

EFEITO FUNGICIDA DA PRÓPOLIS SOBRE *ALTERNARIA* SP. NA CULTURA DO TOMATEIRO

Gustavo Haralampidou da Costa Vieira¹; Livia de Freitas Rocha²; Wagner da Paz Andrade³; Carlos Aparecido Ferreira Barbosa⁴

1- Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul; 2- Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul; 3- Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul; 4- Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

RESUMO

Os impactos causados por agrotóxicos têm levado ao surgimento de inúmeros estudos, que visam desenvolver produtos isentos de substâncias nocivas ao homem e ao ambiente. Sendo o tomate uma das hortaliças que mais recebe agrotóxicos no país e considerando que a *Alternaria* sp. é o fungo de maior incidência nesta cultura, o presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de determinar o potencial fungicida da própolis no tratamento deste fungo ocorrente em plantas de tomateiro no município de Cassilândia/MS. Para tanto, inóculos do fungo foram isolados diretamente de plantas com o patógeno, e a partir desses, determinou-se a capacidade de germinação e crescimento micelial dos fungos submetidos a meios de cultura acrescidos de própolis nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 mL/L, sob diferentes períodos de exposição. A contra prova foi realizada em mudas de tomateiro. Os tratamentos diferiram entre si significativamente em todos os períodos. O tratamento com 16 mL/L de própolis foi o que apresentou melhor desempenho no controle da esporulação do fungo comparado com as demais doses, porém inferior significativamente aos resultados obtidos com o fungicida Folicur 200 EC® (1 mL/L d'água). O período que apresentou melhor controle na esporulação foi o de 12 horas. Os dados sugerem que a própolis apresenta alguma atividade inibitória para fungos.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum* Mill., *Apis mellifera*, própolis, antifúngicos, produção orgânica.

FUNGICIDAL EFFECT OF PROPOLIS ON *ALTERNARIA* SP. IN TOMATO

ABSTRACT

The impacts caused by pesticides have led to the emergence of numerous studies aimed at developing products free of harmful substances to man and the environment. As the tomato one of the vegetables to receive more pesticides in the country, and considering that the *Alternaria* sp. is the fungus is a higher incidence in this culture; this works was to determine the fungicide potential of propolis in the treatment of this fungus occurring on tomato plants in the municipality of Cassilândia/MS. To this end, inoculate of the fungus were isolated directly from plants with the pathogen, and from these, was determined the capacity of germination and mycelial growth in means of culture plus propolis at concentrations of 2, 4, 8 and 16 mL / L, under different exposure periods. The against prove was held in the seedlings of tomato. The treatments differed significantly in all periods. In general treatment with 16 mL / L of propolis showed the best performance in the control of sporulation compared with the other doses, however significantly lower results obtained with the fungicide Folicur ® 200 EC (1 mL / L water). The period showed better control in sporulation was the 12 hours. The data suggest that propolis have any inhibitory activity for fungi.

Key-words: *Lycopersicon esculentum* Mill., *Apis mellifera*, propolis, antifungal, organic production.

INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa ou cerosa, elaborada pelas abelhas a partir de secreções de árvores, flores, folhas e pólen, recebendo ainda a adição de substâncias secretadas pelo metabolismo glandular das abelhas (Burdock, 1998). Esse precioso produto natural é usado na medicina tradicional desde a antiguidade, devido ao seu largo espectro de atividade biológica como antibacteriana, antiviral, antifúngica, antioxidante, apresentando muitas outras atividades biológicas (Orsi et al., 2005, 2006; Fernandes Jr et al., 2005; Gonsales et al., 2006)

As abelhas usam a própolis basicamente para duas funções: mecânica, evitando a perda de calor por convecção e química, por garantir a assepsia principalmente nas regiões de cria (Seeley, 1995), sendo esta última função de maior importância (Ogren, 1990).

Comprova-se a importância deste produto não apenas em termos econômicos, mas principalmente científicos, com centenas de artigos publicados nas últimas décadas (Teixeira et al., 2003).

Nos últimos anos tem aumentado a preferência, por parte dos consumidores, nos produtos de boa qualidade e isentos de agrotóxicos, que oferecem, por tanto, menores riscos a saúde e ao ambiente. Dentre as principais substâncias alternativas que têm sido utilizadas no controle fitossanitário de pragas e doenças, a própolis se destaca por apresentar grande eficiência no controle de microorganismos patogênicos (Silva, 2009). O homem reconheceu as potencialidades da própolis desde a antiguidade e as têm usado no controle de diversos microorganismos patogênicos, principalmente naqueles causadores de doenças as plantas.

De acordo com Lopes & Santos (1994), os fungos que atacam o tomateiro, são responsáveis pelo aumento de 30% no custo de produção. Dentre os fungos ocorrentes, mere-

ce destaque a *Alternaria* sp. que em algumas regiões chega a representar incidência de 88% (Salustiano et al., 2006). Sendo o tomate uma das hortaliças que mais recebe agrotóxicos no país, e considerando que a *Alternaria* sp. é o fungo de maior incidência nesta cultura, o presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de determinar o potencial fungicida da própolis sobre *Alternaria* sp. em plantas de tomateiro cultivadas no município de Cassilândia/MS.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Campus da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Unidade de Ensino de Cassilândia (19°06'48" S; 51°44'03" W – 470 m de altitude), no período de julho a setembro/2009.

Coleta e preparação da própolis

A própolis usada neste trabalho foi produzida na UEMS, em colméias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). Para coleta usou-se coletores de própolis inteligente (CPI) instalados em dez colméias, conforme metodologia de Adomar (1996) citado por Pontara et al. (1999). A solução de própolis foi preparada na concentração de 30%, sendo diluída em álcool de cereais. Para o preparo da calda esta solução foi diluída nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 mL/L de água destilada e esterilizada para aplicação.

Isolamento e produção de inóculo de *Alternaria* sp.

Foram utilizados isolados obtidos a partir da retirada de fragmentos do tecido lesionado de folhas de tomateiro, naturalmente infeccionadas, adquiridas em hortas instaladas no município de Cassilândia/MS. Para a realização do processo de isolamento do patógeno pegou-se as respectivas folhas cortando-as em pequenos fragmentos.

Os fragmentos foram desinfetados durante 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio a 1% e álcool 70% pelo mesmo período, sendo então banhados em água esterilizada por alguns segundos apenas para limpeza. Após a desinfecção os fragmentos foram transferidos para placas de petri contendo como substrato o meio batata-dextrose-ágar (BDA). Essas placas foram incubadas à 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias. Após sete dias foi repetido o processo com mais folhas de tomateiro parasitadas. Após o aparecimento das estruturas reprodutivas do fungo, foi feita a repicagem do material e a transferência destas para outros meios BDA que foram incubados novamente em BOD à 25°C ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias. Todo procedimento de isolamento e obtenção de cultura pura foi realizado em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar) para evitar a contaminação dos meios por outros microorganismos. As colônias puras obtidas foram assim mantidas em laboratório para utilização nos testes.

Avaliação da própolis sobre a germinação de *Alternaria* sp.

Para a avaliação da inibição da germinação do fungo, foi preparada uma suspensão de esporos a partir do micélio fúngico das culturas puras, anteriormente produzidas. O potencial de inóculo da suspensão de esporos foi realizado através da contagem em uma câmara de Peter.

Foram confeccionados meios de suco V8-ágar, contendo as diferentes concentrações de própolis (2, 4, 8 e 16 mL/L). Após a sua solidificação, estes foram cortados em tiras e colocados sobre lâminas, dentro de caixas de acrílico do tipo gerbox, contendo espumas úmidas. Amostras de 30µL da suspensão de esporos foram depositadas na superfície dos meios, sendo estes, posteriormente incubados em BOD, com fotoperíodo de 12 horas a

25 °C, por 12, 24 e 36 horas. A avaliação foi feita estimando-se a percentagem de esporos germinados. As médias de germinação foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3 (4 concentrações de própolis x 3 períodos de incubação), sendo considerado o meio suco V8-ágar como testemunha positiva e o meio com o fungicida Folicur 200 EC® a testemunha negativa, com 6 repetições.

Avaliação da eficiência de controle da própolis no crescimento micelial

Para a avaliação do crescimento micelial realizou-se a repicagem do fungo, através da retirada e instalação de um disco de 8 mm de diâmetro, contendo micélio e esporos de *Alternaria* sp., para o centro de placas de Petri contendo os seguintes tratamentos: extrato de própolis nas concentrações de 0 (testemunha), 2, 4, 8 e 16 mL/L, e o Folicur 200 EC® (1 mL/L d'água), incorporados ao meio BDA. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações de biocontrole da própolis foram realizadas através da medição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos (média de duas medidas diametralmente opostas), com auxílio de uma régua milimetrada. As medições foram realizadas em três períodos de incubação: 48, 72 e 96 horas.

Foram realizadas análise de variância e a comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 6 tratamentos e 5 repetições, sendo cada parcela constituída por 5 placas de Petri.

Avaliação da eficiência de controle da própolis em mudas de tomateiro

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sendo avaliado o efeito da própolis sobre a incidência e a severidade de *Alternaria* sp. em mudas de tomateiro.

Foi realizado o cultivo de mudas de tomate longa vida, híbrido Carmem, em bandejas de poliestireno com 128 células, que foram posteriormente transplantadas para vasos com capacidade para 5L de solo, quando as mesmas atingiram 4 folhas definitivas, cerca de 20 dias após a semeadura. Os tratamentos culturais foram realizados de acordo com as exigências da cultura (Filgueira, 2003).

A inoculação do patógeno nas mudas foi realizada através da pulverização nas plantas, de uma suspensão de esporos obtida a partir da cultura pura de *Alternaria* sp. A suspensão foi calibrada através de contagem em câmara de Peter. O controle químico foi efetuado pelo tebuconazole, sendo o produto comercial o Folicur 200 EC®. Para as pulverizações utilizou-se um pulverizador costal de acionamento manual, com capacidade para 5L. As soluções foram preparadas no momento de cada aplicação.

Os tratamentos utilizados foram: o produto químico Folicur 200 EC® (1 mL/L d'água), extrato de própolis nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 mL/L, e como testemunha a aplicação de água destilada.

A aplicação dos tratamentos teve início a partir do aparecimento dos primeiros sintomas, sendo realizada semanalmente, totalizando três aplicações. As avaliações foram efetuadas sempre uma semana após as pulverizações, determinando-se incidência e severidade de doença.

Para a quantificação da doença através da severidade foi utilizada uma escala diagramática, onde: 1= plantas sem sintomas; 2= plantas apresentando até 2% da área foliar com sintomas; 3= plantas com 4% da área fo-

liar com sintomas; 4= plantas com 8% da área foliar com sintomas; 5= plantas com 16% da área foliar com sintomas e 6= plantas com até 32% da área foliar com sintomas (Azevedo, 1997). Para cada uma das variáveis, foram realizadas análise de variância e a comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com seis tratamentos e quatro repetições, sendo as parcelas constituídas de seis plantas cada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ação da própolis sobre esporos de *Alternaria* sp.

Os tratamentos diferiram entre si significativamente em todos os períodos. O tratamento com 16 mL/L de própolis (T5) foi o que apresentou melhor desempenho no controle da esporulação do fungo comparado aos demais tratamentos, se aproximando aos resultados obtidos com o fungicida Folicur 200 EC® (1 mL/L d'água) (T6). O período que apresentou melhor controle na esporulação foi o período de 12 horas (Figura 1).

Os resultados indicam que a própolis apresenta atividade inibitória para fungos. Embora estudos que comprovam a eficiência da própolis no combate de fungos sejam escassos, na literatura existem trabalhos que mostram a eficiência dessa substância sobre outros patógenos. Dados da Embrapa (2008) ressaltam que o extrato de própolis nas concentrações de 0,5 e 1% são eficiente no controle de bactérias. De acordo com Miorin et al. (2003), uma vez que estas bactérias podem desenvolver resistência aos antibióticos, a atividade antimicrobiana da própolis passa a ter maior relevância, pois pode constituir no futuro, uma alternativa para tratar estes agentes patogênicos.

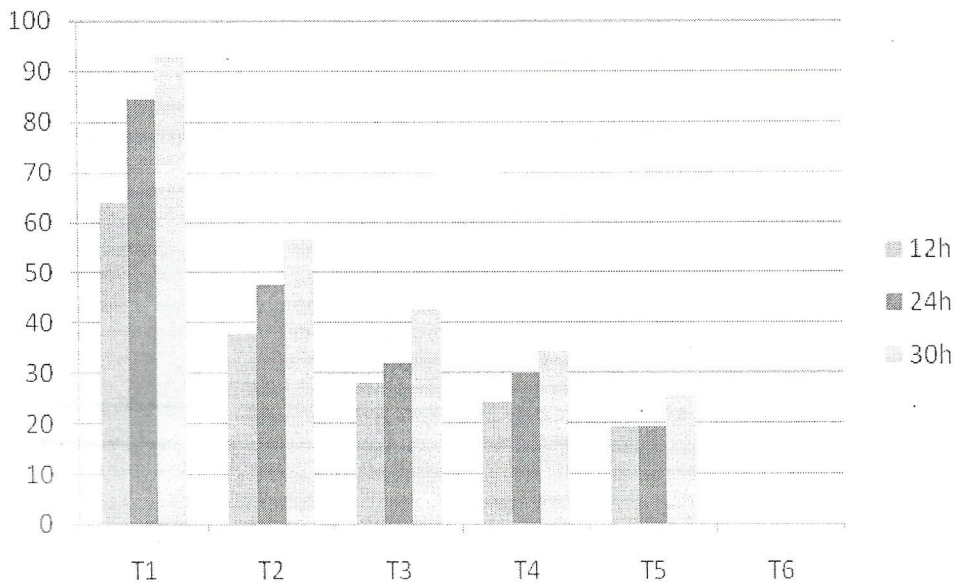


Figura 1. Porcentagem de esporulação de *Alternaria* sp. submetidas a meios de cultura com diferentes concentrações de própolis. Cassilândia/MS, 2009. (T1- meio suco V8-ágar; T2- suco V8-ágar + própolis 2ml/L; T3- suco V8-ágar + 4mL/L; T4- V8-ágar + 8mL/L; T5- suco V8-ágar + 16mL/L; T6- Folicur 200 EC® 1 mL/L d'água).

Avaliação da eficiência da própolis no crescimento micelial de *Alternaria* sp.

O crescimento micelial no meio com própolis na concentração de 16 mL/L (T5) foi significativamente inferior aos demais tratamentos (Tabela 1). Observou-se para o T5 um crescimento micelial de 0,28 cm, enquanto que os tratamentos com as menores concentrações de própolis (T2= 2 mL/L e T3= 4mL/L), apresentaram crescimento micelial de 0,52 cm. Com relação ao tempo de exposição, o período de 72 horas se destacou significativamente dos demais com maior crescimento dentre todos os tratamentos (Tabela 1).

Observa-se que a maior concentração de própolis apresentou, dentre as concentrações testadas, a melhor resposta inibitória no crescimento micelial do fungo. Os dados encontrados neste estudo corroboram com os resultados obtidos por Park et al. (1998), que testou extratos de própolis a 70 e 80% de etanol, observando que esta substância apresenta propriedades anti-fúngicas e antioxidante. Embora a própolis na concentração de 16% tenha

apresentando uma resposta negativa ao crescimento do fungo, os valores encontrados foram inferiores quando comparado ao fungicida (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento micelial do fungo *Alternaria* sp. em diferentes concentrações de própolis e em diferentes períodos de tempo. Cassilândia/MS, 2009.

Tratamentos	Crescimento Micelial (cm)
Meio BDA	0,67 ^a
Própolis a 2%	0,52 b
Própolis a 4%	0,52 b
Própolis a 8%	0,42c
Própolis 16%	0,28d
Fungicida	0,00e
Tempo	
48	0,26 c
72	0,51a
96	0,43 b
CV(%)	18,17

Avaliação da eficiência de controle da própolis em mudas de tomateiro

Os resultados obtidos em relação a eficiência da própolis no controle do fungo em mudas de tomateiro estão dispostos na tabela 2.

Na primeira aplicação feita nas mudas não constatou-se diferença significativa entre os tratamentos, exceto no tratamento 6 que correspondeu ao fungicida Folicur 200 EC® (1 mL/L d'água), apresentando por tanto, melhor

desempenho.

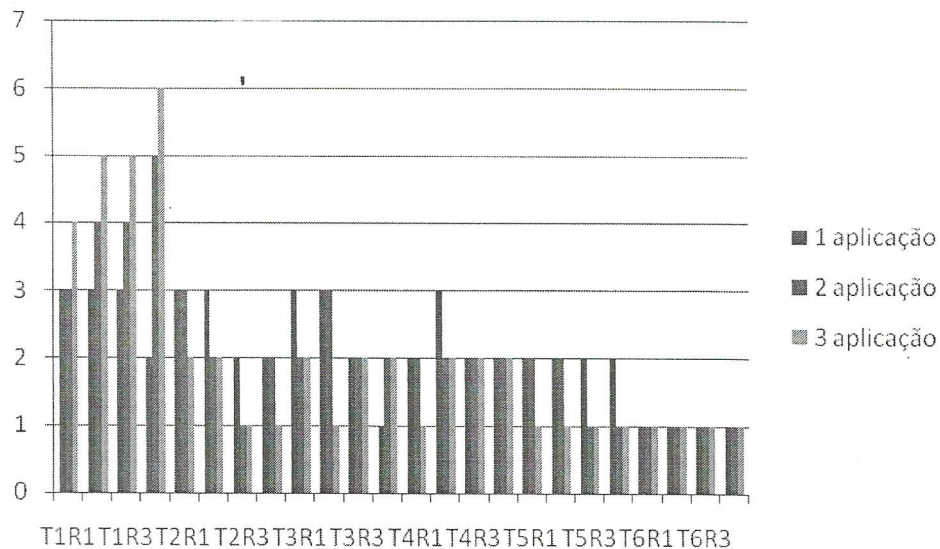
Na segunda aplicação os tratamentos com própolis e fungicida diferiram significativamente do tratamento com água, porém o fungicida foi superior a todos.

Observa-se uma tendência no aumento da eficiência com o aumento da concentração de própolis. Tal resultado deve-se a constantes aplicações fazendo assim com quem o fungo não se desenvolva mais, inibindo sua infestação (Tabela 2) e (Figura 2).

Tabela 2. Médias das notas da eficiência do controle de *Alternaria* sp. em mudas de tomateiro feita através de pulverizações divididas em 3 aplicações. Cassilândia/MS, 2009.

Tratamentos	Aplicação 1	Aplicação 2	Aplicação 3
H ₂ O	1,00a	1,00a	1,00a
Própolis a 2%	2,00 b	1,25ab	1,00a
Própolis a 4%	2,25 b	2,00ab	1,75ab
Própolis a 8%	2,25 b	2,25ab	1,75ab
Própolis a 16%	2,75 b	2,50 b	2,00 b
Fungicida	2,75 b	4,00c	5,00c

Figura 2. Eficiência de diferentes concentrações de própolis sobre *Alternaria* sp. ocorrentes em mudas de tomateiro. Cassilândia/MS, 2009. (1ª. Aplicação = 27 dias; 2ª. Aplicação = 34 dias; 3ª. Aplicação = 41 dias).



CONCLUSÃO

A própolis apresenta alguma ação inibitória sobre o fungo *Alternaria* sp.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, L.A.S. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo, 1997. p.83.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-63, 1998.

EMBRAPA. Controle do Crescimento e Identificação de Microorganismos Contaminantes Visando à Micropropagação de Gemas Laterias de Manguieira. 2008.

FERNANDES JR., A.; BALESTRIN, E.; BERTONI, J.E.C.; ORSI, R.O.; CUNHA, M.L.R.; MONTELLI, A.C. Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 100, p. 563-6, 2005.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças – Viçosa: UFV**, 2ª ed., cap. 13, p. 204. 2003.

GONSALES, G.Z.; ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; FERNANDES JR., A. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **The Journal Venomous Animals and Toxins**, v. 12, p. 124-32, 2006.

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-SSI, 1994. 67p.

MIORIN, P.L.; LEVY JUNIOR, N.C.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 913–920. 2003.

OGREN, W. What in the world is propolis used for? **American Bee Journal**, Hamilton, v.130, n. 4, p. 239-240, 1990.

ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C.; BANKOVA, V. Effects Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages

against Salmonella Typhimurium. **International Immunopharmacol.** v. 5, p. 359-68, 2005.

ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C.; FERNANDES JR, A.; BANKOVA, V. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the Salmonella Thypi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 108-12, 2006.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICINI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18 n. 3 Campinas Aug./Oct. 1998

PONTARA, L.P.M.; NOGUEIRA-COUTO, R.H.; BETT, V.; NANNI, M.R.; FRANCO, S.L.; RAMOS, F.L.; ALVARES, R. Rendimiento de las obreras africanizadas, *Apis mellifera*, productividad de las colonias y producción de propoleos total e por partes de la colmena, valorada mediante cuatro técnicas productivas en las cuatro estaciones del año. Comisión Perm. De Tecnol. y Equipo Apícola. Maringá-PR, 6 p., 1999.

SALUSTIANO, M.E.; VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L.; FONTES, P.C.R. O manejo da pinta-preta do tomateiro em épocas de temperaturas baixas. **Summa Phytopathologica**. v.32, n.4, p. 353-359, 2006.

SEELEY, T. D. **The wisdom of the hive – The social physiology of honey bee colonies.** Harvard: Harvard University Press. 1995. 295p.

SILVA, J.C. Efeito inibitório de métodos alternativos no controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em frutos de mamoeiro. Cassilândia: UEMS/Campus de Cassilândia 2009. 36p. (Trabalho de conclusão de curso).

TEIXEIRA, E.W.; MESSAGE, D.; MEIRA, R.M.S.A.; SALATINO, A. Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odesa, v. 60, n. 1, p. 83-106, 2003.