

INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CÂMPUS SÃO MIGUEL DO OESTE  
AGRONOMIA

Vanucci Marcos Santi

**POTENCIAL DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS DAS ABELHAS  
AFRICANA E MANDAÇAIA NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Monilinia*  
*fructicola***

São Miguel do Oeste – SC (2022)

Vanucci Marcos Santi

**POTENCIAL DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS DAS ABELHAS AFRICANA E  
MANDAÇAIA NO CONTROLE IN VITRO DE *Monilinia fructicola***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Bacharelado em Agronomia do  
Câmpus São Miguel do Oeste do Instituto  
Federal de Santa Catarina como requisito  
parcial à obtenção do título de **Engenheiro(a)**  
**agrônomo(a)**

Orientador

Keli Cristina Fabiane

Coorientador

Maristela dos Santos Rey

São Miguel do Oeste

Vanucci Marcos Santi

**POTENCIAL DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS DAS ABELHAS AFRICANA E  
MANDAÇAIA NO CONTROLE IN VITRO DE *Monilinia fructicola***

Este trabalho foi aprovado pela Banca examinadora composta por Keli Cristina Fabiane, Caliandra Bernardi e Aquidauana Miqueloto Zanardi na data (22/09/2022), cujas notas e assinaturas constam em Ata de Defesa ou Ficha de Avaliação. Por fim, as considerações propostas pela Banca foram incorporadas no trabalho, estando esse apto para arquivamento.

Keli Cristina Fabiane

Instituto Federal Santa Catarina - campus São Miguel Do Oeste

## RESUMO

A podridão parda é a principal doença do pessegueiro, sendo causada pelo fungo *Monilinia fructicola*. O controle desse patógeno é dado principalmente pelo uso de fungicidas, que diante dos danos que podem vir a gerar, têm estimulado a busca por novos compostos alternativos, como a própolis. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de extratos da própolis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona mandacaia* no controle *in vitro* de *M. fructicola*. O isolamento do fungo foi realizado por método direto, e a confirmação da espécie se deu por análise filogenética por agrupamento com isolados referência de *M. fructicola*. O inóculo para realização das análises foi padronizado conforme escala de McFarland. Os extratos testados foram, extrato aquoso de própolis de *M. mandacaia* (EAPM), aquoso de própolis de *A. mellifera* (EAPA), etanólico de própolis de *M. mandacaia* (EPPM), etanólico de própolis de *A. mellifera* (EEPA), e duas formulações hidroalcoólicas comerciais de própolis de *A. mellifera* (ECP1 e ECP2, respectivamente). A avaliação da concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) foi realizada em microplacas de 96 poços, observando a presença de células vivas, indicadas pela reação da resazurina. A concentração fungicida mínima (CFM), foi obtida por meio do Spot Test, a partir da observação do crescimento microbiano. A atividade antifúngica dos extratos de própolis foi avaliada com o método disco-difusão, avaliando-se a inibição do crescimento micelial do fungo. O EAPM, EAPA, EPPM, EEPA, ECP1, ECP2 afetaram o desenvolvimento do fitopatógeno, apresentando CIM de 10%, 10%, 10%, 0,625%, 1,375% e 0,235%, respectivamente. O ECP1 e ECP2 apresentaram CFM de 11% e 1,875%, respectivamente. Os extratos aquosos e o ECP1 não apresentaram efeito antifúngico quando avaliados por disco-difusão, enquanto EEPA, EPPM e ECP2 demonstraram efeito fungistático. O ECP2, na sua forma não diluída (30%) pode ser usado para controle *in vitro*. No entanto, há necessidade de testar concentrações mais elevadas dos extratos e de testes *in vivo* para avançar nos trabalhos do uso de própolis no controle do *M. fructicola*.

**Palavras-chave:** *Apis mellifera*, *Melipona mandacaia*, Podridão parda, Controle alternativo.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Obtenção e confirmação do patógeno.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Obtenção do extrato.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Preparação da solução-padrão do inóculo.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Concentração inibitória mínima (CIM).....</b>	<b>9</b>
<b>2.5 Concentração fungicida mínima (CFM).....</b>	<b>10</b>
<b>2.6 Avaliação da atividade antifúngica.....</b>	<b>10</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>21</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Monilinia* é composto por espécies responsáveis por infectar rosáceas, dentre estes, os fungos *Monilinia laxa*, *Monilinia fructigena* e *Monilinia fructicola* (VILANOVA; VALERO-JIMÉNEZ; VAN KAN, 2021). No entanto, é o fungo *M. fructicola* que se destaca como o principal patógeno no Brasil, representando a maior taxa de crescimento, agressividade e prevalência (VILLARINO; MELGAREJO; DE CAL, 2016).

Os sintomas atingem desde as flores, e ramos até os frutos (HRUISTIĆ *et al.*, 2012; MOREIRA; MAY-DE-MIO, 2007), causando podridões em pêssegos e nectarinas, os quais, passam a sofrer substanciais perdas no pré e pós-colheita (DE CAL; EGUEN; MELGAREJO, 2014).

Dentre as *Rosaceae*, o pessegueiro é altamente suscetível à infecção por fungos fitopatogênicos (LI *et al.*, 2020), com perdas que podem ultrapassar 50% da produção (MACHADO; COUTINHO; ANTUNES, 2005). As perdas causadas pela podridão parda podem ser severas e difíceis de prever, o que causa incertezas no mercado de frutas (LI *et al.*, 2020; MAY-DE-MIO *et al.*, 2008), podendo essa, ser encontrada na maioria dos pomares (FABIANE, 2011; WAGNER JÚNIOR *et al.*, 2008).

Diante dos prejuízos causados pela doença, faz-se necessário o controle, sendo químico, principalmente nos anos que se mostram desfavoráveis, diante de perdas severas em pomares (BASSEGIO, 2021), onde Garrido (2016) destaca de uma a três aplicações a depender da situação climática.

Objetivando garantir segurança ao consumidor e meio ambiente perante um possível uso inadequado dos agrotóxicos, e risco de surgimento de perdas ao produtor, consumidor e meio ambiente, nos últimos anos tem havido um movimento que estabelece normas e regulamentos de limites máximos de resíduos em alimentos (JARDIM; ANDRADE; DE QUEIROZ, 2009). Diante do exposto, é de extrema importância estudar tratamentos alternativos, reduzindo os riscos ambientais e satisfazendo a crescente demanda dos consumidores por alimentos seguros (XU *et al.*, 2021), de tal forma, que proporcione maior segurança ao agricultor, ao consumidor, ao meio ambiente, além desses compostos proporcionarem maior seletividade aos fitopatógenos (MONDINO *et al.*, 2002).

Dentre esses compostos temos a própolis, que nos últimos anos tem ganhado a atenção dos pesquisadores, seja na busca do aprimoramento de técnicas de beneficiamento (BREYER; BREYER; CELLA, 2018), no isolamento de compostos (FRANCHIM, 2016), em

testes *in vitro* com aplicação de extratos de própolis em células tumorais (JUANES *et al.*, 2019), na determinação da atividade antioxidante (FREITAS, 2021) e na avaliação dos efeitos que o própolis exerce sobre os microrganismos patogênicos de forma geral (CARVALHO *et al.*, 2019). De certa forma, há uma complementaridade entre essas pesquisas, além de fornecer subsídio para futuras investigações (FERREIRA, 2015).

A própolis é classificada como um produto das abelhas que é resultado da mistura de cera e compostos resinosos (PAZIN, 2017), sendo amplamente relatado na literatura por suas propriedades antibacterianas (IBRAHIM *et al.*, 2016), antivirais (REFAAT *et al.*, 2021), anti-inflamatórias (ZHANG *et al.*, 2020; CORRÊA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2013), antioxidantes (IBRAHIM *et al.*, 2016) e antiproliferativo (AMALIA; DIANTINI; SUBARNAS, 2020). O mesmo, destaca-se com bom desempenho no controle de fungos (ZULHENDRI *et al.*, 2021), incluindo os fungos fitopatogênicos (LOPES, 2018; BALDIN *et al.*, 2013; PIVA, 2013; FRANCO *et al.*, 2012; QUINTERO-CERÓN *et al.*, 2011).

Para que se alcance esses benefícios podemos fazer uso de diferentes processos de otimização, que dizem respeito à extração sob diferentes condições, tais como: temperatura de extração, tamanho de partícula, razão sólido-líquido, tempo de extração, comparação entre métodos, diferentes líquidos extratores, dentre outros (GALANAKIS *et al.*, 2010; LOGHINI, *et al.*, 2007). Atualmente, o método mais utilizado para extração de compostos de própolis é a extração etanólica, utilizada por diversos produtos comerciais (NUNES, 2019).

Trabalhos como o de Biscaia (2007), apontam que a maceração de própolis com a mistura etanol/água 50% (v/v) levam a extratos de melhor atividade antioxidante. Tal fator está relacionado aos dados relatados por Loghini, *et al.* (2007), que apontam os extratos etanólicos como sendo aqueles que apresentam a melhor ação antifúngica. Dentre os compostos que compõem os extratos, temos Artepillin C, que possui capacidade antioxidante e é melhor extraído sendo feito o uso de etanol (BISCAIA, 2007). Porém, mesmo com uma maior eficiência sendo observada na extração etanólica, há novas metodologias sendo estudadas, com o objetivo diminuir o tempo de extração e melhorar a eficiência da técnica (NUNES, 2019).

Assim, considerando os relatados potenciais antimicrobianos, bem como a problemática do uso de agrotóxicos e a agressividade do fungo *Monilinia fructicola* em condições climáticas subtropicais, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial dos extratos de própolis das abelhas *Apis mellifera* Linnaeus e *Melipona mandacaia* Smith no controle *in vitro* do fungo *Monilinia fructicola* Wint.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), Câmpus São Miguel do Oeste. Foram avaliados a concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM) através do *Spot Test* e avaliação da atividade antifúngica com auxílio do método de disco-difusão.

### 2.1 Obtenção e confirmação do patógeno

O isolamento do *M. fructicola* foi realizado por método direto, que consiste na transferência do patógeno (esporos e hifas) do material vegetal (pêssegos mumificados ou com lesão aparente) para placas de Petri com meio de cultura batata, dextrose e ágar (BDA), com 15 a 25 mL por placa, com raspagem da massa micelial com espátula estéril, em capela de fluxo laminar.

A contaminação com outros fungos foi eliminada por sucessivas repicagens. Para manutenção da cultura foi realizada a transferência de discos (0,5 cm) com micélio para placas novas. Tanto para isolamento quanto para manutenção houve a incubação em BOD à  $24 \pm 1$  °C, em fotoperíodo de 12 horas durante aproximadamente 10 dias.

A confirmação da espécie isolada foi realizada, com placas de 7 dias, pelo Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário Agrônômica, localizado no município de Porto Alegre - RS. Com o micélio, foi realizada a extração do DNA, posteriormente a reação em cadeia da polimerase (PCR), purificação do produto de PCR e sequenciamento. Em seguida, por meio de análise filogenética, utilizando a Máxima Verossimilhança, o isolado agrupou-se com referências de *M. fructicola*.

### 2.2 Obtenção do extrato

As própolis das abelhas africanas e mandaçaia foram obtidas no município de Quatro Barras – PR.

Foram preparados extratos aquosos e etanólicos das própolis de ambas as abelhas, e também testados extratos hidroalcoólicos comerciais de duas marcas diferentes. Assim,

conforme a metodologia Kubiliene *et al.* (2015), foram preparados extratos aquosos de própolis de mandaçaia (EAPM) e africana (EAPA). Também, conforme adaptação da metodologia proposta por Orsi *et al.* (2000) realizou-se a preparação do extrato etanólico da própolis de mandaçaia (EPPM) e de africana (EPPA). Ambos os extratos comerciais de própolis da marca um (ECP1) e dois (ECP2) estavam identificados como própolis de *A. mellifera*.

A preparação do EAPM e do EAPA, consistiu em 10 g de própolis em 100 mL de água destilada, submetidos ao banho maria a 70° C durante 15 min. A solução foi filtrada em funil com papel filtro, e na sequência diluída em água até a concentração de 10%. Por fim, procedeu-se a filtração em membrana Millipore (0,45 µm).

Para obtenção do EPPM e do EPPA, a 10%, foram formuladas soluções com 14 g de própolis bruta, em 20 mL de álcool 70%. Os preparados foram armazenados em frascos âmbar, e ao abrigo da luz, durante um período de 7 dias, sendo agitados a cada 8 h. Após, os extratos foram diluídos em água estéril até a concentração final de 10%, e em seguida filtrados em membrana Millipore (0,45 µm). Ambos os extratos finalizados apresentavam 10% de teor etanólico.

Os produtos hidroalcoólicos ECP1 e ECP2, foram comprados em farmácias nas concentrações de 11% de extrato seco e 30% de própolis, respectivamente. Esses extratos foram filtrados em membrana Millipore (0,45 µm) sem nenhuma diluição prévia em laboratório.

### **2.3 Preparação da solução-padrão do inóculo**

Na preparação do inóculo para utilização na avaliação da concentração inibitória mínima e método disco-difusão, foram utilizadas placas contendo *M. fructicola* bem desenvolvido. Em cada placa, foi adicionado 5 mL de caldo Batata e Dextrose (BD) e em seguida foi feita a raspagem da massa micelial da placa com auxílio de uma espátula.

A massa micelial foi filtrada em gaze, com adição de mais 5 mL de caldo BD, e a solução foi levada ao espectrofotômetro (Analyser 800M.) a 530 nm. Ajustou-se com com caldo ou massa micelial, deixando a solução com absorbância entre 0,400 e 0,500, conforme escala de McFarland. Todos os utensílios utilizados no procedimento foram previamente esterilizados e o processo de preparação ocorreu em capela de fluxo laminar.

## 2.4 Concentração inibitória mínima (CIM)

Como base para a realização do teste de avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), foi utilizada a norma da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), utilizando microplacas de Elisa com 96 poços. As concentrações dos extratos aquosos e etanólicos das duas abelhas foram testadas individualmente, bem como, dois extratos hidroalcolócos comerciais de abelha africana, foram dissolvidos em caldo BD. Em seguida os poços foram inoculados com o extrato do micélio do fungo padronizado segundo escala de McFarland.

As concentrações utilizadas para EAPM, EAPA, EEPM, EEPA foram de 10% na coluna 1 (A, B e C), e a concentração foi reduzida em 50%, a cada coluna consecutiva, até a 12. Para EPC1 e EPC2 a coluna 1 (A, B e C) recebeu 11% e 30% respectivamente, seguindo a mesma ordem de diluição.

O teste consistiu na adição de 200  $\mu\text{L}$  de extrato preparado no primeiro poço (coluna 1) de cada linha (A, B e C). Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de caldo BD nos poços seguintes (colunas 2-12). Em seguida, foram feitas diluições, onde retirou-se 100  $\mu\text{L}$  do extrato da primeira coluna (poço 1) e adicionou-se ao segundo poço, homogeneizando a solução. Em seguida, repetiu-se o procedimento passando 100  $\mu\text{L}$  do segundo poço para o terceiro, e assim sucessivamente até o último poço (12), do qual, depois de homogeneizado, foi retirado 100  $\mu\text{L}$  da solução descartada. Após a diluição das soluções, 10  $\mu\text{L}$  de solução-padrão fúngica, que consistia no inóculo preparado previamente (solução micelar), já ajustada, foi adicionada em cada poço (colunas 1 a 12). O método foi realizado em triplicata.

Como controle, foram utilizados dois fungicidas, fluconazol e cetoconazol, na proporção de 250  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (linhas F e G), inoculados com 10  $\mu\text{l}$  da solução micelial. O controle referente a inocuidade do extrato, foi realizado na linha E, utilizando-se o caldo BD e o extrato da própolis em teste, apenas. O controle da capacidade do micro-organismo de se desenvolver nas condições testadas ocorreu na linha H com o cultivo do fungo em caldo BD. Nas placas que continham EEPM e EEPA, a linha D foi utilizada para avaliar o efeito da concentração do álcool sobre o fungo (adição de etanol a 10 %) substituindo o extrato.

As microplacas foram incubadas a  $24 \pm 2$  °C por 72 horas em câmara BOD com fotoperíodo 12/12 e reveladas com 20  $\mu\text{L}$  de solução de resazurina (0,01 mg em 100 mL de água destilada estéril), responsável por indicar a presença de células vivas. As avaliações foram realizadas de acordo com a coloração dos poços, onde a CIM é referente ao poço anterior ao

primeiro poço com coloração azul. As menores concentrações sem crescimento aparente foram definidas como as concentrações que inibem completamente o crescimento do fungo.

## **2.5 Concentração fungicida mínima (CFM)**

Para avaliação da Concentração Fungicida Mínima foi adotado o *Spot Test*, onde placas contendo meio BDA (30 mL) foram preparadas e secas por um período de 2 dias em estufa à 37 °C até que as mesmas estivessem totalmente sem presença de umidade, para evitar o escorrimento de material da placa. Após a preparação do teste de CIM, antes da adição da solução de resazurina nos micropoços da placa, 2 µL de solução em cada micropoço foram adicionados a placa de Petri, com uma distância de 1 cm<sup>2</sup> entre eles.

A marcação dos pontos onde a solução foi adicionada, foi dada por meio de folha de papel milimetrada utilizada como gabarito abaixo da placa. Para a determinação de quais pontos foram adicionados ao *Spot Test*, foi feita uma observação ao teste de CIM, onde ocorre a formação de *botons* (massa micelial aparente no fundo dos poços), o que indica crescimento microbiano.

Após a identificação do primeiro poço (coluna) que apresenta essa formação, foram escolhidos poços, sendo dois antes e dois depois da formação de *botons*. Realizou-se o *Spot Test* para confirmação do teste CIM, assim, utilizou-se o poço que apresenta menor crescimento microbiano, tendo em vista que é a concentração mais próxima da CIM. No entanto, os poços seguintes devem apresentar um gradativo crescimento, devido sua análise ao teste de CIM. Todos foram realizados em triplicata. A avaliação consistiu no aparecimento de colônia, após 48 horas.

## **2.6 Avaliação da atividade antifúngica**

O método de disco-difusão permite avaliar a atividade antifúngica (BONA *et al.*, 2014), sendo realizado com base em metodologia proposta pela norma M2-A8 (NCCLS, 2003). Para realização do teste, foram preparadas placas contendo meio de cultura BDA. Em cada placa, sobre o ágar solidificado, foi adicionado 4 mL da solução de inóculo preparada previamente.

Após o espalhamento da solução fúngica nas placas, foram adicionados três discos estéreis de papel *Whatman* nº 1, de 6 mm de diâmetro, contendo 20 µL do extrato (com concentração específica) em cada placa de Petri. Cada concentração do extrato testada foi realizada em triplicata. As placas foram fechadas com plástico filme e armazenadas em câmara do tipo BOD à 24 °C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Como controle, foram utilizados discos contendo somente água destilada estéril, nas mesmas quantidades dos extratos.

As avaliações foram realizadas com base na formação de halo de inibição do crescimento. Diante da possível formação de halo, a metodologia indica a medição diária, com a utilização de paquímetro digital.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve influência do EAPM, EAPA, EEPM, EEPA, ECP1 e ECP2 no desenvolvimento do *M. fructicola*, de modo que todos foram capazes de afetar seu desenvolvimento, mesmo que em concentrações distintas (Tabela 1). No entanto, somente os extratos comerciais apresentaram ação fungicida pelo teste de CFM, que considera a exposição direta do fungo ao extrato. Ainda, as formulações que utilizam etanol, na preparação apresentaram ação antifúngica observada na avaliação antimicrobiana por disco-difusão.

TABELA 1 - Concentração mínima inibitória, concentração fungicida mínima e atividade antifúngica, por disco-difusão, para extratos aquosos e etanólicos de própolis de abelhas africana e mandaçaia, e extratos hidroalcoólicos comerciais de africana em *Monilinia fructicola*.

<b>Produto</b>	<b>Concentração mínima inibitória (CIM)</b>	<b>Concentração fungicida mínima (CFM)</b>	<b>Atividade antifúngica por disco-difusão</b>
EAPM	10%	Crescimento	Crescimento similar ao controle
EAPA	10%	Crescimento	Crescimento similar ao controle
EEPM	10%	Crescimento	Efeito fungistático
EEPA	0,625%	Crescimento	Efeito fungistático
ECP1	1,375%	11%	Efeito fungistático
ECP2	0,235%	1,875%	Efeito fungistático

A observação do teste CIM é possível graças à resazurina, que de acordo com Chitolina (2019), é um corante produzido à base de tetrazólio usado para realização de testes de sensibilidade química de fungos e bactérias. Assim, quando observamos poços com coloração arroxeadas temos a ausência de metabolismo. Com base na alteração da coloração é possível observar que nas concentrações testadas, os extratos aquosos de ambas as abelhas afetaram o desenvolvimento do fungo em suas maiores concentrações, ambas 10% (Figura 1).

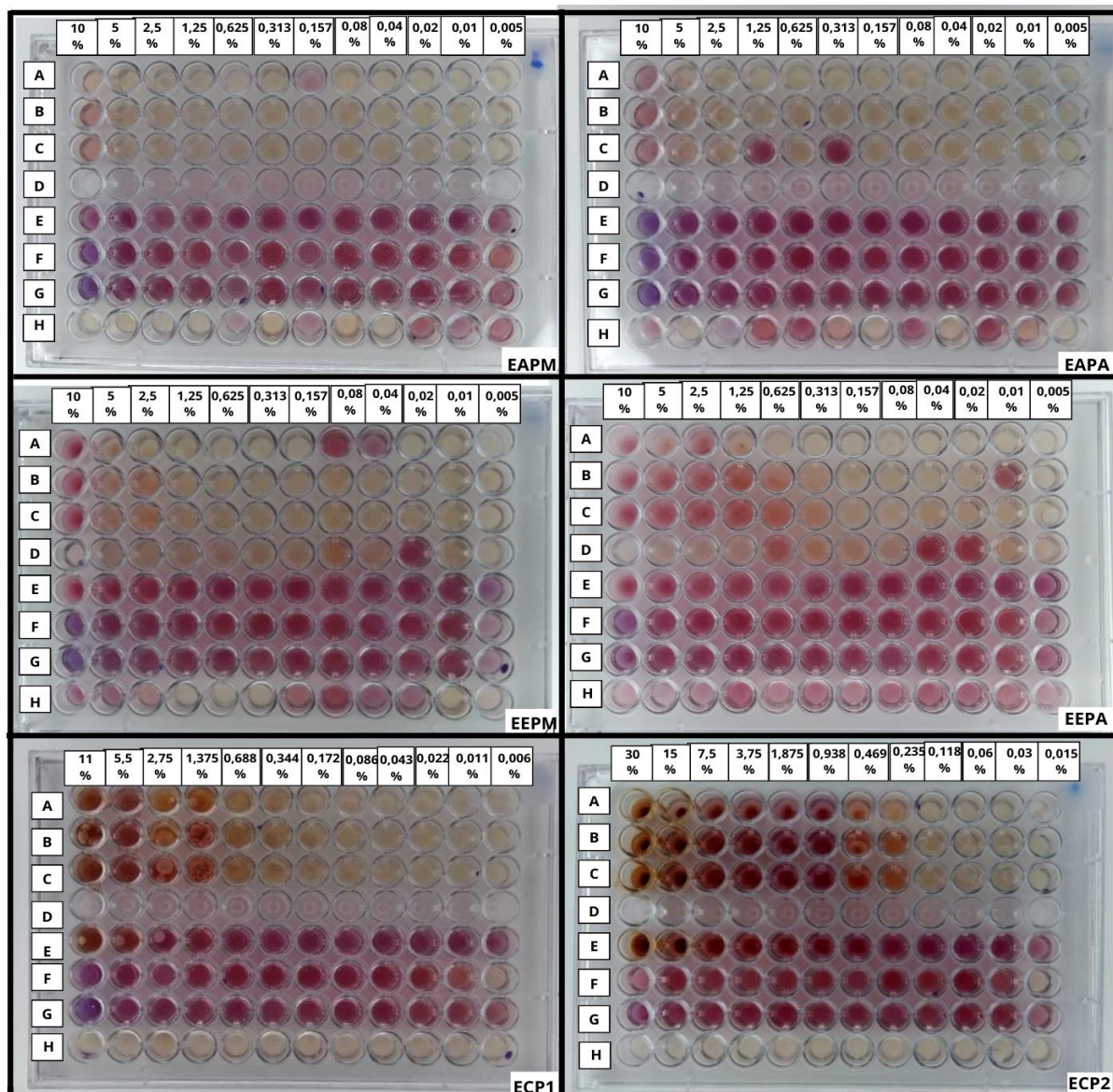


FIGURA 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos aquosos e etanólicos de própolis de abelhas africana e mandaçaia, e extratos hidroalcoólicos comerciais de africana em *Monilinia fructicola*. LEGENDA: A, B e C - repetições da diluição seriada dos extratos; D - controle do etanol nos extratos etanólicos; E- controle do extrato da esterilização do extrato; F- controle negativo com fluconazol; G - controle negativo com cetoconazol; H - controle da viabilidade do fitopatógeno. EAPM - Extrato aquoso de própolis *Melipona mandaçaia*; e EAPA de *Apis mellifera*; EEPM - Extrato etanólico de própolis *M. mandaçaia*; e EEPA de *A. mellifera*; ECP1 - Extrato comercial de própolis de *A. mellifera* 1; ECP2 - Extrato comercial de própolis 2 *A. mellifera*.

Considerando a concentração dos extratos aquosos testados, infere-se em concentrações maiores que 10%, para preparações aquosas, possam ser mais eficientes para o controle antimicrobiano. Esse resultado corrobora os de Silva *et al.* (2018), que trabalhando com extrato aquoso comercial de própolis de *A. mellifera* a 30% na diluição seriada para observação da CIM observaram que houve controle das bactérias *Enterobacter cloacae* e *Staphylococcus aureus* a partir da concentração de 7,5%. Ainda, para Pereira *et al.* (2014), ao avaliar os efeitos do extrato de própolis sobre *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro, obtiveram seus resultados mais satisfatórios nas concentrações acima de 10%.

Considerando que a composição antimicrobiana de própolis varia de acordo com a flora da região, e de maneira geral, é composta por: flavonoides, ácidos graxos, fenóis, ácidos aromáticos, ácido benzoico, ácido cafeico, ácido ferúlico, sesquiterpenos, aminoácidos, vitaminas e elementos químicos como Ca, Mn, Cu, Zn, Al, Ni, Pb, B, N, Mg e Fe (SILVA, 2009; RUBIRA, 2008; MENEZES, 2005; PARK *et al.*, 1998; MARCUCCI, 1996). Com base nos resultados infere-se que a extração aquosa não foi capaz de solubilizar eficientemente os compostos com ação antimicrobiana, ao menos nas concentrações testadas.

Silva *et al.* (2018) atribuem a ineficiência de seus extratos aquosos de própolis, ao fato de que, ao se tratar de um material resinoso, a solubilidade de seus compostos fica comprometida em água. Somado a isso, Obara (2019) avaliando a otimização da extração de compostos fenólicos conclui que os percentuais de etanol entre 70% e 90% são suficientes para extração de compostos com elevada atividade antioxidante. Sendo que quando diluído a concentração de 10%, este não afeta o fungo, como observado para no controle do etanol em ambos os extratos etanólicos (Figura 1). Reforçando assim, a ação antifúngica do extrato.

Também, Cao *et al.* (2017) destacam que a extração utilizando o etanol como solvente ainda é a mais utilizada, e estudos relatam como a composição química e atividade biológica são alteradas a depender do método de extração que está sendo utilizado (SONG *et al.*, 2021; WÓZNIAK *et al.*, 2020; YEN *et al.*, 2017). Assim, considerando as extrações etanólicas testadas, o EEPM inibiu o crescimento do *M. fructicola* na maior concentração, 10%, enquanto o EEPA afetou o desenvolvimento do fitopatógeno até a concentração de 0,625% (Figura 1).

Para as formulações comerciais, ambas com extração hidroalcóolica, o ECP1 inibiu o fitopatógeno na concentração de 1,375%, enquanto que para ECP2 podemos observar que houve inibição do desenvolvimento do fungo até a concentração de 0,235%. No entanto, é possível observar que em ambos os extratos comerciais houve a sedimentação de partículas no

poço (Linhas A, B, C, e F até a coluna 4 para ECP1, e até a coluna 7 para ECP2) conforme pode ser observado na linha F (controle do extrato), diferindo do botton normalmente formado pelo crescimento do fungo (Coluna I: controle do crescimento fúngico) (Figura 1).

Os extratos de própolis de abelha africana EEPA, EPC1 e EPC2 apresentaram concentração inibitória mínima de 0,625%, 1,375% e 0,234% respectivamente (Tabela 1). Corroborando com os resultados obtidos para os extratos etanólicos da própolis de abelhas africanas, Soyly *et al.* (2008) avaliando a atividade antimicrobiana *in vivo* da própolis contra o patógeno cítrico de pós-colheita *Penicillium digitatum*, utilizaram o método de extração com etanol a 70% observaram a inibição do desenvolvimento do fungo nas concentrações de 1; 5 e 10%. No entanto, quando o extrato foi aplicado *in vivo*, nas diferentes concentrações, não apresentaram capacidade inibitória em frutos de toranja.

Quando observamos apenas os extratos EAPM e EEPM, ambos apresentaram capacidade de inibição na concentração de 10%. A atividade antioxidante da própolis de *Melipona mandacaia* é dada pelo conteúdo fenólico, o que a caracteriza como uma rica fonte de compostos bioativos benéficos à saúde (SILVA, 2020). O que explica a bioatividade *in vitro* de extratos etanólicos de própolis de Mandaçaia frente a cepas de fungos do gênero *Candida* (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilhermondii*, *C. parapsilosis*) (SOUZA, 2018).

Extratos de própolis de abelha mandaçaia apresentam teores de flavonóides maiores do que a própolis de outros meliponíneos (SOUZA, 2018) e até mesmo da abelha *Apis mellifera* (FERREIRA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017; DUTRA *et al.*, 2014). Assim, infere-se que o desempenho mais efetivo no CIM do EEPA comparado com EEPM se deve a outros compostos.

Observando a metodologia empregada na CIM, onde o fungo é colocado diretamente em contato com o extrato, objetiva-se a capacidade de inviabilizar o patógeno completamente, e que a ação se confirme na CFM. A ação dos extratos pode ser classificada como fungistática quando o fitopatógeno em contato com o extrato não apresenta crescimento, mas que quando retirado e posto em meio sólido e condições ideais ocorre a retomada do crescimento, e fungicida quando não apresenta crescimento em nenhuma das situações citadas (MACHADO, 2021).

Para o teste de CFM houve crescimento fúngico para EAPM, EAPA, EEPM, EEPA, indicando que o efeito observado no CIM é fungistático. Quanto aos extratos comerciais (ECP1 e ECP2), ambos apresentaram resultados de inibição total do fungo a 11% e 1,875%, respectivamente (Figura 2).

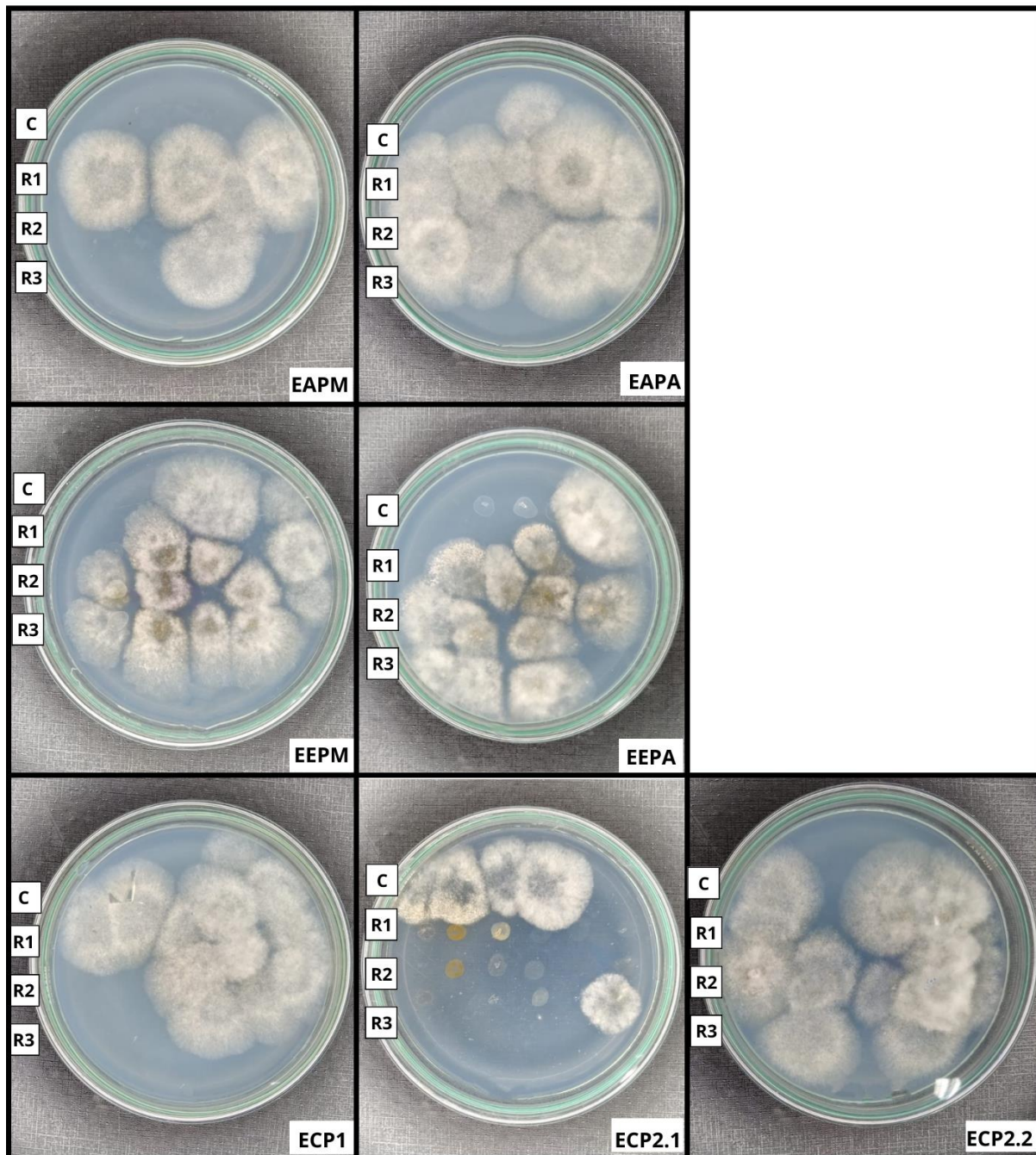


FIGURA 2- Concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos aquosos e etanólicos de própolis de abelhas africana e mandaçaia, e extratos hidroalcolócos comerciais de africana em *Monilinia fructicola*. LEGENDA: EAPM - Extrato Aquoso de Própolis de *Melipona mandacaia*; EAPA - Extrato Aquoso de Própolis de *Apis mellifera*; EPM - Extrato Etanólico de Própolis de *Melipona mandacaia*; EPA - Extrato Etanólico de Própolis de *Apis mellifera*; ECP1 - Extrato Comercial de Própolis 1; ECP2.1 - Extrato Comercia de Própolis 2 poços 1-6; ECP2.2 - Extrato Comercia de Própolis 2 poços 7-12; C – Controle; R1, R2 e R3 – Repetições. Concentrações testadas para EAPM, EAPA, EPM e EPA - 10% 5% 2,5% 1,25% e 0,625%; Concentrações testadas para ECP1 - 11% 5,5% 2,75% 1,375% e 0,688%; Concentrações

testadas para ECP2.1 - 30% 15% 7,5% 3,75% 1,875% e 0,938%; Concentrações testadas para ECP2.2 - 0,469% 0,235% 0,118% 0,06% e 0,03% e 0,015%.

O efeito fungicida, quando presente, se deve basicamente à presença de flavonóides em sua composição, em especial de pinicembrina, enquanto o caráter fungistático é dado pela presença de substâncias como ácido benzóico, ácido salicílico e vanilina (DHEIN *et al.*, 2018). Os flavonóides apresentam a capacidade de inibir a síntese de proteínas e DNA, também comprometendo a membrana plasmática dos fungos (SILVA, 2009).

Corroborando com os resultados obtidos no ECP1 e ECP2, Wuaden *et al.* (2018) avaliando a ação antifúngica sobre *Botrytis cinerea*, de extratos etanólicos de própolis de *A. mellifera*, observaram atividade fungicida na concentração de 12,5 %, e fungistática nas concentrações de 2,5% e 6,25%.

Também, Sobreira *et al.* (2020) demonstram que o extrato etanólico de própolis apresenta uma moderada atividade antifúngica frente a isolados de *Candida spp.* com CIM e CFM, equivalentes, que variam entre 0,023% e 0,093%. Bittencourt *et al.* (2014) obtiveram concentração fungicida mínima de 0,064% de extrato hidroalcolico de própolis como sendo efetivo sobre *Candida albicans*.

Na avaliação da atividade antifúngica por meio do método disco-difusão não foi observada a formação de halo de inibição, excetuando-se o ECP2 (Figura 3), onde a região ao redor do disco afetou o desenvolvimento do fungo, mas não de forma a impedir totalmente seu progresso. Há também interferência no desenvolvimento do fungo na presença do EEPM, EEPA, ECP1, indicando ação fungistática, uma vez que o desenvolvimento do *M. fructicola* na placa foi deficitário.

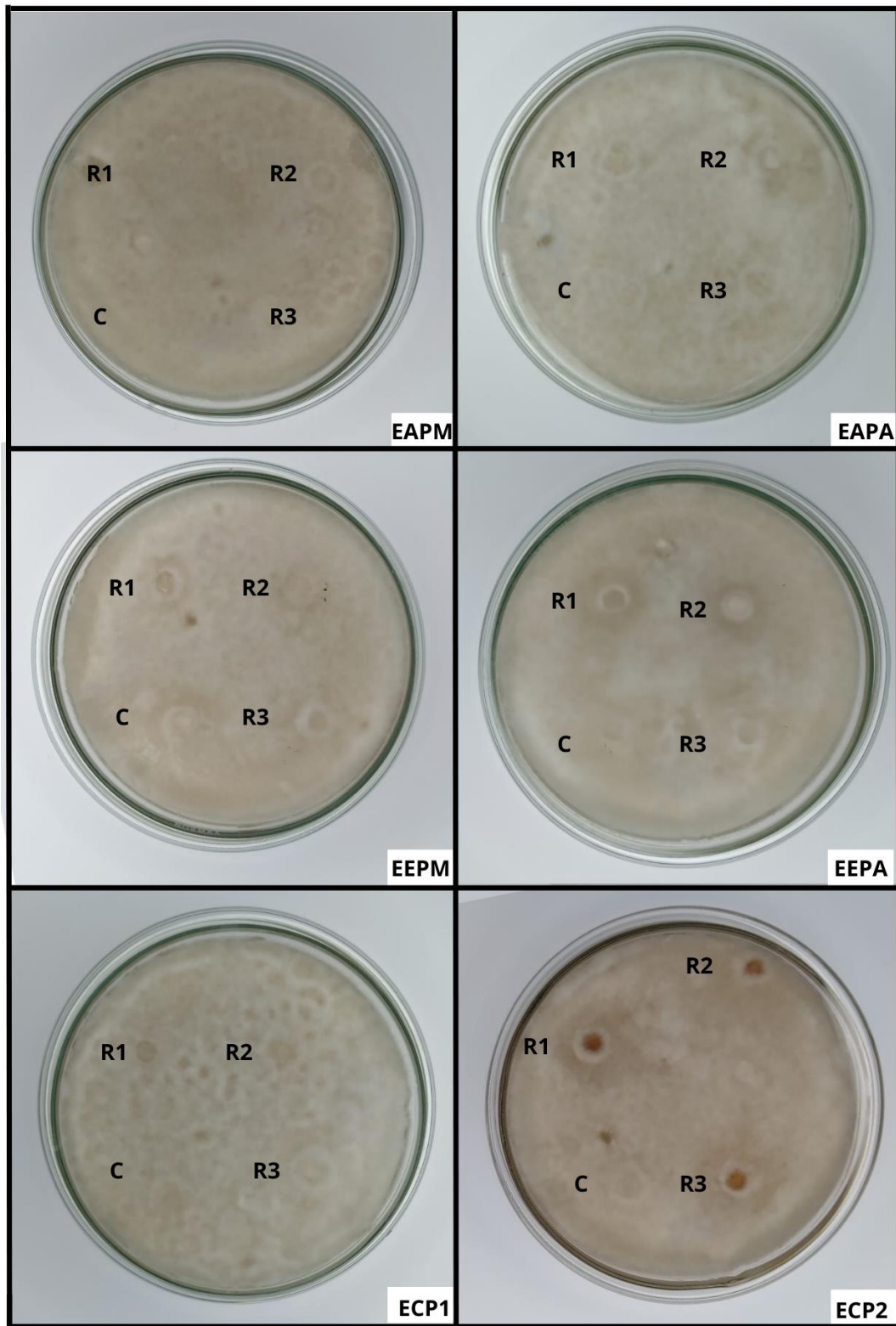


FIGURA 3- Atividade antifúngica por disco-difusão de dos extratos aquosos e etanólicos de própolis de abelhas africana e mandaçaia, e extratos hidroalcólicos comerciais de africana e *Monilinia fructicola*. LEGENDA: EAPM - Extrato aquoso de própolis *Melipona mandaçaia* (10%); EAPA de *Apis mellifera* (10%); EEPM - Extrato etanólico de própolis *M. mandaçaia* (10%); e EEPA de *A. mellifera* (10%); ECP1 - Extrato comercial de própolis de *A. mellifera* 1

(11%); ECP2 - Extrato comercial de própolis 2 *A. mellifera* (30%). R1, R2 e R3 - repetições; C - controle.

O extrato de própolis das duas abelhas, quando extraído por meio aquoso, não indica ação antifúngica sobre o fitopatógeno por disco-difusão. O resultado está em consonância com as metodologias de CFM, onde houve o crescimento do fungo submetido às concentrações de forma similar ao controle. Para o ECP2 a formação do halo foi discreta, mas é possível observar o crescimento irregular na placa, mais evidenciado no entorno da aplicação do extrato. Efeito similar foi observado no EEPM, EEPA.

Os resultados citados são típicos de uma situação fungistática. Nestes casos, os compostos fenólicos da própolis expressam sua atividade por meio da inibição de germinação de esporos, da redução do tamanho dos tubos germinativos e da inibição do crescimento micelial, efeitos estes que são dependentes da concentração utilizada (MARINI *et al.*, 2012).

Assim, a própolis apresenta capacidade de reduzir ou evitar o crescimento de micélio e germinação de esporos, bem como, inibir a produção de toxinas pelos fungos (DHEIN *et al.*, 2018). Há testes *in vitro*, em que a aplicação da concentração de 40% de extrato de própolis é capaz de inibir a germinação de esporos de *Aspergillus flavus* (CORTÉS-HIGAREDA *et al.*, 2019).

Corroborando com o observado, Machado *et al.* (2016) obteve com extrato etanólico de própolis expressiva interferência no desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, quando aplicada a concentração de 30%. Já Pastana, Vieira e Machado (2015), incorporando o extrato ao meio, encontraram efeito fungistático na concentração de 3,2% sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *In vivo*, Damascena *et al.* (2020) encontrou eficiência na concentração de 10%, onde inibiu o desenvolvimento de 99% da germinação dos esporos de *Aspergillus* sp. e 93% de *Fusarium* sp.

A intensidade da atividade da própolis é determinada pelas suas características químicas, as quais, variam conforme o local de extração da própolis, pois ela está intimamente ligada com as espécies de abelhas produtoras, biodiversidade local e características climáticas (ZABAIUO *et al.*, 2017). O que por sua vez, faz com que no Brasil já tenham sido identificados 12 tipos de própolis, sendo 5 da região Sul (COSTA, 2020). A forma mais popular de extração do extrato de própolis é por meio de solventes alcoólicos, graças à elevada solubilidade de seus polifenóis em etanol (ANDRADE *et al.*, 2017), sendo a extração aquosa pouco explorada (COSTA, 2020).

Durante a infecção fúngica a parede celular destes patógenos desempenha um importante papel, servindo como a primeira barreira responsável pelo crescimento, adaptação e regulação da permeabilidade do patógeno no hospedeiro (GUCWA *et al.*, 2018). Neste contexto, Corrêa *et al.* (2020) observaram a capacidade da própolis brasileira em danificar a integridade da parede celular e da membrana celular de *C. albicans*, causando o extravasamento de organelas intracelulares. Ainda, os autores cogitam a possibilidade de que a eficácia antifúngica da própolis é dada graças à capacidade dos polifenóis de formar um complexo com proteínas solúveis ao interromper a síntese de quitina, resultando na ruptura da parede celular.

Os polifenóis são ainda precursores de compostos voláteis, como mono e sesquiterpenos, fenilpropanóides,  $\eta$ -alcanos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres, que mesmo representando uma pequena parcela da composição quando comparada aos outros compostos, podem ser bastante úteis na composição do extrato de própolis, uma vez que estão envolvidos na atividade antimicrobiana (TORRES *et al.*, 2008)

O presente estudo obteve resposta fungistática, para EEPA, EEPM e ECP2 capazes de interferir no desenvolvimento do fungo. No *Spot Test*, observou-se que os extratos etanólicos de própolis, preparados, das duas abelhas não apresentaram CFM, não afetando o desenvolvimento do fungo na placa e tiveram ação fungistática na avaliação por meio do disco-difusão. Isso demonstra que o fungo cresce na presença indireta do extrato, nos levando a conclusão de ação fungistática. Ainda, que EAPA e EAPM, apresentaram inibição somente na CIM, quando submetidos ao contato direto com o extrato.

Também, ECP1 apresentou CFM de 11% e CIM de 1,375%, enquanto ECP2 apresentou CIM de 0,235% e CFM de 1,875%. No entanto, apenas o ECP2 apresentou interferência na avaliação microbiológica, afetando parcialmente o crescimento do fitopatógeno, indicando efeito fungistático. Esse destaque do ECP2 na avaliação antimicrobiana é, provavelmente, consequência da concentração mais elevada (30%).

Trabalhos que testaram o efeito da própolis sobre *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. mostram como o aumento das doses elevam a capacidade reduzir o desenvolvimento do micélio, chegando em até 50 % de redução (SOUZA *et al.* 2020; SILVA 2009).

Ao compararmos o presente estudo com a literatura aqui apresentada, podemos observar que a própolis apresenta potencial antifúngico. Embora as concentrações tenham sido variadas para cada microrganismo, é possível observar que concentrações mais elevadas são mais efetivas. Sendo assim, há possibilidade de que em concentrações maiores, os extratos

possam ser mais efetivos. Ainda, infere-se que há influência da flora e região da coleta, bem como, as variações das formas e solventes de extração.

#### 4. CONCLUSÃO

Há potencial para controle *in vitro* do fungo *Monilinia fructicola* em extratos de própolis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona mandacaia*. O EAPM, EAPA, EEPM, EEPA, ECP1, ECP2 afetaram o desenvolvimento do fitopatógeno, apresentando CIM de 10%, 10%, 10%, 0,625%, 1,375% e 0,235%, respectivamente. O ECP1 e ECP2 apresentaram CFM de 11% e 1,875%, respectivamente. Os extratos aquosos e o ECP1 não apresentaram efeito antifúngico quando avaliados por disco-difusão, enquanto EEPA, EEPM e ECP2 demonstraram efeito fungistático.

O ECP2, na sua forma não diluída (30%) pode ser usado para controle *in vitro*. No entanto, há necessidade de testar concentrações mais elevadas dos extratos e de testes *in vivo* para avançar nos trabalhos do uso de própolis no controle do *M. fructicola*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMALIA, E.; DIANTINI, A.; SUBARNAS, A. Water-soluble propolis and bee pollen of *Trigona* spp. From South Sulawesi Indonesia induce apoptosis in the human breast cancer MCF-7 cell line. **Oncology Letters**, v. 20, n. 274, 2020. DOI 10.3892/ol.2020.12137. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12137>. Acesso em: 9 ago. 2021.

ANDRADE, P. F. D. S. **Fruticultura, análise da conjuntura**. Departamento de Economia Rural do Estado do Paraná, 2020. Disponível em: [https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-01/fruticultura\\_2020.pdf](https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-01/fruticultura_2020.pdf). Acesso em: 25 ago. 2021.

BALDIN, D. *et al.* 14607 - Extrato etanólico de própolis na indução de fitoalexinas em sorgo e na atividade antifúngica sobre *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 2, 2013. Disponível em: <http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/cad/article/view/14607>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BASSEGIO, E. R. **Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de *Monilinia fructicola* in vitro e da podridão parda na pós-colheita de pêssegos**. 2021. 155 p. Tese (Doutorado em agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná,

2021. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br:8080/jspui/handle/1/25349>. Acesso em: 19 jul. 2021.

BISCAIA, D. **Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas**. 2007. 142 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/89628/242460.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 12 set. 2022.

BITTENCOURT, F. O. *et al.* Avaliação da atividade antifúngica de formulações semi-sólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 10, n. 10, 2014. Disponível em: <https://scientiaplenu.org.br/sp/article/view/1914/1038>. Acesso em: 12 set. 2022.

BONA, E. A. M. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivo Instituto. Biológico**, v.81, n.3, 2014. DOI 10.1590/1808-1657001192012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657001192012>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BREYER, E. D. H.; BREYER, H. F. E.; CELLA, I. 2018. **Produção e beneficiamento da própolis**. *Boletim Didático*, 1, 30. Disponível em: <https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/BD/article/view/405>. Acesso em: 24 ago. 2021.

CAMPOS, J. V.; ASSIS, O. B. G.; FILHO, R. B. Processamento e análise de extratos de própolis verde como potencial sanitizante de uso hortifrutícola . **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v.4, n.3, 2021. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1134307/1/P-Processamento-e-analise-de-extratos-de-propolis-verde-como-potencial.pdf>. Acesso em: 12 set. 2022.

CAO, X. P. *et al.* Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its in vitro antioxidant activity. **Phytomedicine**, v. 34, n. 15, 2017. DOI: 10.1016/j.phymed.2017.06.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711317300703?via%3Dihub>. Acesso em: 15 set. 2022.

CARVALHO, B. L. Tratamento de sementes de cebola com extrato de própolis e *Plectranthus amboinicus* no controle de *Aspergillus* sp. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 13, n. 1, 2019. DOI 10.18011/bioeng2019v13n1p12-18. Disponível em: <https://doi.org/10.18011/bioeng2019v13n1p12-18>.

CHITOLINA, G. M. **Caracterização da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerinas, a fungicidas inibidores da quinona externa**. 2019. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, 2019. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-18052020-143352/pt-br.php>. Acesso em: 12 set. 2022.

COSTA, D. J. L. **Otimização da extração de própolis em solução aquosa e caracterização do extrato**. 2020. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, 2020. DOI: 10.11606/D.59.2020.tde-10082021-104651. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-10082021-104651/pt-br.php>. Acesso em: 15 set. 2022.

CORRÊA F.R.S. *et al.* Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 86, 2017. DOI 10.1016/j.biopha.2016.12.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.018>. Acesso em: 10 ago. 2021.

CORRÊA, J. L. *et al.* Propolis extract has bioactivity on the wall and cell membrane of *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 256, 2020. DOI:10.1016/j.jep.2020.112791. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874119349682?via%3Dihub>. Acesso em: 16 set. 2022.

CORTÉS-HIGAREDA, M. *et al.* Nanostructured chitosan/propolis formulations: characterization and effect on the growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins. **Heliyon**, v. 5, 2019. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01776. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844019309806>. Acesso em: 12 set. 2022.

DAMASCENA, J. F. *et al.* Efeito do extrato de própolis sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merril). **Revista Agroecossistemas**, v. 12, n. 2, 2020. Disponível em: <https://periodicos.ufpa.br/index.php/agroecossistemas/article/view/7540/6951>. Acesso em: 15 set. 2022.

DE CAL, A.; ELGUEM, B.; MELGAREJO, P. Vegetative compatibility groups and sexual reproduction among Spanish *Monilinia fructicola* isolates obtained from peach and nectarine orchards, but not *Monilinia laxa*. **Fungal Biology**, York, v. 118, 2014. DOI doi.org/10.1016/j.funbio.2014.03.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.03.007>. Acesso em 20 jul. 2021.

DHEIN, M. *et al.* **Efeito de concentrações de própolis sobre o desenvolvimento de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* em sementes de milho**. 5º agrotec. Disponível em: [https://eventos.uceff.edu.br/eventosfai\\_dados/artigos/agrotec2018/941.pdf](https://eventos.uceff.edu.br/eventosfai_dados/artigos/agrotec2018/941.pdf). Acesso em: 18 set. 2022.

DUTRA, R. P. *et al.* Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, n.12, 2014. DOI: 10.1021/jf404875v. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24571707/>. Acesso em: 18 set. 2022.

FABIANE, K. C. **Reação de pessegueiros a *Monilinia fructicola* (wint.) Honey e sua relação com componentes bioquímicos**. 2011. 139 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2011.

Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/264>. Acesso em: 22 ago. 2021.

FERREIRA, J. M. **Características sensoriais, físico-químicas e atividade biológica da própolis produzida no semiárido do estado do Rio Grande do Norte, Brasil**. 2015. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Universidade Federal Rural do Semiárido, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufersa.edu.br/handle/tede/378>. Acesso em: 23 ago. 2021.

FERREIRA, J. M. *et al.* Antioxidant activity of a geopropolis from northeast Brazil: chemical characterization and likely botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2017, 2017. DOI: 10.1155/2017/402472. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29234387/>. Acesso em: 18 set 2022.

FRANCHIM, M. **Atividade in vivo e in vitro de compostos isolados de própolis brasileiras sobre a modulação do processo inflamatório**. 2016. 100 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual de Campinas, 2016. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/321511>. Acesso em: 24 ago. 2021.

FRANCO, A. A. *et al.* Controle de antracnose na fruta do mamão utilizando própolis e extratos vegetais de alho e sangra d'água. **Revista Cultura Agronômica**, v. 21, n. 2, 2012. Disponível em: <https://ojs.unesp.br/index.php/rculturaagronomica/article/view/2181>. Acesso em: 8 ago. 2021.

FREITAS, C. P. *et al.* Atividade antioxidante da Própolis de Abelhas Jataí. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 1, 2021. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJAER/article/view/24913>. Acesso em: 24 ago. 2021.

GALANAKIS, C. M. *et al.* Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n.8, 2010. DOI: 10.1002/jctb.2413. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jctb.2413?casa\\_token=\\_lt8VpOHxFwAAAAA%3AyhBfP1aKOcBcejccjA92rcSy0zm3ScqSM1qCvEGeeHGfIm0NLgdYvMy5nfZCYVt4LHtok7hIEuvs-FA-uA](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jctb.2413?casa_token=_lt8VpOHxFwAAAAA%3AyhBfP1aKOcBcejccjA92rcSy0zm3ScqSM1qCvEGeeHGfIm0NLgdYvMy5nfZCYVt4LHtok7hIEuvs-FA-uA). Acesso em: 12 set. 2022.

GARRIDO, R. L. **Manejo das doenças das prunóideas (ameixa, nectarina e pêssego)**. Bento Gonçalves : Embrapa Uva e Vinho, 21 p., 2016. (Circular técnica, 61). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/153268/1/Circular-Tecnica-134.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2021.

GUCWA, K. *et al.* Antifungal Activity and Synergism with Azoles of Polish Propolis. **Pathogens**, v. 7, n. 2, 2018. DOI: 10.3390/pathogens7020056. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29921833/>. Acesso em: 10 set. 2022.

IBRAHIM N. *et al.* Antibacterial and phenolic content of propolis produced by two Malaysian stingless bees, *Heterotrigona itama* and *Geniotrigona thoracica*. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 8, p. 156-161, 2016. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/297046720\\_Antibacterial\\_and\\_phenolic\\_content\\_of\\_propolis\\_produced\\_by\\_two\\_Malaysian\\_stingless\\_bees\\_Heterotrigona\\_itama\\_and\\_Geniotrigona\\_thoracica](https://www.researchgate.net/publication/297046720_Antibacterial_and_phenolic_content_of_propolis_produced_by_two_Malaysian_stingless_bees_Heterotrigona_itama_and_Geniotrigona_thoracica). Acesso em: 7 ago. 2021.

HRUSTIĆ, J. *et al.* Genus *Monilinia* on Pome and Stone Fruit Species. **Pesticides and Phytomedicine**, Belgrado, v. 27, n. 4, 2012. DOI: 10.2298/PIF1204283H. Disponível em: <https://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/1820-3949/2012/1820-39491204283H.pdf>. Acesso em: 9 jul. 2021

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. D. A.; DE QUEIROZ, S. C. D. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, 2009. DOI 10.1590/S0100-40422009000400031. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400031>. Acesso em: 6 ago. 2021.

JUANES, C. D. C. *et al.* Própolis vermelha e *L*-lisina na angiogênese e no crescimento tumoral em novo modelo de bolsa jugal de hamster inoculada com células de tumor de Walker 256. **EINSEinstein**, v. 17, n. 2, 2019. DOI 10.31744/einstein\_journal/2019AO4576 . Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eins/a/QbYLx6JKG5CQkFn8dLTddGq/?lang=pt>. Acesso em: 28 ago 2021.

KUBILIENE, L. *et al.* Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **BMC Complement Altern Med**, v.15, n. 156, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0677-5>. Acesso em: 12 set. 2022.

LI, G. *et al.* Nitric oxide regulates multiple defense signaling pathways in peach fruit response to *Monilinia fructicola* invasion. **Scientia Horticulturae**, v. 264, 2020. DOI 10.1016/j.scienta.2019.109163. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109163>. Acesso em: 3 ago, 2021.

LIMA, D. R. F. *et al.* Avaliação das propriedades e potencialidades da própolis verde e sua fonte botânica. **Tecnologia e Tendências**, v. 10, n. 2, 2019. DOI: 10.25112/rtt.v10i2.2078. Disponível em: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES E POTENCIALIDADES DA PRÓPOLIS VERDE E SUA FONTE BOTÂNICA BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA | Revista Tecnologia e Tendências (fevale.br). Acesso em: 12 set. 2022.

LONGHINI, R. *et al.* Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, 2007. DOI: 10.1590/S0102-695X2007000300015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/3rzKjXXNG9ycVMtsfzHV4Zg/?lang=pt>. Acesso em: 13 set. 2022.

LOPES, J. D. R. **Extrato etanólico de própolis no controle alternativo da pinta preta (*Alternaria solani*) e septoriose (*Septoria lycopersici*) na cultura do tomateiro**. 2018. 32 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) - Universidade Federal da Fronteira Sul, 2018. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/2918>. Acesso em: 11 ago. 2021.

LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Risk Analysis for Latent Infection of Prune by *Monilinia fructicola* in California. **Phytopathology**, v. 91, n. 12, 2001. DOI 10.1094/PHYTO.2001.91.12.1197. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.12.1197>. Acesso em: 27 jul. 2021.

MACHADO, I. S. **Controle de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando extratos de araçazeiro e jabuticabeira híbrida**. 2021. 36 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Agrônômica) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2021. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/29269/3/controlesclerotiniasclerotiorumaracazeirojabuticabeira.pdf>. Acesso em: 10 set. 2022.

MACHADO, J. J. *et al.* **Efeito inibitório de extrato de própolis sobre *Colletotrichum gloeosporioides***. VI Encontro de Iniciação Científica e Pós-graduação da Embrapa Clima Temperado. 2016. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/158819/1/Glucia-ANAIS-CIC-EMBRAPA-2016.pdf>. Acesso em: 13 set. 2022.

MACHADO, N. P.; COUTINHO, E. F.; ANTUNES, P. L. **Técnicas alternativas no controle de podridões pós colheita de pêssegos**. Embrapa Clima Temperado: Pelotas, 1 ed., 2005. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/33529/1/documento-132.pdf>, Acesso em: 23 jul. 2021.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Revista Química Nova**, v. 19, n. 5, 1996. Disponível em: [http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=4125](http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=4125). Acesso em: 11 ag. 2020.

MARINI, D. *et al.* Efeito antifúngico de extratos alcoólicos de própolis sobre patógenos da videira. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.2, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/yBhSLBWNSDq3zp77C3hBHHF/?lang=pt>. Acesso em: 8 set. 2022.

MAY-DE-MIO, L. L. *et al.* Infecção de *Monilinia fructicola* no período da floração e incidência de podridão parda em frutos de pessegueiro em dois sistemas de produção. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/tpp/a/sfD7WJk6GKSfV94sd7pS6sp/?lang=pt&format=pdf>. Disponível em: 7 jul. 2021.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, 2005. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V72\\_3/menezes.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V72_3/menezes.PDF). Acesso em: 9 ago. 2021.

MONDINO, P.; ALANIZ, S.; LEONI, C. Manejo integrado de las enfermedades del duraznero en Uruguay. In: SORIA, J. **Manual del duraznero; Manejo integrado de plagas y enfermedades**. Montevideo: INIA. p. 45-76. 2010. <https://www.scielo.br/j/fb/a/HYjXkMj5L7CRdNZqkGQG4Jc/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 3 ago. 2021.

MOREIRA. M. L.; MAY-DE-MIO, L. L. Metodologia para detecção de infecções latentes de *Monilinia fructicola* em frutas de caroço. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, 2007. DOI 10.1590/S0103-84782007000300005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000300005>. Acesso em: 22 ago. 2021.

NCCLS. 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 8th ed., M2-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

NUNES, D. D. G. **Composição química e atividade biológica antimicrobiana e leishmanicida de extratos de própolis obtidos pelo método convencional ou por extração supercrítica**. 2019. 79 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia, 2019. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/39655/2/Danielle%20Devequi%20Gomes%20Nunes...%20Composi%20a7%20a3o%20qu%20admica...2019.pdf>. Acesso em: 12 set. 2022.

OBARA, T. R.A. **Própolis verde: otimização da extração de compostos ativos e sua atividade em diferentes modelos experimentais**. 2017. 113 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, 2017. Disponível em: [https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-06042018-161559/publico/Thalita\\_Riquelme\\_Augusto\\_Obara\\_versao\\_revisada.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-06042018-161559/publico/Thalita_Riquelme_Augusto_Obara_versao_revisada.pdf) . Acesso em: 15 set. 2022.

ORSI, R. O. et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2000. DOI 10.1590/S0104-79302000000200006. Disponível em: SciELO - Brasil - Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. Acesso em: 12 set. 2022.

PARK, Y. K. *et al.* Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, v. 36, n. 1, 1998. DOI 10.1007/s002849900274. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9405742/>. Acesso em: 11 ag. 2020.

PASTANA, R. F.; VIEIRA, G. H. C.; MACHADO, P. P. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 3, n. 1, 2016. Disponível em: <https://periodicosonline.uems.br/index.php/agrineo/article/view/654/897>. Acesso em: 12 set. 2022.

PAZIN, W. M. *et al.* Antioxidant activities of three stingless bee propolis and green propolis types. **Journal Of Apicultural Research**, 2017. DOI 10.1080/00218839.2016.1263496. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1263496>. Acesso em 23 jul. 2021.

PEREIRA, C. S.; MAIA, L. F. P.; PAULA, F. S. Aplicação de extrato etanólico de própolis no crescimento e produtividade do feijoeiro comum. **Revista Ceres**, v. 61, n. 1, 2014. DOI: 10.1590/S0034-737X2014000100013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rceres/a/CPxj5fjgb9qGyCYbGJHyBFx/?lang=pt>. Acesso em: 12 set. 2022.

PIVA, C. A. G. **Extratos de canola e própolis no controle de oídio em pepineiro**. 2013. 93 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/438>. Acesso em: 8 ago 2021.

QUINTERO-CERÓN, J.P. *et al.* In Vitro Fungistatic Activity Of Ethanolic Extract Of Propolis Against Postharvest Phytopathogenic Fungi: Preliminary Assessment. **Acta Horticulturae**, v. 1016, 2011. Disponível em: [https://www.actahort.org/books/1016/1016\\_22.htm](https://www.actahort.org/books/1016/1016_22.htm). Acesso em: 9 ago. 2021.

REFAAT, H. *et al.* Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, 2021. DOI 10.1016/j.ijpharm.2020.120028. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120028>. Acesso em: 10 ago. 2021.

RUBIRA, J. C. **Evaluación del efecto de extractos etanólicos de própolis sobre el control de *Alternaria solani* en cultivo ecológico de tomate, (*Solanum lycopersicum*)**. 2008. 113 p. Trabajo Final de Carrera (Ingeniería Técnica Agrícola) Universitat Politècnica de Catalunya, 2008. Disponível em: <http://hdl.handle.net/2099.1/10194>. Acesso em: 31 jul. 2021.

SANTOS, T. L. A. D. *et al.* *Melipona mondury* produces a geopropolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.89, n.3, 2017. DOI: 10.1590/0001-3765201720160725. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/YZLNGn7pQS6FzvKDcX7fCmm/abstract/?lang=en>. Acesso em: 18 set. 2022.

SILVA, A. F. **Própolis: Caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante**. 2009. 145 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2009. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/416>. Acesso em: 8 ag. 2020.

SILVA, C. C. *et al.* Determinação da Atividade Antimicrobiana do Extrato da Própolis Orgânica Mista Frente a Microrganismos Multirresistentes. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 24, n. 1, 2018. Disponível em: <https://revistas.uepg.br/index.php/biologica/article/view/12969/209209211341>. Acesso em: 13 set. 2022.

SILVA, *et al.* Palynological origin, phenolic content and antioxidant properties of geopropolis collected by Mandaçaia (*Melipona mandacaia*) stingless. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 1, 2020. DOI: 10.1590/1983-21252020v33n126rc. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rcaat/a/kqTRk6kb8B7jNFGLL7mDk3z/abstract/?lang=en>. Acesso em: 18 set. 2022.

SOBREIRA, A. L. C. *et al.* Atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis vermelha contra isolados patogênicos de *Candida* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 15, n. 4, 2020. DOI: 10.18378/rvads.v15i4.7969.

Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7634387>. Acesso em: 13 set. 2022.

SONG, M. *et al.* Composition and distribution of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in propolis from different plant origins and extraction processing.

**Journal of Food Composition and Analysis**, v. 104, 2021. DOI:

10.1016/j.jfca.2021.104141. Disponível em: Composition and distribution of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in propolis from different plant origins and extraction processing - ScienceDirect. Acesso em: 13 set. 2022.

SOUZA, U. P. **perfil químico e atividade antimicrobiana (candida spp.) de geoprópolis coletada pelas abelhas *Melipona subnitida* Ducke e *Melipona mandacaia* Smith:**

formulações de gel e sabonete líquido. 2018. 129 p. Tese (Doutorado em desenvolvimento e inovação tecnológica em medicamentos) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2018. Disponível em: <http://ppgditm.ufrpe.br/sites/default/files/testes-dissertacoes/Tese%20completa%20Umberto%20Pereira%20PPgDITM%20%281%29.pdf>. Acesso em: 18 set. 2022.

SOYLU, E. M. *et al.* Antifungal activity of propolis against postharvest disease agent *Penicillium digitatum*. **Asian Journal of Chemistry**, v. 20, n. 6, 2008. Disponível

em: [https://asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=20\\_6\\_100](https://asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=20_6_100). Acesso em: 10 set. 2022.

TORRES, R. N. S. *et al.* Constituintes voláteis de própolis piauiense. **Química Nova**, v. 31, n. 3, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000300003. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/qn/a/BSFnZQcCfDZXFcpcK5LKPjB/?lang=pt>. Acesso em: 12 set. 2022.

VILANOVA, L.; VALERO-JIMÉNEZ, C. A.; J. A. L. VAN KAN. Deciphering the *Monilinia fructicola* Genome to Discover Effector Genes Possibly Involved in Virulence. **Genes (Basel)**, v. 12, n. 4, 2021. DOI 10.3390/genes12040568.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8070815/tool=pmcentrez&report=abstract>. Acesso em: 3 ago. 2021.

VILLARINO, M.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. Growth and aggressiveness factors affecting *Monilinia* spp. survival peaches. **International Journal of Food Microbiology**, v. 227, p. 6-12, 2016. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.023 .

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.023>. Acesso em: 20 jul. 2021.

WAGNER JUNIOR, A. *et al.* Avaliação de diferentes genótipos de pessegueiro quanto à reação a *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey em frutos. **Revista Ceres**, v. 55, n. 2, 2008. Disponível em: <http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/3293>. Acesso em: 19 jul. 2021.

WANG K. *et al.* Molecular mechanisms underlying the in vitro anti-inflammatory effects of a flavonoid-rich ethanol extract from chinese propolis (poplar type) **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2013, 2013. DOI 10.1155/2013/127672. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/127672>. Acesso em: 4 ago. 2021.

WÓZNIAK, M. *et al.* Effect of the Solvent on Propolis Phenolic Profile and its Antifungal, Antioxidant, and In Vitro Cytoprotective Activity in Human Erythrocytes Under Oxidative Stress. **Moleculares**, v. 25, n. 18, 2020. DOI: 10.3390/molecules25184266. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/18/4266>. Acesso em: 13 set. 2022.

XU, Y. *et al.* Tea tree oil controls brown rot in peaches by damaging the cell membrane of *Monilinia fructicola*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 175, 2021. DOI 10.1016/j.postharvbio.2021.111474. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111474>. Acesso em: 27 jul. 2021.

YEN, C. H. *et al.* Beneficial efficacy of various propolis extracts and their digestive products by in vitro simulated gastrointestinal digestion. **LWT**, v. 84, 2017. DOI:10.1016/j.lwt.2017.05.074. Disponível em: Beneficial efficacy of various propolis extracts and their digestive products by in vitro simulated gastrointestinal digestion - ScienceDirect. Acesso em: 15 set. 2022.

ZABAIU, N. *et al.* Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, Netherlands, v. 207, 2017. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009308417300257?via%3Dihub>. Acesso em: 12 set. 2022.

ZHANG, W. *et al.* Optimized extraction based on the terpenoids of *Heterotrigona itama* propolis and their antioxidative and anti-inflammatory activities. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, 2020. DOI [doi.org/10.1111/jfbc.13296](https://doi.org/10.1111/jfbc.13296). Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfbc.13296>. Acesso em: 7 ago. 2021.

ZULHENDRI, F. *et al.* Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antiparasitic Properties of Propolis: A Review. **Foods**, Basiléia, v. 10, n. 6, jun 2021. DOI 10.3390/foods10061360. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10061360>. Acesso em: 1 ago. 2021.

WUADEN, R. C. *et al.* Atividade antifúngica do extrato alcoólico de própolis, álcool de cereais e do óleo essencial de manjeriço sobre *Botrytis cinerea*. **Colloquium Agrariae**, v. 14, n.2, 2018. DOI: 10.5747/ca.2018.v14.n2.a205. Disponível em: <https://revistas.unoeste.br/index.php/ca/article/view/2003/2192>. Acesso em: 12 set. 2022.

