

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE AGRONOMIA**

CHRISTIANI BALICKI

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DE *Tetragonisca angustula* NO CONTROLE DE
Sclerotinia sclerotiorum E *Rhizoctonia solani* EM ALFACE**

LARANJEIRAS DO SUL

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE AGRONOMIA

CHRISTIANI BALICKI

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DE *Tetragonisca angustula* NO CONTROLE DE
Sclerotinia sclerotiorum E *Rhizoctonia solani* EM ALFACE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para a obtenção do título de bacharelado em Engenharia Agrônoma.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Gilmar Franzener

LARANJEIRAS DO SUL

2023

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Balicki, Christiani
EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DE *Tetragonisca angustula* NO CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* E *Rhizoctonia solani* EM ALFACE / Christiani Balicki. -- 2023.
30 f.

Orientador: Doutor Gilmar Fransener

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Agronomia, Laranjeiras do Sul, PR, 2023.

I. Fransener, Gilmar, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

CHRISTIANI BALICKI

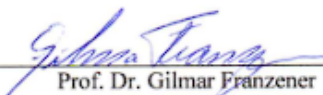
**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DE *Tetragonisca angustula* NO
CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* E *Rhizoctonia solani* EM ALFACE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia linha de formação em Agroecologia pela Universidade Federal da Fronteira Sul- *Campus* Laranjeiras do Sul (PR)

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Franzener

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 08/12/2023.

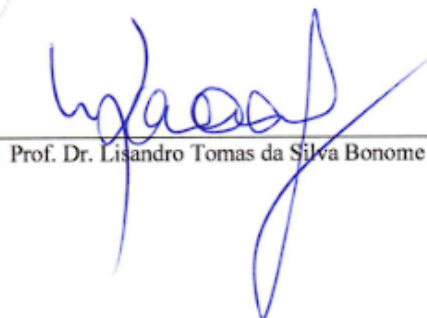
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Gilmar Franzener



Prof. Dr.ª Manuela Franco de Carvalho da Silva Pereira



Prof. Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me acompanhado em todos os momentos.

Agradeço também meus pais Antonio B. e Sueli B., meus irmãos Marcos B. e Anselmo B. por todo apoio, força e todo carinho que me ofereceram para que pudesse concluir essa etapa.

Minhas sobrinhas Jully G. B. e Isabelly V. S. B, em breve serão vocês.

Faço um agradecimento em especial ao CNPq (PES-2022-0387) pela concessão da bolsa. E ao meu Orientador Gilmar Franzener por todo conhecimento e orientação.

Meu menino Gustavo, todo esforço e todo empenho pensando em ti!

E não deixo de agradecer meus companheiros Alana H., Daniela S., Giovani M. e Felipe T. que deixaram os momentos mais leves e alegres.

EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DE *Tetragonisca angustula* NO CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* E *Rhizoctonia solani* EM ALFACE

RESUMO

Uma das principais abelhas sem ferrão utilizadas no Brasil é a *Tetragonisca angustula*, a qual frequentemente é utilizada para produção de mel e própolis, estando presentes na medicina popular e indústria farmacêutica para tratamento de enfermidades e também para consumo alimentício. Devido seu potencial microbiano o produto está sendo estudado para sanidade vegetal, apesar de haver atualmente escassos estudos. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial do uso do extrato de própolis de *T. angustula* no controle de fitopatógenos de solo que acometem a cultura da alface lisa Elisa (*Lactuca sativa* L.). A própolis foi obtida a partir da maceração por 15 dias em etanol 70%, seguido de uma filtração e diluição em diferentes concentrações de água destilada. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - Campus Laranjeiras do Sul (PR). Foram avaliadas as concentrações de 0, 1, 2, 3 e 4% do extrato etanólico da própolis sobre o crescimento dos fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, e no efeito protetor em plantas de alface em aplicações na parte aérea e no solo. O extrato de própolis promoveu significativa redução no crescimento de *R. solani* e *S. sclerotiorum*, bem como inibição na formação de escleródios de *S. sclerotiorum* *in vitro*. De maneira geral não foi observado efeito protetor em plantas de alface pela aplicação da própolis. Os resultados demonstram atividade antifúngica da própolis de *T. angustula* sobre fitopatógenos de solo, embora não foi verificado efeito protetor *in vivo*.

Palavras-chave: *Lactuca sativa*; Agroecologia; Fitopatógenos; Proteção de plantas;

PROPOLIS ETHANOLIC EXTRACT FROM *Tetragonisca angustula* IN THE CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* AND *Rhizoctonia solani* IN LETTUCE

ABSTRACT

One of the main stingless bees used in Brazil is *Tetragonisca angustula*, which is often used to produce honey and propolis, being present in popular medicine and the pharmaceutical industry for treating illnesses and also for food consumption. Due to its microbial potential, the product is being studied for plant health, although there are currently few studies. The objective of the work was to evaluate the potential of using *T. angustula* propolis extract in the control of soil phytopathogens that affect the Elisa lettuce (*Lactuca sativa* L.) crop. Propolis was obtained from maceration for 15 days in 70% ethanol, followed by filtering and dilution in different concentrations of distilled water. The experiments were conducted at the Phytopathology Laboratory of the Federal University of Fronteira Sul (UFFS) - Campus Laranjeiras do Sul (PR). Concentrations of 0, 1, 2, 3 and 4% of the ethanolic extract of propolis were evaluated on the growth of the fungi *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*, and on the protective effect on lettuce plants in aerial and soil applications. Propolis extract promoted a significant reduction in the growth of *R. solani* and *S. sclerotiorum*, as well as inhibition of the formation of *S. sclerotiorum* sclerotia in vitro. In general, no protective effect was observed on lettuce plants due to the application of propolis. The results demonstrate antifungal activity of *T. angustula* propolis against soil phytopathogens, although no protective effect was found in vivo.

Keywords: *Lactuca sativa*; Agroecology; Phytopathogens; Plant protection;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
3.1 CULTURA DA ALFACE (Lactuca sativa L.).....	11
3.2 DOENÇAS DA CULTURA DA ALFACE.....	12
3.2.1 Podridão de Sclerotinia ou Mofo branco.....	12
3.2.2 Doenças da “Queima da saia”.....	13
3.3 PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS.....	13
3.4 ABELHA JATAÍ.....	13
3.5 PRÓPOLIS.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO.....	21
5.2 ENSAIOS DE PROTEÇÃO EM PLANTAS DE ALFACE.....	23
6 CONCLUSÃO.....	25

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L) é uma das culturas mais importantes do cenário agrícola, principalmente na horticultura, sendo a principal folhosa plantada e consumida em todo o Brasil, mesmo com a ocorrência de diferenças climáticas e os hábitos de consumo (COSTA; SALA, 2005).

Afetada por diferentes tipos de fitopatógenos (oomicetos, fungos, bactérias, vírus e nematoides), desordens fisiológicas e nutricionais é a cultura da alface (*Lactuca sativa* L.), a qual requer grande cuidado pois se trata de uma folhosa consumida crua. E para acompanhar a exigência visual do consumidor por folhas mais uniformes, é utilizado uma variada gama de agrotóxicos que podem causar efeitos negativos ao ambiente e na saúde de produtores e consumidores (LOPES et al., 2010).

Dentre as principais doenças se destacam os fitopatógenos de solo *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, que podem causar podridões em diferentes partes da planta.

Segundo dados da ANVISA (2019), o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) demonstrou que dentre as 4.616 amostras de 14 alimentos de origem vegetal no ano de 2017-2018, cerca de 23% foram considerados insatisfatórios em relação à conformidade com o LMR da Anvisa apresentaram resultados, os quais mostraram a presença de agrotóxicos não autorizados e de resíduos acima do permitido. E a alface, devido sua taxa de 30% da presença total de resíduos inadequados, fica entre as hortaliças com maior teor de detecção de resíduos de produtos.

A agricultura atualmente utiliza grandes quantidades de produtos químicos, para controle de pragas, doenças e plantas espontâneas, os quais em alguns casos se observa utilização desenfreada e inadequada, portanto é necessário a fiscalização para que o uso seja responsável ou que possa ser reduzido utilizando outras alternativas (ALMEIDA et al., 2017).

Sendo assim, torna-se de fundamental importância a busca por alternativas mais sustentáveis de manejo fitossanitário tendo em vista a segurança ambiental e da segurança alimentar (EMBRAPA, 2018).

Com o aumento da necessidade de boas práticas para alimentos seguros, é imprescindível que haja alternativas para sanar os problemas que podem ocorrer, portanto produtos naturais, biológicos e de baixo teor de toxicidade vem ganhando espaço no mercado agrícola.

A própolis é uma dessas alternativas, produzida por abelhas, as quais retiram de brotos, cascas, botões florais e exsudatos de plantas (BASTOS, 2010). A própolis mais conhecida e comercializada é das abelhas tradicionais *Apis mellifera*, a qual é conhecida pelos efeitos microbianos em humanos. No Brasil há diversas espécies de abelhas nativas e sem ferrão e dentre elas a *Tetragonisca angustula* conhecida como abelha jataí, a qual também produz a própolis com efeito eficiente antimicrobiano em humanos (MIORIN et al., 2003; RAO et al., 2016), no entanto ainda pouco estudada. Portanto, são necessários estudos para avaliação e maior compreensão do potencial uso da própolis de *Tetragonisca angustula* na agricultura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso do extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca angustula* para controle de fitopatógenos da alface (*Lactuca sativa* L.).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de extrato etanólico de própolis sobre os fungos causadores do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e queima da saia (*Rhizoctonia solani*).

Avaliar o efeito do extrato etanólico de própolis no controle do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e queima da saia (*Rhizoctonia solani*) em plantas de alface.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CULTURA DA ALFACE (*Lactuca sativa* L.)

A alface é pertencente à família Asteraceae, apresenta porte herbáceo, caule diminuto e folhas sobrepostas formando uma roseta, a coloração das folhas variam conforme a variedade podendo ser de diferentes tons de verde e também arroxeados. É originária de locais de clima temperado, portanto sendo exigente em temperaturas amenas. (HENZ; SUINAGA, 2009).

O plantio é indicado em locais onde as temperaturas estejam entre 18 a 25°C. No Brasil, em locais onde a altitude é elevada o plantio pode ser realizado o ano todo. Porém na região sudeste do Brasil é indicado o plantio no período do inverno e do outono.

Por se tratar de uma cultura adaptada a temperaturas mais frias do ano e o pico de consumo está no período de temperaturas mais altas, há uma série de inovações a serem buscadas para melhor produção em períodos quentes, para que supra a demanda do consumidor, e para isso além de variedades resistentes e ambiente controlado, deve haver alternativas para o controle de pragas e doenças que podem aumentar durante a produção (RODRIGUES, 2019).

Nutricionalmente, a alface possui baixo teor de calorias, sendo rica em água, sais minerais e vitaminas, principalmente A, K e o Ca (FRANCO, 2002; RODRIGUES, 2019). Seu consumo é principalmente *in natura*, em saladas e sanduíches.

3.2 DOENÇAS DA CULTURA DA ALFACE

3.2.1 Podridão de *Sclerotinia* ou Mofo branco

O agente causal da doença é o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, o qual ocorre em qualquer estágio de desenvolvimento das plantas, porém a doença ocorre em plantas próximas ao período de colheita, sendo favorecida por períodos úmidos e com temperaturas que variam de 10°C a 20°C. Os sintomas ocorrem na região basal da planta e provoca apodrecimento do caule e da base das folhas, os tecidos vão se degradando e trazendo aspecto molhado de podridão mole. E no colo das plantas ocorre a necrose total do tecido, tendo uma superfície de aspecto cotonoso¹ de micélio branco e o crescimento de escleródios (AMORIM, 2016).

Os sintomas são observados principalmente em plantas adultas próximas ao ponto de colheita e em folhas mais velhas, as quais entram em contato com o solo e, por isso, permanecem mais úmidas. As medidas de controle podem ser o manejo cultural como plantio em solos bem drenados os quais não favoreçam a ocorrência de acúmulo de água na superfície, o plantio deve ser feito em locais sem a ocorrência da doença. No período de maior ocorrência de frio e chuvas recomenda-se fazer o plantio em maiores espaçamentos entre plantas, favorecendo deste modo o aumento da ventilação entre as mesmas. Além disso, recomenda-se a rotação de culturas com gramíneas por pelo menos 3 anos (EMBRAPA, 2010; QUEIROZ et al, 2012).

¹ **Cotonoso:** Revestido de lanugem ou de pelos semelhantes a algodão.

3.2.2 Doenças da “Queima da saia”

A queima da saia é uma doença causada pelo fungo *Rhizoctonia solani*, a qual está relacionada aos inóculos no solo em locais onde a alface é produzida, sendo um perigo para a produção subsequente (AMORIM, 2016).

Os sintomas aparecem inicialmente nas folhas basais e na região mediana, apresentando-se com aspecto murcho e seco, as quais posteriormente morrem. Na região interna das plantas os sintomas de murcha, além do crescimento do micélio de coloração branca inicialmente e com o tempo torna-se amarelado em estádios mais avançados. Logo ao desenvolvimento da doença ocorre o crescimento de numerosos escleródios de tamanho pequeno e coloração branca a pardo-escura. A doença ocorre principalmente em condições de alta umidade e temperatura entre 15°- 25°C (AMORIM, 2016).

3.3 PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

Na agricultura atualmente, há produtos derivados de substâncias não prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente, a serem utilizados na produção de alimentos, desde que estejam em conformidade de sua toxicidade, e haja eficiência no combate dos fitopatógenos e pragas com preço justo para a utilização. Estes ainda podem ser estimulantes do metabolismo das plantas aumentando a sua resistência a possíveis ataques. Nesse nicho podemos citar os biofertilizantes líquidos, as caldas, feromônios, extratos de plantas e de óleos (AYRES et al., 2020).

Porém com o uso indiscriminado de produtos, podem ser perigosos ao meio ambiente, nesse caso pois são produtos que serão aplicados no solo, podendo ter poder residual, contaminando o solo ou eliminando os microrganismos benéficos presentes, ocasionando um impacto severo a produção subsequente (SEABRA; SCORZA JÚNIOR, 2016).

3.4 ABELHA JATAÍ

Abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) são insetos de pequeno porte. Também são chamadas de abelhas sem ferrão ou abelhas indígenas, de importante contribuição como agentes polinizadores (CARVALHO et al., 2003; LOPES, 2015).

Ocorrem naturalmente pelo território brasileiro, sendo criadas principalmente no interior do estado de São Paulo (VILLAS-BÔAS; MALASPINA, 2005; ANACLETO et al., 2009). No estado do Paraná, os estudos de Proní (2008) com abelhas sem ferrão na bacia do Rio Tibagi, de Parpinelli (2016) sobre a qualidade microbiológica e caracterização físico-química do mel deste tipo de abelha e de Schreiner (2022), com a avaliação da

atividade antioxidante e antibacteriana do própolis oriunda de abelhas meliponídeas, demonstram a importância do estudo desta temática.

Seu mel tem crescente utilização no mercado. Além do seu consumo *in natura*, possui propriedades medicinais e antibactericidas (LOPES, 2015). Suas produções podem variar de 0,5 até 1,5 Litros de mel/ano (NOGUEIRA-NETO, 1997; ANACLETO et al., 2009).

Suas colméias são na forma de ninho, geralmente com apenas uma única entrada e no formato de tubo de cera (resina) (CARVALHO et al., 2003). Neste tubo e outros locais na colmeia, as abelhas confeccionam um material para preenchimento/isolamento, chamado de própolis, reconhecidos pela sua atividade antioxidante e antimicrobiana (SCHREINER, 2022).

3.5 PRÓPOLIS

O própolis é um produto resinoso que é produzido pelas abelhas melíferas através de substâncias coletadas em partes diferentes de plantas, isso inclui brotos, cascas, botões florais e exsudatos resinosos. A sua composição possui em torno de 300 substâncias diferentes (FISCHER et al., 2008). O qual depende, além da botânica, da estação de coleta e condições geográficas para a composição do produto final (VASILAKI et al., 2019).

O produto retirado da colméia é chamada de própolis bruta, tendo composição de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra (MENEZES, 2005).

A composição química do composto responsável pela ação biológica e de odor do própolis é de terpenóides, sendo este cerca de 10% da própolis, podendo ser composta de monoterpenos, diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos (GALINDO, 2007).

A própolis é principalmente utilizada em solvente alcoólico, pois se trata de um composto resinoso e não dilui em água, porém alternativas como extrato de óleo de própolis demonstram que há uma redução significativa de teores de flavonóides e a capacidade antioxidante do DPPH e FRAP são inferiores, por isso ainda se mostra compatível com o uso mais eficiente da própolis quando em extrato alcoólico) (FERREIRA et al., 2023).

A própolis se mostra promissora para utilização para tratamentos envolvidos a microrganismos causadores de doenças em humanos, como citado por KROL et al., (1996), a utilização do extrato da própolis de *T. angustula* e *A. mellifera* sobre bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis*, o qual se mostrou eficaz no tratamento.

Já em outros trabalhos envolvendo doenças de plantas, a utilização do extrato etanólico de abelha *Apis mellifera*, possui capacidade de inibição dos fungos causadores da

brusone (*Pyricularia grisea*), giberela (*Fusarium graminearum*), helmintosporiose (*Bipolaris sorokiniana*) e ferrugem do trigo (*Puccinia triticina*) (GOMES, 2023).

Segundo AZEVEDO (2023), a utilização do composto de extrato etanólico de própolis, suspensão de *Bacillus subtilis* e óleo de neem, possuem eficácia no uso para a inibição do crescimento do fungo causador da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul-PR. Foram realizados ensaios em condições de laboratório e casa de vegetação.

Obtenção do preparado de própolis

A própolis foi obtida a partir de apiários da cidade de Laranjeiras do Sul-PR. O preparado foi obtido inicialmente a partir da retirada de possíveis impurezas e então adicionado álcool etílico P. A. 70%, sendo a proporção com base em peso/peso de própolis bruta e álcool de 20:80%. Depois da mistura adequada dos componentes, a solução ficou em “repouso” por um período de 15 dias, sendo agitado por 1 minuto a cada dia. Após 15 dias a solução foi filtrada em papel quantitativo e em membrana de nitrocelulose (tipo Millipore) 0,45 µm de poro utilizando bomba de vácuo, e mantido em frasco de vidro âmbar, em escuro, até o emprego nos experimentos. O extrato obtido então foi diluído em água destilada nas concentrações de 1%, 2%, 3% e 4% para ser utilizado nos experimentos, sendo que cada concentração representou um tratamento. A testemunha foi constituída de apenas água destilada e meio de cultura BDA (Batata-dextrose ágar).

Isolamento, manutenção e preparo do inóculo dos fitopatógenos

Os fungos *Sclerotinia scleroriorum* e *Rhizoctonia solani*, foram obtidos da coleção micológica do Laboratório de Fitopatologia, provenientes de áreas de cultivo de alface do município de Laranjeiras do Sul-PR. Os fungos foram cultivados em placas de Petri (100 x 25 mm) em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e então mantidos em BOD na temperatura contínua de 25°C, em escuro.

O preparo do inóculo para os experimentos *in vivo* foi realizado em frasco Erlenmeyer contendo 150 g de arroz e 200 mL de água destilada, seguida de autoclavagem a 120 °C por 20 min (Figura 1). Depois do resfriamento foi inoculado com três discos de micélio de 5 mm

do respectivo fungo. Os frascos foram incubados em BOD a 25 °C, em escuro até a completa colonização pelo patógeno.

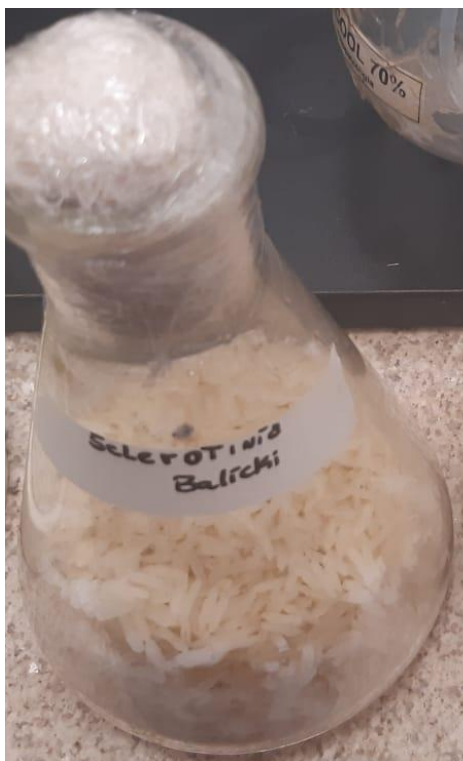


Figura 1. Frasco de Erlenmeyer para cultivo do inóculo do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em arroz.

Ensaio de atividade antifúngica

Foram realizados bioensaios com a avaliação do efeito do própolis sobre os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, na determinação do crescimento micelial.

As respectivas concentrações de própolis foram adicionadas ao meio BDA antes de verter em placas de Petri (100 x 15 mm). Após solidificar o meio, foi adicionado um fragmento de sete mm de diâmetro do patógeno (Figura 2), obtido de colônias com sete dias de crescimento no meio BDA. Então foi feita a passagem das bordas das placas no fogo de uma lamparina para evitar a entrada de contaminantes e então vedadas com plástico filme e colocadas em BOD a 25°C, em escuro.

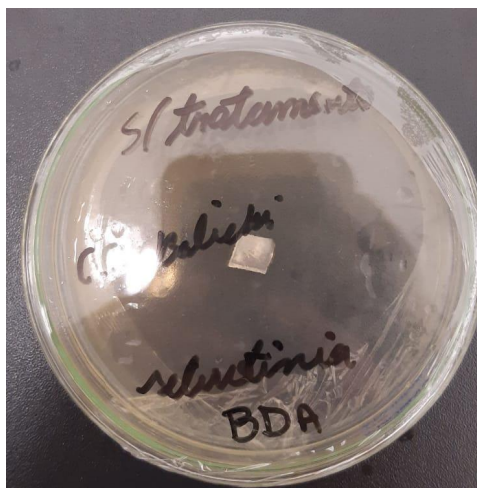


Figura 2. Representação da placa de Petri com o meio de cultura BDA + fragmento do inóculo.

O crescimento foi determinado a cada dois dias através da média do diâmetro do crescimento micelial de duas medidas perpendiculares das placas até quando as maiores colônias atingirem as bordas da placa. Para o fungo *S. sclerotiorum* também foi realizada a contagem dos escleródios formados ao final do experimento.

Um outro experimento foi conduzido nos moldes do anterior, mas nesse caso ao invés de discos de micélio dos fungos, foi avaliado o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* a partir de escleródios. Nesse caso um escleródio, de aproximadamente de 3 mm de diâmetro foi adicionado ao centro da placa contendo meio de cultura BDA com os tratamentos. A avaliação do crescimento a partir dos escleródios foi avaliada pelo diâmetro médio do crescimento micelial após 24 horas e 96 horas de incubação.

Ensaio de proteção de plantas

Bioensaios *in vivo* foram conduzidos em plantas de alface cv. Elisa. Para tanto, mudas com aproximadamente 30 dias foram transplantadas em copos de plástico de 400 mL contendo composto orgânico (substrato para mudas e húmus de minhoca 1:1 v/v), e mantidas em casa de vegetação climatizada, com temperaturas médias de 26°C e irrigadas conforme a necessidade da cultura para ambos fitopatógenos.

Para o experimento do mofo branco (*S. sclerotiorum*), foram incorporados 1 g do inóculo cultivado em arroz ao solo a aproximadamente 1 cm do colo da planta, como

observado na Figura 4 a disposição dos inóculos em contato com o solo e na Figura 5 o estabelecimento do plantio das plantas.



Fonte: Flaticon (adaptado), s.d.

Figura 4. Representação do inóculo de 1g inserido em cada lado da planta na solo.



Figura 5. Plantio das alfaces e inoculação do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em arroz.

Após a inoculação, realizou-se os tratamentos na parte aérea ou no solo. Na parte aérea, a aplicação foi realizada diretamente nas folhas com auxílio de um borrifador até o ponto de escorrimento. O solo foi protegido para evitar contaminação pelo tratamento escorrido. No solo a aplicação foi realizada no volume de 4 mL com auxílio de pipeta. Foram

conduzidas a avaliação da incidência e severidade a cada dois dias dos sintomas que ocorreram utilizando a escala de notas, estabelecendo as notas 1 (0 folhas afetadas), nota 2 (1 folha afetada), nota 3 (2 folhas afetadas) e nota 4 (toda a planta afetada) como observado na Figura 6, a escala de notas realizada com diferentes progressões e avaliar a incidência e severidade.

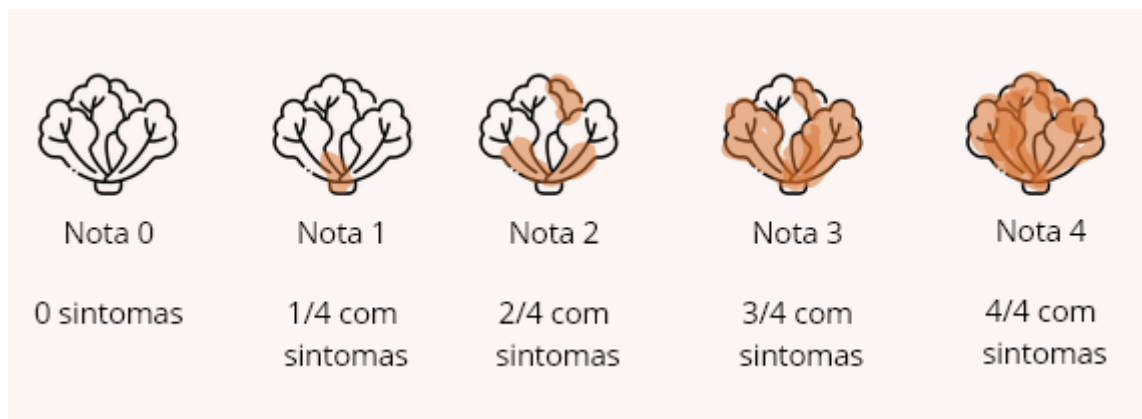


Figura 6. Representação da escala de notas utilizada para a medição.

Para o experimento com o fungo da queima da saia (*Rhizoctonia solani*) a inoculação foi realizada pela adição de 2 fragmentos de 3 mm de diâmetro dispostos sobre a face superior de duas folhas da alface (Figura 7), pois é um patógeno que costuma infectar a parte aérea a partir de respingos do inóculo do solo. Nesse caso a aplicação dos tratamentos foi realizada somente na parte aérea, mas em dois períodos, 48 horas antes da inoculação e 48 horas após a inoculação.



Figura 7. Disposição dos fragmentos de meio de cultura BDA com inóculo de *Rhizoctonia solani* nas folhas jovens das mudas de alface.

No experimento com *R. solani* os sintomas foram avaliados a cada dois dias através do diâmetro médio das lesões nas folhas inoculadas. Nos experimentos *in vivo*, para contemplar todo período de avaliação, a severidade foi estimada com o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (BALBI-PEÑA et al., 2006).

Delineamento experimental e análise dos dados

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados com cinco repetições. Os dados foram então submetidos a teste de normalidade e homogeneidade, e realizada transformação dos dados em raiz de $x + 0,5$ para análise, quando pertinente. Em seguida foi realizada análise de regressão para as diferentes concentrações dos extratos e teste de média de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa computacional Sisvar (FERREIRA, 2018).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

O extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca angustula* promoveu redução linear no crescimento micelial, com maior inibição com o aumento nas concentrações utilizadas (Figura 6). Resultados semelhantes foram observados na formação de escleródios de *S. sclerotiorum*, com maior inibição nas maiores concentrações (Figura 8).

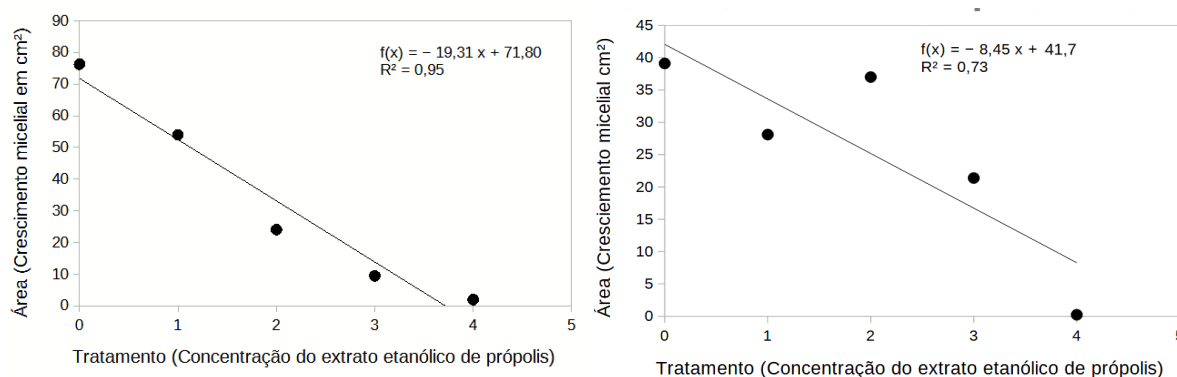


Figura 8. Área de crescimento micelial (esquerda) e número de escleródios (direita) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca angustula*.

A concentração é um fator importante, pois em estudos similares, indicam que a utilização de extrato de própolis nas concentrações de principalmente 400 e 500 μL^{-1} , respectivamente, mostraram que houve maior inibição do crescimento do fungo *S. sclerotiorum* (MACEDO, 2023).

O crescimento vigoroso do micélio é um importante fator que o patógeno usa para causar infecção em plantas, portanto, esse efeito inibitório observado da própolis pode contribuir no uso para proteção das plantas. Além disso, os escleródios são importantes estruturas de resistência do fungo que podem perdurar por até 10 anos viáveis no solo, portanto a inibição dessas estruturas contribui na redução do inóculo (BASTOS, 2010; AMORIM et al., 2016).

No experimento de crescimento micelial de *R. solani* observou-se redução drástica na área das colônias já a partir da concentração de 1%, com inibição total na concentração de 4% da própolis (Figura 9). Esses resultados demonstram que o extrato de própolis apresenta elevada atividade antifúngica sobre o patógeno *R. solani*.

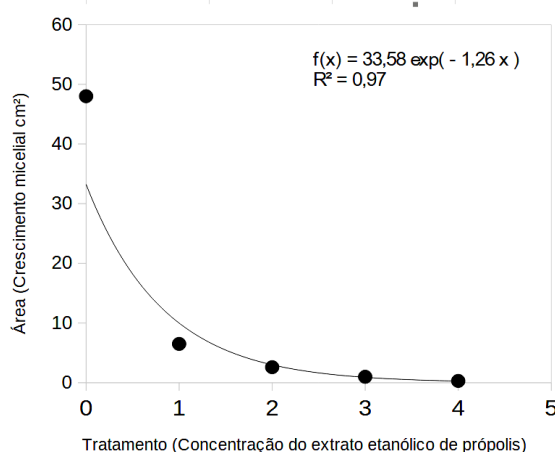


Figura 9. Área de crescimento micelial a partir do fungo *Rhizoctonia solani* em meio BDA com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca angustula*.

No experimento em que foi avaliado o desenvolvimento do fungo a partir de escleródios sob diferentes concentrações da própolis, observou-se efeito significativo no crescimento do fungo a partir dos escleródios já a partir de 24 h de incubação (Figura 10). Após 96 h a inibição foi ainda mais acentuada.

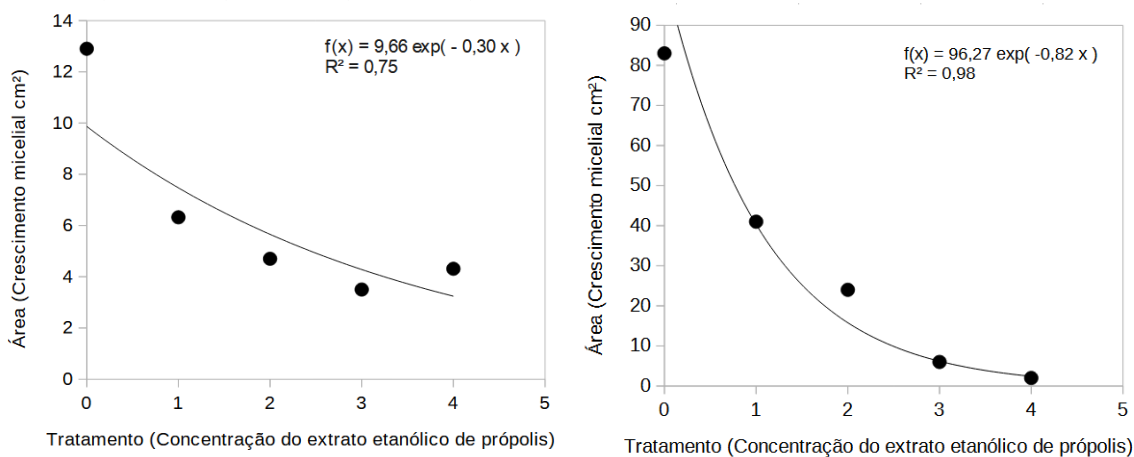


Figura 10. Área de crescimento micelial a partir do escleródio do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca angustula*, após 24 horas (esquerda) e 96 horas (direita) de incubação.

A própolis tem demonstrado atividade antimicrobiana sobre diferentes microrganismos, indicando potencial no controle desses organismos (BASTOS, 2010). No entanto, grande parte das pesquisas realizadas até o momento se referem a própolis de *Apis*

mellifera na utilização farmacêutica e escassos estudos sobre microrganismos de importância agrícola.

Assim, é de grande importância ampliar os estudos e a realização de pesquisas *in vivo* para aprofundar os resultados e compreensão de mecanismos envolvidos. Em comparativo com fungicidas, a própolis também possui grande relevância como demonstrado no trabalho de Barbosa & Vieira (2015), que também retoma a confirmar que há a capacidade de inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* a partir da concentração de 16 mL/L.

5.2 ENSAIOS DE PROTEÇÃO EM PLANTAS DE ALFACE

No experimento de avaliação do mofo branco em plantas de alface inoculadas com *S. sclerotiorum* houve a incidência da doença em todas as plantas inoculadas. No entanto, não foi observada diferença significativa na severidade da doença com base no cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Figura 11), tanto nas plantas em que a aplicação da própolis foi realizada na parte aérea como nas aplicações no solo.

Os valores de AACPD são indicadores importantes da severidade pois considera as diferentes avaliações da severidade durante a ocorrência da doença, então reflete todo período de avaliação. A ausência de diferenças significativas com a aplicação da própolis possivelmente se deve ao fato do rápido e vigoroso desenvolvimento do patógeno, bem como às condições favoráveis para manifestação da doença.

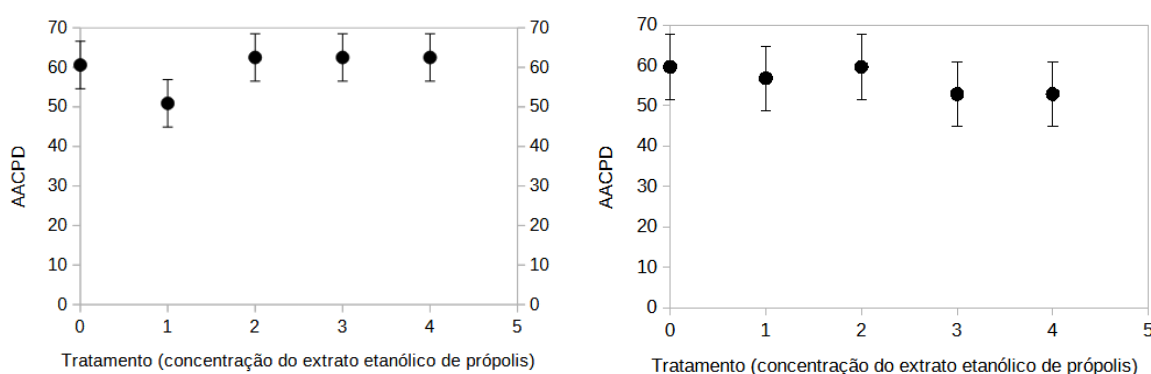


Figura 11. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) mofo branco causada por *S. sclerotiorum* em plantas de alface após tratamento com diferentes concentrações de extrato

de própolis de *Tetragonisca angustula* em aplicação na parte aérea (direita) e no solo (esquerda).

No experimento realizado com o fungo *R. solani*, também não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, tanto nas aplicações realizadas 48 horas antes da inoculação como em aplicações 48 horas após a inoculação (Figura 12). Nas condições do experimento o fungo manifestou sintomas caracterizados por lesões em folhas inoculadas, no entanto os sintomas se manifestaram de forma menos agressiva do que *S. sclerotiorum*, pois não chegou a afetar toda a planta no período de avaliação.

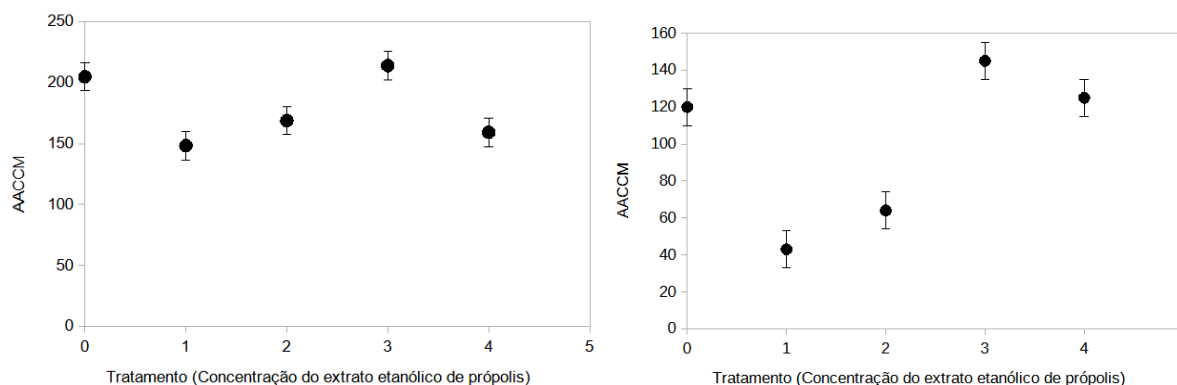


Figura 12. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), da queima da saia em plantas de alface tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca angustula* aplicados 48 horas antes (acima) ou 48 horas após (abaixo) a inoculação com *Rhizoctonia solani*.

O fungo *Rhizoctonia solani* embora seja considerado um fitopatógeno de solo, em plantas de alface costuma afetar a parte aérea, causando a doença conhecida como queima da saia (AMORIM, 2016), pois causa lesões em folhas que tiveram contato com o inóculo, geralmente por respingos de chuva ou irrigação.

Embora o extrato etanólico de própolis tenha apresentado efeito antifúngico *in vitro* sobre os fitopatógenos estudados esses resultados não se reproduziram em condições *in vivo*, possivelmente devido às condições muito favoráveis aos patógenos que permitiram o rápido

desenvolvimento dos mesmos. Torna-se importante aprofundar estudos nesse sentido de forma a permitir maior compreensão das condições e mecanismos de atuação da própolis.

6 CONCLUSÃO

O extrato etanólico de própolis de *T. angustula* apresentou ação inibitória direta sobre o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* e na formação de escleródios de *S. sclerotiorum*. O extrato etanólico de própolis de *T. angustula* não apresentou efeito protetor em plantas de alface à *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. D; et al.. A flexibilização da legislação brasileira de agrotóxicos e os riscos à saúde humana: análise do Projeto de Lei nº 3.200/2015. **Cadernos De Saúde Pública**. 2017. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00181016>

AMORIM, L. et al. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda., 2016. 810 p.

ANACLETO, D. de A., et al. **Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula latreille, 1811*)**. Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Aplicada, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Esalq. Universidade de São Paulo – USP. Piracicaba - SP, Brasil. 2009.

ANVISA. **Programa de análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos - PARA**. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>. Acesso em: 14 de Setembro de 2023.

AYRES, M. I. C.; et al.. **Manejo alternativo para “pragas” e doenças**. INPA. 2020. Disponível em: https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/35814/1/Cartilha_Defensivos_Naturais.pdf. Acesso em: 12 de Maio de 2023.

AZEVEDO, L. C. A. **Proteção de mudas de cafeeiro à ferrugem com aplicação de óleo de neem, silício, própolis e *Bacillus subtilis***. 2023. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/bitstream/prefix/6817/1/AZEVEDO%20JUNIOR.pdf>. Acesso em: 22 de Novembro de 2023.

BARBOSA, M. S., VIEIRA, G. H. C. Potencial da própolis no controle do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* causador de doenças em hortaliças. 2015. **Anais do 10º ENIC**. Disponível em: <https://anaisonline.uems.br/index.php/enic/article/view/1839/1749>. Acesso em: 28 de Nov. de 2023.

BASTOS, I. B. N. **Própolis: revisão bibliográfica**. Repositório UFMG. 2010. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-952NM6/1/monografia_isabella_bastos.pdf. Acesso em: 30 de Junho de 2023.

CARVALHO, C. A. L. et al. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química**. Cruz das almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005. 32 p

COLARICCIO, A. et al., **Aspectos fitossanitários da cultura da alface**. Instituto biológico. 2017. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/pdf/Boletins/Alface_2017/boletim_alface.pdf. Acesso em: 25 de Outubro de 2023.

DIAS, et al., **Controle de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* por biopreparados de isolados de *Trichoderma* spp.** 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/GFN9QNB4JS7DV7zbpPrNsmw/?format=pdf>. Acesso em: 22 de Setembro de 2023.

EMBRAPA. **Doenças da Alfaca.** 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107340/1/CNPH-DOCUMENTOS-14-DOENCAS-DA-ALFACE-FL-07824.pdf>. Acesso em: 12 de Outubro de 2023.

EMBRAPA. **Visão 2030 O futuro da agricultura brasileira.** 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/10180/9543845/Vis%C3%A3o+2030+-+o+futuro+da+agricultura+brasileira/2a9a0f27-0ead-991a-8cbf-af8e89d62829?version=1.1>. Acesso em: 12 de Setembro de 2023.

FERREIRA, A. R. et al.. Propolis oil extract as an alternative means to the alcoholic extract. **Revista observatorio de la economía latinoamericana.** Curitiba, v.21, n. 10, .15657-15676. 2023. Disponível em: <https://ojs.observatoriolatinoamericano.com/ojs/index.php/olel/article/view/1236/1139>. Acesso em: 12 de Out. de 2023.

FERREIRA, D.F. SISVAR: **Sistema de análise de variância para dados balanceado.**, versão 5.8. Lavras: DEX/UFLA, 2018. CD-ROM. Software.

FISCHER, G; et al. Imunomodulação pela própolis. **Arq. Inst. Biológico**, v.75, n.2, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/ppDyV3CZJcgbT37N3k5WDPq/?lang=pt>. Acesso em: 14 de Junho de 2023.

FRANCO, V. M. F.; ROHDE, L.E.P. **Efeito da vitamina k da dieta na anticoagulação oral crônica: evidências prospectivas observacionais e randomizadas.** 2002. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/1613/000353295.pdf>. Acesso em: 13 de Outubro de 2023.

EMBRAPA. **VISÃO 2030 O Futuro da Agricultura Brasileira.** 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/10180/9543845/Vis%C3%A3o+2030+-+o+futuro+da+agricultura+brasileira/2a9a0f27-0ead-991a-8cbf-af8e89d62829?version=1.1>. Acesso em: 22 de Outubro de 2023.

GASPAROTTO, L. **Sobrevivência de *Sclerotinia sclerotiorum* em Solos Cultivados com Gramíneas e Controle Químico da Podridão da Alfaca.** 1980. Disponível em:

GALINDO, A. B. **A composição química pertencente aos princípios biológicos e de odor, são chamados de terpenóides, sendo este cerca de 10% da própolis, podendo ser composta de monoterpenos, diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos.** 2007. Disponível em: https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/3527/1/arquivo6187_1.pdf. Acesso em: 13 de Setembro de 2023.

- GOMES, G. R., **Ação antifúngica sobre fitopatógenos e atividade de enzimas relacionadas à defesa em trigo pelo extrato etanólico de própolis**. 2023. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/bitstream/prefix/6787/1/GOMES.pdf>. Acesso em: 22 de Nov. de 2023.
- HENZ, G. P.; SUINAGA, Fábio. **Tipos de alface cultivados no Brasil**. Embrapa. 2009. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/783588/1/cot75.pdf>. Acesso em: 27 de Maio de 2023.
- KROL, W, et. al. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components, **J. Ethnopharm.** v.55, n.1, 19–25, 1996.
- LOPES, A. E. P. **Caracterização físico-química do mel da abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*)**. 2015. Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/12373>. Acesso em: 27 de Novembro de 2023.
- LOPES, C. A. et al. **Doenças da alface**. Embrapa. 1998. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107340/1/CNPH-DOCUMENTOS-14-DOENCAS-DA-ALFACE-FL-07824.pdf>. Acesso em: 13 de Junho de 2023.
- LOPES, C. A. et al. **Doenças da alface**. Embrapa. 2010. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/866064.pdf>. Acesso em: 13 de Junho de 2023.
- LOPES, C. A., QUEZADO-DUVAL, A. M. **Doenças da alface**. 1998. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/765605>. Acesso em: 20 de Setembro de 2023.
- LOPES, P. R., et al.. Sanidade vegetal na perspectiva da transição agroecológica. **Revista Fitos**, v.13, n.2, p.178-194, 2019.
- MACEDO, L. P., et al. Efeito fungicida agrícola do extrato de própolis de *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811. **Brazilian Journal of Science**, v. 2, n.11, 65-71, 2023. ISSN: 2764-3417.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, 405–411, 2005. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v72p4052005>
- MIORIN, P. L. et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 913–920, 2003.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 997. 446 p.
- PARPINELLI, R. S.. **Qualidade microbiológica e caracterização físico-química de amostras de mel de abelhas sem ferrão de seis regiões do estado do Paraná**. 2016.

PRONÍ, E. A.. Biodiversidade de abelhas indígenas sem ferrão Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) na bacia do rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 3, n. 2, 2000.

QUEIROZ, C. A., et al. Efeito de gramíneas forrageiras sobre a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* e atividade microbiana do solo. 2012. **Anais da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/64837/1/4RRF.pdf>. Acesso em: 22 de Setembro de 2023.

RAO, P. V. et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: A comparative review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 5, p. 657–664, 2016

RODRIGUES, P. **Embrapa lança nova variedade de alface tolerante ao calor**. Embrapa. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/42735426/embrapa-lanca-nova-variedade-de-alface-tolerante-ao-calor>. Acesso em: 13 de Junho de 2023.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Pira Roxa: cultivar de alface crespa de cor vermelha intensa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 1, p.158-159, 2005.

SCHREINER, J. F.. **Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana de própolis oriunda de abelhas sem ferrão (meliponíneos) de Pato Branco - PR. 2022**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2022.

SEABRA, F. A. S., SCORZA JÚNIOR, R. P. **Avaliação do risco ambiental de agrotóxicos: efeito dos dados de entrada do simulador computacional pearl nas estimativas das concentrações ambientais**. 2016. Disponível em: https://portal.uems.br/assets/uploads/biblioteca/2017-06-19_15-15-47.pdf. Acesso em: 11 de Out. de 2023.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. **Manejo e métodos de controle de doenças fúngicas na cultura da alface**. Instituto biológico. SP. 2016. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/pdf/prosaf/apostilas/doencas_alface.pdf. Acesso em: 09 de Set. de 2023.

VASILAKI, A. et al. A natural approach in food preservation: Propolis extract as sorbate alternative in Inon-carbonated beverage. **Food Chemistry**, v.298, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125080>.

VILLAS-BÔAS, J. K.; MALASPINA, O. Parâmetros físicos-químicos propostos para o controle de qualidade de mel de abelhas sem ferrão no Brasil. 2005. **Mensagem doce**. Disponível em: <https://www.apacame.org.br/index1>. Acesso em: 28 de Novembro de 2023.

WITTER, S., et al. **As abelhas e a agricultura**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2014. 143 p.

