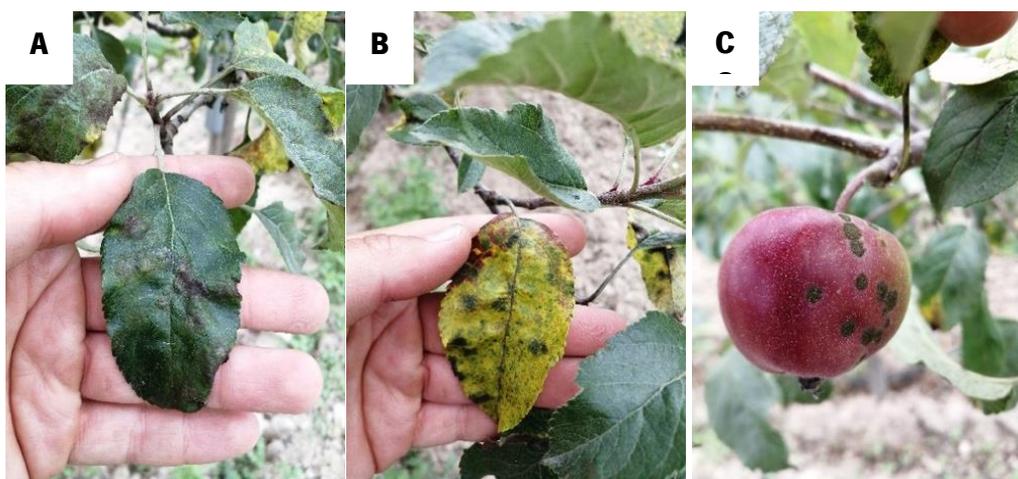


Figura 6 - Sintomas de pedrado nas folhas (A e B) e nos frutos (C) de macieira (fotos da autora).

Apesar de não causar a morte da árvore, a infeção por *V. inaequalis* pode levar ainda à perda de folhas que, se excessiva, pode comprometer a produção do ano seguinte, devido a uma menor produção e translocação de fotoassimilados (MacHardy, 1996 citado por Jamar, 2011). Ataques tardios causam lesões mais pequenas nos frutos ainda no pomar, ou mais tarde, durante o armazenamento (Anónimo, 2020), estas últimas resultando também em perdas significativas (Coutinho, 2011; Jamar, 2011).

2.1.1. Ciclo de vida de *Venturia inaequalis*

O ciclo biológico do agente patogénico responsável pelo pedrado da macieira (Figura 7) pode ocorrer de forma sexuada e assexuada, correspondendo a *V. inaequalis* (saprófita) e o seu anamorfo *Spilocaea pomi* Fr. (parasita), respetivamente (Bonne, 1971).

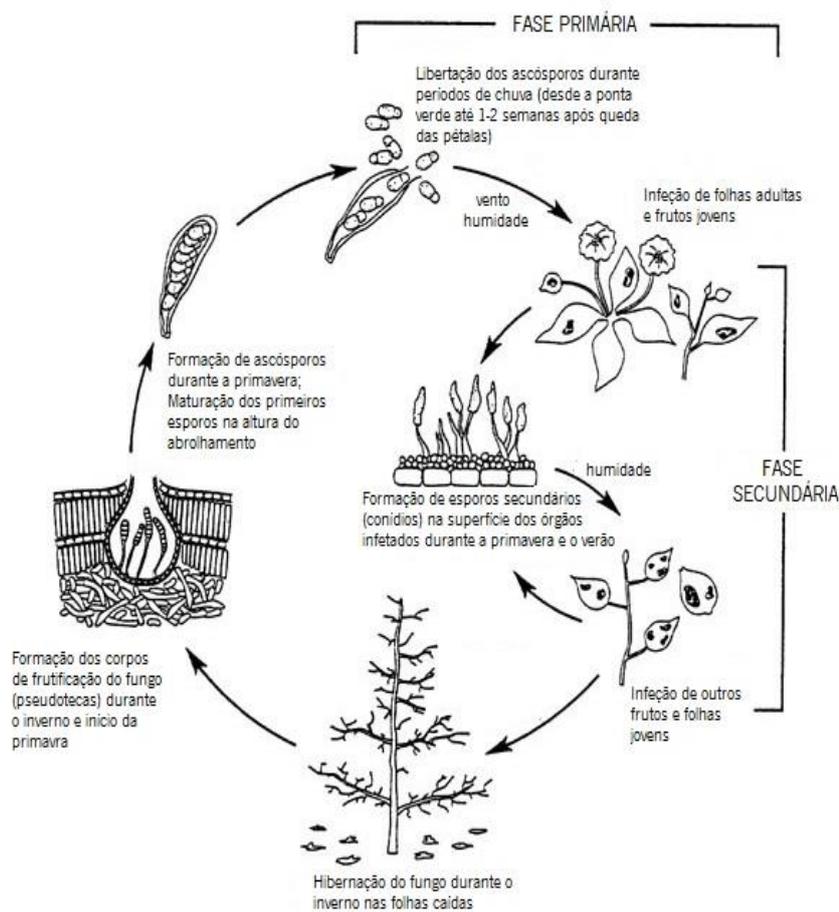


Figura 7 – Ciclo biológico da doença do pedrado (adaptado de Gauthier, 2018).

No inverno, o fungo hiberna sobretudo na forma sexuada em pseudotecas, que se desenvolvem nas folhas infetadas caídas, embora possa, raramente e em certas regiões, hibernar também no ritidoma da madeira e/ou em lesões nos ramos (MacHardy, 1996 citado por Vieira, 2009), ou ainda nos frutos infetados que ficaram mumificados na árvore (Coutinho, 2011). A maior parte das pseudotecas forma-se após a queda das folhas e, depois de um período de dormência, no final do inverno, estas estruturas maturam, desenvolvendo no seu interior ascos que contêm os ascósporos, isto é, os esporos sexuais (inóculo primário), que darão origem às infeções primárias (Vieira, 2009). Estes esporos atingem a maturidade em março e são libertados na presença de chuva, alcançando as plantas por ação do vento. Uma vez na superfície das folhas

ou dos frutos, o fungo penetra nos tecidos infetando os órgãos da planta caso estes permaneçam molhados o tempo suficiente e a temperatura seja adequada (Jamar, 2011).

As primeiras lesões aparecem 9 a 17 dias depois da libertação dos ascósporos (Jamar, 2011), desenvolvendo-se em cada lesão milhares de esporos, os conídios (Anónimo, 2015). Quando chove, a água transporta-os para outras partes da planta, infetando-as, sendo que estas infeções secundárias ocorrem, maioritariamente, dentro da canópia da árvore infetada (MacHardy *et al.*, 2001). O aumento da doença num pomar deve-se à repetição de ciclos de infeção causados pelos conídios (Aylor, 1998), ocorrendo as infeções secundárias sempre que existam condições para tal e até à queda das folhas, altura em que o micélio invade o interior das folhas. Posteriormente, durante o inverno, formam-se as pseudotecas, que darão início a um novo ciclo de doença na primavera (Vieira, 2009).

2.1.2. Condições de desenvolvimento da doença

Na primavera, as macieiras são vulneráveis à doença desde o abrolhamento dos gomos e aparecimento da ponta verde das folhas (estado fenológico, e.f., C₃- D de Fleckinger, Anexo 1) (Coutinho, 2011), altura em que os ascósporos começam a ser libertados. Esta libertação não ocorre, geralmente, antes da abertura das flores (e.f. E₂ – F de Fleckinger, Anexo 1), sendo que a partir daqui o número de ascósporos aumenta semana a semana, atingindo um pico entre a floração e a queda das pétalas (e.f. F₂ e G de Fleckinger, respetivamente, Anexo 1), após o qual a quantidade de esporos libertados diminui até que as reservas nas pseudotecas se esgotem (Jamar, 2011).

A libertação dos ascósporos e, conseqüentemente, a extensão da infeção primária, são influenciadas por vários fatores (MacHardy e Gadoury, 1986), entre eles a humidade (Jamar, 2011), o fotoperíodo (MacHardy e Galoury, 1986; Rossi *et al.*, 2000) e a temperatura, sendo a taxa de descarga maior acima dos 10 °C e mais lenta a valores inferiores, não ocorrendo, geralmente, à noite (MacHardy e Galoury, 1986). Para serem libertados, os ascósporos precisam ainda de passar por um período de maturação, que ocorre desde inícios de março até junho (Vieira, 2009). Depois de maduros, para além da presença de chuva, os ascósporos necessitam também de um período de humectação, conhecido como tempo de folha molhada, que antecede e acompanhe esta fase, permitindo a libertação, o transporte e a germinação dos esporos nas partes suscetíveis da macieira (MacHardy, 1996 citado por Vieira, 2009). Os fatores dos quais depende o sucesso da infeção, nomeadamente a temperatura, a humidade e o período de folha molhada,

apresentam intervalos de variabilidade onde o fungo se desenvolve, dentro dos quais existe também uma variabilidade na expressão dos sintomas, conforme o agente patogénico se desenvolva mais próximo dos limites ou do seu ótimo de desenvolvimento (Llácer *et al.*, 1996 citado por Vieira, 2009).

A germinação dos esporos não garante infecção, isto é, a invasão e crescimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro, dependendo o seu desenvolvimento da suscetibilidade deste e do órgão em questão e, ainda, da temperatura e do tempo que as folhas permanecem molhadas (Belete e Boyraz, 2017). Esta relação entre a temperatura e o período de humectação para a ocorrência de infecção foi inicialmente apresentada por Mills, em 1940, e, entretanto, revista e ajustada por outros autores (MacHardy e Gadoury, 1989), estimando-se, mediante estes parâmetros, 3 níveis de infecção: leve, moderada e acentuada (Anexo 2). Estes níveis, em conjunto com a monitorização das condições meteorológicas, são uma ferramenta *standard* para identificar as condições favoráveis para ocorrer infecção e permitir a aplicação eficaz dos tratamentos (Belete e Boyraz, 2017).

No que respeita ao risco de infecção, este depende, num dado momento, da quantidade total de ascósporos existentes e da fração disponível (maduros) para serem libertados. O número total de esporos sexuais disponíveis para uma campanha, isto é, a dose potencial de ascósporos (PAD, do inglês *Potential Ascospore Dose*), depende da quantidade de doença na anterior (Aylor, 1998). Para além disto, outros fatores como a data da primeira libertação, sua intensidade e progressão (Jamar, 2011), o transporte, diluição e deposição dos esporos no tecido do hospedeiro e, ainda, a própria suscetibilidade e estado fenológico deste determinam o risco de infecção (Aylor, 1998).

Dentro da espécie *Malus domestica*, genótipos diferentes apresentam sensibilidades diferentes a *V. inaequalis*, expressando sintomas diferentes, a partir dos quais foram definidas classes de resistência (Keitt *et al.*, 1948), mais tarde revistas por Chevalier *et al.* (1991) (Figura 8).

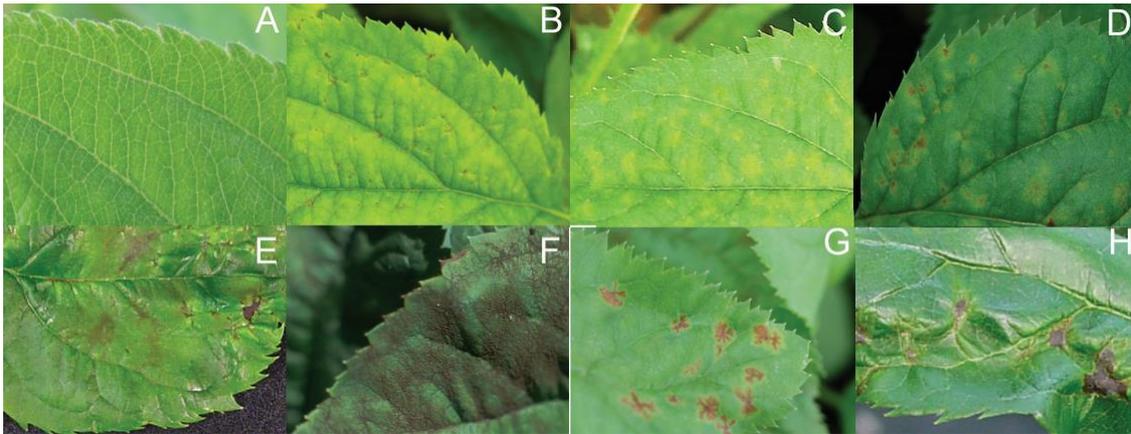


Figura 8 - Classes de resistência após inoculação de *V. inaequalis*. A: Classe 0 - sem sintomas; B: Classe 1 - manchas *pinpoint* sem esporulação (hipersensibilidade); C: Classe 2 - lesões cloróticas e necróticas irregulares sem esporulação; D: Classe 3a - lesões cloróticas e necróticas irregulares com eventual esporulação leve; E: Classe 3b - lesões cloróticas e necróticas irregulares com esporulação; F: Classe 4 - lesões com esporulação abundante (susceptibilidade completa); G e H: necrose (adaptado de Gessler *et al.*, 2006).

A idade do tecido é também um fator determinante na suscetibilidade, quer dos frutos quer das folhas (Aylor, 1998; Vieira, 2009; Jamar, 2011); enquanto nos frutos mais jovens as infeções resultam em lesões maiores levando, normalmente, ao seu fendilhamento e deformação, nos frutos maduros as lesões são em maior número, mas menores, desenvolvendo-se mais lentamente, podendo mesmo não ser visíveis na altura da colheita, mas acabando por aparecer apenas durante o armazenamento (Vieira, 2009).

As condições para ocorrência de infeções secundárias são semelhantes às necessárias para as infeções primárias, mas, no entanto, os conídios necessitam de menos tempo de humectação do que os ascósporos para que ocorra infeção (MacHardy, 1996, citado por Vieira, 2009) e, ao contrário destes últimos, podem ser libertados a qualquer altura do dia ou da noite, em tempo seco e/ou húmido (Jamar, 2011).

2.1.3. Controlo da doença

Para que o controlo do pedrado da macieira seja eficaz, é fundamental a monitorização das condições determinantes na evolução da doença através de estações meteorológicas, isto é, a temperatura, precipitação, tempo de folha molhada e, embora menos importante, direção e velocidade do vento, para depois calcular o risco de infeção de acordo com os critérios de Mills (Jamar, 2011). O combate de fungos cujo micélio se desenvolve no interior das plantas é mais difícil já que se veem diminuídas as janelas de oportunidade do tratamento, pelo que é imprescindível saber que tipo de produto usar e em que momento, o que exige o conhecimento

da relação do ciclo biológico do fungo e da planta hospedeira (Llácer *et al.*, 1996 citado por Vieira, 2009).

A gestão do pedrado da macieria deve focar-se na prevenção das infeções primárias (Aylor, 1998), quer através da redução de inóculo presente, quer através da proteção das plantas contra possíveis infeções. No que diz respeito à redução de inóculo, é aconselhada a eliminação das folhas que se encontrem em decomposição no pomar, através da sua remoção ou queima, ou ainda a aplicação de ureia após a queda das folhas, que acelera a sua decomposição e inibe a formação das pseudotecas devido ao aumento de azoto na folha (Vieira, 2009; Anónimo, 2015), contribuindo também para o desenvolvimento de alguns microrganismos antagonistas de *V. inaequalis* (Vieira, 2009), igualmente importantes no seu controlo (Belete e Boyraz, 2017). No entanto, a ureia, um dos fertilizantes mais utilizados no mundo, é suscetível a perdas pela volatilização da amónia, lixiviação e desnitrificação, levando à acidificação dos solos, contaminação das águas e diminuição da camada do ozono (Prasad, 1998), pelo que a sua utilização deve ser muito criteriosa.

Podem ainda ser implementadas outras medidas culturais com vista à prevenção da doença de forma indireta, tais como a utilização de um compasso adequado e a realização de podas frequentes que promovam a penetração dos raios solares e o arejamento da canópia, mantendo as folhas tão secas quanto possível, facilitando também a aplicação dos tratamentos (Anónimo, 2015; Belete e Boyraz, 2017; Majeed *et al.*, 2017). A mistura de cultivares com diferentes níveis de resistência ao pedrado pode ser também importante para o controlo da doença (Coutinho, 2011; Anónimo, 2015; Majeed *et al.*, 2017), já que a monocultura, que caracteriza os sistemas agrícolas modernos, favorece o rápido desenvolvimento de doenças dependendo, consequentemente, de um grande *input* de pesticidas.

Embora os tratamentos contra esta doença devam ser feitos de modo preventivo (Aylor, 1998), já que se as infeções primárias forem controladas o número de aplicações de tratamentos químicos pode ser reduzido, após germinação e penetração dos esporos nos tecidos da planta, estes produtos deixam de ter ação contra o desenvolvimento da doença (Vieira, 2009). Depois, apenas os tratamentos curativos são capazes de penetrar nos tecidos e impedir que *V. inaequalis* se continue a desenvolver (Anónimo, 2015), desde que aplicados logo após infeção, necessitando, no entanto, de ser altamente específicos para o fungo por forma a não provocarem efeitos adversos nos tecidos do hospedeiro (Vieira, 2009).

Atualmente, a principal ferramenta no combate do pedrado da macieira são os fungicidas sintéticos, por oferecerem uma melhor relação preço/eficácia a curto e médio-prazo (Jamar, 2011). Os tratamentos químicos são realizados desde o abrolhamento dos gomos até ao verão, ou mesmo, em alguns casos, até à colheita (Belete e Boyraz, 2017) e os produtos usados são preventivos e/ou curativos, sendo que para maior eficácia muitos produtores utilizam uma combinação dos dois. Os tratamentos preventivos devem ser aplicados às folhas e aos frutos antes do período de infeção previsto e, por norma, em intervalos de sete a dez dias ou menores, dependendo da frequência e intensidade da chuva, ou ainda se se verificar um rápido crescimento vegetativo (Vieira, 2009).

Para além dos riscos para o ambiente e consumidores associados à presença de resíduos no solo, água e nos próprios frutos, a utilização repetida de fungicidas no combate a *V. inaequalis* tem conduzido, ao longo dos anos, ao desenvolvimento de resistências a estes produtos (Jamar, 2011), motivos pelos quais a agricultura biológica tem recebido bastante atenção também no cultivo de macieiras. Este modo de produção insere-se na produção integrada como uma forma de produção holística e define-se, segundo a Associação Portuguesa de Agricultura Biológica, como *“um sistema de produção agrícola (vegetal e animal) que procura a obtenção de alimentos de qualidade superior, recorrendo a técnicas que garantam a sua sustentabilidade, preservando o solo, o meio ambiente e a biodiversidade, privilegiando a utilização dos recursos locais e evitando o recurso a produtos químicos de síntese e adubos facilmente solúveis”* (AGROBIO, 2017). Atualmente, os produtos permitidos para o controlo do pedrado em Portugal neste modo de produção são à base de cobre e de enxofre (Silva *et al.*, 2012), ambos de contacto com ação preventiva. No entanto, estes produtos podem ser fitotóxicos dependendo da variedade e estado vegetativo da planta, das condições ambientais, da formulação e dose do produto, temperatura e tempo de aplicação. Além disso, a acumulação destes produtos no solo tem efeitos adversos nos microrganismos decompositores e para a própria planta e alguns mamíferos (Jamar, 2011), sendo o uso de tratamentos à base de cobre nos frutos proibido em alguns países (Belete e Boyraz, 2017). Assim, torna-se necessário encontrar métodos eficazes no controlo do pedrado da macieira que permitam igualmente o seu controlo.

O uso de produtos naturais nomeadamente sais de bicarbonato de sódio e de potássio mostraram-se eficaz no controlo de *V. inaequalis in vitro* (Jamar, 2011), mas destacam-se também outras alternativas como o uso de organismos antagonistas (Köhl *et al.*, 2006), extratos de plantas (Gilliver, 1947; Thiesz *et al.*, 2007; Bengtsson *et al.*, 2009; Bálint *et al.*, 2014) e ainda óleos

essenciais (Nagy *et al.*, 2014). Embora o própolis seja usado há séculos pelas suas propriedades antimicrobianas, amplamente testadas em bactérias, leveduras e fungos associados a patogenicidades humanas, o seu uso na agricultura como antifúngico apenas recentemente tem captado alguma atenção (Quiroga *et al.*, 2006; Curifuta *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2016). Ainda assim, a eficácia de extratos de própolis foi já comprovada em diversas culturas, nomeadamente na do café (Pereira *et al.*, 2001, 2008), pepino (Robertson, 1990), feijoeiro comum (Pereira *et al.*, 2014), soja (Pereira *et al.*, 2017) e também curgete (Robertson, 1990), pelo que este produto natural terá potencial para o combate de outras doenças em outras espécies vegetais, nomeadamente, o pedrado da macieira.

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Potencial do extrato de própolis do Caramulo no combate do pedrado da macieira - ensaio de campo

2.2.1.1. Preparação do extrato

Para avaliar o potencial antifúngico do própolis contra o agente causal da doença do pedrado da macieira *in vivo*, preparou-se uma solução etanólica de própolis 10 % (p/v) com etOH₇₀, como descrito por Pereira e colaboradores (2014, 2017). A mistura foi mantida num jerrican à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, agitando-se diariamente, durante 7 dias. Para monitorização do processo extrativo, determinou-se o rendimento em extrato seco, retirando-se três alíquotas de 3 ml cada após 3, 4 e 6 dias de maceração. Tendo-se verificado manutenção do rendimento nas 3 amostragens, ao 7º dia a mistura foi filtrada com papel de filtro e ajuda de uma bomba vácuo (600 milibar), mantendo-se o filtrado (Cr18.EEf₇₀) a 4 °C até ser utilizado. Para avaliação do rendimento, retirou-se uma alíquota de 3 ml imediatamente após filtração, tendo-se liofilizando todas as amostras durante 4 dias (Bioblock Scientific Christ Alpha 2-4 LD Plus), após evaporação do solvente.

2.2.1.2. Material biológico e desenho experimental

Para este ensaio utilizaram-se macieiras da variedade Gala, bastante suscetível ao pedrado. As árvores provenientes de viveiro (Viveiros Albertino Carvalho e Filhos Lda., Miranda do Corvo), com 2 anos e cerca de 2 metros de altura, foram plantadas com um compasso de 1,3 x 1 m, nas hortas comunitárias da Universidade do Minho (Braga, Portugal), no dia 15 de fevereiro de 2020.

Os talhões, com 13 a 16 m², estavam situados numa encosta com orientação este-oeste e exposição a sul, sem historial de infeção conhecido. O terreno foi limpo e mobilizado para receber as árvores, agrupadas em 3 blocos de 10 árvores cada (Figura 9). Cada bloco foi alocado a um tratamento/controlo - (15) tratamento com própolis (PRP), (21) tratamento com enxofre (ENX) e (25) tratamento com etanol a 35 % (ETN) - e o espaçamento entre eles teve em consideração a minimização do risco de transmissão de inóculo entre os mesmos e da dispersão pelo vento dos produtos a aplicar.

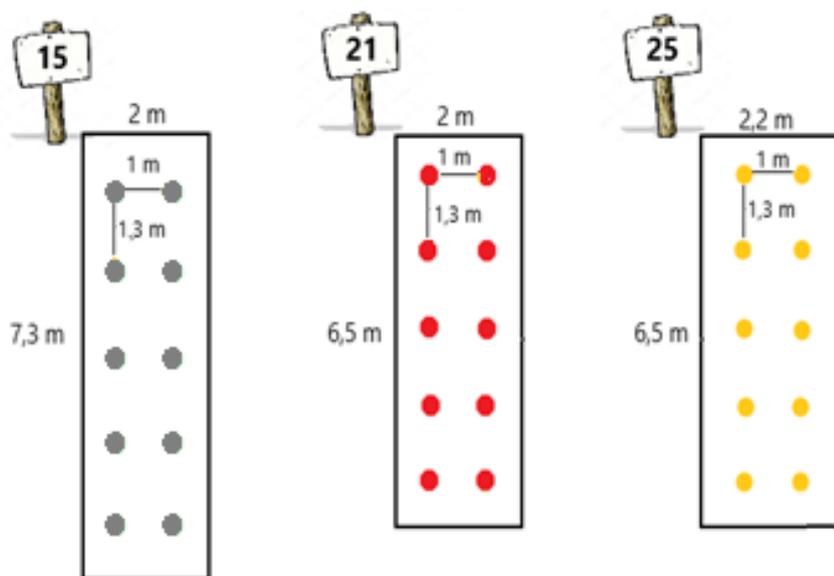


Figura 9 - Desenho experimental do ensaio conduzido no campo com as dimensões dos diferentes talhões referentes às modalidades aplicadas: tratamento com Cr18.EEf₇₀ 5 % (15), tratamento com enxofre (21) e controlo com etanol a 35 % (v/v) (25).

2.2.1.3. Avaliação da atividade antifúngica

O potencial antifúngico de Cr18.EEf₇₀ contra *V. inaequalis* foi avaliado à escala de campo, *in situ*, através da aplicação do tratamento com uma concentração de 5 % (v/v) do extrato Cr18.EEf₇₀, obtido por diluição com água corrente (1:1), antes de cada aplicação. A concentração escolhida teve em consideração as referidas na literatura (Pereira *et al.*, 2014). Como controlo positivo usou-se calda de enxofre (Stulln® WG Advance SAPEC, 4 g/L) e, como controlo negativo, o solvente, diluído na mesma proporção (etanol a 35 %).

As aplicações foram feitas com base nos períodos de risco de infeção determinados segundo os critérios de Mills (Anexo 2), através dos dados meteorológicos de estações próximas dos locais de ensaio (Merelim, Braga), nomeadamente temperaturas máxima, mínima e média, precipitação

e tempo de folha molhada. O primeiro tratamento foi feito a 16 de março - após ocorrência da primeira chuva desde o abrolhamento dos gomos, a 15 de março - com a aplicação de 550 ml de cada solução (quantidade determinada previamente, tendo em consideração o estado vegetativo das árvores), pulverizados de forma uniforme por todas as árvores do respetivo bloco, com um pulverizador manual, por forma a garantir o máximo controlo da aplicação e evitar desperdício de produto. A partir daqui, considerou-se importante tratar sempre que o risco de infeção fosse acentuado. Infelizmente, após a primeira aplicação, não foi possível dar continuidade ao trabalho dada a instalação da pandemia provocada pelo vírus SARS-CoV-2 e a entrada em confinamento, mas as suas datas serão discutidas na secção seguinte. Ainda assim, a avaliação da incidência da doença foi feita em termos da percentagem de folhas com lesões de pedrado relativamente às totais em cada árvore.

Para a avaliação do efeito do extrato de própolis no crescimento de *V. inaequalis* em condições *in vitro* começou por se analisar e otimizar as condições de crescimento do fungo. Para tal, repicou-se uma cultura de *V. inaequalis* (isolado 4710 de *Malus x domestica* da coleção CRA-W), cedido gentilmente por Anne Chandelier do Walloon Agricultural Research Center, na Bélgica. Para tal, retirou-se, com o cabo de uma pipeta de *Pasteur* de vidro, um disco de micélio da parte mais externa da cultura e transferindo-o para o centro de uma nova placa com meio PDA (do inglês *Potato Dextrose Agar*) (VWR Chemicals) ou extrato de malte (Panreac Applichem). Fizeram-se 2 réplicas e as placas foram incubadas a 24 °C ou à temperatura ambiente, no escuro, observando-se o crescimento do micélio fúngico nas semanas seguintes. Apesar da tentativa de repicagem em diferentes meios e condições de temperatura, não foi possível obter um crescimento satisfatório do fungo em tempo útil a esta dissertação, pelo que a atividade antifúngica do própolis contra *V. inaequalis in vitro* não foi realizada.

2.2.2. Análise estatística

Foram usadas 10 réplicas (n=10) de cada condição no ensaio de campo e os resultados apresentados como a média \pm desvio padrão (DP). A análise estatística dos resultados foi feita através da análise de variância *One-way* ANOVA, realizada com o programa GraphPad Prism Software v5.04 (GraphPad Software, California, USA), seguida do pós-teste Tukey. A notação relativa à significância estatística dos resultados dos testes realizados foi: ns - não significativo ($p > 0,05$), * - significativo ($0,01 < p \leq 0,05$), ** - muito significativo ($0,001 < p \leq 0,01$) e *** - altamente significativo ($p \leq 0,001$).

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Tratamento do pedrado da macieira com própolis do Caramulo: uma primeira avaliação

O rendimento de extração depois de 3, 4 e 6 dias de maceração e imediatamente após filtração foi de 92,6, 87,6, 86,5 e 89,4 %, respetivamente, podendo concluir-se que a filtração poderia ser realizada após 3 - 4 dias de maceração com agitação, uma vez que, desde então, o rendimento foi semelhante.

Apesar de não poderem ter sido realizados mais tratamentos além do primeiro devido ao confinamento que adveio com a pandemia COVID-19, através dos dados meteorológicos relativos ao período compreendido entre 15 de março e 16 de junho, nos dias em que ocorreu precipitação (Tabela 6), foi possível avaliar o risco de infeção e assim prever as possíveis datas de tratamento tendo em consideração o risco de infeção avaliado segundo os critérios de Mills (Anexo 2). Para máxima proteção, os tratamentos deveriam também respeitar o intervalo máximo de 10 dias, correspondente ao tempo de persistência do enxofre. No caso de previsão ou ocorrência de chuva, a aplicação deveria ser feita idealmente antes ou logo após o período de precipitação, respetivamente, acautelando ainda que após a aplicação se cumprissem pelo menos 24 horas sem chuva para evitar lavagem do produto (Tavares, 2016). Assim, e com base nos critérios mencionados, teriam sido necessários pelo menos 12 tratamentos para controlo da doença (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados meteorológicos da estação de Merelim (Braga) cedidos pela Estação de Avisos de Entre Douro e Minho - Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte (DRAPN), respetivo risco de infeção segundo os critérios de Mills (Anexo 2) e datas previstas de aplicação de tratamentos.

Data	Temperatura (°C)			Precipitação (mm)	Tempo de folha molhada (h)	Risco de infeção	Aplicação de Cr18.EEf.º
	Mín.	Méd.	Máx.				
15/03	3	7,3	14	4,3	15,25	Leve	16/03
20/03	10,9	12,3	15,6	16,2	21	Acentuado	
21/03	9,5	12	15,2	7,4	17,25	Moderado	22/03
31/03	5,3	8,4	11,6	5,4	4	Leve	2/04
05/04	12,4	14,8	16,8	20,6	16,5	Moderado-Acentuado	
06/04	11,6	14,1	17,8	4,1	14,5	Acentuado	
07/04	13,2	16,5	21,4	7,2	7,25	Acentuado	
09/04	14,5	15,2	16,8	20	24	Acentuado	
10/04	13,1	15	18,2	5,5	12,75	Acentuado	12/04
13/04	7,9	11,4	17,6	4	3	Leve	
15/04	11,7	14,3	17,7	4,3	5,5	Leve	
16/04	11	13,5	16,7	17,8	8,75	Leve	
17/04	8,6	12,4	16,2	5,6	11,25	Leve	18/04
20/04	9,4	12	17,2	10,6	18,75	Moderado -Acentuado	26/04
27/04	10,3	13,3	17,7	3,4	10,25	Leve	
29/04	12,7	14	16,9	10	9,5	Leve	
30/04	12,7	14,9	17,2	7	9,5	Leve	
01/05	14,9	16,3	18,4	14,5	23,25	Acentuado	02/05
04/05	13,4	17,1	20,2	5,5	12	Moderado	
11/05	12,6	16,5	24,9	10,6	9,5	Leve	12/05
14/05	11,3	14,5	18,3	6,8	6	Leve	22/05 01/06 09/06
11/06	12,5	15	20,1	2,9	5,75	Leve	
12/06	11,6	14,5	19	10,4	10,5	Leve - Moderado	
13/06	10,8	16	21,9	2	9,5	Leve - Moderado	
14/06	10,5	15,1	21,1	1	8,75	Leve	15/06

2.3.2. Própolis do Caramulo e o pedrado da macieira: potencialidades e desafios

Apesar de não ter sido possível dar continuidade ao ensaio, foi feita uma amostragem, a 14 de maio de 2020, contando as folhas com sintomas de pedrado em cada um dos talhões em relação às saudáveis, calculando-se posteriormente a percentagem de folhas afetadas (Tabela 7).

Tabela 7 - Percentagem (%) de folhas com sintomas de pedrado em cada uma das condições experimentais: Cr18.EEf_o 5% (15), enxofre (21) e etanol a 35 % (25). Os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n=10), não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p > 0,05$).

Data	Talhão		
	15 (PRP)	21 (ENX)	25 (ETN)
14/05/2020	3,56 \pm 2,39	3,55 \pm 2,24	2,61 \pm 1,41

Em todos os talhões foram observadas percentagens de afetação semelhantes e, ainda que no talhão 25 (ETN) a quantidade de folhas com lesões seja ligeiramente inferior, os valores não são estatisticamente diferentes (Tabela 7). Observaram-se vários níveis de lesões de pedrado, nomeadamente com esporulação abundante (Figura 10A), lesões cloróticas com esporulação (Figura 10B) e necrose (Figura 10C). Apesar de serem as folhas mais jovens as mais suscetíveis a *V. inaequalis* (Jamar, 2011), neste caso, as folhas mais afetadas foram, na sua maioria, as mais velhas e as que se encontram mais baixo na canópia, embora se tenham verificado, pontualmente, lesões em folhas mais superiores e mais jovens. No entanto, importa ter em consideração a tenacidade das árvores em estudo, em que tal resistência pode não se verificar neste caso.

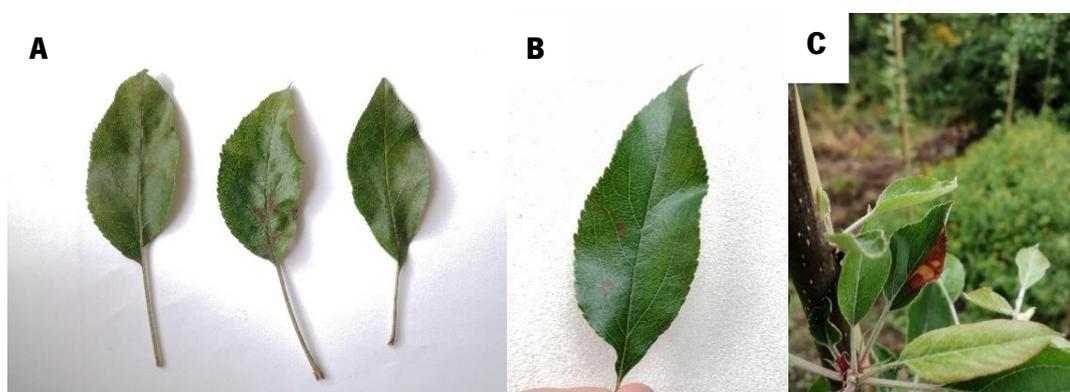


Figura 10 - Sintomas de pedrado observados em folhas: esporulação abundante (A), lesões cloróticas com esporulação (B) e necrose (C).

A maior ou menor intensidade de infecção pode dever-se a diversos fatores, nomeadamente o tipo e a quantidade de plantas infestantes que se desenvolveram devido à impossibilidade de manutenção, consideravelmente menos no talhão 25 (ETN), e que poderão ter influenciado os resultados obtidos, uma vez que, ao criar um microclima em redor das árvores, estas plantas poderão ter contribuído para o desenvolvimento de microrganismos (Belete e Boyraz, 2017; Majeed *et al.*, 2017), para além do aumento da competição por água e nutrientes, já que a densidade das raízes das macieiras era, nesta fase do seu desenvolvimento, menor, comprometendo assim o desempenho do pomar ao nível do crescimento e rendimento (Miñarro, 2012; Atay *et al.*, 2017). Tal observação, aliada às ligeiras diferenças de exposição e/ou do próprio desenvolvimento de cada árvore, pode explicar também a falta de homogeneidade de estados fenológicos entre talhões e dentro do mesmo.

Para além das lesões provocadas por *V. inaequalis*, verificaram-se lesões provocadas por outros agentes, nomeadamente *Botryosphaeria obtusa*, agente causal da *Black rot* (Figura 11A) e algum enrolamento devido à presença de uma grande quantidade de piolho verde (Figura 11B) em todos os talhões, mas especialmente nos 15 (PRP) e 21 (ENX). A forte presença deste agente poderá explicar também a não existência de frutos em crescimento, ao contrário do que seria de esperar em meados de maio, uma vez que pode conduzir ao abortamento dos ovários das flores e, conseqüentemente, à falta de vingamento.

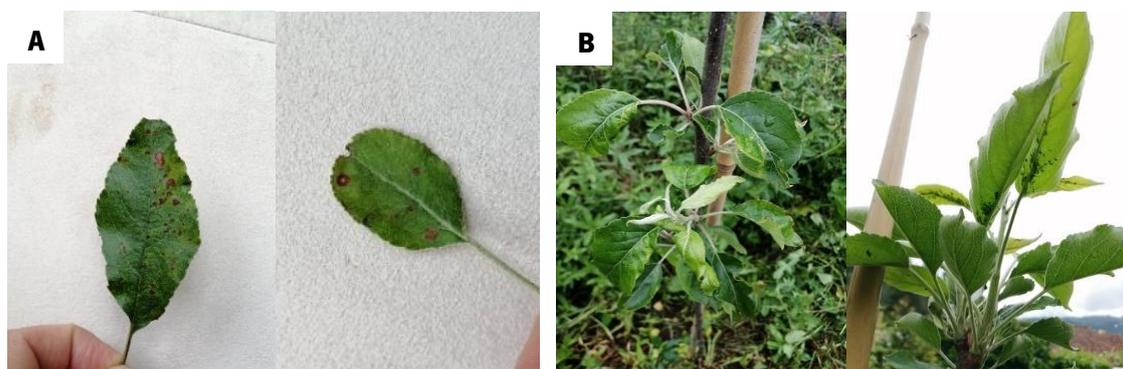


Figura 11 - Folhas de macieira com sintomas de *Black rot* (A) e ataque de piolho verde (B).

Nos talhões 15 (PRP) e 21 (ENX) observaram-se algumas folhas com sintomas daquilo que poderá ser alguma fitotoxicidade (Figura 12). Embora pouco provável, dado o último tratamento ter sido realizado ainda em ponta verde e as folhas em questão estarem já maiores e desenvolvidas corretamente, esta hipótese não deve ser descartada e mais estudos teriam de ser realizados em condições controladas para análise da fitotoxicidade de Cr18.EEf₇₀ em folhas de macieira.



Figura 12 - Folhas com sintomas de aparente fitotoxicidade de Cr18.EEf₇₀.

Recorde-se que o controlo da doença do pedrado da macieira passa pela prevenção das infeções primárias, sendo aconselhado iniciar os tratamentos no início/ meados de março e fazê-lo semanalmente ou de 10 em 10 dias, consoante a persistência dos produtos usados e das condições meteorológicas. Dado ter sido realizado apenas um tratamento, a 16 de março, não é possível saber com precisão se as lesões observadas se devem a infeções ocorridas no período de ação prevista do tratamento ou posteriormente, por falta de mais aplicações, ou seja, não existem dados suficientes para aferir sobre a eficácia ou não do extrato de própolis na prevenção das infeções de *V. inaequalis*. Não obstante, extratos de própolis já demonstraram ser eficazes no controlo de fungos fitopatogénicos em várias culturas, nomeadamente na da soja, onde se comprovou a redução da doença provocada por *Corynespora cassiicola*, aumentando a produtividade de grãos até 23 % e o teor de água nos tecidos foliares das plantas (Pereira *et al.*, 2017). Também em feijoeiro comum se verificou a redução da severidade da antracnose provocada por *Coletothichum lindemuntianum* em cerca de 63 % com um extrato etanólico de própolis a 4 %, a par de um aumento de 33 % na produtividade (Pereira *et al.*, 2014). Os efeitos dos extratos de própolis poderão ser otimizados através da utilização de concentrações mais elevadas, adição de colantes para garantir adesão dos produtos aplicados e/ ou aplicações mais frequentes do mesmo.

A maioria das variedades comerciais de macieiras são suscetíveis à doença (Anónimo, 2015) e as mais resistentes são, normalmente, associadas a uma produtividade menor, fruta com qualidade inferior e pior desempenho durante o armazenamento e, conseqüentemente, fraca aceitação do mercado (Majeed *et al.*, 2017). A variedade de macieiras selecionada para este

ensaio, Gala, é das mais sensíveis ao pedrado da macieira e, apesar de ainda não ser totalmente claro o que determina a maior ou menor resistência de certas variedades, sabe-se que a componente genética e a presença de determinados genes assumem um papel muito importante em diversos mecanismos de defesa contra *V. inaequalis* (Williams e Kuc, 1969; Cova *et al.*, 2017).

Desde há muito tempo que se postula também o envolvimento dos compostos fenólicos na defesa das macieiras contra o agente causal desta doença, tendo vindo a ser desenvolvidos vários trabalhos neste sentido (Hunter, 1975; Treutter e Feucht 1990a, b; Picinelli *et al.*, 1995; Mayr *et al.*, 1997; Rühmann *et al.*, 2002; Leser e Treutter 2005).

Os compostos fenólicos estão presentes em diferentes partes das plantas (raízes, ramos, gomos, folhas, pólen, entre outros) e são conhecidos os seus inúmeros benefícios, intervindo na sua resistência a vários agentes de stresse biótico e abiótico (Petkovšek *et al.*, 2009a). Enquanto as enzimas produzidas por *V. inaequalis* que degradam as paredes celulares são tidas como fatores de virulência, os compostos fenólicos da planta hospedeira parecem estar envolvidos na defesa contra este fungo (Golba *et al.*, 2012). Ainda que este processo não esteja totalmente compreendido, pensa-se que, para além de poderem ser também depositados na parede celular e atuar como barreira à entrada dos fungos, o mecanismo de defesa envolve uma rápida acumulação de polifenóis no local de infeção como resposta pós-infeção, atrasando o crescimento do fungo, uma vez que, ao reagirem com proteínas, causam a perda de função das enzimas por ele produzidas, comprometendo o seu desenvolvimento (Petkovšek *et al.*, 2011; Golba *et al.*, 2012).

Após a infeção por *V. inaequalis* observa-se uma alteração do metabolismo dos compostos fenólicos, aumentando a sua síntese nos locais afetados (Petkovšek *et al.*, 2009b), numa quantidade 10 a 20 % superior à das folhas saudáveis (Petkovšek *et al.*, 2011), principalmente de ácido clorogénico, catequina, epicatequina, rutina e quercitrina (Petkovšek *et al.*, 2009b; Slatnar *et al.*, 2010), florizina e os ácidos cafeico e *p*-cumárico (Petkovšek *et al.*, 2009a). Williams e Kuc (1969) verificaram que os ácidos cinâmico e *o*-cumárico e seus ésteres inibiram o crescimento e a esporulação de *V. inaequalis in vitro*, para além de reduzirem o número de lesões nas folhas de macieira. No tecido e ao redor da zona afetada, assiste-se também a uma acumulação de compostos fenólicos, confirmando a sua importância na resposta do hospedeiro à infeção (Petkovšek *et al.*, 2009c). Estas diferenças nos teores de compostos fenólicos são visíveis entre variedades suscetíveis e resistentes à doença, estando em maior quantidade nestas últimas (Petkovšek *et al.*, 2009a, b; Aric *et al.*, 2014). Porém, não é ainda claro se os compostos fenólicos

assumem efetivamente um papel na defesa da planta contra este agente patogénico ou se a sua acumulação reflete apenas a capacidade de o tecido produzir grandes quantidades destes compostos (Treutter 2001). Não obstante, a inibição da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) levou a uma severa diminuição da esporulação, indicando que a biossíntese de fenóis assume um papel relevante na resistência do hospedeiro (Mayr *et al.*, 1997). Segundo alguns autores, no que diz respeito à defesa contra *V. inaequalis*, parece ser a velocidade de síntese de compostos fenólicos o mais importante, pelo que, para que o mecanismo de inibição de enzimas fúngicas pelos compostos fenólicos seja relevante na defesa contra este agente nos tecidos, terá de existir uma grande disponibilidade dos compostos em questão para que a resposta inibitória não seja apenas a curto-prazo (Mayr *et al.*, 1997; Golba *et al.*, 2012). O conteúdo dos tecidos nestes compostos e, conseqüentemente, o seu potencial de síntese, são influenciados pelas características do pomar e medidas culturais aplicadas (Mayr *et al.*, 1997), sendo que, por exemplo, uma nutrição rica em azoto aumenta a suscetibilidade à doença, por reduzir a acumulação de flavonoides nas folhas (Rühmann *et al.*, 2002; Leser e Treutter 2005).

O extrato de própolis, conhecido pelas suas inúmeras bioatividades, nomeadamente a antimicrobiana, é rico em compostos fenólicos, como ácidos fenólicos (cafeico, *p*-cumárico e ferúlico) e flavonoides (apigenina, pinocembrina, galangina, crisina, entre outros) (Falcão *et al.*, 2010), sugerindo que este produto pode ter um efeito benéfico na proteção da macieira contra *V. inaequalis*. Embora o extrato utilizado neste ensaio, Cr18.EEf₇₀, não tenha sido avaliado quanto ao teor de compostos fenólicos, a riqueza do extrato seco (Cr18.EE₇₀) sugere que esta classe de compostos possa também estar presente em quantidade no extrato em questão. Ainda, este produto poderá também atuar na defesa contra o agente patogénico ao criar uma camada protetora, tal como descrito pelo grupo de Pereira (2008), que afirma que a aplicação foliar de um EE de própolis contribui para a formação de uma camada que dificulta a entrada e esporulação de fungos, por ação de compostos antifúngicos. Kirkham (1954, citado por Williams e Kuc, 1969), mostrou que fenóis solúveis em água extraídos de maçã reduziram o número de lesões em folhas de macieira onde tal fração fenólica tinha sido aplicada, sugerindo que estes podem inibir o crescimento e a esporulação de *V. inaequalis*. Contudo, mais estudos teriam de ser feitos, tais como a análise HPLC para identificação dos compostos presentes em Cr18.EEf₇₀ e análise do seu teor nas folhas antes e após aplicação do extrato de própolis.

3. Potencial antifúngico do própolis do Caramulo no controlo de doenças pós-colheita da maçã

3.1. Introdução

O período pós-colheita de um fruto começa quando é separado da planta e estende-se até que é consumido. Esta fase é uma das mais críticas do processo produção-comercialização, uma vez que define a qualidade e a capacidade de conservação dos frutos (Passos, 2014).

Após a colheita, os frutos são normalmente armazenados por longos períodos em câmaras frigoríficas de atmosfera controlada, onde a temperatura, oxigénio e dióxido de carbono são mantidos a níveis específicos. Este armazenamento permite aos consumidores obterem fruta de qualidade durante todo o ano, para além de dar, a quem a comercializa, a oportunidade de vender consoante a necessidade do mercado (Jurick *et al.*, 2017). No entanto, para além de possuírem uma textura facilmente danificável, os frutos são, na sua maioria, altamente perecíveis, por apresentarem taxas respiratórias elevadas assim como teores também elevados de nutrientes e humidade, constituindo substratos favoráveis à multiplicação microbiana (Passos, 2014), condição que se agrava ao longo do seu amadurecimento (Jurick *et al.*, 2017).

As doenças que surgem durante a conservação dos frutos são um dos principais constrangimentos à sua comercialização e consumo, com repercussões económicas bastante negativas. Com efeito, estimam-se perdas que podem ultrapassar 25 % da produção total, ou até atingir 50 %, no caso de países em desenvolvimento onde a refrigeração dos frutos não é possível (Marin *et al.*, 2017). Estas perdas resultam da deterioração completa ou parcial do produto, em consequência da perda de massa e/ou de alterações nas características físicas, químicas e sensoriais, afetando a sua qualidade e reduzindo drasticamente o seu período de armazenamento e comercialização, para além da aceitação do consumidor (Passos, 2014; Gong *et al.*, 2019). A sua maioria deve-se a podridões, causadas por fungos patogénicos (Lara e Barreiro, 2012), um problema crescente e que leva a 70 a 80 % das perdas económicas nas culturas agrícolas (Moore *et al.*, 2019), sendo estes microrganismos também os principais responsáveis pelas doenças pós-colheita em pomóideas (Filonow, 2004). Embora algumas destas perdas possam advir de doenças desenvolvidas no campo, a infeção dos frutos por fungos ocorre, geralmente, através de ferimentos causados pelo manuseamento inadequado dos frutos e que servem como porta de entrada aos microrganismos, propiciando o desenvolvimento de podridões (Filonow, 2004; Passos, 2014) e prejudicando, assim, a sua qualidade. Paralelamente, a decomposição por fungos após a colheita,

tem efeitos negativos não só ao nível da aparência e qualidade nutricional dos frutos, mas também para a saúde dos consumidores pela presença de toxinas produzidas pelos microrganismos (Errampalli, 2014).

3.1.1. Doenças pós-colheita na cultura da maçã

As principais doenças que afetam a cultura da maçã após a colheita são podridões causadas por fungos, nomeadamente pelas espécies *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* (Filonow, 2004; Lara e Barreiro, 2012), responsáveis pela podridão cinzenta e pela podridão do bolor azul, respetivamente, as quais serão abordadas nesta secção.

Podridão cinzenta

A podridão cinzenta é causada por *Botrytis cinerea* Pers. (Choquer *et al.*, 2007). Esta é a espécie mais estudada e também a mais comum de *Botrytis*, um género de fungos do filo Ascomycota com cerca de 28 espécies fitopatogénicas que infetam mais de 1400 espécies de plantas (Abbey *et al.*, 2018). *B. cinerea* afeta mais de 170 famílias de plantas de importância agronómica levando a severas perdas pré e pós-colheita que podem oscilar, a nível mundial, entre 9 e 90 mil milhões de euros anualmente (Abbey *et al.*, 2018). Este fungo é considerado o segundo agente fitopatogénico mais importante (Dean *et al.*, 2012) e um dos principais da cultura da maçã em todo o mundo (Jurick *et al.*, 2017).

B. cinerea infeta várias partes das plantas (caules, flores, frutos, folhas e sementes) em diferentes estados de desenvolvimento (desde a germinação até ao seu amadurecimento), sabendo-se, no entanto, que são os tecidos maduros e senescentes os mais suscetíveis (Abbey *et al.*, 2018). *B. cinerea* é um patógeno necrotrófico que se desenvolve tanto à temperatura ambiente na superfície das plantas nos pomares, como em condições de refrigeração nos frutos (Sanhueza, 2004); e, mesmo quando um fruto é colhido aparentemente saudável, este fungo pode causar graves danos durante o seu transporte e armazenamento (Abbey *et al.*, 2018). A entrada no hospedeiro é facilitada pela existência de feridas ou aberturas naturais, embora *B. cinerea* possa penetrar também em tecidos intactos (Abbey *et al.*, 2018).

A grande variedade de sintomas em diferentes órgãos e hospedeiros sugere que *B. cinerea* possui um “arsenal de armas” para atacar as plantas, embora existam algumas diferenças no quadro de sintomas entre estirpes (Choquer *et al.*, 2007). Geralmente, a podridão causada por *B. cinerea* é irregular, firme, seca e profunda (Figura 13A), apresentando, a epiderme e polpa dos

frutos infetados, cor inicialmente clara, mas que escurece com o tempo (Sanhueza, 2004). A olho nu é possível observar uma massa cinzenta de conídios, com zonas de aspeto pulverulento (Figura 13B), que facilmente se dispersam causando infeções secundárias (Abbey *et al.*, 2018), uma vez que um fruto não pode ser infetado somente pelo contacto com outro infetado, unindo-se pelo micélio e formando “ninhos” de podridão (Figura 13C) (Sanhueza, 2004).

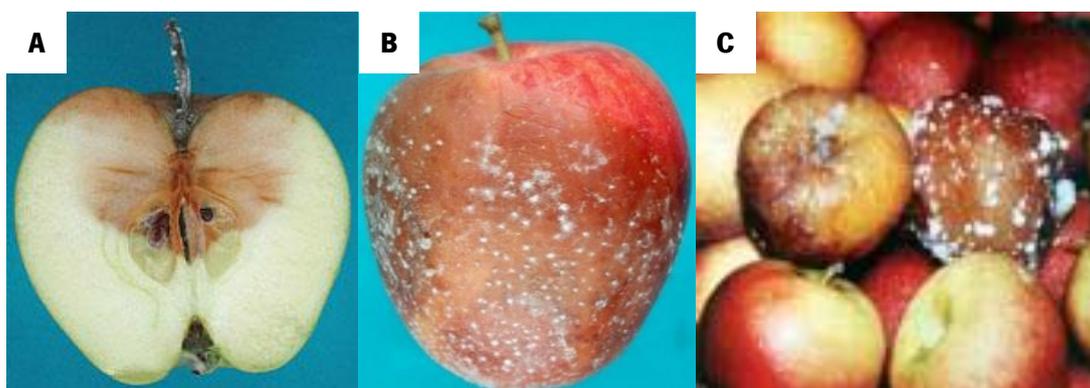


Figura 13 - Sintomas da infeção por *Botrytis cinerea* em maçãs: podridão na polpa (A); focos de esporulação (B); “ninhos” de podridão observados em condições de conservação (C) (adaptado de Sanhueza, 2004)

O facto de conseguir sobreviver em condições adversas, aliado à possibilidade de se tornar resistente aos fungicidas sintéticos tradicionalmente utilizados, faz de *B. cinerea* um fitopatogeno de alto risco. A melhor forma de o controlar é através da proteção integrada, que envolve medidas culturais que desfavoreçam o desenvolvimento do fungo (redução da folhagem, por exemplo), e pela aplicação de fungicidas sintéticos, sendo este o método mais usado e a única opção em alguns casos (Abbey *et al.*, 2018). Produtos à base de plantas, como extratos ou óleos essenciais, foram já testados e comprovada a sua eficácia no controlo de várias doenças fúngicas (Harish *et al.*, 2008; Abbey *et al.*, 2018; Diáñez *et al.*, 2018; Raveau *et al.*, 2020), embora o seu modo de ação ainda não esteja esclarecido. No entanto, estes produtos estão disponíveis em pequenas quantidades devido à dificuldade de purificação à escala comercial, para além da falta de métodos de extração padronizados, porventura ainda o maior obstáculo, pois a ausência de uniformização leva a resultados e eficácia variáveis (Abbey *et al.*, 2018).

Podridão do bolor azul

O agente causal da podridão do bolor azul é *Penicillium expansum* Link., um fungo amplamente distribuído, pertencente ao filo Ascomycota, e que ataca várias espécies de plantas (Errampalli, 2014), sendo uma das espécies mais agressivas e comuns do género *Penicillium* (Cheon *et al.*, 2016). Esta é uma das principais doenças pós-colheita da maçã, que representa 5

a 20 % de perdas em todo o mundo (Matny *et al.*, 2015). Além de provocar estragos diretos na fruta para consumo em fresco, *P. expansum* é também conhecido pela produção de micotoxinas, nomeadamente a patulina, uma substância altamente tóxica que pode provocar graves prejuízos na indústria de transformação, inviabilizando o consumo de produtos derivados de fruta contaminada com este fungo (Matny *et al.*, 2015).

A infeção por *P. expansum* inicia-se a partir de tecidos danificados nas maçãs e, embora a contaminação possa ocorrer no pomar, é mais comum após a colheita durante o armazenamento e transporte dos frutos, podendo ainda ocorrer em ambiente de comercialização. Apesar do armazenamento dos frutos em câmaras refrigeradas constituir um mecanismo de controlo das doenças pós-colheita, reduzindo o crescimento do patógeno pela inibição que o processo de conservação exerce quer sobre a maturação dos frutos, quer sobre o desenvolvimento do fungo (Sanhueza, 2004), *P. expansum* consegue sobreviver às temperaturas que são, por norma, usadas nessas instalações (entre -1,1 e 4 °C), dificultando o seu controlo (Errampalli, 2014). Os fatores que determinam a infeção por *P. expansum* são a existência de feridas na superfície dos frutos - uma vez que não produz apressórios e, por isso, não é capaz de penetrar na superfície dos frutos e vegetais - assim como a presença, no local do ferimento, de oxigénio, humidade e uma fonte de compostos orgânicos metabolizáveis ou secreções naturais do hospedeiro para que os esporos germinem. O grau de amadurecimento dos frutos é também um fator importante, uma vez que quanto mais maduros mais suscetíveis são a doenças pós-colheita, e este fungo afeta principalmente frutos climatéricos (Errampalli, 2014), isto é, aqueles que continuam a amadurecer depois de colhidos. Adicionalmente, a existência de infeção depende também das práticas e condições de armazenamento e, ainda, da suscetibilidade do hospedeiro (espécie e variedade, relacionada com a resistência da epiderme) sendo as variedades de maçã mais resistentes as Royal Gala, Red Delicious e Granny Smith, enquanto as mais suscetíveis são as Fuji, Jonagold, Jonathan e Golden Delicious (Errampalli, 2014).

Nos frutos, os sintomas aparecem primeiramente como lesões de coloração castanho-claro (tanto na epiderme como na polpa), moles, aguadas, profundas e com margens bem definidas (Sanhueza, 2004; Errampalli, 2014) (Figura 14). O desenvolvimento da infeção é rápido e, à medida que avança, aparecem conídios azuis-esverdeados e os frutos afetados possuem um odor bolorento e a terra (Errampalli, 2014).

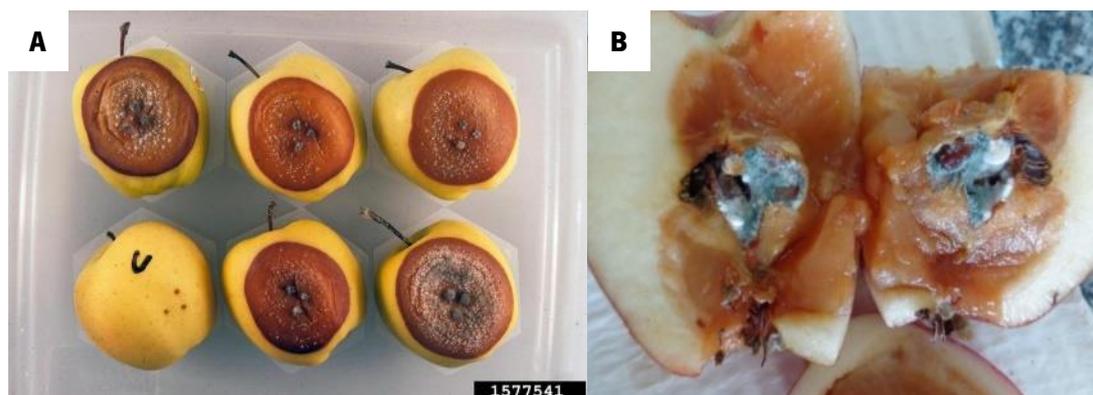


Figura 14 - Sintomas de uma infecção causada por *Penicillium expansum* em maçã, à superfície (A) e na polpa (B) (adaptado de Sanhueza, 2004).

Nas últimas décadas têm sido testados métodos não-fungicidas para controlar a podridão do bolor azul (Spotts e Chen, 1987 e Jonhson *et al.*, 1990, citados por Errampalli, 2014), mas nenhum tem conseguido garantir um controlo adequado da doença quando usado isoladamente, sendo ainda os tratamentos químicos os mais eficazes. No caso específico das maçãs, os frutos são mergulhados em fungicidas logo após a colheita e antes do armazenamento, podendo ser ainda pulverizados antes da embalagem (Errampalli, 2014).

3.1.2. Conservação pós-colheita

A conservação pós-colheita da fruta é feita, por norma, através do armazenamento em câmaras a baixas temperaturas, por permitirem a redução da velocidade dos processos fisiológicos e bioquímicos. Ainda assim, e embora o controlo das podridões que aparecem após a colheita possa ser conseguido usando métodos não químicos (carbonato e bicarbonatos de sódio, entre outros), são os fungicidas sintéticos os mais usados atualmente, aplicados quer no campo, quer após a colheita e durante o armazenamento, na forma de pulverização ou imersão (Lara e Barreiro, 2012; Marín *et al.*, 2017; Luciano-Rosario *et al.*, 2020), uma vez que o controlo químico garante melhores resultados e também mais rápidos, contribuindo para o aumento da produtividade e qualidade de diversas culturas (Marín *et al.*, 2017). Todavia, os vários problemas associados ao uso destes produtos (Aktar *et al.*, 2009; Lara e Barreiro, 2012; Marín *et al.*, 2017) tornam urgente uma mudança de atitude, incrementando a utilização de produtos de controlo sanitário mais ecológicos que substituam os compostos de síntese para salvaguarda da saúde humana, da preservação ambiental e para a valorização económica da indústria frutícola (Lara e Barreiro, 2012). As estratégias para redução das perdas de frutos ao longo de todo o processo de produção e comercialização são também importantes face ao aumento da necessidade de alimentos

decorrente do aumento da população mundial, por diminuírem a pressão para utilização de uma maior área para produção de alimentos e/ou regimes de produção intensivos (Errampalli, 2014). Neste sentido, a utilização do própolis como estratégia de controlo antifúngico após a colheita de fruta, nomeadamente da maçã, poderá mostrar-se vantajosa por permitir não só impedir e/ou controlar o aparecimento das doenças associadas ao pós-colheita desta cultura atuando como bioconservante em alternativa aos pesticidas (Matny *et al.*, 2015; Embaby *et al.*, 2019), como também reduzir a poluição causada pela dispersão destes compostos no ar, no solo e na água (Loebler *et al.*, 2018).

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Atividade antifúngica *in vitro* dos extratos de própolis do Caramulo

A atividade antifúngica de Cr18.EE e Cr18.EE₇₀ foi testada *in vitro* contra os fungos *Botrytis cinerea* (isolado de videira em 2018, Braga) e *Penicillium expansum* (isolado de cevada em 2018, Eslováquia), obtidos da coleção do Departamento de Biologia da Universidade do Minho. Ambas as estirpes foram repicadas, periodicamente, em meio PDA e mantidas a 24 °C até serem utilizadas.

3.2.1.1. Material biológico e preparação das suspensões de esporos

Antes de se iniciar cada ensaio de avaliação de atividade antifúngica, preparou-se uma suspensão de esporos de cada uma das espécies, obtidas a partir de culturas em meio PDA com 2 semanas, das quais se retirou um disco de micélio da parte mais externa com o cabo de uma pipeta de *Pasteur* de vidro para um tubo *ependorf*, adicionando-se 1 ml de solução de Tween-80 (Sigma-Aldrich) 0,25 % (v/v). Após agitação em vórtex, procedeu-se à contagem de esporos com o auxílio de uma câmara de *Neubauer*, ajustando-se a concentração de esporos de *B. cinerea* e *P. expansum* a 5×10^4 e 5×10^6 esporos/ml, respetivamente, com água desionizada estéril.

3.2.1.2. Ensaio *in vitro* para avaliação da atividade antifúngica

Prepararam-se placas de meio PDA com cada um dos extratos (Cr18.EE e Cr18.EE₇₀) por forma a obter concentrações de 500, 1000 e 2000 µg/ml, utilizando-se para o efeito uma única solução *stock* de 100 000 µg/ml de cada um dos extratos. Como controlos usaram-se placas apenas com meio de cultura e com cada um dos solventes (etanol absoluto ou etOH₇₀) num volume equivalente ao maior volume de extrato usado (2 ml), que é o procedimento *standard* usado no

nosso laboratório para este tipo de ensaios. No entanto, verificou-se que esta quantidade de etanol influenciou significativamente o crescimento de *P. expansum* pelo que se testou o efeito de várias concentrações do solvente (250, 500, 1000 e 2000 µg/ml) no crescimento deste fungo, tendo-se concluído que apenas a mais elevada tinha tal efeito, optando-se por usar um volume fixo e máximo de 1 ml de solvente. Para o novo ensaio antifúngico prepararam-se, então, três soluções *stock* de 50 000, 100 000 e 200 000 µg/ml de cada um dos extratos, por forma obter as concentrações a testar de 500, 1000 e 2000 µg/ml, utilizando 1 ml de cada.

Posteriormente, foi colocado, no centro de cada uma destas placas, um disco de papel (BBL™, 6 mm de diâmetro), sobre o qual se pipetaram 15 µl da suspensão de esporos de um dos fungos em estudo. A utilização do disco de papel permitiu evitar o alastramento da solução de esporos sobre o meio. Para cada fungo, fizeram-se 4 réplicas para cada concentração e controlos, utilizando-se suspensões de esporos frescas. Após inoculação, as placas foram incubadas no escuro, a 24 °C, e o crescimento do micélio calculado como a média de dois diâmetros perpendiculares medidos com régua (mm), diariamente, durante 25 dias. Os resultados foram expressos em percentagem (%) de inibição do crescimento (IC) relativamente ao respetivo controlo solvente, calculada através da *equação 6*.

$$\% \text{ IC} = \frac{\text{Diâmetro do micélio no controlo} - \text{Diâmetro do micélio no tratamento}}{\text{Diâmetro do micélio no controlo}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

3.2.2. Atividade antifúngica *in vivo* dos extratos de própolis do Caramulo – ensaio de armazenamento

3.2.2.1. Otimização do protocolo de infeção de maçãs e avaliação da patogenicidade

Inicialmente, começou por se estabelecer um protocolo de infeção de maçãs por *P. expansum* e *B. cinerea*, tendo por base o método descrito por Chen e colaboradores (2017).

As maçãs utilizadas neste ensaio, da variedade Golden Delicious, foram gentilmente cedidas pelo Engenheiro José Pereira e pela Engenheira Sofia Lopes, produtores de maçã das regiões de Lamego e Armamar, transportadas diretamente do campo e mantidas a 4 °C até serem utilizadas. Escolheram-se maçãs sem lesões aparentes, as quais foram desinfetadas mergulhando numa solução de hipoclorito de sódio (Panreac) 0,02 % (v/v) por 5 minutos, sendo posteriormente lavadas três vezes em água desionizada e deixadas secar ao ar. Depois, perfurou-se o exocarpo

em três pontos equidistantes da região equatorial ($3 \times 3 \text{ mm} = 21,2 \text{ mm}^3$), pipetando-se dentro dos ferimentos $8 \mu\text{l}$ de duas concentrações de esporos (5×10^4 e 5×10^6 esporos/ml), preparadas como descrito em 3.2.1.1, ou de água desionizada estéril, usada como controlo. Fizeram-se 5 réplicas (cada maçã é uma réplica com as 2 condições) e foram incubadas à temperatura ambiente, observando-se o desenvolvimento da lesão. Após 8 dias, a infeção *in vivo* foi conseguida apenas para *P. expansum*, pelo que o potencial antifúngico do extrato de própolis do Caramulo foi avaliado *in vivo* apenas contra este fungo.

3.2.2.2. Ensaio *in vivo* para determinação da atividade contra *P. expansum* em maçãs

Para este ensaio utilizou-se o extrato Cr18.EE₇₀ uma vez que, e apesar de ter sido menos ativo *in vitro* contra *P. expansum*, se trata do único compatível com aplicações alimentares, dadas as restrições quanto ao teor alcoólico máximo permitido de 70 % de acordo com o Ministério da Agricultura Brasileiro (2001). As concentrações escolhidas - 2,5, 5 e 10 % (correspondentes a 25, 50 e 100 mg/ml) - basearam-se em ensaios reportados na literatura (Özdemir *et al.*, 2010; Matny *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2016; Embaby *et al.*, 2019; Loebler *et al.*, 2020).

Depois de proceder como em cima descrito para desinfeção e preparação das maçãs, agora com 2 furos opostos no plano equatorial, pipetaram-se, em cada um, $20 \mu\text{l}$ de cada uma das concentrações de Cr18.EE₇₀ testadas ou dos controlos (água desionizada estéril e etOH₇₀). Após 1 hora, inoculou-se cada maçã adicionando $8 \mu\text{l}$ de suspensão de esporos de *P. expansum* (5×10^6 esporos/ml) ou água desionizada estéril, ao respetivo ferimento (Figura 15). As soluções foram preparadas de fresco antes do ensaio e utilizaram-se 5 réplicas por concentração e por controlo (cada maçã é uma réplica contendo 2 ferimentos: um com fungo (+) e outro com água (-), usado como controlo). Pela dificuldade de infeção e/ou elevada heterogeneidade entre réplicas, para os controlos foi necessário repetir o ensaio 3 vezes, calculando-se o diâmetro da lesão como a média obtida nos 3 ensaios.

Após tratamento, as maçãs foram colocadas em tabuleiros, afastadas umas das outras e na mesma posição, envolvendo-se o conjunto com película de plástico e armazenando à temperatura ambiente (aproximadamente $21 \text{ }^\circ\text{C}$). Dentro dos tabuleiros foram colocados algodões hidrófilos embebidos em água desionizada estéril, de modo a manter uma humidade relativa elevada (Embaby *et al.*, 2019). O diâmetro das lesões (mm) foi calculado como a média de dois diâmetros perpendiculares medidos diariamente durante 14 dias, avaliando-se também, no final deste

tempo, a profundidade da lesão em cada maçã. Os resultados foram expressos em percentagem (%) de redução do tamanho da lesão (RTL), face ao controlo, calculada através da equação 7:

$$\% \text{ RTL} = \frac{\text{Diâmetro da lesão no controlo} - \text{Diâmetro da lesão no tratamento}}{\text{Diâmetro do micélio no controlo}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

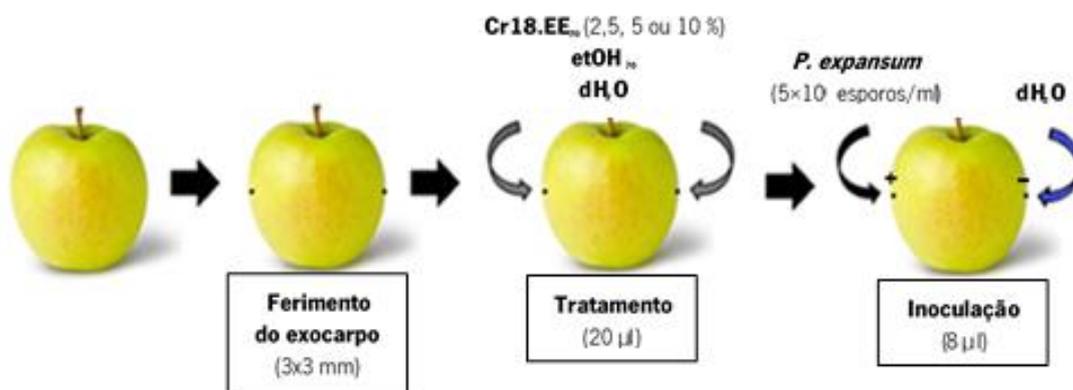


Figura 15 - Esquema ilustrativo dos procedimentos de preparação e inoculação das maçãs para avaliar a atividade de Cr18.EE₇₀ contra *P. expansum* (•: ferimento; +: ferimento inoculado com fungo; -: ferimento inoculado com água).

Optou-se por testar também, seguindo metodologia idêntica, a solução etanólica de própolis preparada para o ensaio de campo (Cr18.EE_{f70}), por forma a verificar se um extrato de mais fácil obtenção poderia exibir um efeito semelhante.

3.2.2.3. Avaliação da fitotoxicidade do extrato de própolis do Caramulo em maçãs

A fitotoxicidade de ambos extratos foi também avaliada, tendo-se realizado um ensaio semelhante ao anterior (Figura 15), mas onde os ferimentos não foram inoculados com suspensão de esporos, e comparando as lesões produzidas pela inoculação dos ferimentos com os extratos com os controlos inoculados com água desionizada estéril ou com o solvente (etOH₇₀). Foram feitas 5 réplicas (cada maçã é uma réplica) e a observação dos ferimentos foi feita diariamente, durante 14 dias.

3.2.3. Análise estatística

Salvo indicação em contrário, foram sempre preparadas 5 réplicas por condição testada (n=5), e os resultados apresentados como a média ± desvio padrão (DP) de um mínimo de 3 réplicas (n≥3). Os resultados obtidos foram analisados através da análise de variância *Two-way* ANOVA seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni com recurso ao programa GraphPad Prism Software v5.04 (GraphPad Software, California, USA). A notação relativa ao nível

de significância estatística dos resultados dos testes foi: ns - não significativo ($p > 0,05$), * - significativo ($0,01 < p \leq 0,05$), ** - muito significativo ($0,001 < p \leq 0,01$) e *** - altamente significativo ($p \leq 0,001$).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Os extratos de própolis do Caramulo possuem atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*

A atividade antifúngica de Cr18.EE e Cr18.EE₇₀ foi determinada *in vitro* através da avaliação do crescimento de *Botrytis cinerea* e de *Penicillium expansum* na presença de várias concentrações de cada extrato de própolis, comparando com o respetivo controlo de solvente e calculando as percentagens de inibição do crescimento do micélio dos microrganismos em questão (Figuras 16 a 19).

Embora o crescimento de *B. cinerea* seja semelhante ao fim de 25 dias na presença de ambos os extratos, para concentrações iguais (Figura 16), é notória uma maior sensibilidade deste fungo ao etanol absoluto (Figura 16B), quando comparado ao etOH₇₀ (Figura 16A), traduzindo-se em percentagens de inibição do crescimento do micélio superiores com Cr18.EE₇₀ (Figura 18A). Na presença deste extrato, e ao contrário do observado com Cr18.EE, verificou-se ainda a estabilização do crescimento do micélio ao fim de 20 dias em todas as concentrações testadas (Figura 16), condição que se mantém até 30 dias após inoculação. Após este tempo, registou-se, na presença de ambos os extratos, um aumento do crescimento (ainda que lento), acabando por alcançar os controlos ao fim de 40 dias (resultados não apresentados).

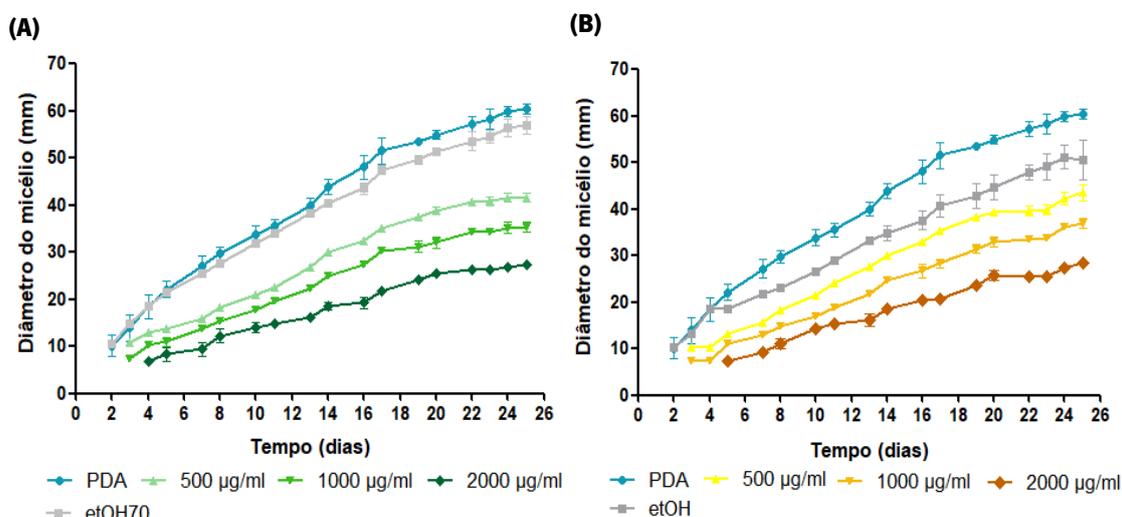


Figura 16 - Crescimento do micélio de *B. cinerea* ao longo do tempo na presença de Cr18.EE₇₀ (A) ou Cr18.EE (B), respetivos solventes e apenas em meio PDA. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

A inibição completa do crescimento do fungo nas primeiras 48 horas com ambos extratos nas três concentrações traduz o atraso induzido por estes no arranque do crescimento do fungo, condição que se mantém, para a maior concentração testada (2000 µg/ml), até aos 3º e 4º dias após inoculação na presença de Cr18.EE₇₀ e de Cr18.EE, respetivamente (Figura 17). O extrato que revelou maior atividade contra *B. cinerea* foi Cr18.EE₇₀, mantendo-se a inibição mais ou menos estável, a partir do 3º dia e até 25 dias após inoculação, entre os 50 e 60 % (Figura 17A). No caso de Cr18.EE, apenas a maior concentração permitiu mais de 50 % de inibição, contudo somente até ao 8º dia após inoculação (Figura 17B).

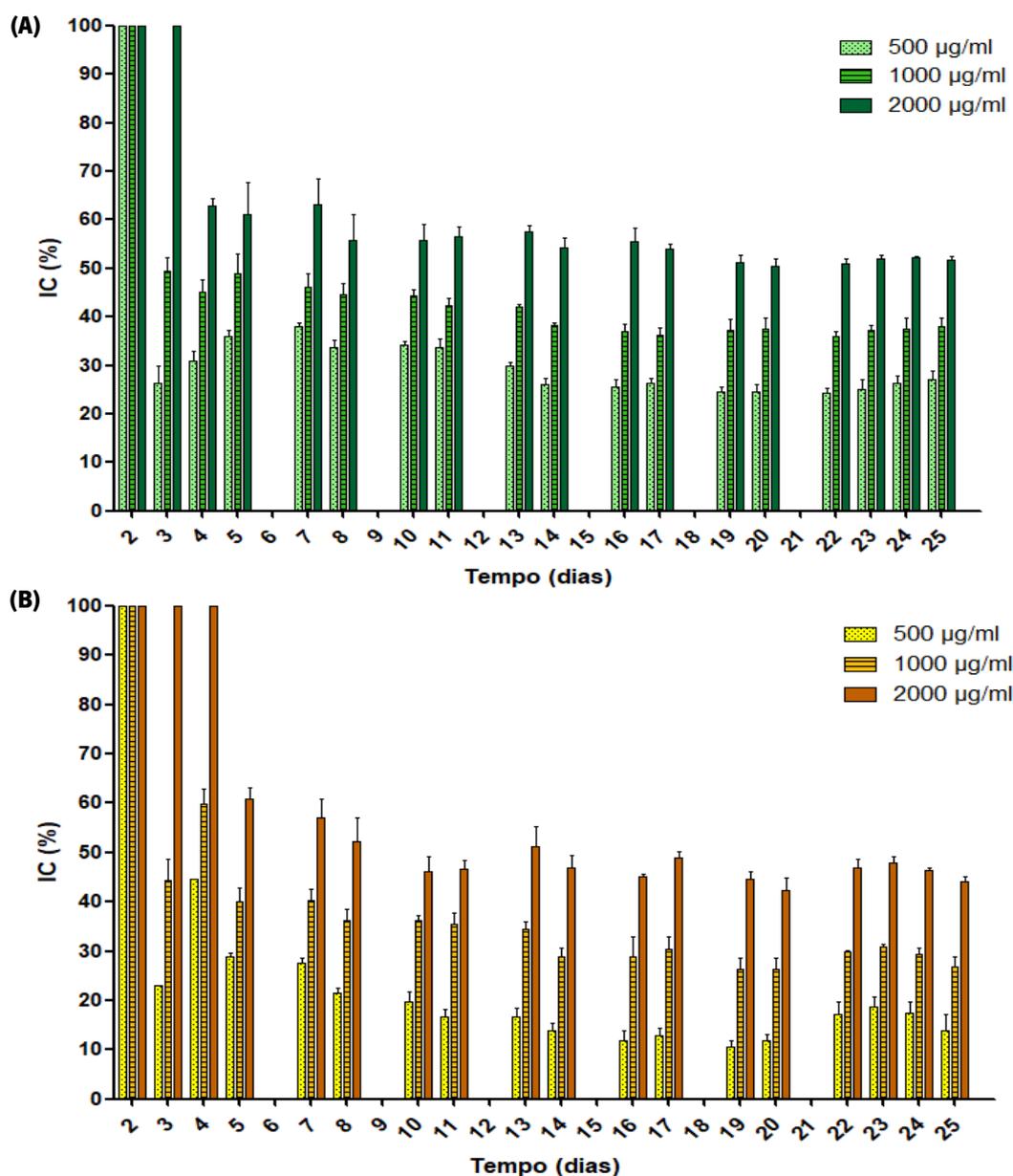


Figura 17 - Efeito inibitório de Cr18.EE₇₀ (A) e Cr18.EE (B) no crescimento de *B. cinerea* ao longo do tempo, em comparação com o controlo de solvente. Os valores são apresentados como a média ± desvio padrão (n=3), sendo que a diferença entre os valores de inibição de todas as concentrações é, todos os dias, altamente significativa (***) ($p \leq 0,001$), com exceção do dia 2, onde não é significativa (ns).

Na presença de ambos os extratos, os máximos de inibição aconteceram entre o 4^o e o 5^o dia, com valores de 45, 60 e 61 % para as concentrações de 500, 1000 e 2000 µg/ml de Cr18.EE, respetivamente, e de 36, 49 e 63 % para as mesmas concentrações de Cr18.EE₇₀ (Figura 17). Apesar das percentagens de inibição das duas concentrações mais baixas serem superiores em Cr18.EE, o seu valor decresceu substancialmente a partir do 5^o dia, o que não se verificou com Cr18.EE₇₀, uma vez que, para as concentrações de 500 e 1000 µg/ml, as percentagens de inibição permaneceram superiores a 25 e 40 %, respetivamente, durante os 25 dias (Figura 17A). Já no caso de Cr18.EE, existe maior variabilidade de inibição em todas as concentrações, mantendo-se esta, durante o mesmo período, acima dos 10, 25 e 40 % para 500, 1000 e 2000 µg/ml, respetivamente (Figura 17B), confirmando, mais uma vez, a menor eficácia deste extrato contra *B. cinerea*. Ainda assim, a concentração mais elevada de ambos extratos conduziu a percentagens de inibição do crescimento do micélio de *B. cinerea* consideráveis, na ordem dos 50 %.

De facto, a resistência de *B. cinerea* a extratos de própolis tem sido relatada (Quintero-Cerón *et al.*, 2014). Loebler e colaboradores (2018), testando um extrato de própolis (500 µg/ml) preparado com etanol a 70 %, verificaram uma redução de cerca de 75 % após 10 dias, um valor bastante superior ao encontrado com Cr18.EE₇₀ no mesmo período (34 %). Não obstante, o grupo de Moura (2016) verificou, quatro dias após tratamento com uma concentração bastante superior de EE de própolis brasileiro verde e castanho (2,5 %), reduções de crescimento semelhantes (43,23 e 38,53 %, respetivamente) às obtidas com a concentração mais elevada de Cr18.EE (2000 µg/ml) (46 %).

P. expansum mostrou-se mais resistente aos extratos de própolis que *B. cinerea* e também menos suscetível ao etanol absoluto (Figura 18). Por outro lado, e contrariamente ao verificado para *B. cinerea* (Figura 16), *P. expansum* apresentou um menor crescimento na presença das três concentrações testadas de Cr18.EE comparativamente a Cr18.EE₇₀ (Figura 18), não se registando a estabilização do crescimento ao fim de 25 dias em nenhuma das concentrações de qualquer um dos extratos.

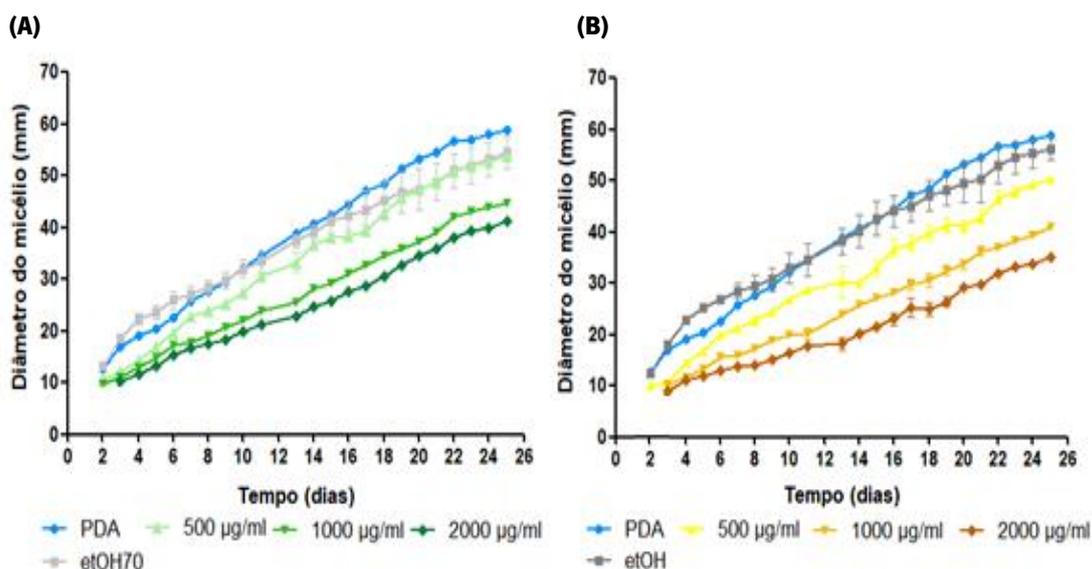


Figura 18 - Crescimento do micélio de *P. expansum* ao longo do tempo na presença de Cr18.EE₇₀ (A) ou Cr18.EE (B), respectivos solventes e apenas em meio PDA. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

Pela análise dos gráficos de inibição do crescimento (Figura 19), é clara esta maior atividade de Cr18.EE, o único extrato onde a inibição do crescimento de *P. expansum* ultrapassou os 50 %, mantendo-se assim até 14 dias após inoculação e sofrendo a partir daí uma redução. Na presença de Cr18.EE₇₀, a inibição permaneceu abaixo de 50 % depois de 2 dias e até 25 dias após inoculação. A inibição do arranque do crescimento do micélio de *P. expansum* apenas se verificou durante as primeiras 48 horas para a maior concentração de Cr18.EE₇₀ e nas concentrações de 1000 e 2000 µg/ml de Cr18.EE, com os máximos de inibição de crescimento alcançados entre o 3º e o 5º dia após inoculação para todas as concentrações testadas, sendo os valores de 41, 49 e 53 % para as concentrações de 500, 1000 e 2000 µg/ml de Cr18.EE (Figura 19B) e de 36, 42 e 48 % para as mesmas concentrações de Cr18.EE₇₀ (Figura 19A), respetivamente. Na menor concentração testada, a atividade de Cr18.EE₇₀ diminuiu até não conseguir inibir o crescimento de *P. expansum* após 17 dias, comprovando a menor eficácia deste extrato, mais baixa também quando comparada com a sua atividade contra *B. cinerea* (Figura 17).

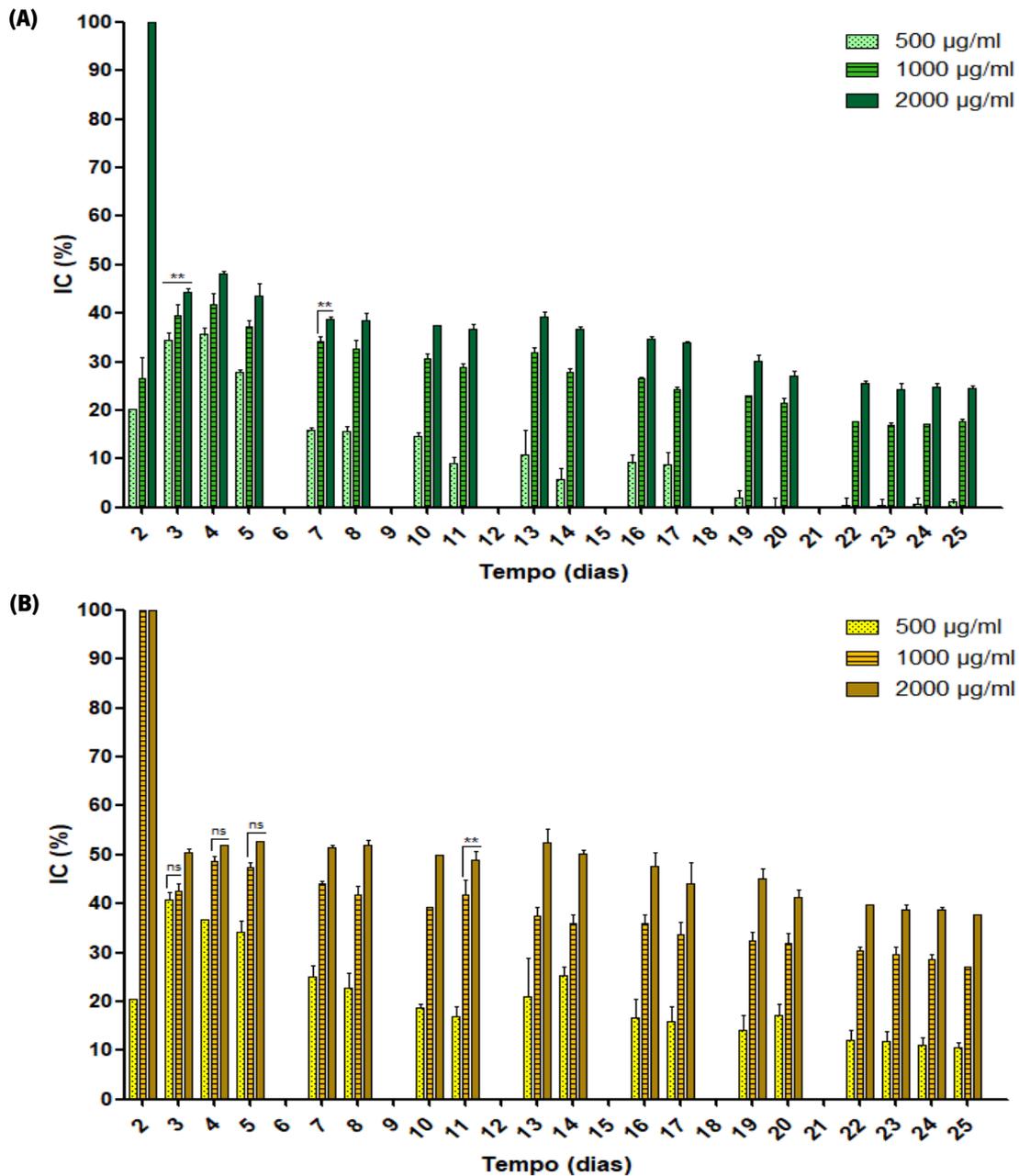


Figura 19 - Efeito inibitório de Cr18.EE₇₀ (A) e Cr18.EE (B) no crescimento de *P. expansum* ao longo do tempo, em comparação com o controle de solvente. Os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão ($n=3$), sendo que a diferença entre os valores de inibição de todas as concentrações é significativa (ns) ($p > 0,05$), é muito significativa (*) ($0,001 < p \leq 0,01$) ou altamente significativa (***) ($p \leq 0,001$) (todos os não apresentados).

A sensibilidade de *P. expansum* a extratos de própolis é frequentemente relatada (Matny *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2016; Embaby *et al.*, 2019), sendo referidas percentagens de redução do crescimento do fungo de 76 % e 84,5 %, após 3 dias, com concentrações de 0,5 % de extrato etanólico de própolis (Embaby *et al.*, 2019) e de 5 % de um extrato de própolis português (Sánchez *et al.*, 2016), respetivamente. Posto isto, pode pensar-se que Cr18.EE₇₀ possui uma menor eficácia

contra *P. expansum*, contudo também é notório o impacto que o atraso no arranque do crescimento pode ter nos primeiros dias após inoculação, pelo que, para termos uma comparação mais fiável, se deviam analisar as % RTL após cerca de uma semana.

Embora com efeitos distintos sobre os fungos aqui em estudo, os resultados obtidos demonstraram que ambos os extratos foram eficazes na redução do crescimento de *B. cinerea* e *P. expansum*, para todas as concentrações testadas e de um modo dependente da concentração, como já reportado por outros autores (Quintero-Cerón *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2016; Loebler *et al.*, 2018, 2020; Embaby *et al.*, 2019). Apesar dos mecanismos envolvidos na defesa contra agentes patogénicos não serem ainda conhecidos, a eficácia dos produtos naturais poderá estar relacionada com a diminuição da viabilidade das estruturas dos fungos como os tubos germinativos, impedindo a germinação dos esporos (Rosero-Hernández *et al.*, 2019). Assim, e uma vez que se trata de fungos diferentes, os extratos de própolis podem ter efeitos distintos nos dois como o reportado pelo grupo de Li (2017), que verificou uma maior suscetibilidade de *B. cinerea* em comparação a *P. expansum* ao óleo de *Melaleuca alternifolia* devido ao facto de que tal produto causar mais danos nas membranas celulares e maior inibição do metabolismo respiratório de *B. cinerea*. Paralelamente, o efeito antifúngico de alguns produtos naturais derivados de plantas pode dever-se à presença de certos compostos como ácidos verátrico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico, *p*-cumárico e ferúlico (Abbey *et al.*, 2018), alguns dos quais presentes em amostras de própolis português (Silva-Carvalho *et al.*, 2015), pelo que seria relevante avaliar os compostos presentes nas amostras em estudo.

3.3.2. O extrato de própolis do Caramulo reduz substancialmente o tamanho das lesões provocadas por *P. expansum* em maçãs

Botrytis cinerea e *Penicillium expansum*, causadores da podridão cinzenta e do bolor azul, respetivamente, são dois dos principais fungos responsáveis pela perda de maçãs (Choquer *et al.*, 2007; Cheon *et al.*, 2016). Embora a infeção possa ocorrer através de lenticelas e da epiderme intacta, estes microrganismos infetam os frutos principalmente por via de ferimentos causados durante o seu manuseamento e/ou armazenamento. Por este motivo, para estudar a infeção por *B. cinerea* e *P. expansum* e/ou outros fungos causadores de podridões em pomóideas é feito, por norma, um ferimento em forma de furo (Filonow, 2004), tendo sido o método escolhido para os nossos ensaios *in vivo*. Assim, e para estabelecer um protocolo de infeção, começou por se avaliar a patogenicidade de ambos os fungos. Apesar de diversas tentativas, variando o título e quantidade de inóculo e ainda as condições de incubação, a indução

de infecção e aparecimento de lesões mensuráveis apenas foi conseguida para *P. expansum*, pelo que se procedeu aos ensaios *in vivo* apenas com esta espécie. Optou-se pelo maior título de inóculo testado (5×10^6 esporos/ml), uma vez que foi o utilizado nos ensaios *in vitro* e não se verificaram diferenças significativas entre os dois títulos testados ao final de oito dias ($31,1 \pm 3,6$ e $31,3 \pm 3,01$ mm para 5×10^4 e 5×10^6 esporos/ml, respetivamente) (Figura 20).

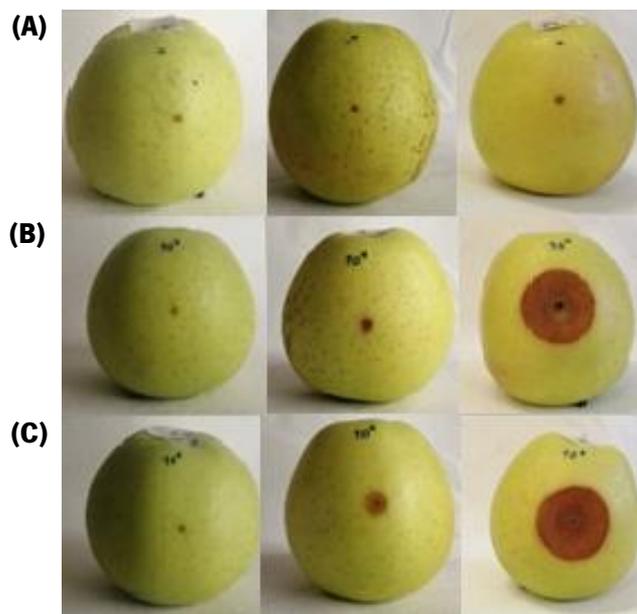


Figura 20 - Patogenicidade de *P. expansum* em maçãs Golden Delicious inoculadas com água desionizada estéril (A), 5×10^4 esporos/ml (B) e 5×10^6 esporos/ml (C), após 1, 4 e 8 dias (da esquerda para a direita).

Contrariamente ao verificado no ensaio *in vitro*, Cr18.EE₇₀ demonstrou uma atividade contra *P. expansum* bastante satisfatória *in vivo*, sendo notória a redução no diâmetro das lesões (RTL) em maçãs Golden Delicious logo após 5 dias de tratamento (Figura 21), tendo-se mantido a RTL acima dos 50 % durante os 14 dias do ensaio. O valor máximo de RTL foi atingido entre o 8º e o 9º dia, com 69, 72 e 66 % para 2,5, 5 e 10 % de extrato, respetivamente, mantendo-se mais ou menos estável até aos 14 dias, quando se atinge uma RTL de 61, 67 e 63 %.

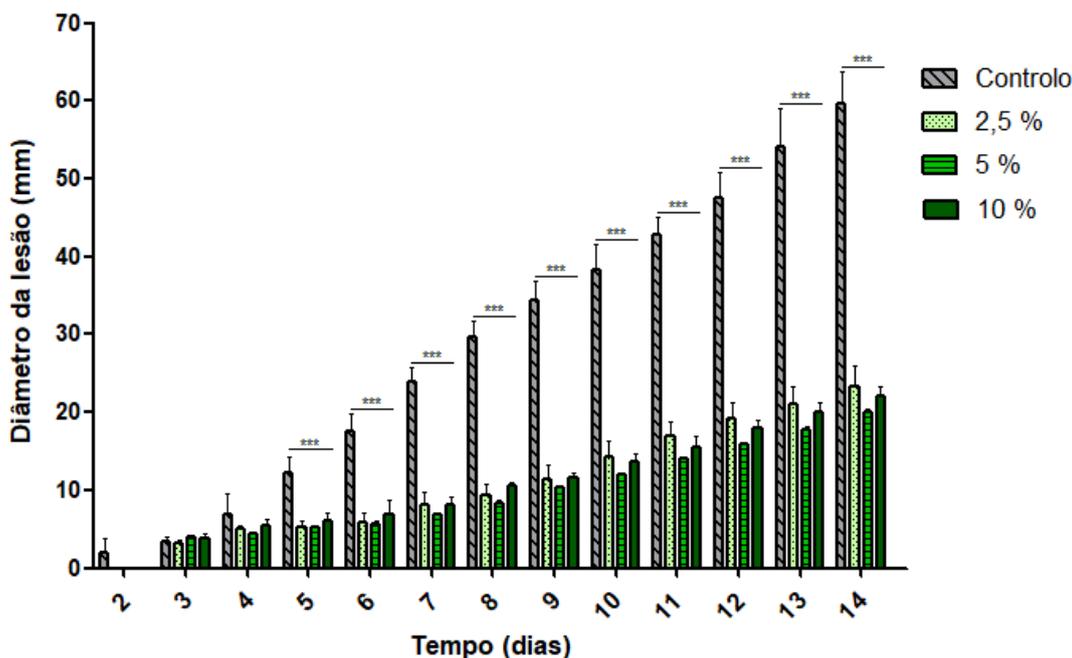


Figura 21 - Diâmetro da lesão provocada pela inoculação de *P. expansum* (5×10^6 esporos/ml) em maçãs Golden Delicious tratadas com concentrações de 2,5, 5 e 10 % de Cr18.EE₇₀ e na situação controlo (solvente). Os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n=3). As diferenças entre os valores de inibição de todas as concentrações são não significativas ($p > 0,05$) mas relativamente ao controlo são altamente significativas (***) ($p \leq 0,001$).

Uma redução semelhante (71 %) na área da lesão provocada pelo mesmo fungo, em maçãs, foi relatada por Matny e colaboradores (2015) duas semanas após tratamento com extrato de própolis iraquiano elaborado com etOH₇₀ numa concentração de 3 %. Também em maçãs, Embaby e colaboradores (2019) verificaram que uma concentração de 0,5 % de um extrato hidroalcoólico permitiu reduzir a lesão em 68 %, após duas semanas. Já em peras Rocha, também um pomo tal como a maçã, o diâmetro da lesão provocada por *P. expansum* sofreu uma redução de apenas 40 %, quatro dias após tratamento com um extrato hidroalcoólico de própolis português, reduzindo a sua atividade após este período (Sánchez *et al.*, 2016).

Embora vários autores reportem uma inibição dependente da concentração (Matny *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2016; Embaby *et al.*, 2019; Loebler *et al.*, 2020), tal não se verificou com Cr18.EE₇₀, uma vez que não se detetaram diferenças estatisticamente significativas entre concentrações. Özdemir e colegas (2010), num estudo com toranjas e um EE de própolis proveniente da Turquia, verificaram até o oposto, sendo que os frutos tratados com uma concentração de 10 % apresentaram uma decomposição por fungos superior à verificada no tratamento com concentrações de 1 e 5 %.

Ao fim de 14 dias, e ainda que superficialmente as lesões não tenham dimensões significativamente diferentes quando se comparam as três concentrações (Figuras 21 e 22B-D), podemos considerar a concentração de 5 % de Cr18.EE₇₀ mais eficaz no controlo da proliferação do fungo, uma vez que a profundidade da lesão é menor nas maçãs tratadas com esta concentração relativamente às concentrações de 2,5 e 10 % (Figura 22F-H), esta última com a lesão mais profunda, tal como reportado por Özdemir e colegas (2010). Ainda que concentrações mais elevadas do extrato possam conter maior quantidade de compostos com propriedades antifúngicas, estes resultados podem estar relacionados com outros componentes, como açúcares e/ou minerais presentes no própolis que, tal como aqueles libertados nos fermentos “frescos” e que são os principais nutrientes usados pelos esporos dos microrganismos induzindo a sua aderência, germinação e crescimento (Filonow, 2004), também poderão contribuir para o desenvolvimento microbiano, fazendo com que, em concentrações mais elevadas, os possíveis efeitos prejudiciais do própolis sejam ultrapassados pelos efeitos benéficos do mesmo em prol dos fungos. Por outro lado, pode pensar-se que alguns compostos fitotóxicos, quando em concentrações mais elevadas, possam causar danos nas células do mesocarpo, contribuindo para uma maior biodisponibilidade de recursos para o crescimento do fungo. De facto, neste ensaio, verificaram-se alguns danos nos tecidos dos controlos apenas com extrato (inoculados com água), pelo que se considerou pertinente fazer um ensaio dirigido à avaliação da toxicidade do extrato, o qual será discutido na secção seguinte.

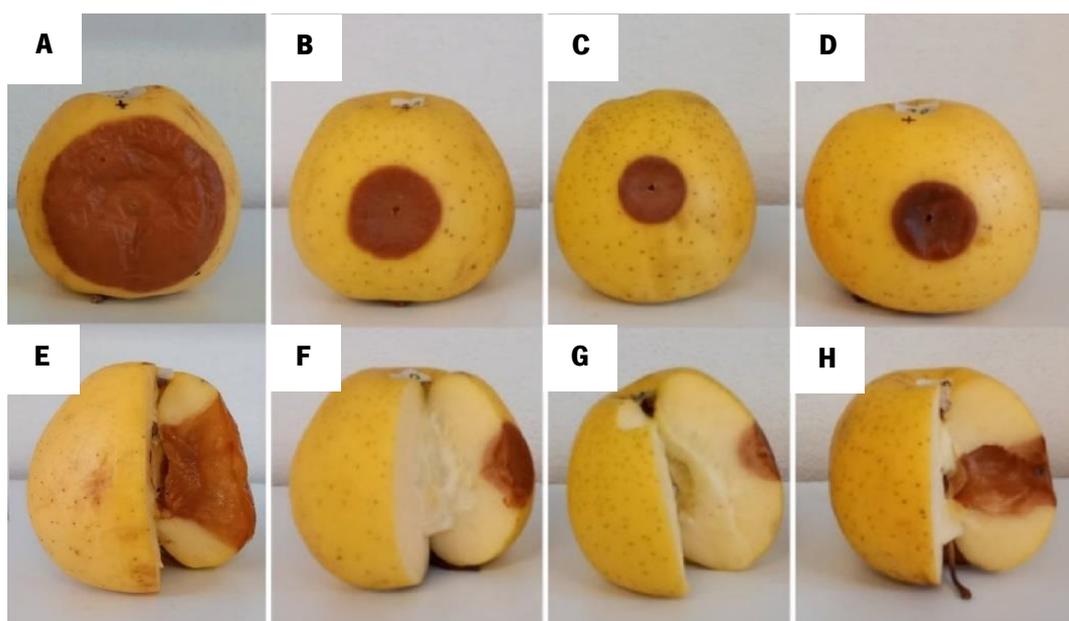


Figura 22 - Lesão provocada por *P. expansum*, após 14 dias, em maçãs Golden Delicious tratadas com Cr18.EE₇₀ na concentração de 2,5 (B), 5 (C) e 10 % (D), em comparação com o controlo (A), e respetiva profundidade (F, G, H e E).

3.3.3. Possíveis efeitos adversos da aplicação do extrato de própolis do Caramulo em maçãs

No ensaio da fitotoxicidade, foram, de facto, observados alguns sinais de fitotoxicidade do extrato, como lesões necróticas na epiderme do fruto ao redor do ferimento tratado com Cr18.EE₇₀, principalmente na concentração mais elevada (Figura 22E e J). Embora alguns autores refiram possíveis efeitos citotóxicos após tratamento com EE de própolis, como o aparecimento de manchas escuras na epiderme e coloração castanha e textura mole da polpa dos frutos (Zahid *et al.*, 2013; Loebler *et al.*, 2018), outros reportam não ter observado qualquer toxicidade do extrato, nomeadamente em peras (Sánchez *et al.*, 2016; Loebler *et al.*, 2020).

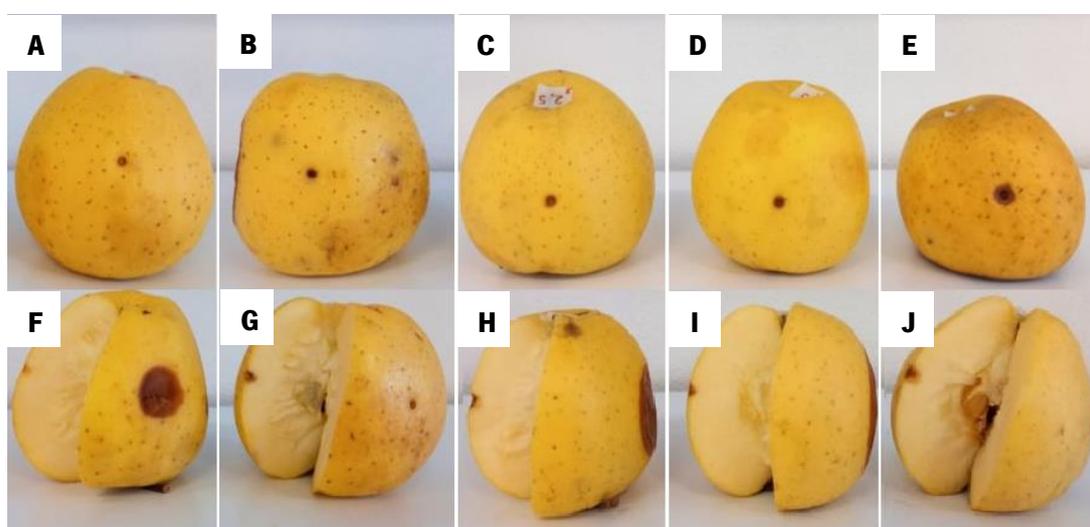


Figura 23 - Efeito fitotóxico do extrato de própolis em ferimentos de maçãs Golden Delicious não inoculados com fungo, após 14 dias do tratamento com 2,5 (C), 5 (D) e 10 % (E) de Cr18.EE₇₀, em comparação com o controlo de água (A) e de etOH₇₀ (B), e respetiva profundidade (H, I, J, F, G).

Apesar de serem visíveis danos nos tecidos com todas as concentrações testadas e no controlo solvente, que não se verificaram no tratamento com água (Figura 23A e F e Figura 24A), estes foram mais evidentes nos ferimentos de maçãs tratadas com 10 % de Cr18.EE₇₀, sendo visível uma mancha castanha de dimensões maiores em redor do ferimento e também mais profunda (Figura 23E e J e Figura 24E). Estes efeitos não se verificaram com as concentrações de 2,5 e 5 % (Figura 23C, D, H e I e Figura 24C, D), como descrito por Sánchez e colaboradores (2016), que não observaram efeitos tóxicos nos tecidos de pera com essas mesmas concentrações de um extrato de própolis português elaborado também com etOH₇₀.

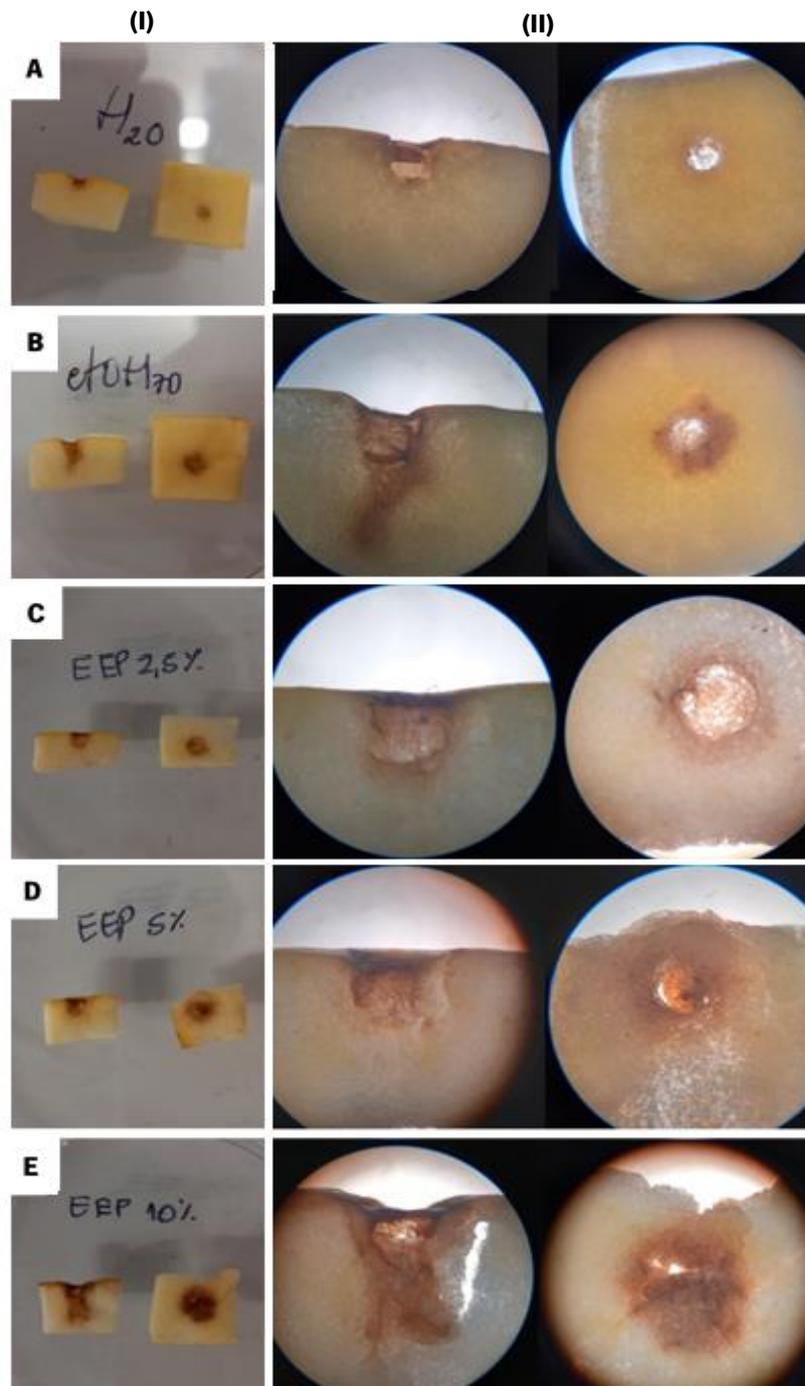


Figura 24 - Danos provocados pelo extrato de própolis na polpa de maçãs Golden Delicious introduzido em fermentos, após 14 dias do tratamento com 2,5 (C), 5 (D) e 10 % (E) de Cr18.EE₇₀, em comparação com os controlos de água (A) e de etOH₇₀ (B). Fotografias a olho nu (I) e à lupa ampliação de 10x (II).

Embora parte dos danos observados possam estar relacionados com o efeito do etanol, cujo tratamento também origina danos (Figura 24B), de facto, aqueles causados pela maior concentração de extrato podem também contribuir para ocorrência de distúrbios fisiológicos e morte celular (Özdemir *et al.*, 2010). Este resultado corrobora a hipótese anteriormente avançada de que as lesões maiores causadas por *P. expansum* na presença de 10 % de Cr18.EE₇₀, tal como

a maior incidência de fungos (Özdemir *et al.*, 2010), se devam mais a danos causados por compostos fitotóxicos presentes do extrato, do que por compostos benéficos utilizáveis pelo fungo. Os danos observados podem também ser parte de uma resposta hipersensível, uma forma programada de morte celular ao redor da zona infetada (Gaffoor e Chopra 2014), mas mais estudos teriam de ser realizados para perceber o mecanismo de ação do própolis no crescimento de microrganismos.

3.3.4. Um extrato de própolis de mais fácil obtenção é eficaz no controlo de *P. expansum* sem efeitos tóxicos nos tecidos das maçãs

Com o intuito de verificar se um extrato de mais fácil obtenção permitiria obter resultados igualmente satisfatórios aos observados com Cr18.EE₇₀, testou-se o extrato obtido apenas por maceração e filtração (Cr18.EEf₇₀). A resposta obtida em termos de diâmetro de lesão (Figura 25) foi muito semelhante à observada com Cr18.EE₇₀ (Figura 21) sendo que, neste caso, se observou um atraso no arranque do desenvolvimento do fungo até às 72 horas após tratamento e, tal como com Cr18.EE₇₀, também não se verificou uma resposta dependente da concentração. Contudo, obtiveram-se desvios padrão elevados que podem induzir em erro, pelo que seria necessário repetir o ensaio, o que não foi possível por falta de tempo.

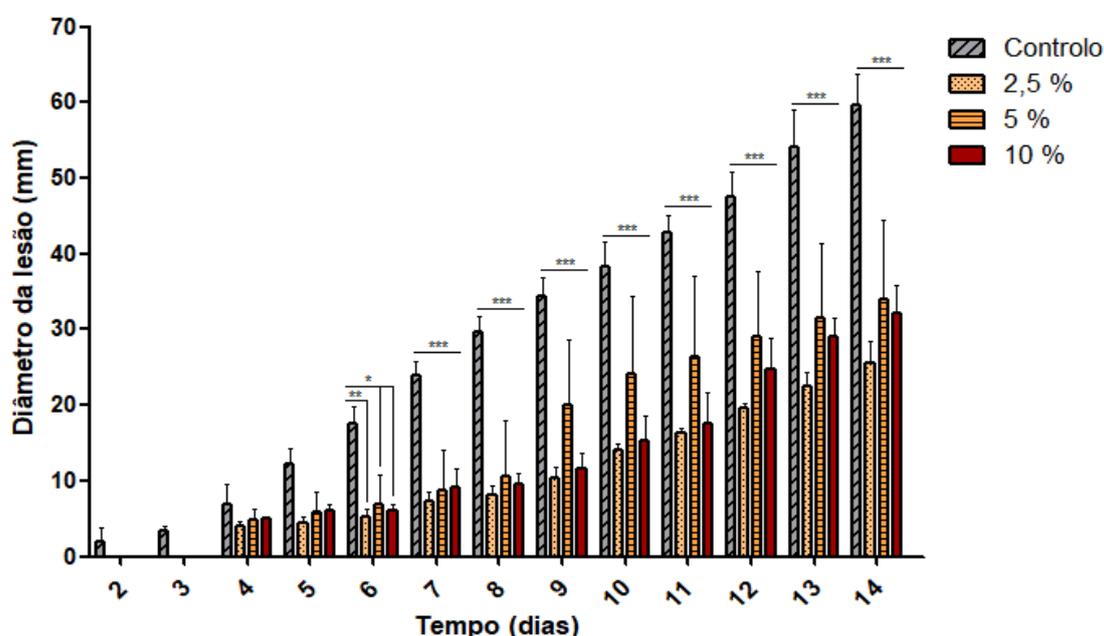


Figura 25 - Diâmetro da lesão provocada pela inoculação de *P. expansum* (5×10^6 esporos/ml) em maçãs Golden Delicious tratadas com concentrações de 2,5, 5 e 10 % de Cr18.EEf₇₀ e na situação controlo (solvente). Os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n=3). As diferenças entre os valores de inibição de todas as concentrações são significativas (*) ($0,01 < p \leq 0,05$), muito significativas (**) ($0,001 < p \leq 0,01$) ou altamente significativas (***) ($p \leq 0,001$).

O máximo de redução também foi atingido ao 8º dia após inoculação, registando-se 73, 64 e 68 % de RTL para as concentrações de 2,5, 5 e 10 %, respetivamente, valores semelhantes aos obtidos no tratamento com Cr18.EE₇₀. Contudo, com Cr18.EEf₇₀ observou-se uma profundidade do tamanho da lesão menos acentuada depois de 14 dias (Figura 26), principalmente na concentração de 10 % (Figura 26H e Figura 22H).

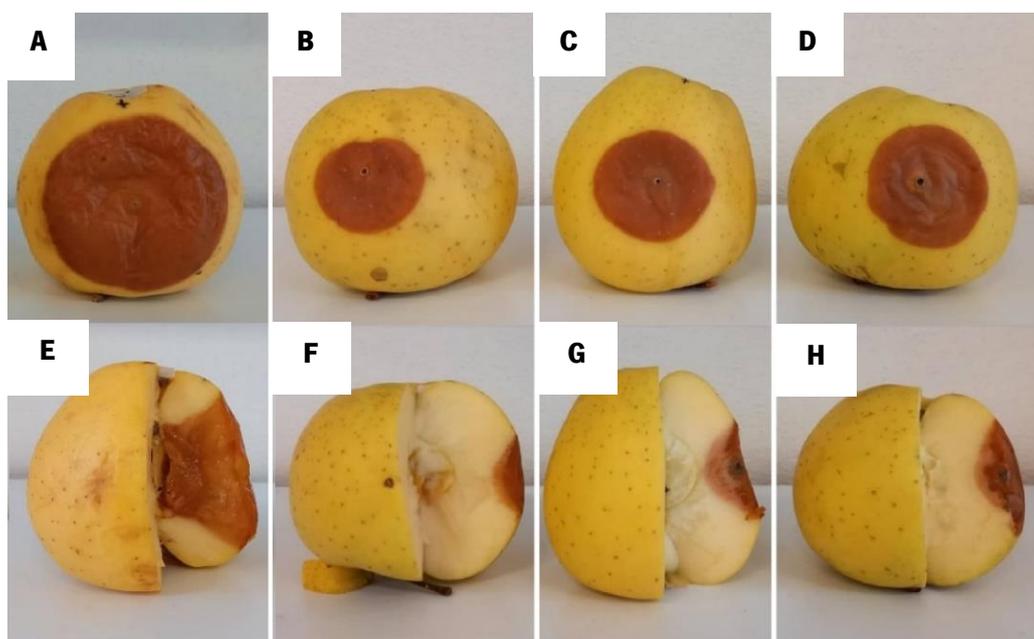


Figura 26 - Lesão provocada por *P. expansum*, após 14 dias, em maçãs Golden tratadas com Cr18.EEf₇₀ na concentração de 2,5 (B), 5 (C) e 10 % (D), em comparação com o controlo (A), e respetiva profundidade (F, G, H e E).

Quanto aos efeitos fitotóxicos, estes foram menos evidentes que os encontrados com Cr18.EE₇₀, principalmente com a concentração de 10 %, observando-se menos danos nos tecidos (Figura 27C), os quais foram semelhantes aos verificados com as outras concentrações (Figura 27A e B). Assim, e tendo em conta também a profundidade das lesões, os resultados sugerem que os efeitos de Cr18.EEf₇₀ podem ser distintos dos exercidos por Cr18.EE₇₀ ao ser menos tóxico para os tecidos da maçã e, ao mesmo tempo, permitindo um melhor controlo da profundidade das lesões. Contudo, a partir do 9º dia, a percentagem de RTL no tratamento com Cr18.EEf₇₀ sofre uma diminuição, registando-se, após 14 dias, valores de 57, 43 e 56 % nas maçãs tratadas com 2,5, 5 e 10 % (Figura 25), respetivamente, os quais foram inferiores aos obtidos com Cr18.EE₇₀ (Figura 21). Pode-se, portanto, concluir que, ainda que igualmente eficaz até oito dias após inoculação do patógeno, o tratamento com Cr18.EEf₇₀ não permite um controlo tão eficaz da podridão provocada por *P. expansum*, uma vez que o seu efeito é menos duradouro.

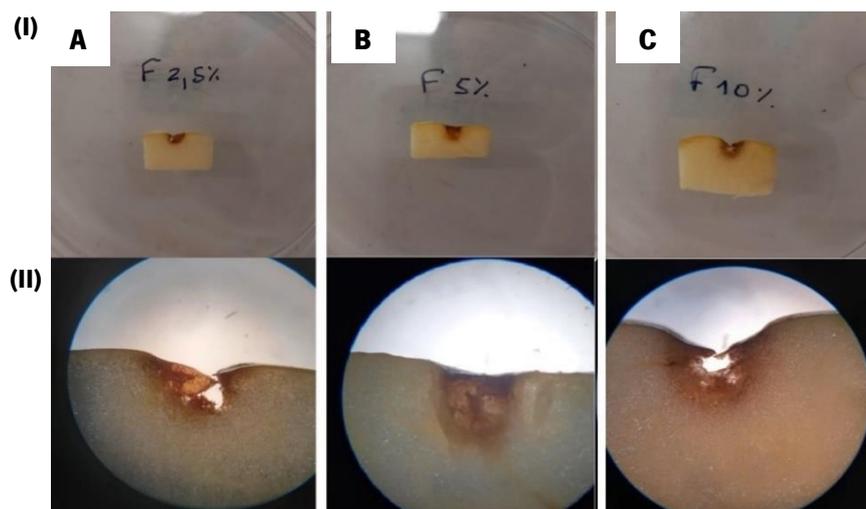


Figura 27- Danos provocados pelo extrato de própolis na polpa de maçãs Golden Delicious em ferimentos não inoculados com fungo, após 14 dias do tratamento com 2,5 (A), 5 (B) e 10 % (C) de Cr18.EEf₇₀. Observação a olho nu (I) e à lupa com ampliação de 10x (II).

Embora alguns autores relatem uma maior eficácia na redução da incidência da doença quando o própolis é aplicado depois da inoculação do patógeno (ação curativa), em comparação com a sua aplicação antes (ação preventiva/profilática) (Loebler *et al.*, 2020), a eficácia da aplicação preventiva de extratos de própolis elaborados com etOH₇₀ foi já comprovada (Guginski-Piva *et al.*, 2014). Assim, neste trabalho optou-se por realizar o tratamento de própolis com ação preventiva, isto é, aplicando-se antes da inoculação do agente patogénico dado o objetivo final para aplicação antes do armazenamento em câmara frigorífica ou mesmo em supermercados, protegendo os frutos de possíveis contaminações decorrentes de manuseamento e/ou transporte após a colheita, uma vez que, depois de instaladas, as podridões são difíceis de controlar. A ação preventiva pode estar relacionada com a criação de uma camada protetora que dificulta a penetração do fungo e/ou com a acumulação de compostos antifúngicos nas zonas passíveis de infecção, enquanto o efeito da aplicação do extrato após inoculação poderá dever-se à sua atuação nas estruturas do fungo, nomeadamente na germinação dos esporos e na sua instalação nos tecidos do hospedeiro (Guginski-Piva *et al.*, 2014).

As plantas possuem diversos mecanismos que lhes permitem resistir à invasão de fungos, mecanismos estes inatos (constitutivos) ou induzidos (Gaffoor e Chopra, 2014). Enquanto os primeiros incluem características físicas como a espessamento da cutícula e/ou das paredes celulares, que atuam como barreira aos agentes patogénicos e determinam a rapidez com que estes penetram nos tecidos (Belete e Boyraz, 2017), os últimos são aqueles que surgem quando

do ataque de inimigos como resposta local ou sistêmica e que, para além poderem interferir diretamente com o invasor, podem também enviar um alerta às células envolventes para que organizem uma resposta contra o patógeno. Esta inclui a produção de ROS, enzimas e fitoalexinas, um grupo vasto de compostos antimicrobianos que são produzidos imediatamente após invasão (Gaffoor e Chopra, 2014), e cuja produção pode ser induzida pelo tratamento com própolis (Baldin *et al.*, 2013; Guginski-Piva *et al.*, 2015), demonstrando que este produto poderá ter um papel importante na ativação de mecanismos de defesa por parte da planta.

Outros aspetos que podem contribuir para a maior ou menor sensibilidade a determinado agente patogénico é a presença de determinados genes/alelos e, no caso específico da cultura da maçã, o grande número de variedades, que pode determinar o efeito do própolis na extensão das lesões (Embaby *et al.*, 2019). A variedade Golden Delicious, usada no ensaio em questão, é uma das mais suscetíveis a *P. expansum* (Errampalli, 2014), uma vez que possui uma cutícula menos espessa comparativamente a outras, para além de menos ácidos orgânicos e um conjunto elevado de hidratos de carbono, lípidos e proteínas, que podem servir de nutrientes ao agente patogénico, resultando num maior tamanho da lesão por ele provocada (Sattar *et al.*, 2018). A dimensão da infeção parece variar também com fatores ambientais, como a temperatura e humidade, embora estes dois não impeçam a germinação dos esporos de *P. expansum* (Sattar *et al.*, 2018).

Paralelamente, e embora não se conheçam totalmente quais os mecanismos que conferem ao própolis a sua atividade antifúngica, a grande quantidade de compostos nele presentes assume um papel importante na ativação de mecanismos de defesa das plantas (Guginski-Piva *et al.*, 2014). Um extrato é uma mistura de diferentes componentes em distintas proporções, não se sabendo como esses constituintes interagem e promovem os seus efeitos sobre outros organismos (Pereira *et al.*, 2015). Alguns autores reportam uma relação entre as propriedades antimicrobianas dos extratos de própolis e os seus teores de polifenóis e flavonoides (Da Silva *et al.*, 2006; Chaillou e Nazareno, 2009), já que são principalmente estas classes de compostos as responsáveis pelas várias bioatividades do própolis, particularmente a antimicrobiana (Devequi-Nunes *et al.*, 2018). Assim, terão um papel importante na proteção e resistência de frutos e vegetais após a colheita das plantas, sendo que uma baixa incidência de agentes patogénicos é encontrada em paralelo com uma maior concentração destes compostos (Giovannelli, 2008). Neste sentido, seria esperada uma maior atividade antifúngica de Cr18.EE₇₀, tal como verificado *in vivo* (Figura 21), já que este extrato possui maior teor desta classe de compostos (Tabela 5). Alguns destes compostos estão já identificados como é o caso da pinocembrina e galangina (Quiroga *et al.*, 2006; Cruz *et al.*,

2016), do ácido fenil éster cafeico (CAPE) (Bankova, 2009) e, ainda, a artepilina C, esta com efeitos contra patógenos de diferentes espécies (Pazin *et al.*, 2019). Não obstante, o mecanismo de ação dos compostos bioativos presentes no própolis ainda não é totalmente compreendido, sabendo-se apenas que se trata de uma interação entre estes e as membranas das células alvo que, por sua vez, desencadeia uma panóplia de atividades biológicas (Pazin *et al.*, 2014), entre as quais distúrbios metabólicos e influência na expressão de genes (Martini *et al.*, 2017), inativação de mecanismos enzimáticos envolvidos na produção de energia e na síntese de compostos (Giovanelli, 2008).

Também a cera contida no própolis pode dificultar a penetração do fungo ao formar uma camada protetora (Pereira *et al.*, 2008). De facto, a aplicação de ceras nos frutos é uma prática comum na indústria, principalmente para garantir maior atratividade para os consumidores (Özdemir *et al.*, 2010; Luciano-Rosario *et al.*, 2020). Além do mais, a aplicação de revestimentos comestíveis, isto é, ceras naturais ou comerciais, pode ser uma abordagem inovadora no controlo de microrganismos em diversos frutos (Ali *et al.*, 2010), atuando diretamente através de propriedades antifúngicas, ou indiretamente como barreira mecânica (Marín *et al.*, 2017). O uso do própolis como revestimento dificulta ainda as trocas gasosas e a perda de água, diminuindo a perda de peso e as taxas de respiração, transpiração e oxidação ao selarem as lenticelas da epiderme dos frutos e, conseqüentemente, aumentando não só a sua resistência a agentes patogénicos, mas também melhorando a aparência, a qualidade e o tempo de prateleira dos frutos (Özdemir *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2013, 2014; Embaby *et al.*, 2019).

CAPÍTULO III – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

A procura de produtos naturais para aplicação em diversas áreas é cada vez mais comum, com vista a maior sustentabilidade e segurança quer para o meio ambiente, quer para os consumidores que são cada vez mais exigentes. O aproveitamento do própolis remonta a séculos atrás, sendo usado na medicina tradicional, e, nas últimas décadas, a utilização deste produto natural tem-se estendido a outras áreas como a farmacêutica, nutracêutica e cosmética, pelas suas diversas propriedades. Mais recentemente, também no setor alimentar e na agricultura, e em particular no controlo de fungos fitopatogénicos, alguns esforços têm sido feitos. No entanto, e embora o setor apícola se encontre em expansão na UE, em Portugal a oferta de outros produtos da colmeia para além do mel é ainda reduzida, sendo o própolis muitas vezes desvalorizado e mesmo descartado, fundamentalmente por falta de conhecimento do seu potencial pelos apicultores e também pelos consumidores.

Atualmente, o aproveitamento do própolis passa pela indústria internacional, nomeadamente a farmacêutica, tendo, no entanto, de cumprir critérios rigorosos para esta finalidade. A amostra aqui em estudo, proveniente da região do Caramulocontinha, aparentemente, impurezas derivadas de armazenamento incorreto (nomeadamente bolores), tendo sido rejeitada para esta finalidade. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros de qualidade deste “resíduo” (teores de cera, água, cinza e bálsamo) para averiguar se amostras que não possam ser usadas para fins com regulamentações mais específicas e/ou restritivas mantêm a sua aptidão para outras aplicações. Mais especificamente, pretendeu-se avaliar o potencial antifúngico do extrato desta amostra de própolis em doenças da maçã antes e após a colheita. A macieira é uma das culturas com maior expressão em todo o mundo e também em Portugal, mas a sua produção e comercialização enfrentam vários desafios, nomeadamente no que diz respeito ao ataque de agentes patogénicos, que conduzem a perdas económicas e contribuem para o agravamento da problemática do desperdício alimentar.

Estando em causa a aplicação no setor alimentar, e tendo em conta as restrições de solvente, nomeadamente o teor alcoólico, decidiu-se elaborar dois extratos: com etanol absoluto e etOH₇₀, avaliando as suas características e diferenças em parâmetros considerados importantes fatores de qualidade. **Os teores de humidade, cinza, cera e bálsamo obtidos para o própolis do Caramulo encontravam-se, no geral, dentro dos limites considerados aceitáveis, confirmando a boa qualidade da amostra Cr18**, mesmo com a indicação que a mesma continha impurezas que inviabilizaram a sua comercialização. Os resultados relativos à composição fenólica de Cr18.EE e Cr18.EE₇₀ revelaram **extratos ricos em compostos**

fenólicos, principalmente o extrato hidroalcoólico, realçando a boa qualidade dos extratos em estudo, já que é esta classe de compostos a principal fração do própolis e aquela a que se atribuem as suas bioatividades. Também a nível do potencial antioxidante, **ambos os extratos demonstraram elevada atividade anti-radicalar, mais elevada até do que normalmente reportado**. Paralelamente, embora a extração hidroalcoólica tenha conduzido a um rendimento inferior ao da etanólica (61,4 e 73 %, respetivamente), o etOH₇₀ permitiu extrair mais polifenóis e flavonóides o que, aliado à atividade antioxidante significativa, antecipa que este solvente, para além de compatível com aplicação em alimentos, poderá garantir bons resultados.

Para avaliar o potencial antifúngico dos extratos na cultura da maçã *in vitro* e *in vivo*, selecionaram-se três dos principais agentes patogénicos desta cultura: *Venturia inaequalis* (pré-colheita) e *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* (pós-colheita). Infelizmente, não foi possível avaliar a atividade do extrato de própolis do Caramulo contra *V. inaequalis* no campo devido à pandemia COVID-19. No entanto, o potencial de vários extratos de própolis foi já comprovado no biocontrolo de fungos de diversas culturas (Robertson, 1990; Pereira *et al.*, 2001, 2008; Pereira *et al.*, 2014, 2017), pelo que este produto natural terá, previsivelmente, potencial no combate de outras doenças, nomeadamente do pedrado da macieira. Ainda, o mecanismo de defesa contra este agente patogénico poderá estar relacionado com uma maior quantidade de compostos fenólicos, reforçando o potencial dos extratos de própolis do Caramulo, dada a sua composição rica nestes compostos.

Através dos resultados obtidos é possível concluir que ***B. cinerea* é mais susceptível aos extratos de própolis do Caramulo que *P. expansum* e que ambos os extratos exercem efeitos distintos nos fungos, sendo que para *B. cinerea* o extrato o mais eficaz é Cr18.EE₇₀, enquanto que para *P. expansum* é Cr18.EE**. Ainda assim, ambos os extratos exibem atividade antifúngica satisfatória contra ambos os fungos: com *B. cinerea*, registou-se com Cr18.EE e Cr18.EE₇₀ (2000 µg/ml), um máximo de inibição de 63 %, ao 7º dia após inoculação, mantendo-se acima dos 50 % até ao final do ensaio (25 dias); e com *P. expansum*, registou-se um máximo de inibição de 53 % ao 5º dia na presença de Cr18.EE e de 48 % ao 4º dia com Cr18.EE₇₀.

Dadas as restrições de aplicação do extrato elaborado com etanol absoluto *in vivo*, apenas se testou a eficácia de Cr18.EE₇₀, e apenas para *P. expansum*, uma vez que não foi conseguida a infeção das maçãs com *B. cinerea*. **A concentração intermédia das testadas (5 %) revelou-se a mais promissora ao permitir mais de 70 % de redução do tamanho da lesão provocada por *P. expansum*, sem efeitos tóxicos significativos nos tecidos dos frutos.**

Como a partir do 8º dia a percentagem de redução diminui ligeiramente, poder-se-ia eventualmente beneficiar de nova aplicação de Cr18.EE₇₀ com vista a prolongar os seus efeitos, hipótese que carece de confirmação.

Curiosamente, **o extrato obtido através de maceração e filtração apenas, sem evaporação do solvente seguida de liofilização - Cr18.EE₇₀ -, preparado à semelhança da “tintura de própolis” tradicional, parece ser mais eficaz na concentração de 2,5 %, onde se observou a maior redução do tamanho da lesão, sem danos relevantes nos tecidos da maçã**, embora não estatisticamente significativa comparativamente ao efeito das restantes concentrações. Não obstante, os resultados sugerem que estes extratos, nas menores concentrações, podem ter **potencial no controlo de fungos no período pós-colheita**, quer a nível do armazenamento em câmaras frigoríficas ou mesmo no supermercado, para prolongar o tempo de prateleira dos produtos sem efeito tóxicos significativos nos frutos, ao mesmo tempo que se veem rentabilizados os recursos (amostra e solvente), por serem necessários em menor quantidade.

O potencial do própolis como biofungicida foi já comprovado contra diversos microrganismos em várias culturas (Robertson, 1990; Çandir *et al.*, 2009; Özdemir *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Zahid *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014; Guginski-Piva *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2016, Loebler *et al.*, 2018, 2020), sugerindo que pode ser uma boa fonte de compostos com propriedades antifúngicas. Embora alguns trabalhos não tenham constatado a eficácia de extratos de própolis *in vivo* (Mattiuz *et al.*, 2015; Moura *et al.*, 2016), tal poderá dever-se às baixas concentrações utilizadas (Moura *et al.*, 2016), sendo, no entanto, importante ter atenção a este fator uma vez que, para além dos efeitos adversos nos próprios frutos, tratamentos com concentrações mais elevadas podem deixá-los pegajosos ou manchados, dificultando o armazenamento e a aceitação por parte dos consumidores (Özdemir *et al.*, 2010). No caso da maçã, o seu exocarpo é algo resistente e poderá provavelmente suportar concentrações mais elevadas sem efeitos negativos, o que não se verifica, por exemplo, no morango, em que as características da sua epiderme tornam mais difícil a aplicação, pelo que outros tipos de extratos deveriam ser investigados, nomeadamente os aquosos ou com menores percentagens de etanol. Acresce que, ainda que o sabor e odor fortes dificultem a sua adição a alimentos (Albuquerque *et al.*, 2013), o tratamento com própolis não afeta a qualidade sensorial de diversos frutos tratados, havendo mesmo uma melhoria de alguns parâmetros de qualidade como o peso, cor, textura, sabor, concentração de sólidos solúveis e acidez (Candir *et al.*, 2009; Özdemir *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2013, 2014; Mattiuz

et al., 2015; Sánchez *et al.*, 2016; Embaby *et al.*, 2019). As propriedades antioxidantes do própolis contribuem ainda para a valorização nutricional dos alimentos (Loebler *et al.*, 2018; Embaby *et al.*, 2019).

Dadas a baixa toxicidade e ausência de efeitos colaterais graves comparativamente aos tratamentos sintéticos (Bankova, 2009), **o própolis afigura-se um excelente substituto para ser usado na conservação de alimentos para controlar a degradação natural e/ou controlar contaminações microbianas, evitando assim perdas que podem pôr em causa a economia do setor e contribuindo, ainda, para o combate do desperdício alimentar.** Ainda assim, e apesar das várias vantagens já mencionadas, existem ainda muitos entraves à comercialização de própolis, nomeadamente a necessidade de padronização da sua composição e caracterização, bem como o isolamento dos compostos com efeito fungicida e/ou outras bioatividades de interesse (Pereira *et al.*, 2008), uma vez que o própolis é um recurso limitado e as suas características químicas podem variar com a sua origem. É ainda fundamental melhorar a formulação dos extratos com vista a obter soluções mais compatíveis com a sua utilização em alimentos (Sánchez *et al.*, 2016), assim como a otimização das concentrações utilizadas (Robertson, 1990), método e momento de aplicação (Embaby *et al.*, 2019) e, ainda, estudos sobre a sua eficiência nas culturas agronómicas de interesse, inclusive a nível de citotoxicidade (Pereira *et al.*, 2008). É também fundamental estudar e compreender a cadeia da produção do própolis e definir políticas de incentivo à sua produção, para que se possa atender o possível mercado no setor agrícola.

O própolis é sem dúvida um produto fascinante e, ao que tudo indica, bastante promissor para aplicação nas mais diversas áreas, pelo que continua a ser de extrema importância divulgar este produto da colmeia e as suas propriedades, não só com vista à sua valorização comercial, mas também pela valorização, no geral, do setor apícola. Para além disso, **o própolis poderá ser uma mais-valia para os produtores agrícolas** do ponto de vista de proteção das culturas ao mesmo tempo que, ao complementar as explorações com uma atividade paralela aproveitando um produto que, provavelmente, se tornaria um resíduo, reduz os custos de produção mantendo a exploração mais rentável. **Paralelamente, o própolis afigura-se uma mais-valia para o bem-estar do meio ambiente e dos consumidores.**

CAPÍTULO IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbey J.A., Percival D., Abbey L., Asiedu S.K., Prithviraj B. & Schilder A. (2018). **Biofungicidas as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*) – prospects and challenges**. *Biocontrol Science and Technology*, 29(3): 1-22.
- Abd-El-Kareem F., Abd-Elgawad M.M.M. & Saied N. (2017). Postharvest application with propolis for controlling white rot disease of green bean pods. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal (special issue)*: 310-314.
- Agüero M., González M., Lima B., Svetaz L., Sánchez M., Zacchino S., Feresin G.E., Schmeda-Hirschmann G., Palermo J., Wunderlin D. & Alejandro Tapia A. (2010). **Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity**. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 58: 194-201.
- AGROBIO - Associação Portuguesa de Agricultura Portuguesa (2017). **Agricultura Biológica, o que é? A Estratégia e Plano Acção Nacional em Agricultura Biológica**. Consultado em http://www.draplvt.mamaot.pt/DRAPLVT/Comunicacao/Noticias/Documents/seminario_Agricultura_rio_maior_2017/3_AB_agrobio.pdf a 14-04-2020.
- Aktar M.W., Sengupta D. & Chowdhury A. (2009). **Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards**. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1): 1-12.
- Albuquerque F., Romeiro S. & Figueiredo P. (2013). **Própolis: apenas um suplemento alimentar?** *Studia*. 9p. Consultado em <https://repositoriocientifico.uatlantica.pt/bitstream/10884/1348/1/Propolisapenasumsuplementoalimentar.pdf> a 07-07-2020.
- Ali A., Chow W.L., Zahid N. & Ong M.K. (2013). **Efficacy of Propolis and Cinnamon Oil Coating in Controlling Post-Harvest Anthracnose and Quality of Chilli (*Capsicum annum L.*) during Cold Storage**. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12): 3295-3644.
- Ali A., Cheong C.K. & Zahid N. (2014). **Composite effect of propolis and gum arabic to control postharvest anthracnose and maintain quality of papaya during storage**. *International Journal of Agriculture & Biology*, 16: 1117-1122.
- Anjum S.I., Ullah A., Khan K.A., Attaullah M., Khan H., Ali H., Bashir M.A., Tahir M., Ansari M.J., Ghramh H.A., Adgaba N. & Dash C.K. (2018). **Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review**. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7): 695-1703.
- Anónimo (2015). **Apple Scab**. Department of Crop Sciences, University of Illinois Extension. Report on Plant Disease, 800: 1-4. Consultado em http://extension.cropsciences.illinois.edu/fruitveg/pdfs/800-Apple_Scab-2015.pdf a 14-04-2020.
- Anónimo (2020). **Apple Scab**. Ontario Ministry of agriculture, food and rural affairs. Integrated Pest Management for Apples, 310. Consultado em <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/apscab.htm> a 14-04-2020.
- Araújo S.G.M. (2011). **Análise a nível molecular da interação pedrado-macieira num hospedeiro resistente e num hospedeiro susceptível**. Tese de mestrado em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Aric S.E, Kafkas E., Kaymak S. & Kemal K.N. (2014). **Phenolic compounds of apple cultivars resistant or susceptible to *Venturia inaequalis***. *Pharmaceutical Biology*, 52(7): 904–908.

- Archaina D., Rivero R., Sosa N. & Coronel B.B. (2016). **Influence of the harvesting procedure and extracting process on the antioxidant capacity of ethanolic propolis extracts**. Journal of Apicultural Research, 54(5): 474-481.
- Atay E., Gargin S., Esitken A., Guzel N.P., Atay A.N., Altindal M., Senyurt H. & Emre M. (2017). **The Effect of Weed Competition on Apple Fruit Quality**. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici, 45(1): 120-125.
- Aylor D.E. (1998). **The aerobiology of apple scab**. Plant Disease, 82(8): 838-849.
- Baldin D., Scariot E., Telaxka F.J., Jaski J.M. & Franzener G. (2013). **Propolis ethanolic extract in the induction of phytoalexins in sorghum and antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Phaeoisariopsis griseola***. Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia. Cadernos de Agroecologia. 8(2): 1-5.
- Bálint J., Nagy S., Thiesz R., Nyáradi I. & Balog A. (2014). **Using plant extracts to reduce asexual reproduction of apple scab (*Venturia inaequalis*)**. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38: 91-98.
- Bankova V.S., de Castro S.L. & Marcucci M.C. (2000). **Propolis: recent advances in chemistry and plant origin**. Apidologie, 31(1): 3–15.
- Bankova V. (2009). **Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds (Review article)**. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science, 1(2): 23-28.
- Bankova V., Popova M. & Trusheva B. (2016). **New emerging fields of application of propolis (Review)**. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 35(1): 1–11.
- Bankova V., Bertelli D., Borba R., Conti B.J., Cunha I.B.S., Danert C., Eberlin M.N., Falcão S.I., Isla M.I., Moreno M.I.N., Popova G.P.M., Santiago K.B., Salas A., Sawaya A.C.H.F., Schwab N.V., Sforcin J.M., Simone-Finstrom M., Spivak M., Trusheva B., Vilas-Boas M., Wilson M. & Zampini C. (2019). **Standard methods for *Apis mellifera* propolis research**. Journal of Apicultural Research. 58(2): 1-49.
- Belete T. & Boyraz N. (2017) **Critical Review on Apple Scab (*Venturia inaequalis*) Biology, Epidemiology, Economic Importance, Management and Defense Mechanisms to the Causal Agent**. Journal of Plant Physiology & Pathology, 5(2).
- Bengtsson M., Wulff E., Jørgensen H.J.L., Pham A., Lübeck M. & Hockenhull J. (2009). **Comparative studies on the effects of a yucca extract and acibenzolar-S-methyl (ASM) on inhibition of *Venturia inaequalis* in apple leaves**. European Journal of Plant Pathology, 124(2): 187–198.
- Bogdanov S. (2011). **Functional and Biological Properties of the Bee Products: a Review**. Bee Products Science. 12p.
- Bogdanov S. (2016). **Propolis: biological properties and medical applications**. The Propolis Book, Chapter 2, p. 1-41.
- Bonvehí J.S. & Gutiérrez A.L. (2011). **Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain)**. Journal of the American Oil Chemists' Society, 88: 1387-1395.
- Bonne D.M. (1971). **Genetics of *Venturia inaequalis***. The Annual Review of Phytopathology, 9: 297-318.

- Burdock G.A. (1998). **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)**. Food and Chemical Toxicology, 36(4): 347–363.
- Cardoso S.M., Ribeiro M., Ferreira I.L. & Rego A.C. (2011). **Northeast Portuguese propolis protects against staurosporine and hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in primary cortical neurons**. Food and Chemical Toxicology, 49(11): 2862-2868.
- Carvalho V.E.S.S. (2019). **Desenvolvimento de técnicas de avaliação de bioatividades de produtos da colmeia: amostras de propolis do apiário Alves de 2018**. Relatório de Projeto de Licenciatura em Bioquímica. Universidade do Minho.
- Casaca J.D. (2010). **Manual de produção de pólen e propolis**. Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, Lisboa.
- Castaldo S. & Capasso F. (2002). **Propolis, an old remedy used in modern medicine**. Fitoterapia, 73(1): S1–S6.
- Chaillou L.L. & Nazareno M.A. (2009). **Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition**. Food Science and Technology, 42(8): 1422–1427.
- Chen Y., Li B., Zhang Z. & Tian S. (2017). **Pathogenicity Assay of *Penicillium expansum* on Apple Fruits**. Bio-protocol, 7(9).
- Cheon W., Kim Y.S., Balaraju K., Kim B., Lee B. & Jeon Y. (2016). **Postharvest Disease Control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium expansum* on Stored Apples by Gamma Irradiation Combined with Fumigation**. The Plant Pathology Journal, 32(5): 460-468.
- Chevalier M., Lespinasse Y. & Renaudin S. (1991). **A microscopic study of different classes of symptoms coded by the Vf gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*)**. Plant Pathology, 40: 249-256.
- Choquer M., Fournier E., Kunz C., Levis C., Pradier J., Simon A. & Viaud M. (2007). ***Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen**. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 277(1): 1-10.
- Coelho J., Falcão S.I., Vale N., Almeida-Muradian L.B. & Vilas-Boas M. (2017). **Phenolic composition and antioxidant activity assessment of southeastern and south Brazilian propolis**. Journal of Apicultural Research, 56(1): 21-31.
- Cottica S.M., Sawaya A.C.H.F., Eberlin M.N., Franco S.L., Zeoula L.M. & Visentainer J.V. (2011). **Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods**. Journal of the Brazilian Chemical Society, 22(5): 929-935.
- Coutinho C. (2011). **O pedrado das macieiras (*Venturia inaequalis* (Cke) Wint.)**. DRAP Norte. Ficha técnica 41: 1-3. Consultado em http://www.drapn.min-agricultura.pt/drapn/conteudos/ft2010/ficha_tecnica_41_2011.pdf a 20-05-2020.
- Cova V., Paris R., Toller C., Patocchi A., Velasco R. & Komjanc M. (2017). **Apple genes involved in the response to *Venturia inaequalis* and salicylic acid treatment**. Scientia Horticulturae, 226: 157–172.
- Cronin G., Lindquist N., Hay M.E. & Fenical W. (1995). **Effects of storage and extraction procedures on yields of lipophilic metabolites from the brown seaweeds *Dictyota ciliolata* and *D. menstrualis***. Marine Ecology Progress Series, 119: 265-273.

- Cunha I.B.S., Sawaya A.C.H.F., Caetano F.M., Shimizu M.T., Marcucci M.C., Drezza F.T., Povial G.S. & Carvalho P.O. (2004). **Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts**. Journal of the Brazilian Chemical Society, 15(6): 964-970.
- Curifuta M., Vidal J., Sánchez J., Contreras A., Salazar L.A. & Alvear M. (2012). **The *in vitro* antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance**. Ciencia e Investigación Agraria, 39(2): 347-359.
- Cruz M., Antunes P., Paulo L., Ferreira A.M., Cunha A., Aguiar C.A. & Oliveira R. (2016). **Antioxidant and dual dose-dependent antigenotoxic and genotoxic properties of an ethanol extract of própolis**. Royal Society of Chemistry Advances, 6(55): 49806-49816.
- Çandir E.E., Özdemir A.E., Soylu E.M., Sahinler N. & Gül A. (2009). **Effects of Propolis on Storage of Sweet Cherry Cultivar Aksehir Napolyon**. Asian Journal of Chemistry, 21(4): 2659-2666.
- Da Silva J.F.M., de Souza M.C., Matta S.R., de Andrade M.R. & Vidal F.V.N. (2006). **Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities**. Food Chemistry, 99(3): 431-435.
- Dean R., Van-Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. & Foster G.D. (2012). **The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology**. Molecular Plant Pathology, 13(4): 414-430.
- De Carvalho F.M.A., Schneider J.Kl., de Jesus C.V.F., de Andrade L.N., Amaral R.G., David J.M. Krause L.C., Severino P.S., Cleide M.F., Bastos E.C., Padilha F.F., Gomes S.V.F., Capasso R. Santini A., Souto E.B. & de Albuquerque-Júnior R.L.C. (2020). **Brazilian Red Propolis: Extracts Production, Physicochemical Characterization, and Cytotoxicity Profile for Antitumor Activity**. Biomolecules, 10(726): 1-16.
- Del Carlo M., Amine A., Haddam M., della Pelle F., Fusella G.C. & Compagnone D. (2012). **Selective Voltammetric Analysis of α -Diphenols from Olive Oil Using Na_2MoO_4 as Electrochemical Mediator**. Electroanalysis, 24(4): 889-896.
- Devequi-Nunes D., Machado B.A.S., Barreto G.A., Silva J.R, da Silva D.F., da Rocha J.L.C., Brandão H.N., Borges V.M. & Umsza-Guez M.A. (2018). **Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction**. PLoS One, 13(12): 1-20.
- DGAV (2019). **Programa Sanitário Apícola 2019**. Lisboa. 22p.
- Diánez F., Santos M., Parra C., Navarro M.J., Blanco R. & Gea F.J. (2018). **Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom**. Letters in Applied Microbiology, 67(4): 400-410.
- Duarte A. (2019). **Tendências atuais da fruticultura portuguesa**. As novas tendências da fruticultura. AGROTEC, 30. Consultado em <http://www.agrotec.pt/noticias/tendencias-atuais-da-fruticultura-portuguesa/> a 29/03/2020.
- DRAPN (2013). **Avisos Agrícolas. Circular 2/2013**. Consultado em http://www.drapn.min-agricultura.pt/drapn/conteudos/edm/Circular_02_2013.pdf a 06-01-2020.
- Embaby E.M., Hazaa M.M., El-DougDoug K.H., Abdel Monem M.O., Abd-Elgalil M.M. & Elwan E.E. (2019). **Control Apple Fruit Decay by Using 'Ethanol Extract of Propolis' (EEP)**. International Journal of Advances in Medical Sciences, 4(3): 1-11.
- Errampalli D. (2014). **Penicillium expansum (Blue Mold)**. In Postharvest Decay: Control Strategies, p. 189-231. Academic Press.

- Eurostat (2019a). **Structure of orchards in 2017**. Newsrelease 32/2019. Consultado em <https://ec.europa.eu/eurostat/documents/2995521/9603938/5-21022019-AP-EN/826b6eac-e1ce-43d2-816e-062b0be9859f> a 29/03/2020.
- Eurostat (2019b). **Agriculture, forestry and fishery statistics**. Statistical books. Imprimeries Bietlot Frères. Consultado em <https://ec.europa.eu/eurostat/documents/3217494/10317767/KS-FK-19-001-EN-N.pdf/742d3fd2-961e-68c1-47d0-11cf30b11489> a 29/03/2020.
- Eurostat (2019c). **The fruit and vegetable sector in the EU – a statistical overview**. Consultado em https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/The_fruit_and_vegetable_sector_in_the_EU_-_a_statistical_overview#Trade a 29/03/2020.
- Eurostat (2019d). **Do you eat fruit and vegetables daily?** Consultado em <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/DDN-20190401-1> a 29/03/2020.
- Falcão S.I. (2013). **Chemical composition of portuguese própolis. Bioactive properties**. Tese de Doutoramento em Química. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.
- Falcão S.I., Vilas-Boas M., Freire C., Domingues M.R.M. & Cardoso S.M. (2009). **Characterization of New Phenolic Derivatives in Portuguese Propolis by Electro spray Mass Spectrometry**. EuroFoodChem XV-Food for the Future-Proceeding, 2(2): 64-67.
- Falcão S.I., Vilas-Boas M., Estevinho L.M., Barros C., Domingues M.R.M. & Cardoso S.M. (2010). **Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds**. Analytical and Bioanalytical Chemistry 396: 887-897.
- Falcão S.I., Vale N., Gomes P., Domingues M.R.M., Freire C., Cardoso S.M. & Vilas-Boas M. (2012). **Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC–MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides**. Phytochemical Analysis, 24(4): 309-318.
- Falcão S.I., Freire C. & Vilas-Boas M. (2013). **A Proposal for Physicochemical Standards and Antioxidant Activity of Portuguese Propolis**. Journal of the American Oil Chemists' Society, 90: 1729-1741.
- FAOSTAT (2020). **CROPS, Apples** - Production quantities of Apples by country. Consultado em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> a 28/05/2020.
- Ferreira C.F.R.I., Aires E., Barreira C.M.J. & Estevinho L.M. (2009). **Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract**. Food Chemistry, 114(4): 1438–1443.
- Filonow A.B. (2004). **Adhesion of decay-causing fungal conidia in wounds of *Malus × domestica* ‘Golden Delicious’ apple fruit is influenced by wound age**. Canadian Journal of Botany, 82: 265-272.
- Fokt H., Pereira A., Ferreira A., Cunha A., Aguiar C. (2010). **How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis**. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, Chapter 1, p. 481-493.
- Fonte A., Gonçalves F., Costa C.A. & Ferreira-Wessel D. (2017). **Avaliação de atitudes no consumo de produtos da colmeia**. Revista de Ciências Agrárias, 40 (Especial): 216-221.

- Freitas A.S., Cunha A., Cardoso S.M., Oliveira R. & Almeida-Aguiar C. (2019). **Constancy of the bioactivities of propolis samples collected on the same apiary over four years.** Food Research International, 119: 622-633.
- Funari C.S. & Ferro V.O. (2006). **Análise de própolis.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, 26(1): 171-178.
- Gaffoor I. & Chopra S. (2014). **Role of Biotechnology to Produce Plants Resistant to Fungal Pathogens.** Plant Biotechnology, 14: 169–177.
- Garcia B., Coelho J., Costa M., Pinto J. & Paiva-Martins F. (2012). **A simple method for the determination of bioactive antioxidants in virgin olive oils.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 93(7): 1727–1732.
- Gardini S., Bertelli D., Marchetti L., Graziosi R., Pinetti D., Plessi M. & Marcazzan G.L. (2018). **Chemical composition of Italian propolis of different ecoregional origin.** Journal of Apicultural Research, 57(5): 639-647.
- Gauthier N. (2018). **Apple scab.** The Plant Health Instructor. Consultado em <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/AppleScab.aspx> a 06-01-2020.
- Gessler C., Patocchi A., Sansavini S., Tartarini S. & Gianfranceschi L. (2006). **Venturia inaequalis resistance in apple.** Critical reviews in Plant Sciences, 25: 473-503.
- Ghisalberti E.L. (1979). **Propolis: A Review.** Bee World, 60(2): 59–84.
- Gilliver K. (1947). **The effect of plant extracts on the germination of the conidia of Venturia inaequalis.** Annals of Applied Biology, 34(1): 136–143.
- Giovanelli L.C. (2008). **Evaluation of an Ethanolic Extract of Propolis as a Potential Pre- and Post-Harvest Fungicide for ‘Fuerte’ Avocado (Persea americana Mill.) Fruits and Orchards.** Dissertação de Mestrado em Ciências, Universidade de Witwatersrand.
- Golba B., Treutter D. & Kollar A. (2012). **Effects of apple (Malus x domestica Borkh.) phenolic compounds on proteins and cell wall-degrading enzymes of Venturia inaequalis.** Trees, 26: 131–139.
- Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A. & Fernández-Gutiérrez A. (2006). **Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41(4): 1220–1234.
- Gonçalves A.I.P. (2016). **Potencial antioxidante e antimicrobiano do própolis de Pereiro para o desenvolvimento de produtos cosmecêuticos.** Relatório de Projeto de Licenciatura em Bioquímica. Universidade do Minho.
- Gonçalves R.B. (2017). **Desenvolvimento de extratos de própolis português visando diferentes aplicações: o caso da aplicação oral.** Tese de mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas. Universidade do Minho.
- Gong D., Bi Y., Li Y., Zong Y., Han Y. & Prusky D. (2019). **Both Penicillium expansum and Trichothecium roseum Infections Promote the Ripening of Apples and Release Specific Volatile Compounds.** Frontiers in Plant Science, 10(338): 1-14.
- Gouveia C., Peres M.F., Vitorino M.C., Henriques L.R. & Pinheiro-Alves M.C. (2009). **Polifenóis e tocoferóis em azeites monovarietais.** Actas Portuguesas de Horticultura, 13: 209- 214.
- GPP (2016). **Programa apícola nacional 2017-2019.** Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território, p. 1-99. Lisboa.

- Guginski-Piva C.A., dos Santos I., Júnior A.W., Heck D.W., Flores M.F. & Pazolini K. (2014). **Propolis for the control of powdery mildew and the induction of phytoalexins in cucumber.** *IDESIA*, 33(1): 39-47.
- Harish S., Saravanakumar D., Radjacommare R., Ebenezer E.G. & Seetharaman K. (2008). **Use of plant extracts and biocontrol agents for the management of brown spot disease in rice.** *BioControl*, 53(555): 555–567.
- Henriques A., Burton N.F. & Cooper R.A. (2005). **Antibacterial activity of selected Portuguese honeys.** *Journal of Apicultural Research*, 44(3): 119-123.
- Hogendoorn E.A., Sommeijer M.J. & Vredendregt M.J. (2013). **Alternative method for measuring beeswax content in propolis from the Netherlands.** *Journal of Apicultural Science*, 57(2): 81-90.
- Hunter L.D. (1975) **Phloridzin and apple scab.** *Phytochemistry*, 14(7): 1519–1522.
- INE (2019a). **Área, produção e produtividade das principais culturas.** Consultado em https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&userLoadSave=Load&userTableOrder=173&tipoSelecao=1&contexto=pq&selTab=tab1&submitLoad=true a 29/03/2020.
- INE (2019b). **Consumo humanos de frutos per capita.** Consultado em https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000163&&lang=pt a 29/03/2020.
- Isidorov V.A., Bakier S., Pirożnikow E., Zambrzycka M. & Swiecicka I. (2016). **Selective Behaviour of Honeybees in Acquiring European Propolis Plant Precursors.** *Journal of Chemical Ecology*, 42(6): 475–485.
- Jamar L. (2011). **Innovative strategies for the control of apple scab (*Venturia inaequalis* [Cke.] Wint.) in organic apple production.** Tese de doutoramento em Ciências Agronómicas e Engenharia Biológica. Université De Liege - Gembloux Agro-Bio Tech.
- Jug M., Končić M.Z. & Kosalec I. (2014). **Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures.** *LWT - Food Science and Technology*, 57(2): 530–537.
- Jurick W.M., Macarasin O., Gaskins V.L., Park E., Yu J., Janisiewicz W. & Peter K.A. (2017). **Characterization of Postharvest Fungicide-Resistant *Botrytis cinerea* Isolates From Commercially Stored Apple.** *Fruit Phytopathology*, 107(3): 362-368.
- Keitt G.W., Leben C.C. & Shay J.R. (1948). ***Venturia inaequalis* (Cke) Wint. IV. Further studies on the inheritance of pathogenicity.** *American Journal of Botany*, 35: 334-336.
- Kubiliene L., Laugaliene V., Pavilionis A., Maruska A., Majiene D., Barcauskaite K., Kubilius R., Kasparaviciene G. & Savickas A. (2015). **Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(156): 1-7.
- Kubiliene L., Jekabsonė A., Zilius M., Trumbeckaitė S., Simanavičiūtė D., Gerbutavičiūtė R. & Majiene D. (2018). **Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: antioxidant and mitochondria modulating properties.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(165): 1-10.
- Kujumgieva A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R. & Popov S. (1999). **Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.** *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 235–240.

- Kumazawa S., Hamasaka T. & Nakayama T. (2004). **Antioxidant activity of propolis of various geographic origins**. Food Chemistry, 84(3): 329–339.
- Lara C.S. & Barreiro M.G. (2012). **Controlo biológico de doenças de pós-colheita: situação actual E perspectivas futuras**. Revista da APH, 108: 29-32.
- Leser C. & Treutter D. (2005). **Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees**. Physiologia Plantarum, 123(1): 49–56.
- Li Y., Shao X., Xu J., Wei Y., Xu F. & Wang H. (2017). **Effects and possible mechanism of tea tree oil against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo test**. Canadian Journal of Microbiology, 63(3): 219-227.
- Loebler M., Sánchez C., Santos M., Vasilenko P., Duarte P., Cruz A. & Gonçalves M. (2018). **Aplicação de extratos de própolis para conservação pós-colheita de morangos**. Vida Rural: 38-40.
- Loebler M., Sánchez C., Maurício, M.E., Diogo E., Santos M., Vasilenko, Cruz A.S., Mendes B., Gonçalves M. & Duarte M.P. (2020). **Potential Application of Propolis Extracts to Control the Growth of *Stemphylium vesicarium* in “Rocha” Pear**. Applied Sciences, 10(6): 1990.
- Lopes M., Nunes L.F., Falcão S.I. & Vilas-Boas M. (2017). **Harmonização de metodologias de análise da própolis**. Revista de Ciências Agrárias, 40 (Especial): 208-215.
- Lourenço T., Oliveira T., Ferreira A.M., Oliveira R.P.S., Bento M.F., Geraldo M.D., Aguiar C. & Cunha A. (2014). **Antimicrobial and antioxidant properties of propolis ethanol extracts from Terceira Island (Azores, Portugal)**. Planta Medica, 80(16): P1117.
- Luciano-Rosario D., Keller N. P. & Jurick W. M. (2020). ***Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit**. Molecular Plant Pathology, 00: 1-14.
- MacHardy W.E. & Galoury D.M. (1986). **Patterns of ascospore discharge by *Venturia inaequalis***. Phytopathology, 76: 985-990.
- MacHardy W.E. & Gadoury D.M. (1989). **A revision of Mills’s criteria for predicting apple scab infection periods**. Phytopathology, 79: 304-310.
- MacHardy W.E., Gadoury D.M. & Gessler C. (2001). **Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: relationship to disease management strategies**. Plant disease, 85: 1036-1051.
- Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S. & Lima J.L. (2008). **Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties**. Analytica Chimica Acta, 613(1): 1-19.
- Maia S.I.C. (2014). **Avaliação da atividade antioxidante de extratos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica**. Dissertação de Mestrado em Análises Clínicas. Universidade de Lisboa.
- Majeed M., Bhat N.A., Badri Z.A., Yousuf V., Wani T.A., Hassan M., Saleem M., Dorjey S. & Paswal S. (2017). **Non-Chemical Management of Apple Scab- A Global Perspective**. International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB), 2(2): 912-921.
- Marcucci M.C. (1996). **Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis**. Química Nova, 19: 529-536.

- Marín A., Atarés L. & Chiralt A. (2017). **Improving function of biocontrol agents incorporated in antifungal fruit coatings: a review.** *Biocontrol Science and Technology*, 27(10): 1220-1241.
- Marques J.M.R.F. (2016). **Potencial do própolis do Gerês para o desenvolvimento de soluções orais antissépticas.** Relatório de Projeto de Licenciatura em Biologia Aplicada. Universidade do Minho.
- Martini D., Barbosa G.F., Matias R., Filho W.C.M. & Garcia N.Z.T. (2017). **Seasonality on the antifungal potential of green propolis collected in Campo Grande – MS, Brazil.** *Ciência Rural*, Santa Maria 47(3): 1-6.
- Mattiuz B., Ducamp-Collin M., Mattiuz C.F.M., Vigneault C. & Marquesa K.M. (2015). **Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of ‘Kent’ mango.** *Scientia Horticulturae*, 184: 160–168.
- Matny O.N., AL-Warshan S.H.S. & Ali A.M. (2015). **Antifungal Evaluation of Iraqi Propolis against *Penicillium expansum* and Mycotoxin Production in Apple.** *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(11): 399-405.
- Mayr U., Michalek S., Treutter D. & Feucht W. (1997). **Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance.** *Journal of Phytopathology*, 145(2-3): 69–75.
- Meneses E.A, Durango D.L. & Garcia C.M. (2009). **Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from colombian propolis.** *Química Nova*, 32(8): 2011-2017.
- Miguel M.G., Nunes S., Dandlen S.A., Cavaco A.M. & Antunes M.D. (2010). **Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal.** *Food and Chemical Toxicology*, 48(12): 3418–3423.
- Miguel M.G. & Antunes M.D. (2011). **Is propolis safe as an alternative medicine?** *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(4): 479-95.
- Miguel M.G., Nunes S., Cruz C., Duarte J., Antunes M.D., Cavaco A.M., Mendes M.D., Lima A.S., Pedro L.G., Barroso J.G. & Figueiredo A.C. (2013). **Propolis volatiles characterisation from acaricide-treated and -untreated beehives maintained at Algarve (Portugal).** *Natural Product Research*, 27(8): 743–749.
- Miñarro M. (2012). **Weed communities in apple orchards under organic and conventional fertilization and tree-row management.** *Crop Protection*, 39: 89-96.
- Ministério da Agricultura Brasileiro (2001). **Instrução normativa SDA nº 03, de 19-01-2001.** Consultado em <https://www.cnabrazil.org.br/artesanaisetradicionais/assets/files/documento%201%20%20instrucao%20normativa%20sda%20n%2003%20de%2019012001.pdf> a 11-12-2020
- Mitra K. & Uddin N. (2014). **Total Phenolics, Flavonoids, Proanthocyanidins, Ascorbic Acid Contents and *In-Vitro* Antioxidant Activities of Newly Developed Isolated Soya Protein.** *Discourse Journal of Agriculture and Food Sciences*, 2(5): 160-168.
- Moore D., Robson G.D. & Trinci A.P.J. (2019). **Fungal diseases and loss of world agricultural production.** 21st Century Guidebook to Fungi, 2ª edição. Capítulo 14. Consultado em http://www.davidmoore.org.uk/21st_Century_Guidebook_to_Fungi_PLATINUM/Ch14_01.htm a 12/04/2020.
- Moura G.S., Jaski J.M. & Franzener G. (2016). **Potencial de extratos etanólicos de propólis e extratos aquosos de plantas espontâneas no controle de doenças pós-colheita do morango.** *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 11(5): 57-63.

- Moreira L., Dias L.G., Pereira J.A., & Estevinho L. (2008). **Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal.** Food and Chemical Toxicology, 46(11): 3482–3485.
- Moreira A.B.S. (2017). **Desenvolvimento de uma linha de cosmética à base de própolis português.** Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas. Universidade do Minho.
- Nagy G., Hochbaum T., Sárosi S. & Ladányi M. (2014). **In Vitro and in Planta Activity of Some Essential Oils against *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter.** Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 42(1): 109-114.
- Nascimento T.G., Silva A.S., Constant P.B.L., Silva S.A.S., Moura M.A.B.F., Almeida C.P., Silva V.C. Wanderley A.B., Júnior I.D.B. & Escodro P.B. (2018). **Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis,** Journal of Apicultural Research, 57(2): 246-254.
- Özdemir A.E., Çandir E.E., Kaplankiran M., Soylu E.M., Şahinler N. & Gül A. (2010). **The effects of ethanol-dissolved propolis on the storage of grapefruit cv. Star Ruby.** Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 34(2): 155-162.
- Pagare S., Bhatia M., Tripathi N., Pagare S. & Bansal Y.K. (2015). **Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview.** Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 9(3): 293-304.
- Passos F. (2014). **Extrato de própolis na conservação pós-colheita de frutas.** Tese de Mestrado em Produção Vegetal. Universidade Federal de Viçosa Campus de Rio Paranaíba.
- Pazin W.M., Santos S.N., Queiroz S.C.N., Soares A.E.E. & Ito A.S. (2014). **In vitro studies of Brazilian propolis against a phytopathogen agent: analyzing bioactivity and mechanism of action in model membranes.** Revista Brasileira de Física Médica, 8(2): 2-5.
- Pazin W.M., Mônico L.M., Soares A.E.E., Miguel F.G., Berretta A.A. & Ito A.S. (2017). **Antioxidant activities of three stingless bee propolis and green propolis types.** Journal of Apicultural Research, 56(1): 1-10.
- Pazin W.M., Santos S.N., Queiroz S.C.N., Bagatolli L.A, Soares A.E.E., Melo I.S. & Ito A.S. (2019). **Bioactivity and action mechanism of green propolis against *Pythium aphanidermatum*.** Anais Da Academia Brasileira De Ciencias, 91: e20180598.
- Pereira C.S., Araujo A.G., Guimarães R.J. & Paiva L.C. (2001). **Uso da própolis como inibidor da germinação de esporos de *Hemileia vastatrix*.** Mensagem Doce (Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíficas Europeias), 64: 22-24.
- Pereira C.S., Guimarães R.J., Pozza E.A. & Silva A.A. (2008). **Controle da cercosporiose e da ferrugem do cafeeiro com extrato etanólico de própolis.** Revista Ceres, 55(5): 369-376.
- Pereira C.S., Maia L.F.P. & de Paula F.S. (2014). **Aplicação de extrato etanólico de própolis no crescimento e produtividade do feijoeiro comum.** Revista Ceres, 61(1): 98-104.
- Pereira C.S., Matte W.D. & Venâncio P.H.B. (2016). **Aplicação de extrato de própolis na agricultura.** Revista de Ciências Agroambientais, 14(1): 143-156.
- Pereira C.S., Rempel D., Senhorin A.P., Fernandes H. & Fiorini I.V.A. (2017). **Aplicação de extrato etanólico de própolis em doenças da cultura da soja.** Revista de Ciências Agrárias, 40(4): 854-862.

- Pereira D.S., Freitas C.I.A., Freitas M.O., Maracajá P.B., Silva J.B.A., Silva R.A. & Silveira D.C. (2015). **Histórico e principais usos da própolis apícola**. ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido, 11(2): 1-21.
- Pereira L.R.L., Salatino M.L.F. & Salatino A. (2020). **Production of propolis and geopropolis by stingless bees**. MOJ Food Processing & Technology, 8(1): 1-3.
- Petkovšek M.M., Stampar F. & Veberic R. (2009a). **Seasonal changes in phenolic compounds in the leaves of scab-resistant and susceptible apple cultivars**. Canadian Journal of Plant Science, 89(4): 745–753.
- Petkovšek M.M., Stampar F. & Veberic R. (2009b). **Phenolic compounds as response to apple scab (*Venturia inaequalis*) infection**. Zbornik 9: 267-271.
- Petkovšek M.M., Stampar F. & Veberic R. (2009c). **Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis***. Physiological and Molecular Plant Pathology, 74(1): 0–67.
- Petkovsek M.M., Slatnar A., Stampar F. & Veberic R. (2011). **Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab**. Biologia Plantarum, 55(4): 725-730.
- Picinelli A., Dapena E. & Mangas J.J. (1995). **Polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance. A preliminary study**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(8): 2273–2278.
- Popova M., Bankova V., Bogdanov S., Tsvetkova I., Naydensky C., Marcazzan G.L. & Sabatini A.G. (2007). **Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin**. Apidologie, 38: 306-311.
- Prasad R. (1998). **Fertilizer urea, food security, health and the environment**. Current Science, 75(7): 677-683.
- Quintero-Cerón J.P., Váquiro H.A., Solanilla J.F., Murillo E. & Méndez J.J. (2014). **In vitro fungistatic activity of ethanolic extract of propolis against postharvest phytopathogenic fungi: preliminary assessment**. Acta Horticulturae, (1016): 157–162.
- Quiroga E.N., Sampietro D.A., Sobero J.R., Sgariglia M.A. & Vattuone M.A. (2006). **Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles**. Journal of Applied Microbiology, 101: 103-110.
- Rafińska K., Pomastowski P., Rudnicka J., Krakowska A., Maruška A., Narkute M. & Buszewski B. (2019). **Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity of *Lepidium sativum* extracts**. Food Chemistry, 289(2019): 16–25.
- Ramnath S. & Venkataramgowda S. (2016). **Antioxidant Activity of Indian Propolis - An In Vitro Evaluation**. International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine, 5: 79-85.
- Raveau R., Fontaine J. & Sahraoui A.L. (2020). **Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: a Review**. Foods, 9(365): 1-31.
- Ristivojevića P., Trifkovićb J., Andrić F. & Milojković-Opšenicab D. (2015). **Poplar-type Propolis: Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity**. Natural Product Communications, 10(11): 1869-1876.
- Robertson D. (1990). **Laboratory and field evaluations of propolis as a plant protective agent**. Tese de Mestrado em Horticultural Science. Massey University.

- Rosero-Hernández E.D., Moraga J., Collado I.G. & Echeverri F. (2019). **Natural Compounds That Modulate the Development of the Fungus *Botrytis cinerea* and Protect *Solanum lycopersicum***. *Plants*, 8(111): 1-13.
- Rossi V., Ponti I., Marinelli M., Giosuè S. & Bugiani R. (2000). **A new model estimating the seasonal pattern of air-borne ascospores of *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. in relation to weather conditions**. *Journal of Plant Pathology*, 82: 111-118.
- Rowe R.N., Farr D.J. & Richards B.A.J. (1994). **Effects of foliar and root applications of methanol or ethanol on the growth of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill)**. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 22(3): 335-337.
- Rubira J.C. (2008). **Evaluación del efecto de extractos etanólicos de própolis sobre el control de *Alternaria solani* em cultivo ecológico de tomate (*Solanum lycopersicum*)**. Trabajo Final de Carrera. ITA - Escola Superior d'Agricultura de Barcelona.
- Rühmann S., Leser C., Bannert M. & Treutter D. (2002). **Relationship between growth, secondary metabolism, and resistance of apple**. *Plant Biology*, 4(2): 137–193.
- Sánchez C., Duarte P., Vasilenko P., Santos M., Loebler M., Cruz A.S. & Gonçalves M. (2016). **Potential application of Portuguese propolis to control blue mould disease in 'Rocha' pear**. *Acta Horticulture*, 1144: 359-364.
- Sanhueza R.M.V. (2004). **Podridões de maçãs frigorificadas**. *Frutas do Brasil*, 39: 35-44.
- Sattar A., Riaz A., Mehmood N., Altaf R., Afzal A. & Jabeen Z. (2018). **Effect of incubation temperature on lesion diameter of *Penicillium expansum* on apple fruit varieties**. *International Journal of Biosciences*, 12(1): 1-5.
- Sawaya A.C.H.F., Cunha I.B.S. & Marcucci M.C. (2011). **Analytical methods applied to diverse types of Brazilian própolis**. *Chemistry Central Journal*, 5: 27.
- Silva A., Prates A., Mendes F., Bento F., Gaspar L. & Cavaco M. (2011). **Guia dos produtos fitofarmacêuticos em modo de produção biológica**. MAMAOT - Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, 352: 1-48.
- Silva-Carvalho R., Miranda-Gonçalves V., Ferreira A.M., Cardoso S.M., Sobral A.J.F.N, Almeida-Aguiar C. & Baltazar F. (2014). **Antitumoural and antiangiogenic activity of Portuguese propolis in *in vitro* and *in vivo* models**. *Journal of Functional Foods*, 11: 160–171.
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., & Almeida-Aguiar, C. (2015). **Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Silva C.S.G. (2017). **Impacto da proveniência das abelhas na qualidade da própolis**. Tese de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária de Bragança.
- Silva J.C., Rodrigues S., Feás X. & Estevinho L.M. (2012). **Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis**. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5): 1790–1795.
- Silva L.R., Sousa A. & Taveira M. (2017). **Characterization of Portuguese honey from Castelo Branco region according to their pollen spectrum, physicochemical characteristics and mineral contents** *Journal of Food Science Technology*, 54(8): 2551–2561.
- Simone-Finstrom M. & Spivak M. (2010). **Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honeybees**. *Apidologie*, 41(3): 295–311.

- Slatnar A., Petkovsek M.M., Halbwirth H., Stampar F., Stich K. & Veberic R. (2010). **Response of the phenylpropanoid pathway to *Venturia inaequalis* infection in maturing fruit of 'Braeburn' apple.** Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 85(6): 465–472.
- Statista (2020a). **Fresh fruit production worldwide 1990-2018.** Consultado em <https://www.statista.com/statistics/262266/global-production-of-fresh-fruit/> a 20-03-2020.
- Statista (2020b). **Population - statistics and facts.** Consultado em https://www.statista.com/topics/776/population/#dossierSummary_chapter1 a 20-03-2020.
- Šturm L. & Ulrich N.P. (2020). **Advances in the Propolis Chemical Composition between 2013 and 2018: A Review.** eFood, 1(1): 24 - 37.
- Sun C., Wu Z., Wang Z. & Zhang H. (2015). **Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts.** Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015: 1-9.
- Thiesz R., Balog A., Ferencz L. & Albert J. (2007). **The effects of plant extracts on apple scab (*Venturia inaequalis* Cooke) under laboratory conditions.** Romanian Biotechnological Letters, 12(4): 3295.
- Toreti V.C., Sato H.H., Pastore G.M. & Park Y.K. (2013). **Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin (Review Article).** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013: 1-13.
- Treutter D. (2001). **Biosynthesis of phenolic compounds and their regulation in apple.** Plant Growth Regulation, 34: 71–89.
- Treutter D. & Feucht W. (1990a). **The pattern of flavan-3-ols in relation to scab resistance of apple cultivars.** Journal of Horticultural Science, 65(5): 511–517.
- Treutter D. & Feucht W. (1990b). **Accumulation of flavan-3-ols in fungus-infected leaves of Rosaceae.** Journal of Plant Diseases and Protection, 97(6): 634–641
- Valença I., Morais-Santos F., Miranda-Gonçalves V., Ferreira A.M., Almeida-Aguiar C. & Baltazar F. (2013). **Portuguese propolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer *in vitro*.** BMC Complementary and Alternative Medicine, 13(184): 1-8.
- Valente M.J., Baltazar A.F., Henrique R., Estevinho L. & Carvalho M. (2011). **Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth *in vitro*.** Food and Chemical Toxicology, 49(1): 86-92.
- Vieira F.J.P. (2009). **Resistência de *Venturia inaequalis* a estrobilurinas na Cova da Beira.** Tese de Mestrado em Fruticultura Integrada. Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico De Castelo Branco.
- Wang L. & Weller C.L. (2006). **Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants.** Trends in Food Science and Technology, 17: 300-312.
- Wang X., Sankarapandian K., Cheng Y., Woo S.O., Kwon H.W., Perumalsamy H. & Ahn Y.J. (2016). **Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea.** BMC Complementary And Alternative Medicine, 16(1): 1-12.

- Wenneker M. (2019). **Fungal pathogens in pome fruit orchards and causal agents of postharvest decay.** Tese de Doutorado. Wageningen University.
- Wilcox W. **Apple Scab: *Venturia inaequalis*.** Cornell University, NYSAES, Geneva, NY. Consultado em <https://www.dialenvironmental.com/images/apple-scab.pdf> a 16-05-2020.
- Williams E.B & Kuc J. (1969). **Resistance in Malus to *Venturia Inaequalis*.** Annual Review of Phytopathology, 7(1): 223–246.
- Woisky R.G. & Salatino A. (1998). **Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control.** Journal of Apicultural Research, 37(2): 99-105.
- Woo S.O., Hong I. & Han S. (2015). **Extraction Properties of Propolis with Ethanol Concentration.** Journal of Apiculture, 30(3): 211-216.
- Yang S., Peng L., Cheng Y., Chen F. & Pan S. (2010). **Control of Citrus Green and Blue Molds by Chinese Propolis.** Food Science Biotechnology, 19(5): 1303-1308.
- Yu L., Qiao N., Zhao J., Zhang H., Tian F., Zhai Q. & Chen W. (2020). **Postharvest control of *Penicillium expansum* in fruits: A review.** Food Bioscience, 100633.
- Zahid N., Ali A., Alderson P.G., Maqbool M. & Manickam S. (2013). **Dual Mode of Action of Ethanolic Extract of Propolis (EEP) for the Control of Postharvest Anthracnose in Dragon Fruits.** Acta Horticulturae, 1012: 711-718.
- Zin N.B.M., Azemin A., Muslim M., Rodi M. & Mohd K.S. (2018). **Chemical Composition and Antioxidant Activity of Stingless Bee Propolis from Different Extraction Methods.** International Journal of Engineering & Technology, 7(4.43): 90-95.
- Zulhendri F., Felitti R., Fearnley J. & Ravalia M. (2021). **The use of propolis in dentistry, oral health, and medicine: A review.** Journal of Oral Biosciences, 63(1): 23-34.

CAPÍTULO V – APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Atividade antifúngica de extratos de própolis contra diferentes agentes patogênicos em diversas culturas:

Tabela AP1 – Efeito de extratos de própolis contra microrganismos fitopatogênicos em frutos.

Cultura	Origem/ Tipo de própolis	Tipo de extrato	Concentração	Agente Patogênico	Resultados	Observações	Referência
Pera Rocha	Portugal	EHA	1:40 e 1:20	<i>Penicillium expansum</i>	Inibição do crescimento do micélio <i>in vitro</i> ; ↓ tamanho das lesões <i>in vivo</i> (40 e 23 %).	Sem efeitos tóxicos nos tecidos das frutas.	Sánchez <i>et al.</i> , 2016
Morango	Brasil (Própolis verde e castanho)	EE	0,5 e 2,5 %	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum gloesporioides</i> e <i>Rhizopus nigricans</i>	↓ crescimento radial do micélio de <i>B. cinerea</i> com EE de ambos os tipos de própolis a 2,5 % (43,23 e 38,53 %); ↓ severidade da doença provocada por <i>C. gloesporioides</i> em frutos tratados com EE de própolis verde a 0,5 %; ↓ incidência e severidade da podridão causada por <i>R. nigricans</i> com EE de ambos os tipos de própolis a 2,5 %.	Diferenças pouco significativas na ↓ da incidência e da severidade da podridão provocada por <i>B. cinerea</i> em ambos os tipos de própolis provavelmente devido às baixas concentrações utilizadas.	Moura <i>et al.</i> , 2016
Morango	Portugal	EHA e EA	0,1; 0,2; 0,5; 1 e 2 mg/ml	<i>Botrytis cinerea</i> e <i>Colletotrichum spp.</i>	↓ crescimento de ambos os fungos (~80 %), relação direta entre a concentração do extrato de própolis e a eficácia da inibição.	Efeito citotóxico do EE; ↑ concentração de compostos fenólicos e antioxidantes nos frutos; ↓ perda de água dos frutos.	Loebler <i>et al.</i> , 2018

Legenda: EHA – Extrato hidroalcoólico (elaborado com % etanol ≤ 70, v/v); EE - Extrato etanólico (elaborado com etanol absoluto); EA - Extrato aquoso; ↑ - Aumento; ↓ - Diminuição; × - Inibição;
PAL – Fenilalanina amônia-liase; PPO – Polifenoloxidase; POD – Peroxidase.

Tabela AP1 – Efeito de extratos de própolis contra microrganismos fitopatogênicos em frutos (cont.).

Toranja	Turquia	EHA	1, 5 e 10 %	<i>Penicillium</i> spp.	↓ decomposição por fungos com EE a 5 %, durante 5 meses, sem perda de qualidade.	↓ perda de peso nos frutos tratadas com EE a 5 e 10 %.	Özdemir <i>et al.</i> , 2010
Maçã	?	EHA	50, 100, 200 e 500 ml/L de PDA	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium</i> spp. e <i>Penicillium expansum</i>	↓ crescimento de todos os fungos, relação direta com a concentração do extrato.	↑ qualidade dos frutos.	Embaby <i>et al.</i> , 2019
Maçã	Iraque	EE	1, 2 e 3 %	<i>Penicillium expansum</i>	↓ da doença nas concentrações de 2 e 3%.	↓ produção de micotoxinas no tratamento com própolis.	Matny <i>et al.</i> , 2015
Laranja	Iraque	EHA	<i>In vitro</i> : 0,5; 1,5 e 3 % <i>In vivo</i> : 1, 2 e 3 %	<i>Penicillium digitatum</i>	↓ profundidade da podridão; ↓ severidade e incidência da doença, principalmente na concentração mais elevada.	-	Matny, 2015
Cereja	Turquia	EHA e EA	1, 5 e 10 %	-	↓ decomposição por fungos por 4 semanas.	Alteração das propriedades sensoriais e da cor do pedúnculo. EE sem eficácia <i>in vivo</i> ;	Çandir <i>et al.</i> , 2009
Manga	Brasil	EE	0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5 %	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	× crescimento do micélio e germinação com EE a 2,5 %.	Sem diferenças significativas nos parâmetros de qualidade dos frutos.	Mattiuz <i>et al.</i> , 2015

Legenda: EHA – Extrato hidroalcoólico (elaborado com % etanol ≤ 70, v/v); EE - Extrato etanólico (elaborado com etanol absoluto); EA - Extrato aquoso; ↑ - Aumento; ↓ - Diminuição; × - Inibição; PAL – Fenilalanina amônia-liase; PPO – Polifenoloxidase; POD – Peroxidase.

Tabela AP1 – Efeito de extratos de própolis contra microrganismos fitopatogênicos em frutos (cont.).

Papaia	China	EE	0,5; 1; 1,5 e 2 %	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	↓ crescimento do micélio; ↓ incidência e severidade da doença, com maior redução com EE a 1,5%.	-	Ali <i>et al.</i> , 2014
Pitaia	?	EE	0,25; 0,5; 0,75 e 1 %	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	× crescimento radial do micélio e germinação; ↓ severidade e incidência da doença, com melhores resultados com EE a 0,5%.	Indução de resistência à doença por ativação das enzimas PAL PPO e POD; Efeitos fitotóxicos em frutas tratadas com EE a 0.75 e 1%.	Zahid <i>et al.</i> , 2013
Pêra Rocha	Portugal	EHA e EE	0,2; 0,5 e 1 mg extrato seco/ml	<i>Stemphylium vesicarium</i>	× crescimento micelial (até 90 %); ↓ incidência da doença <i>in vivo</i> (25 %); ↓ diâmetro das lesões (57 %).	Maior ↓ da incidência da doença quando a aplicação do extrato é feita após inoculação e não antes.	Loebler <i>et al.</i> , 2020

Legenda: EHA – Extrato hidroalcoólico (elaborado com % etanol ≤ 70, v/v); EE - Extrato etanólico (elaborado com etanol absoluto); EA - Extrato aquoso; ↑ - Aumento; ↓ - Diminuição; × - Inibição; PAL – Fenilalanina amônia-liase; PPO – Polifenoloxidase; POD – Peroxidase.

Tabela AP2 - Efeitos de extratos de própolis contra microrganismos fitopatogênicos em vegetais.

Cultura	Origem/ Tipo de própolis	Tipo de extrato	Concentração	Agente Patogênico	Resultados	Observações	Referência
Soja	Brasil	EE	Aplicação foliar de 0, 106, 212 e 318 g de própolis bruto/ha	<i>Corynespora cassicola</i>	↓ severidade da doença provocada por <i>C. cassicola</i> .	↑ teor de água nas plantas; ↑ crescimento vegetativo; ↑ produtividade da soja até 23 % (mais 11 % que com os fungicidas).	Pereira <i>et al.</i> , 2017
Sorgo	Brasil	EHA	0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5 e 5 %	<i>Botrytis cinerea</i> e <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	Sem efeito na germinação de esporos; × desenvolvimento dos tubos germinativos com o aumento da concentração (maior efeito sobre <i>B. cinerea</i>).	Indução da síntese de fitoalexinas nos mesocótilos.	Baldin <i>et al.</i> , 2013
Pepino e Soja	Brasil	EHA	0,5; 1; 2; 4 e 8 %	<i>Podosphaera fuliginea</i>	↓ severidade da doença com a maior concentração usada.	Indução da síntese de fitoalexinas nos cotilédones da soja (resposta diretamente relacionada com a concentração).	Guginski-Piva <i>et al.</i> , 2015
Feijão-verde	?	EE	0, 5, 10 e 15 %	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	↓ germinação dos esporos na concentração mais elevada; ↓ incidência e severidade da doença em todas as concentrações testadas, relação direta com a concentração.	-	Abd-El-Kareem <i>et al.</i> , 2017

Legenda: EHA – Extrato hidroalcoólico (elaborado com % etanol ≤ 70, v/v); EE - Extrato etanólico (elaborado com etanol absoluto); EA - Extrato aquoso; ↑ - Aumento; ↓ - Diminuição; × - Inibição.

Tabela AP2 - Efeitos de extratos de própolis contra microrganismos fitopatogênicos em vegetais (cont.).

Chili	Verde brasileiro	EA	5 %	<i>Colletotrichum capsici</i>	↓ crescimento micelial (42 %).	↓ perda de peso; ↓ perda de firmeza; ↓ perda da cor da casca; ↓ perda da concentração de sólidos solúveis.	Ali <i>et al.</i> , 2013
Pepino	Austrália	Éter 0,1g/ml	1 %	<i>Erysiphe cichoracearwn</i>	↓ incidência da doença (33,4 %).	↑ área foliar total.	Robertson, 1990

Legenda: EHA – Extrato hidroalcoólico (elaborado com % etanol ≤ 70, v/v); EE - Extrato etanólico (elaborado com etanol absoluto); EA - Extrato aquoso; ↑ - Aumento; ↓ - Diminuição; × - Inibição.

CAPÍTULO VI - ANEXOS

ANEXO 1- Estados fenológicos da macieira

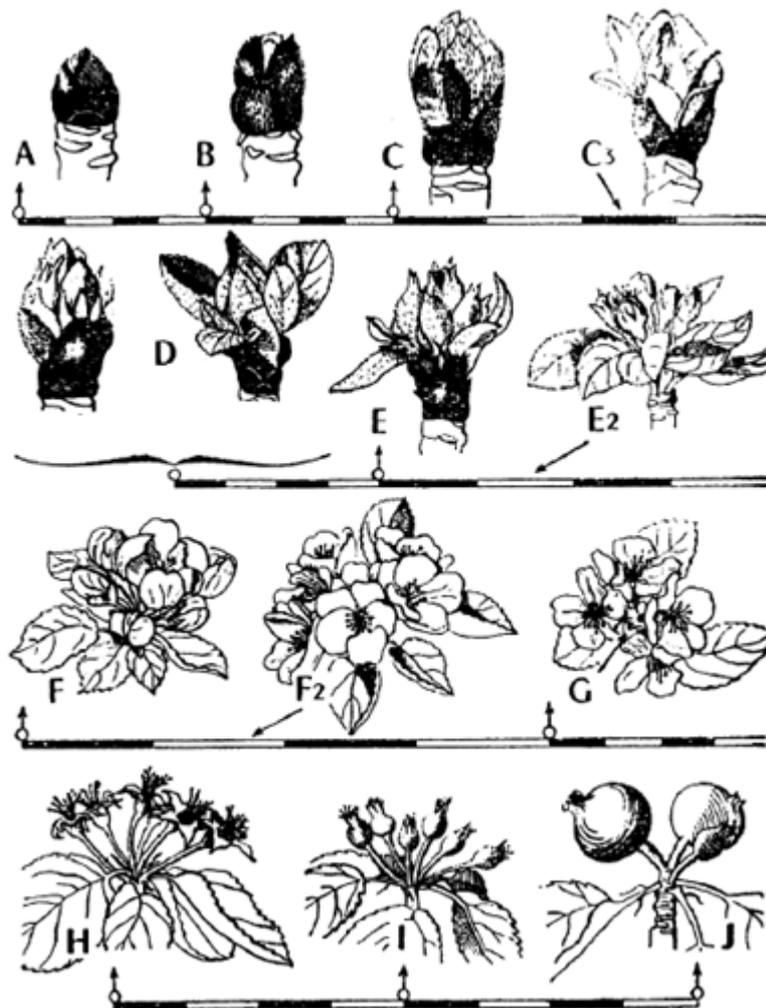


Figura AN1 - Estados fenológicos da macieira, segundo Fleckinger (1953). (A): Gomo dormente; (B) Pré-abrolhamento; (C) e (C3) Abrolhamento; (D) e (D2) Ponta verde; (E) Botão verde; (E2) Botão rosa; (F) Início da floração; (F2) Plena floração; (G) Queda das primeiras pétalas; (H) Queda das últimas pétalas; (I) Vingamento; (J) Desenvolvimento dos frutos (adaptado de DRAPN, 2013).

ANEXO 2 - Critérios de Mills para identificação dos períodos de risco para infecção por

V. inaequalis:

Tabela AN1 - Tempo de humectação (horas) para existência de infecção de pedrado (leve, moderada e acentuada) e o tempo de incubação (dias necessários para aparecimento de lesões e desenvolvimento de conídios), mediante diferentes temperaturas médias (adaptado de Gauthier, 2018).

Temperatura média (°C)	Tempo de folha molhada (h)			Período de incubação (dias)
	Níveis de infecção			
	Leve	Moderada	Acentuada	
25,6	13	17	26	-
25,0	11	14	21	-
24,4	9,5	12	19	-
17,2 - 23,9	9	12	18	9
16,7	9	12	19	10
16,1	9	13	20	10
15,6	9,5	13	20	11
15,0	10	13	21	12
14,4	10	14	21	12
13,9	10	14	22	13
13,3	11	15	24	13
12,8	11	16	24	14
12,2	11,5	16	25	14
11,7	12	17	26	15
11,1	12	18	27	15
10,6	13	18	29	16
10,0	14	19	30	16
9,4	14,5	20	30	17
8,9	15	20	35	17
8,3	17	23	38	17
7,8	19	25	41	17
7,2	20	27	45	17
6,6	22	30	51	17
6,1	25	34	60	17
5,5	30	40	93	17