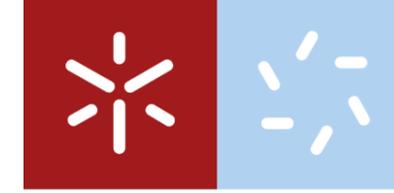




**Potencial do própolis português no
biocontrolo de doenças da macieira**

Juliana Silva

UMinho | 2022

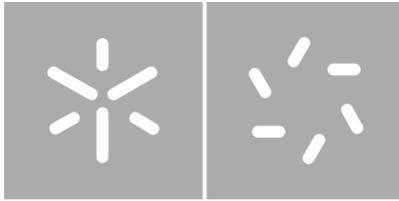


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Juliana Dias Silva

**Potencial do própolis português no
biocontrolo de doenças da macieira**

Dezembro de 2022



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Juliana Dias Silva

**Potencial do própolis português no
biocontrolo de doenças da macieira**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e
Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho realizado sob a orientação de
Professora Doutora Ana Cristina Gomes Cunha
e
**Professora Doutora Cristina Alexandra Almeida
Aguar**

Dezembro de 2022

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

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

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

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

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

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

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar por agradecer à Universidade do Minho e à Escola de Ciências por tornarem esta dissertação possível de realizar. Gostaria de expressar também a minha admiração e os mais sinceros agradecimentos às minhas orientadoras, Professora Cristina Aguiar e Professora Ana Cunha por partilharem todo o seu conhecimento comigo, pela paciência, ajuda e tempo prestado e também por me ensinarem que é sempre possível fazer mais e melhor, basta acreditarmos e trabalharmos para isso. Obrigada de coração por me terem aberto portas para o mundo da ciência e por me demonstrarem que quando trabalhamos naquilo que gostamos a vida fica mais interessante e desafiadora.

Gostaria de começar por agradecer à minha mãe, pai e namorado, por todo o apoio, amor carinho e pela enorme paciência que sempre tiveram comigo. Obrigada por estarem sempre do meu lado, por acreditarem em mim, por nunca me deixarem desistir, por investirem na minha formação e futuro e por me darem sempre a oportunidade de fazer mais e melhor. O meu mais profundo obrigada por tudo aquilo que me ensinaram, por me terem tornado na mulher que sou hoje com objetivos e vontade de vencer, o meu mais profundo obrigada por serem os pilares da minha vida.

Aos meus colegas de laboratório gostaria também de agradecer pela ajuda prestada no laboratório e nas hortas da Universidade do Minho, por todo o conhecimento partilhado e pela animação e diversão na realização dos ensaios que tornou tudo mais leve.

A todo o pessoal técnico que trabalha no Departamento de Biologia, gostaria também de agradecer por toda a ajuda, simpatia e disponibilidade prestada que tornaram este trabalho mais fácil de realizar.

Ao meu tio Óscar, o meu sincero obrigada por tornar possível a realização do ensaio de campo com o resíduo de própolis, por ter despendido do seu tempo para me acompanhar até Braga e me ter ajudado na gestão do terreno e na plantação das alfaces.

A todos o meu mais sincero, Obrigada!

A vida só faz sentido quando nos
rodeamos das pessoas certas!

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

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

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

Potencial do própolis português no biocontrolo de doenças da macieira

RESUMO

O própolis, uma mistura elaborada pelas abelhas a partir de exsudados de plantas, possui inúmeras bioatividades tais como antimicrobiana e antioxidante. Com várias aplicações, nomeadamente medicinais e cosméticas, tem vindo a ser investigado na agricultura no controlo de doenças causadas por microrganismos fitopatogénicos. A cultura da maçã é uma das mais importantes a nível global e enfrenta desafios tais como as elevadas perdas económicas causadas por doenças fúngicas, que também contribuem para agravar o desperdício alimentar. As doenças pré- e pós-colheita são maioritariamente controladas pela aplicação de produtos químicos de síntese eficazes, mas que acarretam sérios riscos para os seres vivos e o ambiente, e contribuem para o aparecimento de estirpes resistentes. Assim, urge desenvolver produtos igualmente eficazes, mas mais seguros. Neste contexto, com vista a estudar o potencial do própolis como biopesticida, este trabalho pretendeu avaliar o potencial antifúngico de extratos hidroalcoólicos de própolis do Caramulo – Cr18.EEf₇₀ e Cr18.EEf₃₅ – contra fungos causadores de doenças da maçã pré- e pós-colheita, nomeadamente *Venturia inaequalis*, *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*. Ambos os extratos se mostraram ativos contra *B. cinerea* e *P. expansum*, com cerca de 80 % de inibição ao terceiro dia, sendo *P. expansum* o fungo mais suscetível e Cr18.EEf₇₀ o extrato mais eficaz. Cr18.EEf₇₀ e Cr18.EEf₃₅ foram igualmente capazes de inibir o crescimento de *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus*. No ensaio de campo com macieiras, constatou-se que a calda de própolis teve uma eficiência semelhante à da calda de enxofre, usado em fungicidas comerciais, com percentagens de folhas afetadas comparáveis, mas conseguiu ainda mitigar a progressão da severidade das lesões foliares. Os extratos de própolis estudados têm assim potencial biofungicida na cultura da maçã, sendo uma alternativa mais ecológica e segura, permitindo aumentar o rendimento de produção, reduzir o desperdício alimentar e valorizar, ainda, o setor apícola nacional. A aplicação de resíduo de própolis no solo inibiu o crescimento de alfaces, registando-se menores valores de área foliar, peso seco e peso fresco de modo dependente da dose. Porém, a capacidade antioxidante das mesmas alfaces aumentou, de modo dependente da dose, sugerindo que a aplicação deste resíduo, em doses adequadas, possa potenciar a qualidade nutricional dos produtos e simultaneamente controlar microrganismos fitopatogénicos do solo.

Palavras-chave: Própolis, resíduos da extração de própolis, biocontrolo, fungos fitopatogénicos, maçã.

Potential of Portuguese propolis in the biocontrol of apple tree diseases

ABSTRACT

Propolis, a mixture made by bees from exudates of plants, has numerous bioactivities such as antimicrobial and antioxidant. With several applications, including medicinal and cosmetic, it has been investigated in agriculture to control diseases caused by phytopathogenic microorganisms. The apple crop is one of the most important globally and faces challenges such as the high economic losses caused by fungal diseases, which also contribute to worsening food waste. Pre- and post-harvest diseases are mostly controlled by the application of effective synthetic chemical products, but these pose serious risks to living beings and the environment and contribute to the emergence of resistant microbial strains. Therefore, it is urgent to develop products that are equally effective but safer. In this context, in order to study the potential of propolis as a biopesticide, this work aimed to evaluate the antifungal potential of hydroalcoholic extracts of Caramulo propolis - Cr18.EEf₇₀ and Cr18.EEf₃₅ - against fungi causing pre- and post-harvest apple diseases, namely *Venturia inaequalis*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. Both extracts proved active against *B. cinerea* and *P. expansum*, with about 80% inhibition by day 3, *P. expansum* being the most susceptible fungus and Cr18.EEf₇₀ the most effective extract. Cr18.EEf₇₀ and Cr18.EEf₃₅ were also able to inhibit the growth of *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* and *Staphylococcus aureus*. In the field trial with apple trees, Cr18.EEf₃₅ was found to have similar efficiency to sulfur solution, used in commercial fungicides, with comparable percentages of affected leaves, but was still able to mitigate the progression of leaf lesion severity. The propolis extracts studied thus have biofungicidal potential in apple culture, being a more ecological and safer alternative, allowing to increase production yield, reduce food waste and also valorize the national beekeeping sector. The application of solid residues obtained after propolis ethanolic extraction in the soil have inhibited the growth of lettuce, with lower total leaf area, dry weight and fresh weight in a dose-dependent manner. However, the antioxidant capacity of the same lettuce increased, also in a dose-dependent manner, suggesting that the application of this residue, in adequate doses, can enhance the nutritional quality of the products and simultaneously control soil borne phytopathogenic microorganisms.

Key-words: Propolis, propolis extraction residues, biocontrol, phytopathogenic fungi, apple.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS..... | ii |
| AGRADECIMENTOS..... | iii |
| DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE..... | iv |
| RESUMO..... | v |
| ABSTRACT..... | vi |
| ÍNDICE..... | vii |
| LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xi |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | xvi |
| CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS DO TRABALHO..... | 1 |
| 1. Própolis: da natureza às aplicações..... | 2 |
| 1.1. Origem..... | 3 |
| 1.2. Fontes botânicas e tipos de própolis, composição química e características físicas..... | 3 |
| 1.3. Propriedades biológicas..... | 8 |
| 1.4. Aplicações: da antiguidade à atualidade..... | 10 |
| 2. A maçã: taxonomia, características, produção e principais doenças da cultura..... | 11 |
| 2.1. A cultura da maçã em Portugal e no mundo..... | 12 |
| 2.2. Ameaças e desafios ao cultivo de maçã..... | 13 |
| 2.3. Doenças pré e pós colheita em macieiras..... | 14 |
| 2.3.1. Pedrado da macieira – ciclo de vida, condições de crescimento e controlo da doença.... | 15 |
| 2.3.2. Podridão cinzenta – ciclo de vida, condições de crescimento e controlo da doença..... | 18 |
| 2.3.3. Podridão do bolor azul – ciclo de vida, condições de crescimento e controlo da doença.. | 21 |
| 3. Objetivos do trabalho..... | 23 |
| CAPÍTULO II. MATERIAL E MÉTODOS..... | 25 |
| 1. Potencial antifúngico do extrato Cr18.EEf ₇₀ e da solução Cr18.EEf ₃₅ na cultura da maçã..... | 26 |
| 1.1. Própolis, extratos e soluções utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i> | 26 |
| 1.2. Avaliação do potencial antifúngico <i>in vitro</i> do extrato Cr18.EEf ₇₀ e da solução Cr18.EEf ₃₅ | 26 |
| 1.2.1. Testagem preliminar de procedimentos de aplicação dos extratos para avaliação do potencial antifúngico <i>in vitro</i> de Cr18.EEf ₇₀ e Cr18.EEf ₃₅ | 26 |
| 1.2.2. Avaliação do potencial antifúngico <i>in vitro</i> de Cr18.EEf ₇₀ e Cr18.EEf ₃₅ | 31 |
| 1.3. Avaliação do potencial antibacteriano <i>in vitro</i> de Cr18.EEf ₇₀ e Cr18.EEf ₃₅ | 33 |
| 1.4. Avaliação do potencial antifúngico de Cr18.EEf ₃₅ contra <i>Venturia inaequalis</i> – ensaio de campo..... | 34 |
| 1.4.1. Preparação da solução Cr18.EEf ₃₅ (calda de própolis)..... | 34 |

| | |
|---|------------|
| 1.4.2. Ensaio de eficácia da calda de própolis, Cr18.EE ₃₅ , em macieiras no campo | 35 |
| 1.5. Determinação da capacidade antioxidante de Cr18.EE _{f35} | 38 |
| 1.5.1. Ensaio DPPH | 39 |
| 1.5.2. Ensaio ABTS | 39 |
| 1.6. Análise química de Cr18.EE _{f35} | 40 |
| 1.6.1. Teor de ortodifenóis | 40 |
| 1.6.2. Teor de flavonoides totais..... | 41 |
| 1.6.3. Teor de polifenóis totais | 41 |
| 2. Efeito da aplicação de resíduos de própolis no crescimento de plantas de alface – ensaio de campo adaptado de Ferreira (2011) | 42 |
| 2.1. Preparação do solo, aplicação do resíduo de própolis e plantação das alfaces nos plots | 42 |
| 2.2. Parâmetros avaliados | 43 |
| 2.3. Avaliação da capacidade redutora total e da atividade antioxidante da alface, cultivada com adição de resíduo de própolis no solo | 44 |
| 2.3.1. Avaliação da Capacidade Redutora Total | 44 |
| 2.3.2. Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH | 45 |
| 3. Análise estatística..... | 45 |
| CAPÍTULO III. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 47 |
| 1. Potencial antifúngico do extrato Cr18.EE _{f70} e da solução Cr18.EE _{f35} na cultura da maçã..... | 48 |
| 1.1. O extrato hidroalcoólico e a calda de própolis exibem atividade antifúngica contra <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Penicillium expansum</i> | 48 |
| 1.2. O extrato Cr18.EE _{f70} e a solução Cr18.EE _{f35} possuem atividade antibacteriana..... | 54 |
| 1.3. Avaliação do potencial antifúngico da calda Cr18.EE _{f35} contra <i>Venturia inaequalis</i> em ensaio de campo com macieiras | 56 |
| 2. Potencial antioxidante da calda de própolis Cr18.EE _{f35} | 67 |
| 3. Determinação do teor de polifenóis, flavonoides e ortodifenóis da calda de própolis do Caramulo.. | 68 |
| 4. Efeito da aplicação de resíduo de própolis no crescimento de plantas de alface – ensaio de campo | 71 |
| 4.1. Avaliação de parâmetros de crescimento..... | 71 |
| 4.2. Avaliação da capacidade redutora total (CRT) e do efeito bloqueador do radical livre DPPH.... | 75 |
| CAPÍTULO IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS | 78 |
| CAPÍTULO V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
| CAPÍTULO VI. ANEXOS | 106 |

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS - 2,2' -azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulphonate)

ABTS** - Radical

AG - Ácido gálico

Cr18.EE - Extrato de própolis do Caramulo do ano 2018 elaborado com etanol absoluto (e seco)

Cr18.EE₇₀ - Extrato de própolis do Caramulo do ano 2018 elaborado com etanol a 70 % (v/v) (e seco)

Cr18.EE_{f70} - Extrato de própolis do Caramulo do ano 2018 elaborado com etanol a 70 % (v/v) (e filtrado)

C1q - complexo proteico envolvido no sistema complemento

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

DPPH• - Radical DPPH

EAG - Equivalentes de Ácido Gálico

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

EE - Extrato Etanólico (elaborado com etanol absoluto)

EQ - Equivalentes de Quercetina

etOH₇₀ - Etanol a 70 % (v/v)

EU - União Europeia

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês Food and Agriculture Organization

FNAP - Federação Nacional dos Apicultores de Portugal

G18.EE - Extrato etanólico de própolis do Gerês do ano 2018

G18.E₇₀E - Extrato etanólico de própolis do Gerês do ano 2018 elaborado com etanol a 70 % (v/v)

IBEs - Inibidores da biossíntese dos esteróis

IC (%) - inibição de crescimento

INE - Instituto nacional de estatística

PDA – Meio de cultura Potato Dextrose Agar

LB - Meio de cultura Luria-Bertani

LBA – Meio de cultura Luria-Bertani com agar

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MIC - Concentração mínima inibitória (do inglês Minimum Inhibitory Concentration)

OMS - Organização mundial da saúde

Ppm - Partes por milhão

p/p - Percentagem em massa por massa

p/v - Percentagem em massa por volume

TFT - Teor de Flavonoides Totais

TLR3 e TLR4 - Recetores do tipo Toll 3 e 4 (do inglês Toll-like receptor 3, 4)

TOD - Teor de Ortodifenóis

TPT - Teor de Polifenóis Totais

v/v - Percentagem volume por volume

WHO – Organização mundial de saúde (do inglês World Health Organization)

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Exemplos de folhas e frutos afetados com pedrado da macieira, doença causada pelo fungo <i>Venturia inaequalis</i> . As manchas observáveis nas folhas e frutos evoluem para manchas aveludadas com esporulação do fungo, até à necrose. Foto da autora (Juliana Silva)..... | 15 |
| Figura 2. Ciclo de vida de <i>Venturia inaequalis</i> . Adaptado de Agrios (2005)..... | 17 |
| Figura 3. Maçãs afetadas pela podridão cinzenta causada pelo fungo <i>Botrytis cinerea</i> . Retirado de Girardi <i>et al.</i> (2002)..... | 18 |
| Figura 4. Ciclo de <i>Botrytis</i> sp. em hortícolas. Adaptado de Agrios (2005)..... | 19 |
| Figura 5. Exemplo da podridão azul em maçãs causada pelo fungo <i>Penicillium expansum</i> , onde se observa através dos diferentes planos como o fungo afeta o interior e o exterior do fruto. Retirado de Girardi <i>et al.</i> (2002)..... | 21 |
| Figura 6. Ciclo de vida de <i>Penicillium</i> sp. Adaptado de Abdelghany <i>et al.</i> (2016)..... | 22 |
| Figura 7. Desenho experimental do ensaio com <i>Botrytis cinerea</i> para o estudo da avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> com Cr18EEf ₇₀ /Cr18.EEf ₃₅ onde se encontra representada a inoculação do fungo (A) e o processo de pulverização de no meio de cultura e no micélio do fungo em simultâneo (B)..... | 31 |
| Figura 8. Desenho experimental do ensaio com <i>Penicillium expansum</i> para o estudo da avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> com Cr18EEf ₇₀ /Cr18.EEf ₃₅ com 3 réplicas por tratamento: pulverização de Cr18.EEf ₇₀ ou de Cr18.EEf ₃₅ sobre o meio de cultura para onde serão transportados os micélios passado as 24 horas (A) pulverização de Cr18.EEf ₇₀ ou de Cr18.EEf ₃₅ sobre o meio de cultura e o micélio do fungo simultaneamente (B), placas sem qualquer tratamento (C) e pulverização de etanol 35 % ou de etanol 70 % sobre o meio de cultura e sobre o micélio do fungo simultaneamente (D)..... | 32 |
| Figura 9. Representação esquemática do ensaio para a avaliação da atividade antibacteriana de Cr18.EEf ₇₀ /Cr18.EEf ₃₅ contra as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Escherichia coli</i> . Para cada bactéria foi realizado um ensaio em triplicado (E1, E2, E3) com três réplicas cada (R1, R2, R3). Em cada réplica de cada ensaio foram colocados 5 µL de suspensão bacteriana, ou seja, um total de 9 gotas de 5 µL por placa..... | 33 |

| | |
|--|----|
| Figura 10. Desenho experimental dos talhões de macieiras situados nas hortas da UMinho, Braga, Portugal..... | 34 |
| Figura 11. Desenho experimental do ensaio conduzido no campo com a numeração das árvores e com as dimensões dos diferentes talhões onde foram aplicados os diferentes tratamentos a testar: tratamento com Cr18.EEf ₃₅ (C), tratamento com enxofre (S) e controlo com etanol a 35 % (v/v) (E)..... | 36 |
| Figura 12. Friso das classes de afetação de <i>V. inaequalis</i> . A: Classe 0 - sem sintomas; B: Classe 1 - manchas pintpoint sem esporulação (hipersensibilidade); C: Classe 2 - lesões cloróticas e necróticas irregulares sem esporulação; D: Classe 3a - lesões cloróticas e necróticas irregulares com eventual esporulação leve; E: Classe 3b - lesões cloróticas e necróticas irregulares com esporulação; F: Classe 4 - lesões com esporulação abundante (suscetibilidade completa); G: necrose. Foto da autora (Juliana Silva)..... | 38 |
| Figura 13. Desenho experimental dos plots de alfaces nas hortas da UMinho, Braga, contendo a distribuição das plantas pelos plots sem tratamento 0 % (0 Kg por 0,45m ²), os plots com o tratamento 15 % de resíduo de própolis (0,750 Kg por 0,45m ²) e os plots com tratamento 30 % de resíduo de própolis (1,5 Kg por 0,45m ²)..... | 43 |
| Figura 14. Crescimento micelial de <i>B. cinerea</i> (A) e de <i>P. expansum</i> (B) ao longo do tempo na presença de etanol 35 %, etanol 70 % e água. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3)..... | 48 |
| Figura 15. Parâmetros cinéticos avaliados segundo o modelo de Gompertz: μ - taxa específica de crescimento (mm dia ⁻¹), Y_{max} - Diâmetro máximo atingido pelo micélio (mm) e T_i - Tempo de inflexão (dias) para o crescimento de <i>Botrytis cinerea</i> (A) e <i>Penicillium expansum</i> (B) na presença de etanol 35 %, etanol 70 % e água. Os resultados são apresentados como média + DP (n≥3). A análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para análise de significância. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$)..... | 49 |
| Figura 16. Crescimento de <i>B. cinerea</i> (A) e <i>P. expansum</i> (B) ao longo do tempo na presença do extrato hidroalcoólico de própolis e da calda de própolis. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3)..... | 50 |

| | |
|--|----|
| Figura 17. Efeito do extrato hidroalcoólico a 70 % e da calda de própolis na inibição do crescimento (IC) de <i>B. cinerea</i> (A) ao terceiro e sétimo dias e de <i>P. expansum</i> (B) ao quarto, sétimo e décimo sétimo dia. Os resultados são apresentados como média + DP (n≥3). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey para significância. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$)..... | 51 |
| Figura 18. Parâmetros cinéticos do crescimento micelar dos fungos <i>B. cinerea</i> (I) e <i>P. expansum</i> (II) avaliados segundo o modelo de Gompertz: taxa específica de crescimento (mm dia ⁻¹) (A, B), Y _{max} ou diâmetro máximo atingido pelo micélio (mm) (C, D) e T _i ou Tempo de inflexão (dias) (E, F). Os resultados são apresentados como média + DP (n≥3). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey para análise de significância. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$)..... | 52 |
| Figura 19. Imagens do talhão 25 (A), talhão 21 (B) e do talhão 15 (C) presentes nas hortas comunitárias da UMinho, onde foram implementado o ensaio para avaliação da eficácia da calda de própolis (Cr18.EE ₃₅). Cada talhão tinha 10 macieiras e os três tratamentos (calda de própolis, enxofre e etanol 35 %). Foto da autora (Juliana Silva)..... | 57 |
| Figura 20. Análise do desenvolvimento das macieiras presentes nos talhões 15, 21 e 25 (no final do ensaio), tendo sido avaliados os parâmetros: número de folhas totais de cada árvore por talhão (A), número de flores totais de cada árvore por talhão (B), número de frutos totais de cada árvore por talhão (C) e peso dos frutos colhidos em cada talhão (D). Os resultados são apresentados como média + DP. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$)..... | 58 |
| Figura 21. Análise de sintomatologia de pedrado das árvores presentes nos talhões 15, 21 e 25 das hortas da UMinho (até dia 4 de agosto de 2022, onde foram avaliados os parâmetros: número de árvores afetadas por talhão (A) e percentagem de folhas afetadas por árvore por talhão (B). Os resultados são apresentados como média + DP. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$)..... | 59 |

- Figura 22.** Percentagem de folhas afetadas ao longo do tempo (desde dia 5 de maio de 2021 até 4 de agosto de 2022) em cada tratamento por talhão onde A diz respeito ao talhão 15, B ao talhão 21 e C ao talhão 25. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão.....59
- Figura 23.** Percentagem de folhas afetadas nas classes de afetação 1-2 e 3-5 por talhão. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$).....60
- Figura 24.** Análise do desenvolvimento das árvores presentes nos talhões 15, 21 e 25 (até final do ensaio), onde foram avaliados os parâmetros: número de folhas totais de cada árvore por talhão (A), número de flores totais de cada árvore por talhão (B), número de frutos totais de cada árvore por talhão (C) e peso dos frutos colhidos em cada talhão (D). Os resultados são apresentados como média + DP. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$).....61
- Figura 25.** Análise do desenvolvimento das árvores presentes nos talhões 15, 21 e 25 (até ao final do ensaio), onde foram avaliados os parâmetros: número de árvores afetadas por tratamento (A) e percentagem de folhas afetadas por tratamento (B). Os resultados são apresentados como média + DP. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$).....62
- Figura 26.** Percentagem de folhas afetadas por árvore ao longo do tempo (desde dia 5 de maio de 2021 até 4 de agosto de 2022) em cada tratamento tendo em conta a combinação dos 3 talhões. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=10).....63
- Figura 27.** Percentagem de folhas afetadas nas classes de afetação 1-2 e 3-5 por tratamento. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$).....64
- Figura 28.** Número de frutos afetados por tratamento. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$).....64

| | |
|--|----|
| Figura 29. Mações colhidas do talhão 21 onde é possível verificar lesões indicativas de pedrado da macieira causado pelo fungo <i>Venturia inaequalis</i> nos três tratamentos. A - etanol 35 %; B - enxofre; e C - calda de própolis. Foto da autora (Juliana Silva)..... | 65 |
| Figura 30. Parâmetros avaliados nas alfaces no final do ensaio com resíduo de própolis no solo. A - peso fresco total, B - peso fresco da parte aérea, C - peso fresco a parte radicular, D - peso seco total, E - peso seco da parte aérea e F - peso seco da parte radicular. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão (n=10). Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$)..... | 71 |
| Figura 31. Conteúdo em água das alfaces por tratamento. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão (n=10). Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$)..... | 73 |
| Figura 32. Evolução da área foliar total das alfaces nos três tratamentos (0, 15 e 30%) ao longo do período de ensaio. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=10). Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$)..... | 73 |
| Figura 33. Evolução do crescimento das alfaces no ensaio com resíduo de própolis aplicado no solo, onde A corresponde à área foliar das alfaces e B corresponde ao número de folhas totais de cada alface nos três tratamentos. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão (n=10). Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$)..... | 74 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Tipos de própolis, origem geográfica, fontes botânicas e composição química (adaptado de Silva-Carvalho <i>et al.</i> , 2015)..... | 6,7 |
| Tabela 2. Atividade antibacteriana do extrato e da calda de própolis preparados com amostras de própolis do Caramulo recolhidas em 2018. A atividade antibacteriana foi avaliada por observação da presença (+) ou ausência (-) de crescimento em meio LBA suplementado com Cr18.EEf ₇₀ e com Cr18.EEf ₃₅ | 54 |
| Tabela 3. Capacidade antioxidante de Cr18.EEf ₃₅ , Cr18.EE ₇₀ e Cr18.EE avaliada segundo o método DPPH. Os resultados são expressos em EC ₅₀ (µg/mL), como média ± desvio padrão, e o ácido gálico foi usado como padrão..... | 67 |
| Tabela 4. Teores de polifenóis totais (TPT), flavonoides totais (TFT) e ortodifenóis totais (TOD) dos extratos base do própolis do Caramulo recolhido em 2018. Os TPT e TOD foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/ g) e o TFT em miligramas de quercetina por grama de extrato (mg EQ/ g). Os valores são apresentados como a média ± desvio padrão (n=3)..... | 69 |
| Tabela 5. Capacidade redutora total (CRT) de alfaces crescidas com diferentes concentrações (0 %, 15 % e 30 %) de resíduo de própolis aplicado no solo. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato e alface (mg EAG/ g) e são apresentados como a média ± desvio padrão (DP). Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$)..... | 75 |
| Tabela 6. Atividade antioxidante determinada pelo método DPPH de extratos de alfaces crescidas com os tratamentos de resíduo de própolis aplicado no solo de 0 %, 15 % e 30 %. Os resultados estão expressos em EC ₅₀ (mg/mL), como média ± desvio padrão (DP). Ácido gálico foi usado como padrão para os ensaios DPPH. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$)..... | 76 |

CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS DO TRABALHO

1. Própolis: da natureza às aplicações

O própolis é ainda hoje um produto apícola pouco valorizado pela maioria dos apicultores nacionais. A falta de conhecimento técnico e o interesse principal na produção de mel fazem com que a produção de própolis seja uma produção secundária e muitas vezes até negligenciada. O própolis é uma mistura resinosa, aromática e de consistência mais ou menos viscosa consoante a temperatura, que tem sido explorado pelo ser humano desde a antiguidade e com diversas finalidades, como usos terapêuticos, alimentares, entre outros. A matéria-prima para a produção do própolis é recolhida pelas abelhas – principalmente *Apis mellifera* L. - de diversas partes das plantas como gomos, cascas e exsudatos de árvores, transformando-o no produto final pela adição de secreções salivares, cera e pólen (Burdock 1998; Adelman 2005) de composição química variável e com inúmeras propriedades biológicas (Katalinic *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2010).

De etimologia grega, o nome própolis deriva das palavras “pro” (significa defesa) e “polis” (que significa cidade), aludindo à sua função de defesa da colmeia. As abelhas utilizam o própolis para proteção contra insetos e microrganismos e também na reparação de frestas ou danos da colmeia, na preparação de locais assépticos para postura de ovos pela abelha rainha e na mumificação de cadáveres de insetos invasores (Marcucci 1996). Este produto é ainda utilizado na impermeabilização, vedação e isolamento térmico da colmeia (Manara *et al.*, 1999) e a sua presença na entrada da colmeia serve também como repelente, reduzindo a atenção dos invasores (Zhang *et al.*, 2014).

A recolha do própolis é feita antes do inverno em regiões temperadas e no início da estação chuvosa em climas tropicais, quando o própolis parece ser mais ativo (Farré *et al.*, 2004). A recolha é realizada através da raspagem do própolis colocada pelas abelhas sobre as paredes da colmeia ou através da colocação de redes específicas no interior da colmeia (Lopes *et al.*, 2017). Estas redes devem ser de plástico e de cor branca ou cor clara, porque as metálicas contaminam o própolis e as de fibra de vidro tendem a rasgar-se com facilidade, dificultando a recolha (FNAP 2010). Estas redes possuem orifícios com dimensões específicas que induzem as abelhas à sua selagem com própolis, podendo assim este produto ser recolhido mais facilmente pelo apicultor. O própolis pode ser vendido quando ainda se encontra nas redes ou após recolha das mesmas. Esta opção permite ao apicultor alcançar um valor de mercado substancialmente superior ao obtido pela venda do produto nas redes. Tendo em conta os métodos tradicionais de

raspagem utilizados, conseguem-se obter entre 100 a 200 gramas de própolis por ano por cada colmeia, esperando-se que com a utilização de redes se obtenham produções unitárias de cerca de 500 gramas por colmeia/ano (FNAP 2010).

1.1. Origem

As abelhas são descendentes das vespas que deixaram de se alimentar de pequenos insetos e aranhas e passaram a consumir o pólen das flores e a utilizar parte dos seus compostos bioativos para a produção de própolis (Embrapa 2016). Durante esse processo evolutivo surgiram várias espécies de abelhas, como *Apis mellifera*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipeis*, *Nanotrigona* sp. e *Tetragonisca angustula* (Manrique *et al.*, 2008), que são capazes de fazer a seleção de substâncias da natureza que melhor se adequam às suas necessidades alimentares e nutricionais, originando assim o própolis. As abelhas nativas sem ferrão, conhecidas por pertencerem ao grupo dos meliponíneos (*Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipeis*, *Nanotrigona* sp. e *Tetragonisca angustula*) produzem própolis com atividade biológica tão importante quanto o própolis produzido por abelhas nativas com ferrão (*Apis mellifera*) (Manrique *et al.*, 2008).

Ainda não está claro como é que as abelhas selecionam as espécies botânicas com a resina apropriada às funções do própolis, propondo-se que a sua seletividade esteja relacionada com as propriedades antimicrobianas da resina ou com a presença de determinados compostos nestas que evitam que as abelhas as recolham (Isidorov *et al.*, 2016). As abelhas têm espécies botânicas preferenciais, mas, na sua ausência, são capazes de utilizar outras espécies como fontes de resina (Falcão *et al.*, 2013).

1.2. Fontes botânicas e tipos de própolis, composição química e características físicas

A composição química do própolis é bastante diversa e complexa, sendo principalmente definida pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia e reflexo direto das fontes botânicas das quais as abelhas se servem (Kumazawa *et al.*, 2004). Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a fonte dominante de própolis é o exsudato dos gomos de choupo (*Populus* sp.) (Markham *et al.*, 1996). Na América do Sul, o género *Populus* não é nativo,

existindo uma grande diversidade vegetal para recolha de resina, o que dificulta a correlação do própolis com a fonte produtora (Park *et al.*, 2002). Noutras partes do mundo, as espécies vegetais utilizadas como fontes de própolis são os pinheiros, carvalhos, salgueiros, acácias, entre outras (Markham *et al.*, 1996; Lustosa *et al.*, 2008). No Brasil existem dois tipos de própolis, o própolis vermelho e o própolis verde sendo as suas fontes botânicas distintas. Assim, enquanto o própolis vermelho provém das espécies *Dalbergia ecastaphyllum* e *Clusia* spp. (*C. rosea* e *C. minor*), o própolis verde provém de *Baccharis* spp. (*B. dracunculifolia*). Na Rússia a principal fonte botânica é *Betula* spp. e na região do Pacífico as principais espécies são *Macaranga tanarius* e a *Mangifera indica*. O própolis australiano provém de *Acacia paradoxa*, enquanto o própolis mediterrânico provém principalmente de *Populus* spp., *Cistus* spp., *Eucalyptus* spp. e *Castanea sativa*. Por fim, o própolis africano tem como fontes botânicas *Musa schweinfurthii*, *Acacia* spp., *Azadirachta indica*, *Acacia* spp., *Mangifera indica* e *Sytrax* spp. (Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Desta forma, a especificidade da flora local, em cada região, torna-se um fator determinante da composição química do própolis, sendo este normalmente tipificado segundo a sua origem botânica e os seus principais constituintes (Bankova *et al.*, 2000, 2009; Falcão *et al.*, 2013) (Tabela 1). A época da colheita, a técnica de recolha a espécie de abelha que o produz também influenciam a composição química do própolis. Segundo Burdock (1998) este conjunto de fatores exerce uma enorme importância nas propriedades físicas, químicas e biológicas do própolis.

O própolis é composto basicamente de resinas e bálsamos (55 %), cera (30 %), óleos voláteis (10 %) e pólen (5 %), que formam uma mistura complexa, heterogénea, com variação de elementos e compostos químicos e suas concentrações (Woisky e Salatino, 1998). Os principais compostos já identificados são: ácidos ésteres alifáticos e aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos-gordos, aminoácidos, esteroides, cetonas, charconas e dihidrocharconas, flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, minerais e substâncias controlam a atividade de fungos e bactérias (Marcucci 1996; Park *et al.*, 1996; Bankova *et al.*, 2000; Menezes 2005). Os flavonoides constituem o principal grupo de compostos bioativos encontrados no própolis (Santos *et al.*, 2003).

De um modo geral, o própolis é um produto de coloração e consistência variada. A coloração do própolis pode variar do castanho-escuro passando por uma tonalidade esverdeada até ao castanho avermelhado, de acordo com a flora de origem. O própolis possui normalmente um odor balsâmico característico, que pode variar entre amostras (Marcucci 1996; Burdock

1998) ou mesmo ser inodoro. O própolis é quebradiço quando frio e torna-se dúctil e maleável quando aquecido. O seu ponto de fusão varia entre 60 e 70 °C podendo atingir em alguns casos 100 °C (Marcucci 1996).

Tabela 1. Tipos de própolis, origem geográfica, fontes botânicas e composição química (adaptado de Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

| Tipo de própolis | Origem geográfica | Fonte botânica | Composição química |
|------------------|---|---|---|
| Africano | Camarões, Congo, Nigéria, Quênia | <i>Musa schweinfurthii</i> | Isoflavonoides, isoflavonoides prenilados e estilbenóides, triterpenos, lignanas do tipo arilnaftaleno, geranilestilbenos e geranilflavona, derivados de amirina, lupeol e flavonoides di-prenilados |
| | Etiópia | <i>Acacia</i> spp. | Triterpenóides (α - e β -amirinas, α - e β -amiril e lupeol) |
| | Omã | <i>Azadirachta indica</i> , <i>Acacia</i> spp., <i>Mangifera indica</i> | Triterpenos, flavononas preniladas, chalconas, cardanol, cardol e ácidos anacárdicos |
| | Tailândia | <i>Styrax</i> spp. | (E)cinamil-(E)cinamilidenato |
| Australiano | Austrália | <i>Acacia paradoxa</i> | Xantorreol, pterostilbeno, sacuranetina, pinostrobin, estilbenos, tetrahidroestilbenos prenilados, ácidos cinâmicos prenilados, flavononas, flavonóis, chalconas |
| Europeu | América do Norte, Europa, Nova Zelândia, zonas temperadas da Ásia | <i>Populus</i> spp. (<i>P. nigra</i>) | Pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina, ácido cafeico, ácido ferrúlico, ácido cinâmico e seus ésteres |
| Mediterrânico | Argélia | <i>Populus</i> spp., <i>Cistus</i> spp. | Pinocembrina, pinobanksina e seu acetato, crisina, apigenina, pectolinarigenina, pilosina, ladaneina, galangina, naringenina, tectocrisina, metoycrisina, prenil ésteres de ácido cafeico, ácidos ferúlicos, ácidos diterpênicos (ácido hidroxiditerpênico, lábdano e clerodano) |
| | Grécia | <i>Conifer</i> spp. | Flavonoides, ácidos diterpênicos (isocuprêssico, pimárico e comúncio), isoagatolal, agatadiol, ferruginol e totarol |
| | Malta | <i>Ferula</i> spp. (<i>F. communis</i>) | Ácidos diterpênicos (isocuprêssico, comúncio, pimárico e ácido imbricatoloico), totarol e 13-epitorulosal |
| | Suíça | <i>P. tremula</i> | Benzil p-cumarato, benzil ferulato, e glicerídeos fenólicos |
| | Turquia | <i>Populus</i> spp., <i>Eucalyptus</i> spp., <i>Castanea sativa</i> | Pinocembrina, pinobanksina e seu acetato, prenil ésteres do ácido cafeico, ácidos ferúlicos, ácidos diterpênicos (pimárico, isopimárico, abiético, dihidroabiético, cinamil-cinamato e oleato de etilo), ésteres de ácidos aromáticos (cinamato de benzila, ácido benzenodicarboxílico) e flavonóis (benzopireno e crisina) |
| Pacífico | Havai, Taiwan, Okinawa | <i>Macaranga tanarius</i> | Flavonoides prenilados (isonimfaeol-B, nimfaeol-A, nimfaeol-B, nimfaeol-C, propolinas e 3-geranil naringenina) |

| | | | |
|----------|---------------------|--|--|
| | Indonésia, Birmânia | <i>Mangifera indica</i> | Alc(en)resorcinóis, triterpenos do tipo cicloartano e flavanonas preniladas |
| Russo | Rússia | <i>Betula</i> spp. (<i>B. verrucosa</i> , <i>B. pendula</i> e <i>B. pubescens</i>) | Ácidos cinâmicos, sesquiterpenóides, fenilpropanoides, acetina, apigenina, ermanina, ramnocitrina, campferide, α -acetoxibetulenol |
| Verde | Brasil | <i>Baccharis</i> spp. (<i>B. dracunculifolia</i>) | Fenilpropanoides prenilados, ácidos fenólicos, ácido p-coumárico prenilado, acetofenonas, ácidos diterpénicos, ácidos cafeoilquínicos, campferide, isosakuranetina e campferol |
| Vermelho | Brasil | <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> | Formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina e biochanina A |
| | Cuba, Venezuela | <i>Clusia</i> spp. (<i>C. rosea</i> e <i>C. minor</i>) | Benzofenonas polisopreniladas (nemorosona, chantoquimol e gutiferona E) |

1.3. Propriedades biológicas

As propriedades biológicas que têm sido reportadas para o própolis estão intimamente ligadas à sua composição química, particularmente à predominância de compostos fenólicos (Falcão *et al.*, 2013). A diversidade química entre diferentes amostras de própolis faria prever diferentes propriedades biológicas, no entanto, na maioria dos casos isso não se verifica (Seruga *et al.*, 2011). Entre as propriedades biológicas do própolis, destacam-se as atividades antimicrobiana (Cheng e Wong, 1996; Afolayan e Meyer, 1997; Park e Ikegaki, 1998; Sforcin *et al.*, 2000; Cushnie e Lamb, 2005), antineoplásica (Weng *et al.*, 2005), anti-inflamatória (Park *et al.*, 1996), hepatoprotetora (Gonzalez *et al.*, 1995), anti tumoral (Park *et al.*, 1999; Heo *et al.*, 2001; Búfalo *et al.*, 2009), imunomoduladora (Sforcin 2000) e antioxidante (Park 1999; Russo *et al.*, 2004). Esse potencial biológico deve-se não apenas aos compostos bioativos, mas também a sinergismos que ocorrem entre os seus muitos constituintes (Marcucci 1996).

A atividade antibacteriana foi a primeira atividade biológica do própolis a ser reconhecida e é também uma das suas bioatividades mais importantes (Kujumgiev *et al.*, 1999). Foi comprovado que o própolis possui um forte efeito contra bactérias Gram-positivas, como *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e contra bactérias Gram-negativas como o caso de *Salmonella typhimurium* (Bankova *et al.*, 1995; Bogdanov 2016; Przybyłek *et al.*, 2019).

A atividade antifúngica é particularmente relevante no controlo de vários agentes causadores de doenças fúngicas. O própolis tem a capacidade de inibir a atividade da enzima extracelular fosfolipase dificultando a adesão das células fúngicas às células epiteliais (D'Auria *et al.*, 2003). A atividade antifúngica já foi comprovada contra leveduras como *Candida albicans* (Packer e D Luz, 2007) e *Candida tropicalis* (Bogdanov 2016). Foi também já comprovada a ação do própolis contra *Aspergillus* sp., *Histoplasma capsulatum*, *Madurella mycetomatis*, *Microsporium canis*, *Microsporium cepillo*, *Microsporium distortum*, *Microsporium ferrugineum*, *Microsporium gypseum*, *Phialophora jeanselmei*, *Penicillium italicum* e *Trichosporon cutaneum* (Bogdanov 2016), *Fusarium* (Castro 2006) e contra *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira *et al.*, 2006).

Os produtos naturais são uma fonte rica em compostos bioativos e por isso, podem ser utilizados no tratamento do cancro, como por exemplo na quimioterapia. O própolis é considerado um agente anti tumoral por revelar capacidade antiproliferativa, tanto *in vitro* como *in vivo* (Rao *et al.*, 1992; Banskota *et al.*, 2001) bem como citotoxicidade contra linhas celulares de cancro do pulmão, colo uterino, pele, cancro renal (Watanabe *et al.*, 2011), cólon (Valença *et*

al., 2013) mama e próstata (Silva-Carvalho *et al.*, 2014). O própolis pode atuar diminuindo o número de células cancerígenas, aumentando a via da apoptose, exercendo efeitos antiangiogénicos e modulando o tumor ao eliminar a sua invasão e migração para outras zonas do organismo (Sawicka *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2013; Silva-Carvalho *et al.*, 2014).

A atividade cicatrizante do própolis foi comprovada através de estudos em roedores diabéticos onde a sua aplicação aumentou a taxa de cicatrização de feridas (Martinotti e Ranzato, 2015) através da redução da inflamação (McLennan *et al.*, 2008). O stresse oxidativo causado por substâncias tóxicas pode levar a lesões no fígado, o principal órgão do metabolismo de compostos. O própolis revelou ter um efeito hepatoprotetor, atribuído a substâncias bioativas com potencial antioxidante, anti-inflamatório e genoprotetor. Um extrato etanólico de própolis vermelho diminuiu os danos causados às células hepáticas quando expostas a substâncias hepatotóxicas em ensaios *in vitro* (Silva *et al.*, 2019).

A atividade antioxidante foi demonstrada em vários extratos de própolis (Banskota *et al.*, 2001; Sheng *et al.*, 2007; Valente *et al.*, 2011; Falcão *et al.*, 2013) Num extrato etanólico de própolis do Chile que mostrou ter a capacidade de reduzir o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), utilizado comumente nos testes para avaliação do potencial antioxidante, tendo exibido um efeito análogo a uma superóxido dismutase (SOD) inibidora da formação do anião superóxido (Russo *et al.*, 2004). Amostras de própolis português, proveniente do Pereiro (Marques 2015) e amostras de própolis do Gerês (Freitas *et al.*, 2019) também demonstraram possuir atividade antioxidante. Estudos realizados em ratos demonstraram o efeito protetor do própolis sobre o cérebro (Desamero *et al.* 2017; Nanaware *et al.* 2017) através da proteção contra danos neurológicos e hematotoxicidade induzidos por temperatura ambiente e a melhoria da memória e a proteção antioxidante do sistema nervoso central. Jabir (2017) e Samadi *et al.* (2017) também demonstraram a eficácia do própolis contra a diabetes, como antioxidante, através da diminuição de distúrbios metabólicos e da diminuição da expressão dos recetores TLR3 e TLR4 (responsáveis pela imunidade inata) e ainda uma melhoria dos níveis de glucose presente no sangue.

Relativamente à atividade imunomoduladora, estudos realizados com própolis demonstraram a sua capacidade de modular *in vivo* e *in vitro* a produção de C1q (um complexo proteico envolvido no sistema complemento, que faz parte do sistema imune inato) por macrófagos, de inibir as vias clássica e alternativa do sistema complemento (Ivanovska *et al.*, 1995; Sforcin

2007) e ainda de alterar o funcionamento do recetor complemento (Dimov *et al.*, 1992; Sforcin 2007). É também capaz de modular a imunidade inespecífica através da ativação dos macrófagos (Dimov *et al.*, 1991) e de estimular a produção de citocinas, como a TL-I e TNF-I dos macrófagos na cavidade peritoneal de ratos (Sforcin 2007).

Apesar de todas estas atividades e da sua eficácia ser de extrema relevância, o própolis apresenta uma utilização limitada devido à sua baixa absorção oral e pelo facto do própolis ter de possuir determinadas características e composição que estejam de acordo com parâmetros definidos para que possa ser utilizado a nível farmacológico (Ambardekar *et al.*, 2012), e também pela ausência de critérios de qualidade e legislação apropriados para a sua utilização a nível farmacológico.

1.4. Aplicações: da antiguidade à atualidade

Já na antiguidade clássica se usava própolis para diversos fins, ainda que não houvesse praticamente estudos acerca deste produto natural e das suas potencialidades. Os primeiros relatos da sua utilização datam do ano 300 antes de Cristo, e descrevem o uso da «cera negra» por egípcios na mumificação de corpos de faraós (Castaldo e Capasso, 2002). Na mesma época, os gregos também utilizavam o própolis na cura de feridas (Park *et al.*, 2004) e ainda na confeção de perfumes, descrevendo este produto como um medicamento eficaz na redução de inchaços, de dores e como cicatrizante de feridas internas e externas (Pereira *et al.*, 2002). Também existem vários registos de utilização na antiga medicina tradicional chinesa Tibetana, em procedimentos de cicatrização e controle antisséptico. Era ainda utilizado para outras finalidades, como a conservação de alimentos (Silva *et al.*, 2012), em muitas partes do mundo. Com o tempo, o interesse neste produto despoletou vários estudos que permitiram descobrir e validar muitas das suas propriedades e potencialidades para a saúde humana, mas também para uma melhoria significativa nos setores do agroalimentar e da cosmética.

Para além de servir como uma forma de defesa da colmeia, o própolis é conhecido como um produto multifuncional graças às inúmeras bioatividades que possui. As suas propriedades biológicas permitem que seja comumente utilizado na medicina popular bem como encontrado em suplementos alimentares, na indústria biofarmacêutica e em cosméticos (The Groot 2013) e até em produtos alimentares. O própolis está disponível em diferentes formas para uso tópico ou

ingestão, como cremes, géis, pós, sabonetes, xaropes para a tosse, bolos, vinhos, pastilhas elásticas, gomas, comprimidos, extratos e cápsulas (Fokt *et al.*, 2010; Anjum *et al.*, 2019). O própolis foi ainda utilizado no restauro de instrumentos musicais, quer na sua forma líquida, espessa, funcionando com um verniz (Monti *et al.*, 1983), quer enquanto resina para instrumentos de cordas e na reparação de acordeões (Van Ketel e Bruynzeel, 1992).

2. A maçã: taxonomia, características, produção e principais doenças da cultura

A maçã é o fruto pomáceo da macieira, *Malus domestica*, que pertence à família Rosaceae, subfamília Pomoideae. O género *Malus* abrange cerca de 100 géneros e mais de 2000 espécies espalhadas pelo mundo (Luchi 2002). A macieira cultivada é uma frutífera lenhosa, decídua, capaz de se adaptar a diferentes climas, desde trópicos a altas latitudes apesar de ser essencialmente de clima temperado (Petri 2006).

A maçã apresenta uma pele impermeável e um sabor ácido ou agridoce dependendo da espécie em questão. É rica em água (aproximadamente 85 % p/p) e potássio (Anexo 4). Ao longo do seu amadurecimento sofre grandes transformações bioquímicas (Santana 2012) até chegar ao fruto maduro consumível. Esta fruta é muito importante numa alimentação saudável, uma vez que fornece sais minerais como o potássio, fibras como a pectina, vitaminas como o ácido ascórbico e substâncias antioxidantes que são componentes integrantes de uma dieta humana saudável e equilibrada (Henríquez *et al.*, 2010). A maçã é rica em compostos bioativos, denominados fitoquímicos, cujas concentrações variam com a cultivar, armazenamento e processamento das frutas (Zardo 2007). Exemplos destes compostos bioativos são os polifenóis, compostos fenólicos que podem prevenir o aparecimento de doenças, através de uma ação antioxidante, acabando por reduzir o stresse oxidativo e as consequências que acarreta para as células e para o organismo como um todo (Zardo 2007). Cada variedade de maçã apresenta uma composição de compostos fenólicos característica (Perez-Illarbe *et al.*, 1991), embora possam ser encontradas diferentes quantidades dependendo do grau de maturação, do ambiente onde foram cultivados os frutos e das condições de armazenamento (Spanos *et al.*, 1990). Os flavonóides são outro exemplo e de extrema importância para a saúde, tendo sido associados a uma atividade anticancerígena em leucemia, cancro do pulmão, da mama, do ovário, da boca e do fígado (Ramos e Miranda, 2007), à prevenção da diabetes tipo II (Song, *et al.*, 2005) e oxidação do LDL colesterol (Vidal *et al.*, 2005; Davis, *et al.*, 2006). A forma como

estes compostos atuam incluem redução da proliferação celular (Kern *et al.*, 2005), proteção do DNA celular e inibição de invasão dos tumores (McCann *et al.*, 2007). Dos vários compostos fitoquímicos que podem ser encontrados na maçã destacam-se o propilgalato, ácido salicílico, ácido gálico (Wolfe *et al.*, 2003) e a quercetina (Lee *et al.*, 2003).

Por ser um fruto muito pobre em gordura, a maçã é utilizada em algumas dietas de emagrecimento e pode ser consumida ao final das refeições ou ao lanche, quer ao natural quer em sobremesas, ou ainda como um ingrediente na confecção dos mais diversos pratos de cozinha (Bértolo 2011).

2.1. A cultura da maçã em Portugal e no mundo

A fruta faz parte da alimentação do ser humano desde a antiguidade, ainda que nessa altura não fossem conhecidos muitos dos seus benefícios para a saúde humana. Entretanto, o consumo de fruta revelou ser fundamental para a promoção de uma alimentação saudável e uma melhoria de qualidade de vida do ser humano. Estudos da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que uma alimentação inadequada, com reduzidas quantidades de frutas na dieta, é responsável por cerca de 2,7 milhões de mortes anuais (Toledo *et al.*, 2013). Desta forma, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a OMS recomendam uma ingestão mínima diária de 400 g de frutas e legumes (Bonany *et al.*, 2013). Em 2017, nos estados-membros da União Europeia (UE), a ingestão diária de frutas mais prevalente era em Itália (85 % população) e em Portugal (81 %). Em contrapartida, menos de 40 % da população consumia fruta diariamente na Letónia (35 %), Bulgária e Lituânia (ambas 37 %) (Eurostat 2021a). Face aos dados que foram sendo obtidos ao longo dos anos acerca dos benefícios das frutas, a população passou a consumir cada vez mais frutas e, deste modo, também a produção global foi aumentando. A produção de frutas e a sua comercialização foram um dos grandes fatores impulsionadores da economia de cada país, na medida em que permitiram que terras que se encontravam abandonadas pudessem ter uma nova vida e fosse feito o seu aproveitamento obtendo benefícios monetários. Desde 1990 a 2019 a produção de frutas mais que duplicou, totalizando em 2019 cerca de 883,42 milhões de toneladas (Statista 2021a). Com o aumento da produção de frutas também as áreas de cultivo foram aumentando, sendo que em 2017 quase 1,3 milhões de hectares (ha) de terras na UE foram cobertos com árvores frutíferas estando pouco mais de um terço desse total representado por pomares de maçã (473 500 ha,

37 %) e um quinto por pomares de laranja (255 500 ha, 20 %). A Polónia é o país da UE que apresenta a maior área de pomares de maçã (Eurostat, 2021b). Quanto à produção de maçã a nível mundial, a UE produziu 11 477 toneladas de maçãs entre 2019 e 2020 (Statista 2021b), sendo a China o maior produtor com cerca de 41 000 toneladas no mesmo período.

A nível global, as maçãs ocupam o terceiro lugar na tabela de frutas mais produzidas, a seguir às bananas e às melancias, os frutos mais cultivados em 2019 (Statista 2021c). Na Europa, as principais culturas encontradas são maçãs, laranjas e pêssegos (Eurostat 2021c). Em Portugal, a maçã foi o fruto mais comercializado e também o mais consumido entre 2019 e 2020, totalizando cerca de 75,1 kg por habitante, seguindo-se a pera, o pêssego e a uva de mesa (INE 2021). Ainda que em comparação com outros países da UE, Portugal apresente uma baixa produção de maçã, esta cultura é a que apresenta maior expressão no país, abrangendo uma área de mais de 14 mil hectares e uma produção de 267 mil toneladas (Faostat 2021). Assim, a cultura de maçã assume um papel muito importante para a alimentação do ser humano e também para a economia nacional e mundial. Existem centenas de variedades de maçã cultivadas. Atualmente, são já conhecidas 10 000 variedades diferentes, embora só uma pequena percentagem seja produzida e comercializada a nível global (Hampson e Kemp, 2003). Em Portugal, as variedades com maior expressão são Golden Delicious, Gala (Royal Gala), Red Delicious/Starking, Jonagold, Jonagored, Reineta (Parda e Branca) e Bravo de Esmolfe (GPP 2007).

2.2. Ameaças e desafios ao cultivo de maçã

As pomoideas, de que são exemplo as macieiras, apresentam-se como um enorme desafio no que diz respeito à sua proteção, particularmente na agricultura biológica, sendo os fungos fitopatogénicos uma das principais ameaças a estas culturas (Moore *et al.*, 2019). A cultura de maçã não é exceção e tem apresentado algumas perdas significativas decorrentes de doenças causadas por agentes fitopatogénicos nas árvores e nas próprias maçãs. Desta forma, a sua produção e comercialização acarretam bastantes desafios, nomeadamente o controlo de doenças provocadas por fungos que levam a graves perdas económicas, e conseqüentemente a um maior desperdício alimentar. O combate às doenças causadas por fungos, quer na pré- quer no pós-colheita, recorre ao uso de pesticidas químicos de síntese que, apesar da eficácia, acarretam imensos riscos e problemas para o meio ambiente e para os próprios seres vivos,

para além de contribuírem para o aparecimento de estirpes resistentes, dificultando o seu controlo e prevenção da doença (Matny *et al.*, 2015; Loebler *et al.*, 2018; Embaby *et al.*, 2019).

2.3. Doenças pré- e pós-colheita em macieiras

O cultivo da macieira enfrenta problemas fitossanitários relacionados com o ataque de pragas e doenças que, dependendo do nível de danos nos frutos, pode provocar depreciação na qualidade e redução no seu valor comercial (Dos Santos *et al.*, 2006). Várias doenças podem ser encontradas nas macieiras e nos seus frutos, quer em fase de pré-colheita, quer em fase de pós-colheita, nomeadamente: o pedrado da macieira causado por *Venturia inaequalis*, a podridão cinzenta causada por *Botrytis cinerea* Pers, a podridão do bolor azul causada por *Penicillium expansum* Link, o cancro europeu causado por *Neonectria galligena* Bress, a podridão amarga causada por *Colletotrichum* spp. e a podridão branca ou cancro papel causada por *Botryosphaeria dothidea*, todos fungos filamentosos, e o fogo bacteriano causada pela bactéria *Erwinia amylovora*. O controlo das doenças fúngicas da cultura da maçã depende, atualmente, de múltiplas aplicações de vários fungicidas sintéticos (Araújo 2011). Contudo, e como já referido, a utilização excessiva destes fungicidas sintéticos acarreta inúmeros danos para o meio ambiente, como a contaminação do solo e das águas, e para os seres vivos não alvo, que ficam expostos a contaminação direta pelos fungicidas tendo a sua saúde debilitada e também de forma indireta pelo consumo de águas poluídas, o que afetará a biodiversidade e também interferirá na qualidade de vida do ser humano (Ribas e Matsumura, 2009). Ao longo dos tempos, estes problemas foram sendo reconhecidos e estudados contribuindo para a consciencialização da importância da saúde dos ecossistemas e da segurança alimentar. Neste trabalho, foram selecionadas três doenças que ocorrem na macieira - o pedrado da macieira, a podridão cinzenta e a podridão do bolor azul - por serem das doenças mais comumente encontradas e que mais afetam a cultura da maçã mundialmente, e também pelo facto de dispormos das estirpes responsáveis por essas doenças no departamento de Biologia.

2.3.1. Pedrado da macieira – ciclo de vida, condições de crescimento e controlo da doença

O pedrado é causado pelo fungo *Venturia inaequalis* que pertence à classe Loculoascomycetes, ordem Pleosporales e família Venturiaceae (Ponti e Laffi, 1988). Este fungo é responsável pela principal doença da macieira afetando folhas e frutos (Figura 1) nas regiões com clima temperado e húmido (MacHardy 1996, citado por Jamar 2011), como é o caso de Portugal, e tem maior expressão em macieiras das espécies Fuji, Gala e Golden Delicious (Anónimo 2015).



Figura 1. Exemplos de folhas e frutos afetados com pedrado da macieira, doença causada pelo fungo *Venturia inaequalis*. As manchas observáveis nas folhas e frutos evoluem para manchas aveludadas com esporulação do fungo, até à necrose. Foto da autora (Juliana Silva).

Para que ocorra infeção é necessário que existam certas condições ótimas para o desenvolvimento de *Venturia inaequalis*, nomeadamente de pluviosidade, humidade (Jamar 2011), temperatura, fotoperíodo (Rossi *et al.*, 2000) e período de humectação (MacHardy 1996, citado por Vieira 2009). Relativamente à temperatura, humidade e período de humectação, existem intervalos de variabilidade onde o fungo se desenvolve, sendo a expressão dos sintomas também variável conforme o agente patogénico se desenvolva mais próximo dos limites ou do seu ótimo de desenvolvimento (Llácer *et al.*, 1996, citado por Vieira 2009). A severidade da doença varia de ano para ano, dependendo de fatores como: severidade da doença no ciclo anterior, condições climáticas e a limpeza do local onde se encontram as árvores, em particular

de folhas doentes caídas. Os sintomas de pedrado podem ser observados em folhas, pecíolos, flores, sépalas, frutos, pedúnculos e, com menos frequência, em rebentos jovens e escamas das gemas, sendo mais notórios e visíveis nos frutos e nas folhas (Jones e Aldwinckle, 1990; MacHardy 1996). Nas folhas as lesões assumem uma coloração acastanhada a verde olivácea, com margens irregulares que, com o tempo, evoluem para margens mais distintas, e manchas mais escuras, com uma textura mais aveludada resultante do aparecimento dos conídios (Jones e Aldwinckle, 1990).

O ciclo de vida de *Venturia inaequalis* apresenta duas fases distintas: uma fase saprofítica, sexuada, que ocorre no inverno, nas folhas que se encontram caídas no chão, e outra fase parasítica e assexuada que se manifesta durante o período vegetativo da macieira, em que o estroma origina na extremidade os conidióforos que vão originar os conídios (Jones e Aldwinckle, 1990) (Figura 2). Na fase sexuada o fungo produz pseudotecas de coloração preta/acastanhada. As pseudotecas imaturas formam-se 4 semanas após a queda das folhas e é no final do inverno que continuam a sua maturação, dando origem a ascos com ascósporos. Os ascósporos maduros precisam de chuva para que ocorra a sua libertação e consequente transporte pelo vento até às partes mais suscetíveis da macieira, para que assim possa ocorrer o processo de infeção (MacHardy 1996 citado por Vieira 2009). Dando-se a infeção começa a ocorrer o desenvolvimento de hifas entre a cutícula e a parede das células epidérmicas ao longo de vários dias, resultando no aparecimento de conidióforos com conídios, que rompem a cutícula (MacHardy 1996). Nesta altura a lesão torna-se visível a olho nu podendo assim ser detetada e avaliada. Sempre que as condições climatéricas de temperatura e humidade sejam ótimas ao desenvolvimento do fungo, podem surgir novas infeções até ao outono, altura em que as folhas caem e o fungo volta à sua fase sexuada dando assim continuidade à produção de pseudotecas imaturas (Figura 2).

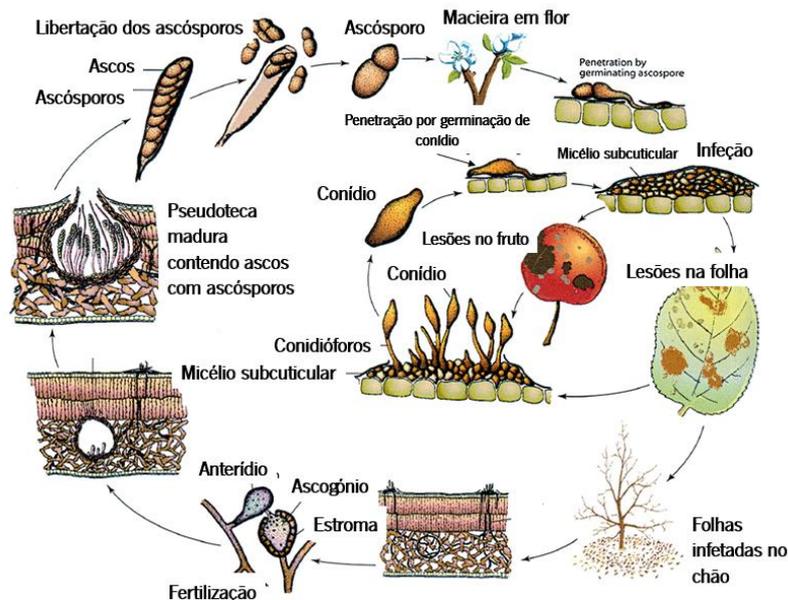


Figura 2. Ciclo de vida de *Venturia inaequalis*. Adaptado de Agrios (2005).

Para o controlo da doença, é aconselhado que se atue de forma preventiva fazendo uma monitorização das condições climáticas, recorrendo a estações meteorológicas, para se estimar os riscos de infeção através dos critérios de Mills (Gauthier 2018), e depois do inverno é importante observar as árvores e as folhas para se perceber o grau de maturação das pseudotecas, ascos e ascósporos em função da sua coloração. A principal ferramenta no combate ao pedrado são os fungicidas cuja eficácia depende de repetidas aplicações (MacHardy 1996). Os fungicidas atualmente autorizados em Produção Integrada das Pomóideas são a dodina, benzimidazóis (tiofanato-metilo), IBEs ou inibidores da biossíntese dos esteróis (bitertanol, difenoconazol, fenebuconazol, fluquinconazol, miclobutanil e tebuconazol), estrobilurinas (cresoximemetilo e trifloxistrobina) e anilopirimidinas (ciprodinil e pirimetanil), mas o seu uso tem levado ao aparecimento de estirpes resistentes (Llácer *et al.*, 1996; Brent e Hollomon, 2007).

Para além do uso de fungicidas, outras formas de combater o pedrado da macieira passam pela redução da carga de inóculo, sendo aconselhada a eliminação das folhas que se encontrem caídas e em decomposição. Pode ainda recorrer-se à aplicação de ureia após a queda das folhas, que acelera a sua decomposição e inibe a formação das pseudotecas devido ao aumento de azoto na folha (Vieira 2009; Anónimo 2015), e/ou ainda favorecendo o desenvolvimento de alguns microrganismos antagonistas de *V. inaequalis* que vão ajudar na gestão da doença (Vieira 2009). No entanto, o uso da ureia é limitado visto que contribui para a

acidificação dos solos, contaminação das águas e diminuição da camada do ozono (Prasad 1998). Aliado a estas práticas, podem ainda ser integradas medidas com vista à prevenção da doença de forma indireta, tais como a realização de podas frequentes que promovam a penetração dos raios solares na copa, mantendo as folhas o mais secas possível, facilitando também a aplicação dos tratamentos (Anónimo 2015; Belete e Boyraz, 2017; Majeed *et al.*, 2017), a implementação de um espaçamento considerável entre plantas e, ainda, a mistura de diferentes variedades de macieiras com diferentes níveis de resistência ao pedrado (Coutinho 2011; Anónimo 2015; Majeed *et al.*, 2017). Em último recurso, se a infeção já se deu, podem ainda ser utilizados fungicidas altamente específicos de forma a atuarem somente sobre o fungo e não causarem efeitos adversos no hospedeiro, atuando de forma curativa pela sua capacidade de penetrar nos tecidos e impedir o desenvolvimento da doença (Vieira 2009).

2.3.2. Podridão cinzenta – ciclo de vida, condições de crescimento e controlo da doença

A podridão cinzenta é causada pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers., a espécie mais comum de *Botrytis*, pertencente à classe Leotiomycetes e ordem Helotiales (Choquer *et al.*, 2007). Está descrito na literatura que este fungo afeta mais de 170 famílias de plantas com importância económica, o que implica que existam grandes perdas de produção, a nível mundial, e consequentemente grandes perdas económicas, ascendendo a cerca de 9 a 90 mil milhões de euros anuais (Abbey *et al.*, 2018) (Figura 3).



Figura 3. Maçãs afetadas pela podridão cinzenta causada pelo fungo *Botrytis cinerea* (retirado de Girardi *et al.*, 2002).

Este fungo pode ocorrer em diversas partes das plantas como em partes aéreas (folhas, flores, frutos, gemas ou haste) e em sementes (Barnes e Shaw, 2003) causando lesões que variam de bem delimitadas a podridões-moles ou podridões-secas (Elad *et al.*, 2004). Caracteriza-se por possuir conidióforos retos, levemente sinuosos e ramificados, de parede espessa, que vão diminuindo a sua tonalidade escura para clara no ápice. Possui também conídios ovóides e elipsoides, lisos e de cor hialina a escuro e ainda um micélio branco (Coley Smith *et al.*, 1980, Soares *et al.*, 2009). Os conídios são libertados rapidamente no tempo húmido e são transportados por correntes de ar. Estima-se que a temperatura ótima para que ocorra infecção de *B. cinerea* seja de 20 °C (Bulger *et al.*, 1987) e entre 15-22 °C para que ocorra esporulação (Sosa-Alvarez *et al.*, 1995). Ainda assim, o fungo é capaz de se desenvolver em diferentes ambientes e em diferentes condições. *Botrytis cinerea* é capaz de ter atividade em temperaturas próximas dos 0 °C (Brooks e Cooley, 1917), o que o torna um dos fungos mais importantes no pós-colheita dado poder causar perdas em frutos armazenados (Droby e Lichter, 2004). Apesar de ser dos maiores causadores de perdas em pós colheita na cultura da maçã, *Botrytis cinerea* é considerado um parasita de fraqueza, uma vez que um esporo isolado só é capaz de penetrar em órgãos de plantas que apresentem uma fina cutícula ou então em folhas, caules ou frutos que se encontrem com lesões/feridas ou que se encontrem caídos no solo, ou seja, só ocorre infecção após o fungo ter crescido em partes mortas da planta ou na matéria que se encontra caída no solo em decomposição (Ascenza 2020) (Figura 4).

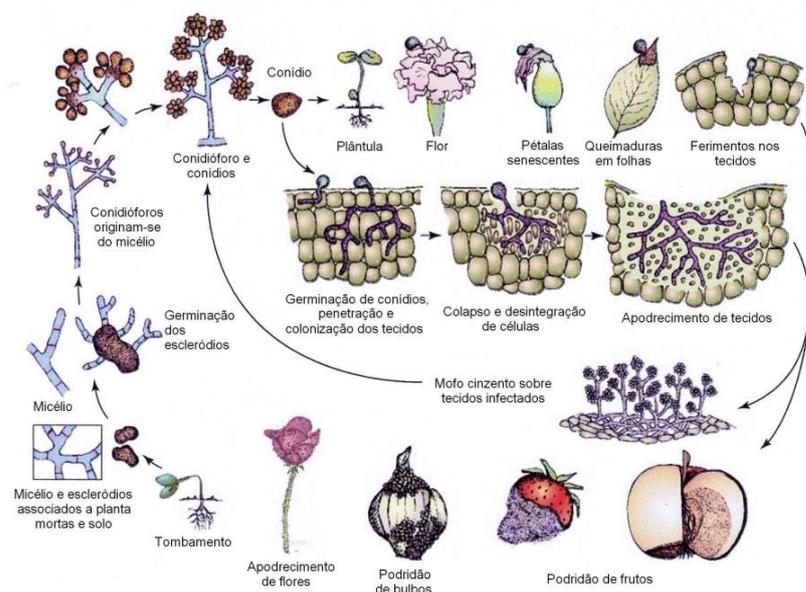


Figura 4. Ciclo de *Botrytis* sp. Em hortícolas. Adaptado de Agrios (2005).

No início da infecção, quando afeta folhas, flores e frutos, este patógeno apresenta manchas pequenas de coloração amarela que se tornam mais largas, acinzentadas ou acastanhadas, fundas, coalescentes e frequentemente envolvem a folha completamente. Já nos caules as lesões são escuras e alongadas, com um rebordo bem definido e os tecidos começam a tornar-se moles e húmidos até dada altura em que apresentam uma tonalidade castanha-escura e textura esponjosa, podendo as lesões resultar em pequenos cancro laterais ou em total necrose (Ascenza 2020).

No contexto das medidas de controlo para reduzir as perdas (Gullino 1992), aplicam-se medidas sanitárias, a alteração do ambiente e das condições (temperatura, humidade relativa e radiação), a aplicação de fungicidas em pré e pós colheita e o biocontrolo (Elad e Volpin, 1991; Gullino 1992; Jarvis 1992; Hausbeck e Moorman, 1996; Hammer 1988). Com as medidas sanitárias pretende-se eliminar o inóculo de fungo, o que pode ser feito através de podas das partes doentes da planta seguida da destruição das mesmas. Quanto à alteração do ambiente e das condições, pode aumentar-se o espaçamento entre plantas e fazerem-se podas de limpeza, pode também optar-se pela remoção de ramos excessivos e ainda evitar o uso de irrigação por aspersão para que não existam condições de humidade ótimas ao desenvolvimento da infecção. Já no fruto após ser colhido pode utilizar-se radiação UV-C (Marquenie *et al.*, 2002) e controlar a humidade e temperatura de armazenamento. No que diz respeito ao uso de fungicidas, o controlo químico de *B. cinerea* é bastante difícil, visto que este patógeno pode infetar uma variedade grande de plantas, em praticamente todas as suas partes, em quase todas as fases de desenvolvimento e de crescimento e em pós colheita. Este fungo é capaz de desenvolver rapidamente resistência aos fungicidas e até mesmo a misturas de princípios ativos (Northover e Matteoni, 1986). Desta forma, para combater a resistência adquirida pelo fungo, é recomendado que se utilizem fungicidas com diferentes modos de ação, de forma alternada ou conjuntamente (Elad 1992; Gullino 1992; Moorman 1992; Hausbeck e Moorman, 1996). Apesar de poder ser eficiente, a utilização de fungicidas para controlo da infecção não deve descurar o uso de boas práticas de limpeza ou de controlo do ambiente, especialmente quando a expressão da infecção é elevada (Monteiro 1996; Hausbeck e Moorman, 1996).

2.3.3. Podridão do bolor azul – ciclo de vida, condições de crescimento e controlo da doença

A podridão do bolor azul é causada pelo fungo *Penicillium expansum* pertencente à ordem Eurotiales da subdivisão Ascomycotina e família Trichocomaceae (Frisvad e Samson, 2004; Kozlovskii *et al.*, 2013). Este fungo pode produzir micotoxinas nos órgãos de plantas / frutos atacados (Figura 5) como, por exemplo, a patulina (Sanzani *et al.*, 2008).

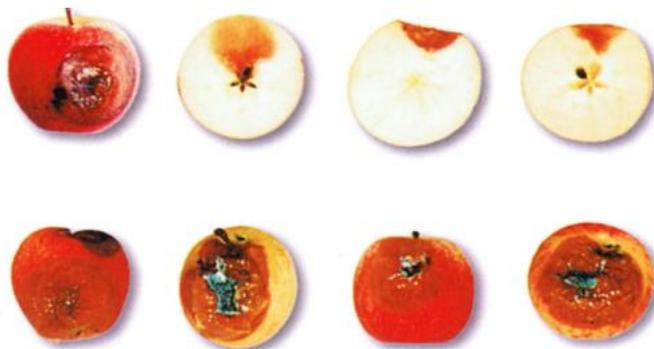


Figura 5. Exemplo da podridão azul em maçãs causada pelo fungo *Penicillium expansum*, onde se observa através dos diferentes planos como o fungo afeta o interior e o exterior do fruto. Retirado de Girardi *et al.*, (2002).

Este patógeno afeta culturas como maçã, peras e citrinos. No que diz respeito à produção de maçã, é o responsável pela doença mais importante no que diz respeito a perdas de qualidade e quantidade de frutos armazenados (Janisiewicz 1999, citado por Neto 2011), representando 5 a 20 % de perdas em todo o mundo (Matny *et al.*, 2015). O fungo *Penicillium expansum* tem o seu crescimento ótimo a 25 °C e humidade relativa de 80 %, ainda assim, é comumente encontrado em locais de armazenamento refrigerado, pois os seus conídios têm a capacidade de germinar a temperaturas de até 0 °C (Wyatt e Parish 1995; Plaza *et al.*, 2003). Os conidióforos correspondem às estruturas reprodutivas assexuadas do fungo, apresentam coloração que varia de cinza a azul / verde-azulado, e possuem paredes lisas e formato cilíndrico (Palou 2014). Os conidióforos são produzidos individualmente e em conjunto dão origem a colónias que podem exibir várias cores, variando de verde-cinza, laranja, amarelo, azul, cinza e branco (Figura 6). As colónias podem apresentar diferentes texturas como flocosa, fasciculada e podem ser planas ou apresentar crateras ou zonas enrugadas, além de possuir sulcos radiais ou concêntricos (Figueiredo *et al.*, 2020). *P. expansum* não é capaz de penetrar a cutícula dos frutos e, por isso, a infeção só é capaz de ocorrer a partir de tecidos danificados, ou seja, através

de feridas, tanto em condições ambientais ou sob refrigeração quando os frutos se encontram armazenados (Mapa 2002; Osório *et al.*, 2013). Outro fator importante para ocorrer infecção é o grau de amadurecimento dos frutos, uma vez que quanto mais maduros estiverem, maior será a sua suscetibilidade (Errampalli 2014). Apesar da infecção poder começar no campo, geralmente é após a colheita, durante o processo de armazenamento e transporte dos frutos, que é mais comum e tem maior expressão. Nos locais de armazenamento, a humidade influencia o aparecimento e desenvolvimento de infecção por *P. expansum*, pois quanto maior a humidade do local, maior e mais facilitado será o desenvolvimento do bolor (Silva 2008). Os conidióforos são bastante resistentes ao stresse hídrico e por isso são capazes de sobreviver nas caixas de colheita e nas câmaras de refrigeração (Kimati *et al.*, 1997, citado por Silva 2008) o que dificulta a sua eliminação e aumenta o risco de novo desenvolvimento de doença.



Figura 6. Ciclo de vida de *Penicillium* sp. Adaptado de Abdelghany *et al.*, (2016).

No controlo deste bolor são utilizados fungicidas, como por exemplo o enilconazole (Erasmus *et al.*, 2015), pelo facto de ser barato, de fácil aplicação e ter uma ação reparadora contra infeções já existentes ou que possam ainda vir a ocorrer (Palou 2014). São ainda utilizados contra o bolor azul os fungicidas da classe dos benzimidazóis e iprodiona (Kimati *et al.*, 1997, citado por Silva 2008). Como a utilização destes fungicidas pode levar ao aparecimento

de estirpes resistentes é importante que se procurem adotar novas práticas que permitam a diminuição do seu uso. Desta forma, para reforçar o controlo do bolor azul podem aliar-se, ao uso de fungicidas, práticas menos agressivas, como a desinfestação das caixas de colheita com hipoclorito de sódio a 100 ppm de cloro ativo, e dos locais de armazenamento com pastilhas de tiabendazol de forma a evitar a contaminação cruzada; e ainda evitar danos mecânicos nos frutos; aquando da sua colheita e transporte para não criar zonas de entrada da infeção. Existem ainda outras alternativas com vista à substituição parcial ou total dos fungicidas que são o tratamento térmico (Palou 2014); radiação gama e ultravioleta (Nigro *et al.*, 2000); atmosfera controlada (Mari e Guizzardi, 1998); utilização de quitosana (Chien e Chou, 2006), óleos essenciais (Caccioni *et al.*, 1998), peptídeos e proteínas (Broekaert *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 2007). Relativamente à maçã, o controlo da doença passa por mergulhar os frutos em fungicidas logo após a colheita e antes do armazenamento, podendo ser ainda pulverizados antes da embalagem (Errampalli 2014).

3. Objetivos do trabalho

Enquadrados por estes desafios à produção de maçã, conscientes que a segurança alimentar não prescinde do controlo de doenças mas também de que, cada vez mais, implica produtos de qualidade nutricional e sem riscos para a saúde, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do uso de própolis português do Caramulo no controlo de doenças pré- e pós-colheita da cultura da maçã causadas por fungos fitopatogénicos, nomeadamente *Venturia inaequalis* (pré-colheita), *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* (pós-colheita), de forma a encontrar tratamentos mais seguros para o consumo humano e para o meio ambiente e eficazes na sua ação contra agentes patogénicos.

Assim, após a caracterização química dos extratos etanólicos de própolis utilizados – extrato 10 % (p/v) obtido com etanol 70 % e uma diluição deste com água (1:2) ou “calda de própolis”, avaliou-se o seu efeito antifúngico *in vitro* contra alguns fungos fitopatogénicos e, posteriormente, o potencial antifúngico da calda de própolis *in vivo*, num ensaio de campo com macieiras jovens (3 anos). Paralelamente, foi também avaliada a atividade antibacteriana do própolis, concretamente do extrato de própolis a 70 % e da calda de própolis contra algumas espécies de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo.

Por fim, tendo em conta que a extração etanólica do própolis deixa alguns resíduos (insolúveis), decidiu-se explorar também o aproveitamento destes resíduos quando aplicados no solo para ver o seu efeito em plantas de interesse agronómico. Para o efeito instalou-se um ensaio de campo com alfaces (*Lactuca sativa* L.), variedade maravilha das quatro estações, onde resíduos secos de própolis descartados pela indústria, foram misturados com porções de solo nativo em diferentes doses, de forma a avaliar o seu potencial no crescimento e qualidade das alfaces.

CAPÍTULO II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Potencial antifúngico do extrato Cr18.EEf₇₀ e da solução Cr18.EEf₃₅ na cultura da maçã

1.1. Própolis, extratos e soluções utilizadas nos ensaios *in vitro*

A amostra de própolis utilizada nesta tese de mestrado é proveniente do Caramulo tendo sido recolhida em 2018 (utilizando-se, por isso, a nomenclatura de identificação “Cr18”). Num estudo anterior do grupo de investigação foi feita a extração com etanol 70 % (v/v; EE₇₀), na proporção 10 % própolis (p/v de solvente), submetendo-se a suspensão etanólica a uma filtração para se obter o extrato Cr18.EEf₇₀ (Pereira 2021). Parte deste extrato Cr18.EEf₇₀ foi ainda diluído com água corrente (1:2) obtendo-se aquilo que denominamos calda, ou Cr18.EEf₃₅. O extrato Cr18.EEf₇₀ e a solução Cr18.EEf₃₅ ou calda foram utilizados nos ensaios *in vitro* realizados no decorrer deste trabalho. A calda de própolis foi adicionalmente utilizada nos tratamentos realizados em macieiras numa instalação de campo nas hortas comunitárias da Universidade do Minho (UMinho).

1.2. Avaliação do potencial antifúngico *in vitro* do extrato Cr18.EEf₇₀ e da solução Cr18.EEf₃₅

A avaliação do potencial antifúngico de um determinado extrato/solução permite perceber se tem algum efeito no crescimento de fungos, mais concretamente se consegue inibir ou retardar esse crescimento. Para a avaliação do potencial antifúngico *in vitro* de Cr18.EEf₇₀ e Cr18.EEf₃₅ foram previamente testadas várias metodologias de forma a otimizar o protocolo para colocar em prática com os restantes fungos em estudo. O fungo escolhido para estes ensaios preliminares foi *Botrytis cinerea* devido ao facto de ter um crescimento rápido, permitindo realizar ensaios em poucos dias e obter resultados mais rapidamente quanto ao efeito das amostras a testar.

1.2.1. Testagem preliminar de procedimentos de aplicação dos extratos para avaliação do potencial antifúngico *in vitro* de Cr18.EEf₇₀ e Cr18.EEf₃₅

Em todos os ensaios que se irão descrever começou por se proceder à repicagem do fungo para meio de cultura fresco PDA (Oxoid) para obter uma cultura pura e biomassa suficiente para a realização de toda a experiência. Foram realizados vários ensaios com diferentes variantes visando a seleção do que melhor mimetizasse as condições no campo e que surtisse um maior

efeito no combate aos fungos. Em todo o caso, em cada um desses ensaios/variantes foram usados conjuntos de quatro placas contendo meio PDA para cada uma das seguintes modalidades: os tratamentos propriamente ditos - com Cr18.EEf₇₀ e com Cr18.EEf₃₅ -, os respectivos controlos de crescimento na presença de solvente - tratamento com etanol 70 % e tratamento com etanol 35 % - e ainda o controlo de crescimento (ausência de qualquer tratamento). As placas foram de seguida incubadas no escuro à temperatura ambiente. O crescimento dos micélios foi observado e registado diariamente sempre no mesmo horário, sendo medidos 3 diâmetros perpendiculares da colónia com o auxílio de uma régua (mm). Os ensaios decorreram até os micélios ocuparem toda a superfície da placa de Petri ou até o fungo cessar o seu crescimento. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição de crescimento (% IC), calculada de acordo com a seguinte equação (1):

$$IC (\%) = \frac{D_{controlo} - D_{tratamento\ i}}{D_{controlo}} \cdot 100 \quad \text{eq. 1}$$

sendo que $D_{controlo}$ corresponde ao diâmetro máximo atingido pelo inóculo do fungo sem qualquer tratamento aplicado e $D_{tratamento\ i}$ corresponde à média dos três diâmetros da colónia micelial em cada placa. A percentagem de inibição de crescimento de cada condição foi obtida pela média das 4 réplicas.

Os resultados foram ainda analisados através do modelo matemático de Gompertz, traduzido pela seguinte equação (2):

$$Y(t) = Y_{max} * \exp(-\exp(-KG(t - T_i))) \quad \text{eq. 2}$$

onde Y_{max} corresponde ao diâmetro máximo atingido pelo micélio (mm), K_G ao coeficiente da taxa de crescimento, e T_i ao tempo de inflexão (dias). Através dos valores de Y_{max} e de K_G pode obter-se μ , que corresponde à taxa específica de crescimento (mm dia⁻¹), e se calcula através da equação que se segue (3):

$$\mu = \frac{Y_{max} * K_G}{e} \quad \text{eq. 3}$$

onde e corresponde ao número de Euler.

Como melhor se detalhará a seguir, uma das variantes experimentais avaliadas foi a **pulverização de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ diretamente sobre o inóculo micelial** de forma a mimetizar as condições no campo onde o fungo recebe o tratamento diretamente. Procedeu-se também a um **espalhamento do tratamento antes da repicagem do fungo** de forma a representar um tratamento preventivo, presumivelmente ainda na ausência de doença e, ainda, à pulverização

do inóculo de fungo para mimetizar a ação dos tratamentos em pomares já com doença manifestada, mas percebeu-se não ser o melhor método visto não mimetizar as condições no campo por não se conseguir ter um espalhamento uniforme sobre todas as folhas, o que em larga escala ainda mais difícil se antevê. Outra das variantes testadas consistiu no **espalhamento no meio de cultura e pulverização de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ no inóculo do fungo** para perceber se um aumento na quantidade de tratamento aplicado teria melhor efeito que a já testada anteriormente (100 µL). Foi ainda testada a **incorporação de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ no meio de cultura**, à semelhança da metodologia normalmente adotada nos ensaios para avaliação de atividade antimicrobiana, uma variante que não mimetizava, no entanto, as condições no campo visto que não se iriam incorporar os tratamentos nas folhas, ramos e frutos das macieiras. Tal como se fez anteriormente para a variante do espalhamento e pulverização do tratamento, decidiu-se também testar a **incorporação do tratamento no meio de cultura e pulverização no inóculo do fungo**, correspondendo esta abordagem a um aumento da quantidade de tratamento e, simultaneamente, uma forma de tratamento preventivo e pós doença.

Assim, a pulverização de tratamento no meio de cultura antes de repicagem do fungo representa o tratamento preventivo, à semelhança dos tratamentos aplicados em grande escala em pomares pelos agricultores, na tentativa de prevenirem o aparecimento da doença que não sabem se já existe ou não no pomar. Já a pulverização do tratamento sobre o meio de cultura e o fungo após repicagem mimetiza as condições de campo num pomar que já tem doença e os tratamentos são aplicados sobre folhas saudáveis e folhas já doentes, assim como em frutos e ramos de forma a tentar combater ou pelo menos controlar a doença tendo em vista reduzir a perda de produtividade.

a. Pulverização de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ diretamente sobre o inóculo fúngico

Para este ensaio foram utilizadas placas de Petri, contendo meio PDA (Oxoid), para onde foram transferidos os discos de inóculo de *Botrytis cinerea*, com o auxílio de pontas de micropipetas (1 mL), palitos e uma pinça, colocando-se um disco (diâmetro = 8 mm) no centro de cada uma das placas. As placas foram incubadas no escuro, a 4 °C, durante 24 horas (h) após o que se procedeu a duas pulverizações (total de 100 µL), diretamente sobre o fungo, de Cr18.EEf₇₀, de Cr18.EEf₃₅, de etanol (Carlo Erba) 70 % e de etanol 35 % (em quatro conjuntos de quatro placas de meio PDA, respetivamente). Um outro conjunto de quatro placas com *Botrytis cinerea* não recebeu qualquer tipo de tratamento (controlo de crescimento). As placas foram

incubadas no escuro, à temperatura ambiente, até o fungo ocupar toda a superfície da placa de Petri ou até cessar o seu crescimento. Durante este período, o crescimento dos inóculos foi observado e registado conforme atrás descrito e calcularam-se os parâmetros do modelo Gompertz bem como a percentagem de inibição de crescimento (% IC).

b. Espalhamento de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ sobre o meio de cultura

Neste ensaio procedeu-se ao espalhamento de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ com ajuda de um espalhador, bem como ao espalhamento de etanol 70 %/etanol 35 % em meio PDA, mantendo quatro placas sem qualquer tratamento. Discos de inóculo foram então transferidos para o centro das placas de Petri, como acima descrito, e as culturas foram colocadas no escuro, a 4 °C durante 24 h, passando-se no dia seguinte para uma incubação no escuro, à temperatura ambiente. O crescimento dos inóculos foi monitorizado e registado diariamente e a percentagem de inibição de crescimento (% IC) e a taxa específica de crescimento (μ) calculadas como atrás descrito.

c. Espalhamento no meio de cultura e pulverização de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ no inóculo do fungo

Neste ensaio procedeu-se ao espalhamento de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ em placas contendo meio PDA e também de etanol 70 %/etanol 35 %, mantendo-se quatro placas sem qualquer tratamento. Os discos de inóculo foram inoculados e de seguida incubados a 4 °C durante 24 h, após o que foram feitas duas pulverizações de Cr18.EEf₇₀ (ou de Cr18.EEf₃₅) diretamente sobre o disco de inóculo do fungo previamente inoculado em placas contendo Cr18.EEf₇₀ (ou Cr18.EEf₃₅). Nas placas com etanol 70 % ou etanol 35 % espalhado procedeu-se à pulverização do disco de inóculo do fungo com etanol 70 % ou etanol 35 %, respetivamente. As placas foram então incubadas no escuro à temperatura ambiente e o crescimento dos inóculos foi monitorizado, registado e avaliado como acima descrito.

d. Incorporação de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ no meio de cultura

Nestes ensaios de incorporação de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ ou etanol 70 %/etanol 35 % em meio PDA, prepararam-se falcons com 15 ml de meio PDA. Após autoclavagem e com o meio ainda liquefeito foram adicionados 100 μ L de cada tratamento - Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ e etanol 70 %/etanol 35 % - tendo sido vertidas estas misturas para placas de Petri. Após solidificação do meio procedeu-se à inoculação dos discos de inóculo no centro das placas. Após 24 h de incubação no escuro a 4 °C, as placas foram incubadas no escuro, à temperatura

ambiente até ao término da experiência. O crescimento dos inóculos foi monitorizado e avaliado como vem sendo descrito.

e. Incorporação de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ no meio de cultura e pulverização de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ sobre o inóculo do fungo

Inicialmente procedeu-se à preparação de meio PDA com Cr18.EEf₇₀ e Cr18.EEf₃₅ incorporado ou com etanol 70 %/etanol 35 % como descrito na secção d. As placas foram incubadas no escuro a 4 °C durante 24 h após o que foram feitas duas pulverizações de Cr18.EEf₇₀ ou Cr18.EEf₃₅ nas placas contendo Cr18.EEf₇₀ ou Cr18.EEf₃₅ incorporado, respetivamente. Nas placas contendo etanol 70 % ou etanol 35 % foram feitas duas pulverizações com etanol 70 % ou etanol 35 %, respetivamente, sobre o inóculo de cada fungo. Após incubação no escuro à temperatura ambiente, o crescimento dos inóculos foi monitorizado e avaliado como vem sendo descrito.

f. Pulverização de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ no meio de cultura antes de repicagem do fungo

Neste ensaio, placas de Petri contendo meio PDA foram pulverizadas com 100 µL de Cr18.EEf₇₀ ou de Cr18.EEf₃₅, bem como com etanol 70 % ou etanol 35 %. Sendo que, quatro placas não sujeitas a qualquer tratamento. Discos de inóculo foram colocados no centro de cada uma destas placas de Petri e estas foram incubadas no escuro a 4 °C durante 24 h, e de seguida no escuro, mas à temperatura ambiente. O crescimento dos inóculos foi monitorizado e avaliado como vem sendo descrito.

g. Pulverização de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ no meio de cultura e no fungo após repicagem

Neste ensaio, placas de Petri com meio PDA e contendo discos de inóculo foram incubadas a 4 °C no escuro durante 24 h. No dia seguinte foram feitas duas pulverizações de Cr18.EEf₇₀ ou de Cr18.EEf₃₅ bem como de etanol 70 % e de etanol 35 % deixando quatro placas sem qualquer tratamento. Após pulverização sobre o inóculo do fungo, as placas foram incubadas como já descrito e calculou-se a percentagem de inibição de crescimento (% IC) e a taxa específica de crescimento (μ).

1.2.2. Avaliação do potencial antifúngico *in vitro* de Cr18.EEf₇₀ e Cr18.EEf₃₅

Após esta fase preliminar para selecionar o melhor procedimento de aplicação dos extratos decidiu-se adotar a pulverização sobre o meio de cultura e o inóculo do fungo simultaneamente, ou seja, depois da inoculação do inóculo do fungo no centro da placa. Esta metodologia é a que melhor mimetiza as condições de aplicação dos tratamentos no pomar, já que a pulverização é feita abrangendo toda a copa, podendo estar a aplicar-se em plantas/folhas afetadas ou não, podendo também a infeção surgir posteriormente ao tratamento; mas garantiu também um crescimento regular da colónia micelial e a determinação rigorosa dos parâmetros % IC e μ .

Nestes ensaios foram utilizados os fungos *Botrytis cinerea* (isolado de videira em 2018, Braga) cedido pelo Doutor Rui Oliveira, Professor auxiliar, do Departamento de Biologia da Escola de Ciências, da Universidade do Minho (Figura 7) e *Penicillium expansum* (isolado de cevada em 2018, Eslováquia) disponibilizado pelo Departamento de Biologia da Escola de Ciências, da Universidade do Minho (Figura 8), sendo que para *P. expansum* se teve de fazer uma adaptação ao método de pulverização, dado que a dispersão de esporos provocada pelas pulverizações gerava multifocos de novos crescimentos. Esta adaptação consistiu na pulverização dos micélios - com tratamento ou com etanol - numa placa à parte e só depois eram transferidos para as placas da experiência que foram pulverizadas previamente com tratamento ou com etanol, onde o crescimento do fungo era acompanhado e registado diariamente.

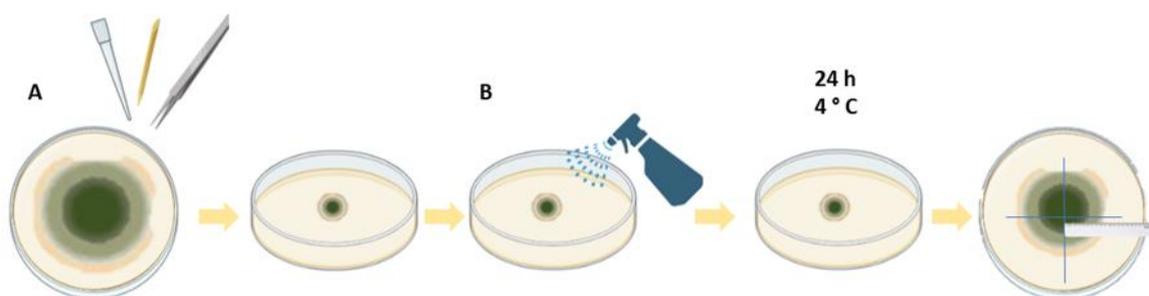


Figura 7. Desenho experimental do ensaio com *Botrytis cinerea* para o estudo da avaliação da atividade antifúngica *in vitro* com Cr18EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ onde se encontra representada a inoculação do fungo (A) e o processo de pulverização de no meio de cultura e no micélio do fungo em simultâneo (B).

No caso de *Penicillium expansum*, foi colocado um disco de inóculo em quatro placas de Petri contendo meio PDA e, em outras quatro placas, foram inoculados quatro inóculos de fungo em cada uma das placas. Após incubação de 24 horas, no escuro, a 4 °C, foram feitas duas pulverizações de Cr18.EEf₇₀ sobre os quatro inóculos de uma das placas e duas pulverizações de Cr18.EEf₃₅ sobre os quatro micélios presentes noutra placa. Um procedimento semelhante foi realizado no caso do tratamento com etanol 70 % e etanol 35 %. Os discos de inóculos pulverizados com Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ foram transferidos para placas previamente pulverizadas com 100 µL de Cr18.EEf₇₀ ou com 100 µL de Cr18.EEf₃₅ cada e os pulverizados com etanol 35 % ou etanol 70 % foram transferidos, respetivamente, para placas previamente pulverizadas com etanol 35 % ou com etanol 70 %. As quatro placas inicialmente inoculadas com um disco de micélio mantiveram-se sem tratamento. As placas foram incubadas no escuro à temperatura ambiente o crescimento dos micélios foi monitorizado e avaliado como já descrito.

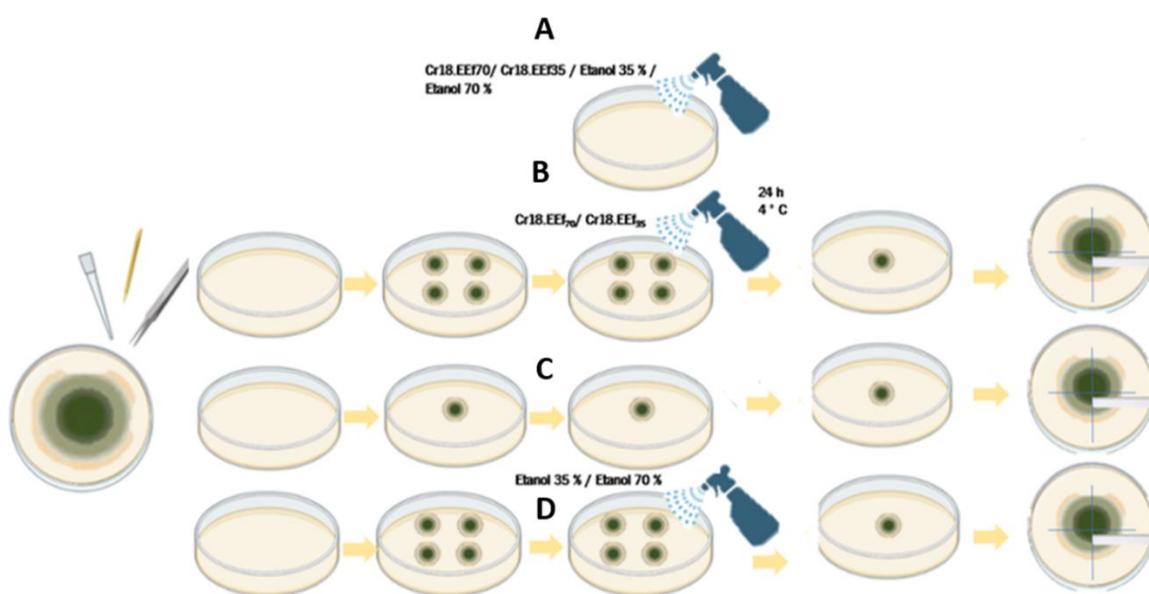


Figura 8. Desenho experimental do ensaio com *Penicillium expansum* para o estudo da avaliação da atividade antifúngica *in vitro* com Cr18EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ com 3 réplicas por tratamento: pulverização de Cr18.EEf₇₀ ou de Cr18.EEf₃₅ sobre o meio de cultura para onde serão transportados os micélios passado as 24 horas (A) pulverização de Cr18.EEf₇₀ ou de Cr18.EEf₃₅ sobre o meio de cultura e o micélio do fungo simultaneamente (B), placas sem qualquer tratamento (C) e pulverização de etanol 35 % ou de etanol 70 % sobre o meio de cultura e sobre o micélio do fungo simultaneamente (D).

1.3. Avaliação do potencial antibacteriano *in vitro* de Cr18.EEf₇₀ e Cr18.EEf₃₅

Para avaliar o potencial antibacteriano de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ foram utilizadas as espécies de bactérias Gram-positivo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus* (ATCC 7064), *Bacillus megaterium* (932) e *Bacillus subtilis* (48886) e uma bactéria Gram-negativo: *Escherichia coli* (CECT 423).

Inicialmente procedeu-se à pulverização (100 µL) de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ e de etanol 70 % /etanol 35 % sobre o meio de cultura. As bactérias foram cultivadas em meio LB (Panreac) durante a noite, a 37 °C e 200 rpm. No dia seguinte, o crescimento foi monitorizado pela leitura da densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) e as culturas foram diluídas em meio fresco para obter uma DO₆₀₀ = 0,1, seguindo-se novo período de crescimento até atingirem a fase de crescimento exponencial (DO₆₀₀ = 0,4-0,6). Seguidamente, alíquotas de 5 µL de suspensão bacteriana foram adicionadas às placas com meio LBA (Panreac) contendo Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ ou etanol 35 % /70 %, e também para placas sem qualquer aditivo. Para cada estirpe bacteriana foram utilizadas três placas, uma contendo apenas meio LBA, outra contendo Cr18.EEf₇₀ ou Cr18.EEf₃₅ e outra contendo etanol 70 ou 35 %, respetivamente. O ensaio foi realizado em triplicado (E1, E2, E3), com três réplicas cada (R1, R2, R3), como se exemplifica na Figura 9. Em cada réplica de cada ensaio independente foram colocadas 5 µL de suspensão bacteriana. Por fim, as culturas foram incubadas a 37 °C, e ao fim de 24 h foram inspecionadas para registo do crescimento.

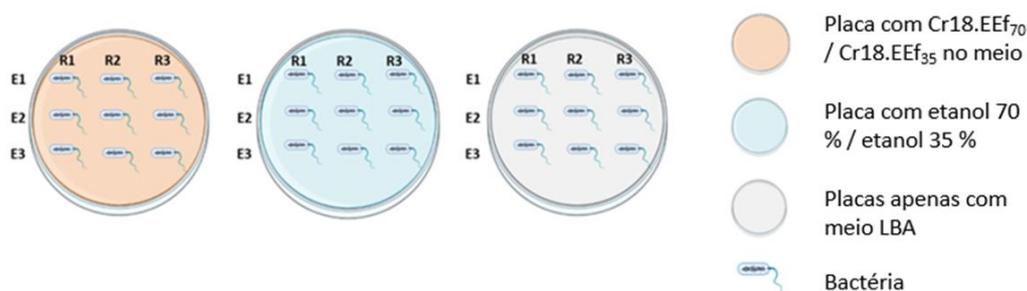


Figura 9. Representação esquemática do ensaio para a avaliação da atividade antibacteriana de Cr18.EEf₇₀/Cr18.EEf₃₅ contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Para cada bactéria foi realizado um ensaio em triplicado (E1, E2, E3) com três réplicas cada (R1, R2, R3). Em cada réplica de cada ensaio foram colocados 5 µL de suspensão bacteriana, ou seja, um total de 9 gotas de 5 µL por placa.

1.4. Avaliação do potencial antifúngico de Cr18.EEf₃₅ contra *Venturia inaequalis* – ensaio de campo

Para este ensaio foram utilizadas macieiras certificadas da variedade Gala provenientes de viveiro (Viveiros Albertino Carvalho e Filhos Lda., Miranda do Corvo) que foram plantadas com um compasso de 1,3 x 1 m, nas hortas comunitárias da UMinho (Braga, Portugal), no dia 15 de fevereiro de 2020 (Pereira 2021). Os talhões encontram-se numa encosta de declive suave, com orientação este-oeste e exposição a sul (Figura 10).

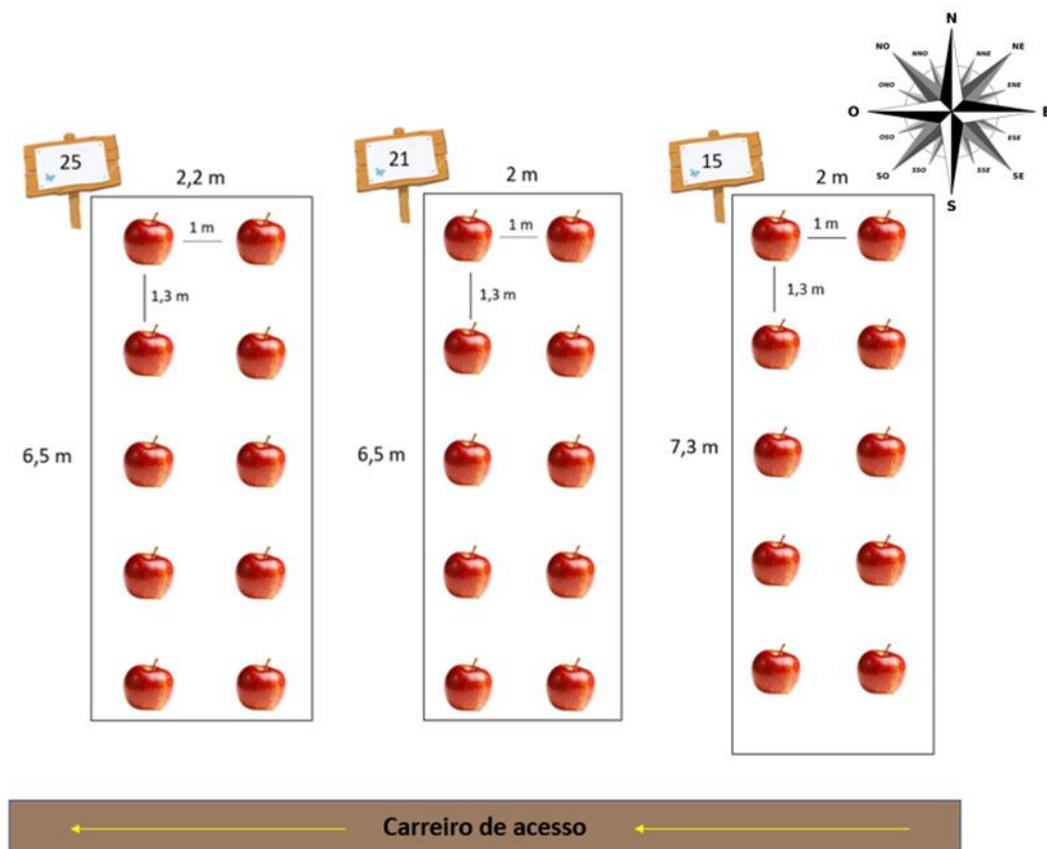


Figura 10. Desenho experimental dos talhões de macieiras situados nas hortas da UMinho, Braga, Portugal.

1.4.1. Preparação da solução Cr18.EEf₃₅ (calda de própolis)

De forma a avaliar o potencial antifúngico *in vivo* do própolis do Caramulo do ano de 2018 contra o fungo *Venturia inaequalis*, foi preparado, num estudo anterior, um extrato

etanólico de própolis a 10 % (p/v) com etanol a 70 %. A mistura (20 litros (L)) foi mantida num jerrican à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, agitando-se diariamente, ao longo de sete dias. Posteriormente, a mistura foi filtrada através de papel de filtro com ajuda de uma bomba de vácuo (600 milibar), mantendo-se o filtrado (Cr18.EEf₇₀) a 4 °C até ser utilizado. Para aplicação nas macieiras, e a cada aplicação, Cr18.EEf₇₀ foi diluído com água corrente (1:2), obtendo-se aquilo que denominamos de calda, ou Cr18.EEf₃₅, com a concentração de própolis de 5 % (p/v) e de etanol de 35 % (v/v).

1.4.2. Ensaio de eficácia da calda de própolis, Cr18.EEf₃₅ em macieiras no campo

O potencial antifúngico do própolis contra o pedrado da macieira, doença causada pelo fungo *V. inaequalis*, foi avaliado à escala de campo através da aplicação da calda de própolis - Cr18.EEf₃₅. A aplicação de uma calda de enxofre (Stulln® WG Advance SAPEC, 4 g/L), o tratamento tradicional recomendado, serviu como controlo positivo e, como controlo negativo (solvente), foi utilizado uma solução de etanol 35 % (v/v) que corresponde ao solvente da calda de própolis. A periodicidade das aplicações teve por base o método adotado por Pereira (2021), que teve em atenção os dados meteorológicos, nomeadamente a precipitação e o tempo de folha molhada segundo os critérios de Mills (Anexo 1). Desta forma, e na ausência de precipitação, os tratamentos foram aplicados de 10 em 10 dias. Em caso de chuva, deixou-se passar o período chuvoso e, quando as folhas se encontravam secas, retomou-se a aplicação dos tratamentos, mesmo que não tivessem sido completados 10 dias depois da última aplicação. Quando choveu antes de completar esse período de 10 dias, optou-se por aplicar os tratamentos no dia anterior ao período chuvoso e voltar a aplicá-los novamente uma vez terminado o período chuvoso e assim que as folhas se mostrassem secas. Os tratamentos foram distribuídos pelos três talhões de macieiras de forma que em cada talhão se fizessem os diferentes tratamentos (enxofre, calda de própolis e etanol 35 %), tendo em conta a existência de diferenças entre talhões visto estes se encontrarem situados em diferentes locais das hortas comunitárias da Universidade do Minho, estando assim sujeitos a diferentes fatores, como por exemplo exposição solar, tipo de solo, entre outros.

As três condições foram aplicadas nos 3 talhões e a sua distribuição dentro de cada talhão foi definida da seguinte forma: no talhão 15, as árvores 1 a 4 foram sujeitas ao tratamento com enxofre, as árvores 5 a 8 ao tratamento com Cr18.EEf₃₅ e árvores 9 e 10 ao

tratamento com etanol 35 %, no talhão 21, as árvores 1 a 4 foram tratadas com etanol 35 %, as árvores 5 a 8 com enxofre e as árvores 9 e 10 com Cr18.EEf₃₅ e, por fim, no talhão 25, as árvores 1 a 4 foram tratadas com Cr18.EEf₃₅, as árvores 5 a 8 com etanol 35 % e as árvores 9 e 10 com enxofre, num total de 10 árvores por condição (Figura 11).

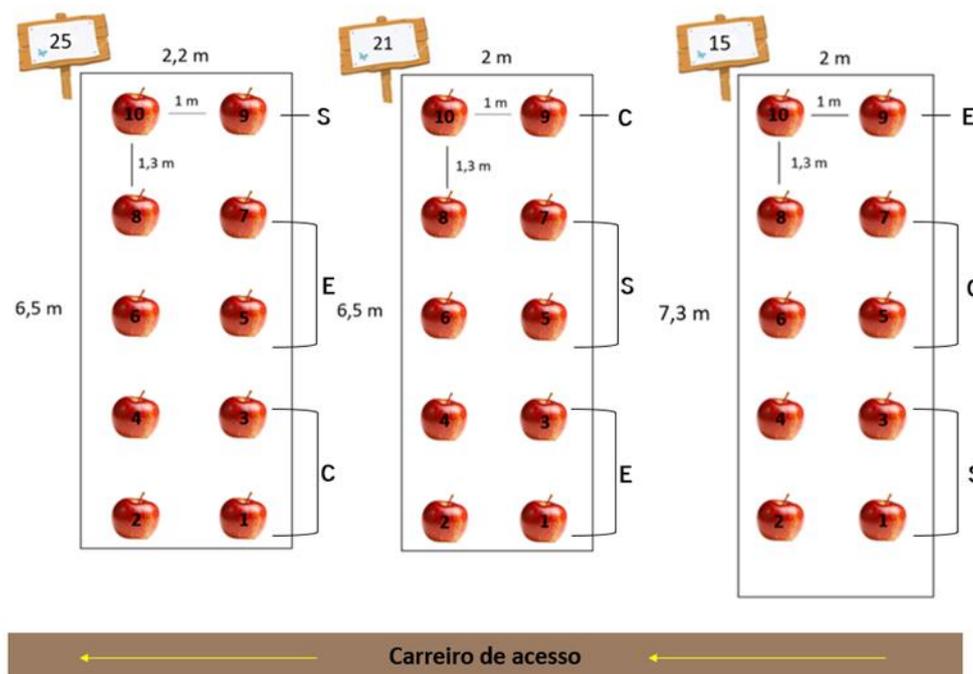


Figura 11. Desenho experimental do ensaio conduzido no campo com a numeração das árvores e com as dimensões dos diferentes talhões onde foram aplicados os diferentes tratamentos a testar: tratamento com Cr18.EEf₃₅ (C), tratamento com enxofre (S) e controlo com etanol a 35 % (v/v) (E).

O primeiro tratamento foi realizado a 20 de abril, quando já era visível o abrolhamento dos gomos, tendo sido aplicados 1 L de cada solução (quantidade determinada previamente, tendo em consideração o estado vegetativo das árvores). Ao longo do ensaio e com o crescimento vegetativo das macieiras, as quantidades foram sendo ajustadas, primeiro para 1,5 L e mais tarde para 2 L por tratamento, para os 3 talhões. As soluções foram aplicadas em toda a macieira - abrolhamentos, ramos, folhas, frutos e caule - tendo o cuidado de pulverizar da maneira mais uniforme possível todas as partes das árvores, para que todas as árvores estivessem sob as mesmas condições. A aplicação foi realizada com um pulverizador manual para um maior controlo e eficácia na pulverização. A pulverização foi realizada com o operador virado para a árvore-alvo e de costas viradas para as restantes árvores do talhão, e em dias sem

vento para evitar “contaminações” cruzadas de tratamentos e desperdício de produto. Foi realizada uma paragem na aplicação dos tratamentos na altura de floração das macieiras (estado fenológico E2 a F do anexo sobre estados fenológicos em macieiras – Anexo 2) por poderem levar ao abortamento de flores e, conseqüentemente, a uma diminuição da produção de frutos. Após o período de floração os tratamentos foram retomados respeitando a periodicidade referida e os cuidados referentes à ocorrência de precipitação (estado fenológico H do anexo 2 sobre estados fenológicos em macieiras). Foram realizados 9 tratamentos ao longo deste trabalho, tendo estes sido feitos a 20 de abril, 13 de maio, 20 de maio, 7 de junho, 17 de junho, 28 de junho, 8 de julho, 19 de julho e 21 de julho.

Para avaliação do poder antifúngico da calda de própolis foram realizadas, semanalmente, contagens do número de folhas afetadas e, esporadicamente, contagens de folhas totais por árvores e contagens de flores e frutos, com início no dia 5 de maio. Para além do número total de folhas afetadas, contabilizou-se ainda o grau de afetação de cada folha tendo por base a escala de classes de resistência elaborada por Keitt *et al.* (1948) e mais tarde revistas por Chevalier *et al.* (1991) (Anexo 3). Mais tarde, foi elaborado um friso de classes de afetação das folhas contendo pedrado da macieira que foi adaptado com imagens nossas (Figura 12) tendo em conta o friso de classes de resistência já existente. A avaliação da incidência da doença foi feita em termos de percentagem de folhas com lesões de pedrado relativamente às totais em cada árvore.



Figura 12. Friso das classes de afetação de *V. inaequalis*. A: Classe 0 - sem sintomas; B: Classe 1 - manchas pintpoint sem esporulação (hipersensibilidade); C: Classe 2 - lesões cloróticas e necróticas irregulares sem esporulação; D: Classe 3a - lesões cloróticas e necróticas irregulares com eventual esporulação leve; E: Classe 3b - lesões cloróticas e necróticas irregulares com esporulação; F: Classe 4 - lesões com esporulação abundante (susceptibilidade completa); G: necrose. Foto da autora (Juliana Silva).

1.5. Determinação da capacidade antioxidante de Cr18.EEf₃₅

Substâncias antioxidantes encontram-se presentes em maior ou menor concentração nos alimentos e, em baixas concentrações, retardam ou previnem a oxidação de substratos oxidáveis (Halliwell 1995), atuando assim como agentes protetores do organismo contra radicais livres, que estão associados a variadas doenças, como por exemplo doenças neurodegenerativas e cancro (Kaliora e Dedoussis, 2007). O organismo humano não é capaz de produzir antioxidantes naturais que ajudem no combate aos radicais livres tendo os alimentos um papel muito importante, dado que estes, em especial os frutos e os vegetais, são as fontes principais de nutrientes antioxidantes (Wang *et al.*, 1996). A maçã é um exemplo de um fruto que fornece fibras, destacando-se a pectina, vitaminas como o ácido ascórbico, sais minerais com destaque para o potássio, e substâncias antioxidantes com reconhecida importância como componentes de uma dieta humana equilibrada (Henríquez *et al.*, 2010). Existem vários métodos para a determinação da atividade antioxidante de compostos e extratos, como por exemplo o FRAP (Benzie *et al.*, 1996), TEAC/ABTS (Miller *et al.*, 1993) e DPPH (Sanchez-Moreno 1998). Neste trabalho foram utilizados os métodos DPPH e ABTS para avaliar o potencial antioxidante de Cr18.EEf₃₅ devido à sua simplicidade, rapidez, economia e facilidade de manipulação (Roginsky e

Lissi, 2005) o que faz com que sejam também estes os métodos mais utilizados para determinação desta bioatividade (Kedare e Singh, 2011).

1.5.1. Ensaio DPPH

Os antioxidantes são muito importantes para a saúde na medida em que interagem com radicais livres, prevenindo a ativação do oxigénio a produtos altamente reativos (Ratnam *et al.*, 2006) que poderiam levar ao stresse oxidativo. A capacidade antiradicalar de Cr18.EEf₃₅ foi avaliada através do método de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•), que corresponde a um radical livre estável que, quando é reduzido, altera a sua cor de roxo para amarelo exibindo uma forte absorvância a 517 nm (Sharma, 2009). Para tal, foi utilizada uma microplaca de 96 poços onde, em cada poço, foram adicionados 50 µL de Cr18.EEf₃₅ nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10, 25 e 50 µg/mL a 100 µL de etanol 35 % e 100 µL DPPH (Sigma-Aldrich) 0,004 % (p/v). Foram ainda preparados um branco por cada concentração de calda, com 100 µL de solvente e 50 µL de Cr18.EEf₃₅ e, ainda, um controlo apenas com 50 µL de solvente e 100 µL de DPPH. Após 20 min de incubação no escuro e à temperatura ambiente, a absorvância foi lida a 517 nm (Spectra Max Plus 384). O ácido gálico (SigmaAldrich) foi utilizado como padrão nas concentrações 0,2, 0,35, 0,50, 0,75, 1,00 e 1,50 µg/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. A capacidade antioxidante da solução Cr18.EE₃₅ foi expressa como a percentagem (%) de redução do radical e calculada através da equação 4:

$$\% \text{ redução} = \frac{\text{Abscontrolo} - (\text{Absamostra} - \text{Abscontrolo})}{\text{Abscontrolo}} \times 100 \quad \text{eq. 4}$$

onde Abscontrolo corresponde à absorvância do controlo (DPPH• e etanol 35 %) e Absamostra corresponde à absorvância das amostras (Cr18.EEf₃₅ com DPPH•). A concentração de Cr18.EE₃₅ necessária para reduzir 50 % da quantidade inicial de radical (DPPH•) - EC₅₀ - foi calculada através dos valores obtidos e com recurso à equação da reta.

1.5.2. Ensaio ABTS

Este método permite avaliar o decaimento do catião - radical ABTS^{*+}, produzido pela oxidação do ABTS (3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate) após a adição de antioxidantes e pode ser medido a 734 nm (Re *et al.*, 1999). Para este ensaio foi também utilizada uma microplaca de

96 poços onde, em cada poço, foram adicionados 2,5 µL de Cr18.EEf₃₅ nas concentrações de 1, 5, 15, 25, 35, 50 e 75 µg/mL juntamente com 247,5 µL de solução ABTS (Roche) Foram ainda preparados um branco por cada concentração de calda, com igual volume de Cr18.EE₃₅ e com 247,5 µL de etanol 100 % e, ainda, um controlo com 247,5 µL de solução ABTS e 2,5 µL de Cr18.EEf₃₅. Após incubação de 30 min, no escuro, à temperatura ambiente, foi lida a absorvância a 734 nm (Spectra Max Plus 384). Trolox (Acros organics) foi utilizado como padrão nas concentrações 0,2, 0,35, 0,50, 0,75, 1,00 e 1,50 µg/mL. Este ensaio foi realizado também em triplicado. A capacidade antioxidante da solução Cr18.EE₃₅ foi expressa como a percentagem (%) de redução do radical e calculada através da equação descrita anteriormente. A concentração de Cr18.EE₃₅ necessária para reduzir 50 % da quantidade inicial de radical (DPPH•) - EC₅₀ - foi calculada através dos valores obtidos e com recurso à equação da reta.

1.6. Análise química de Cr18.EEf₃₅

1.6.1. Teor de ortodifenóis

O teor de ortodifenóis de Cr18.EEf₃₅ foi determinado espectrofotometricamente pelo método do Molibdato de Sódio (Na₂MoO₄) (Acro Organics) que consiste na reação de compostos ortodifenólicos com sais de molibdato dando origem a um produto alaranjado (Dossi 2017). Neste ensaio foi utilizada uma microplaca de 96 poços, onde se colocaram 160 µL de Cr18.EE₃₅ com concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/mL às quais foram adicionados 40 µL de Na₂MoO₄ (Acros Organics) (50 mg/mL, preparado com etanol 50 %). Foram também preparados brancos, um por cada concentração de Cr18.EE₃₅ testada, com 160 µL de Cr18.EE₃₅ e 40 µL de etanol 50 %, e um controlo apenas com 160 µL de etanol 50 % e 40 µL de Na₂MoO₄. O ácido gálico (Sigma-Aldrich) foi utilizado como padrão nas concentrações de 40, 60, 80, 100, 140, 160 e 180 µg/mL. As soluções foram feitas de fresco e o ensaio realizado em triplicado, com três réplicas cada. Após incubação de 15 min no escuro, à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura da absorvância a 370 nm. Os resultados obtidos foram comparados com a reta de calibração e o teor de ortodifenóis da calda foi expresso em equivalentes de ácido gálico por massa de própolis (mg EAG/ g Cr18.EE₃₅).

1.6.2. Teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais de Cr18.EEf₃₅ foi determinado espectrofotometricamente pelo método do cloreto de alumínio (AlCl₃) que resulta na alteração de cor das amostras para amarelo quando existem flavonoides presentes, e onde a absorvância lida a 420 nm aumenta proporcionalmente com a concentração de flavonóides (Woisky e Salatino, 1998). Para tal, em microplacas de 96 poços foram colocados 50 µL de Cr18.EEf₃₅ nas concentrações de 200, 400, 800, 1000, 1200, 1400 e 1600 µg/mL às quais foram adicionados 50 µL de AlCl₃ (Acrós Organics) 2 % (p/v). Os brancos foram preparados com 50µL de etanol 35 % e 50 µL de Cr18.EEf₃₅. A quercetina (Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão nas concentrações de 5, 25, 50, 100, 150 e 200 µg/mL. As soluções foram feitas de fresco e o ensaio realizado em triplicado, com três réplicas cada. Após 1 h de incubação no escuro, à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura da absorvância a 420 nm, sendo o resultado expresso em equivalentes de quercetina por massa de própolis (mg EQ/ g Cr18.EEf₃₅).

1.6.3. Teor de polifenóis totais

O teor de polifenóis totais de Cr18.EEf₃₅ foi determinado através do método colorimétrico de Folin- Ciocalteu (Kumazawa *et al.*, 2004). O reagente Folin-Ciocalteu (Folin-C) na presença de carbonato de sódio (Na₂CO₃) reage com os polifenóis presentes na amostra mudando a sua cor amarela para azul, sendo a absorvância lida a 760 nm diretamente proporcional ao teor de polifenóis (Magalhães *et al.*, 2008). Desta forma, em microplacas de 96 poços foram colocados 10 µL de Cr18.EEf₃₅ com concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/mL às quais foram adicionados 50 µL de reagente de Folin-C (Sigma-Aldrich) 10 % (v/v), e 40 µL de Na₂CO₃, (Merck) 7,5 % (p/v). Os brancos para cada concentração utilizada foram constituídos por 90 µL de etanol 35 % e 10 µL de Cr18.EEf₃₅ e os controlos por 10 µL de etanol 35 %, 50 µL de reagente de Folin-C e 40 µL de Na₂CO₃. O ácido gálico (Sigma-Aldrich) foi utilizado como padrão nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 25, 30 e 50 µg/mL. As soluções foram feitas de fresco e o ensaio realizado em triplicado, com três réplicas cada. Após incubação de 1 h no escuro, à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura da absorvância a 760 nm. Os resultados obtidos foram comparados com a reta de calibração e o teor de polifenóis totais da calda foi expresso em equivalentes de ácido gálico por massa de calda de própolis (mg EAG/ g Cr18.EEf₃₅).

2. Efeito da aplicação de resíduos de própolis no crescimento de plantas de alface – ensaio de campo adaptado de Ferreira (2011)

2.1. Preparação do solo, aplicação do resíduo de própolis e plantação das alfaces nos plots

Para a realização deste ensaio foram utilizadas alfaces da variedade Maravilha das Quatro estações provenientes do Horto das Oliveiras na Trofa com cerca de 25 dias de crescimento. No campo foram feitos seis plots com cerca de 0,45 m². O terreno foi primeiramente limpo com ajuda de sacholas e enxadas e posteriormente o solo foi cavado para realização das 6 valas onde as alfaces foram colocadas. As valas distavam entre si 50 cm a contar do centro de cada alface e os tratamentos a testar 0 %, 15 % e 30 % foram divididos pelos plots da seguinte forma: 1 plot 0 %, 2 plot 15 %, 3 plot 30 %, 4 plot 0 %, 5 plot 15 % e 6 plot 30 % de resíduo de própolis. Para cada tratamento foram utilizadas 10 plantas, sendo divididas pelos 2 plots com o tratamento a testar, ou seja, 5 plantas por plot. O resíduo de própolis proveniente da empresa Montesino (que corresponde a um resíduo obtido após a extração etanólica a 70 % de própolis comercializado para a indústria farmacêutica) foi distribuído e misturado manualmente no solo pelos plots respetivos tendo sido aplicados 0,750 Kg de resíduo por 0,45 m² nos plots com tratamento 15 % e 1,5 Kg por 0,45 m² nos plots com tratamento 30 %. Utilizou-se o formato de concentração para identificação dos tratamentos, no caso 0 % para plots sem qualquer resíduo aplicado no solo, 15 % para plots com 0,750 Kg de resíduo por 0,45 m² e 30 % para plots com 1,5 Kg de resíduo de própolis por 0,45 m². De seguida, foram feitos os buracos para colocar as alfaces tendo cada plot um total de 7 alfaces, 5 com os tratamentos a testar e as 2 alfaces das extremidades apenas para funcionarem como efeito bordadura, ou seja, funcionarem como barreira a invasores, perfazendo assim um total de 42 plantas. As alfaces foram escolhidas de forma a terem um peso e aparência semelhantes e foram colocadas com um espaçamento de 30 cm entre si, à exceção do espaçamento entre as alfaces das extremidades e as seguintes, que foi de 50 cm (Figura 13). A rega foi feita sempre que necessário (geralmente dia sim, dia não) e o ensaio decorreu durante 36 dias (1 de setembro a 7 de outubro).



Figura 13. Desenho experimental dos plots de alfaces nas hortas da UMinho, Braga, contendo a distribuição das plantas pelos plots sem tratamento 0 % (0 Kg por 0,45m²), os plots com o tratamento 15 % de resíduo de própolis (0,750 Kg por 0,45m²) e os plots com tratamento 30 % de resíduo de própolis (1,5 Kg por 0,45m²).

2.2. Parâmetros avaliados

Ao fim de 36 dias de crescimento procedeu-se à colheita de todas as alfaces e procedeu-se à avaliação do peso fresco da parte aérea e da parte radicular, peso seco da parte aérea e da parte radicular, número de folhas de cada planta, área foliar e o conteúdo em água.

A avaliação do crescimento foi efetuada pela determinação do número total de folhas de cada planta, tendo esta contagem sido feita semanalmente a partir da segunda semana do início do ensaio de campo. A contagem foi realizada com ajuda de uma régua, lápis e papel e depois os valores de comprimento e largura de cada folha permitiram que fosse feito o cálculo da área foliar de cada alface recorrendo à equação da reta que conseguimos obter através da multiplicação do comprimento pela largura. Foram avaliadas 10 plantas por tratamento.

A avaliação do crescimento em função do peso foi efetuada pela determinação do peso fresco (Pf) e peso seco (Ps) das plantas completas e separadamente da parte aérea e radicular. O material fresco foi pesado numa balança analítica e posto a secar em sacos de papel numa estufa ventilada a 60 °C durante 3 dias. Após os 3 dias de secagem, o material foi novamente pesado. O conteúdo em água foi avaliado através do cálculo: $(Pft - Pst) / Pft$. As determinações foram efetuadas em 10 plantas de cada tratamento.

2.3. Avaliação da capacidade redutora total e da atividade antioxidante da alface, cultivada com adição de resíduo de própolis no solo

Após secagem na estufa a 60 °C, as plantas foram trituradas com ajuda de um moinho tendo sido depois armazenadas em falcons de 50 mL, ao abrigo da luz, até à análise da capacidade redutora total. As condições de extração utilizadas para se obterem os extratos de alface foram as seguintes: o solvente usado foi o metanol a 30 % (v/v) na proporção de 0,4/10 (g/mL). A temperatura de extração foi de 60 °C durante 60 minutos. De seguida, filtraram-se os extratos através de papel de filtro e de um funil. Todas as experiências efetuadas foram realizadas em triplicado. Nos extratos obtidos determinou-se a Capacidade Redutora Total e o Efeito Bloqueador do Radical Livre de DPPH, descritos nas secções seguintes.

2.3.1. Avaliação da Capacidade Redutora Total

A Capacidade Redutora Total (CRT) dos extratos de alface foi determinada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Em mais pormenor, em microplacas de 96 poços foram colocados 10 µL de extrato, 10 µL de reagente Folin Ciocalteu (Sigma-Aldrich) 10 % (v/v), 10 µL de Na₂CO₃ (Merck) 7,5 % (p/v) e 70 µL de água destilada. Os brancos foram constituídos por 20 µL de metanol 30 %, 10 µL de extrato e 70 µL de água destilada e os controlos por 10 µL de metanol 30 %, 10 µL de reagente de Folin-C, 10 µL de Na₂CO₃ e 70 µL de água destilada. As soluções foram feitas de fresco e o ensaio realizado em triplicado, com três réplicas cada. A reação foi mantida no escuro por 90 minutos à temperatura ambiente, sendo depois a absorvância lida a 725 nm (Spectra Max Plus 384). Simultaneamente, foram preparadas várias soluções padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 75 µg/mL. As soluções foram feitas de fresco e o ensaio realizado em triplicado, com três réplicas cada. Após incubação de 90 minutos no escuro, à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura da absorvância a 725 nm. Os resultados obtidos foram comparados com a reta de calibração e a capacidade redutora total dos extratos de alface foi expressa em equivalentes de ácido gálico por massa de extrato de alface (mg EAG/ g extrato de alface).

2.3.2. Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH

A capacidade antiradicalar dos extratos de alface foi avaliada através do método de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•). Em cada poço de uma microplaca de 96 poços foram adicionados 30 µL de extrato de alface e 135 µL DPPH (Sigma-Aldrich) 0,004 % (p/v). Foi preparado um branco com 135 µL de metanol 30 % e 30 µL de extrato de alface e, ainda, um controlo apenas com 30 µL de metanol 30 % e 135 µL de DPPH. Após 60 min de incubação no escuro e à temperatura ambiente, a absorvância foi lida a 517 nm (Spectra Max Plus 384). O ácido gálico (SigmaAldrich) foi utilizado como padrão nas concentrações 0,1, 0,2, 0,4, 0,70 e 1,00 µg/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. A capacidade antioxidante dos extratos de alface foi expressa como a percentagem (%) de redução do radical e calculada através da equação 5:

$$\text{Efeito Bloqueador do radical livre DPPH} \bullet (\%) = [(ADPPH - AS) / ADPPH] \times 100 \quad \text{eq. 5}$$

, onde AS é a absorvância da solução quando um volume de extrato de alface foi adicionado, e ADPPH a absorvância da solução de DPPH (controlo).

No ensaio das alfices à qual se adicionou resíduo de própolis no solo, diferentes concentrações de extrato de alface foram utilizadas, o que permitiu determinar o valor de EC₅₀.

3. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média ± desvio padrão (DP). Nos ensaios de caracterização química (TOD, TFT, TPT, CRT) e atividade antioxidante foram utilizadas 3 réplicas (n=3) para cada condição, nos ensaios de atividade antifúngica *in vitro* foram utilizadas 4 réplicas e nos ensaios *in vivo* (de campo) foram usadas 10 réplicas por condição. Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (one-way ANOVA) seguida do pós-teste Tukey para comparações entre grupos. O nível de significância foi indicado por notação alfabética onde valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si (p>0,05).

O ajuste das curvas de crescimento com a equação de Gompertz e estimativa dos respetivos parâmetros, bem como a análise estatística de todos os resultados, foram realizadas

com o GraphPad Prism 8.0 versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia EUA, www.graphpad.com).

CAPÍTULO III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Potencial antifúngico do extrato Cr18.EEf₇₀ e da solução Cr18.EEf₃₅ na cultura da maçã

1.1. O extrato hidroalcoólico e a calda de própolis exibem atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*

A atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico de própolis (Cr18.EEf₇₀) e da calda de própolis (Cr18.EEf₃₅) foi determinada *in vitro* através da avaliação do crescimento de *Botrytis cinerea* e de *Penicillium expansum* após pulverização dos tratamentos, comparando com os respectivos controlos onde os controlos água correspondem ao controlo sem qualquer tratamento aplicado no ensaio. Na análise dos controlos utilizados - crescimento dos fungos sem qualquer tratamento ou sob pulverização de etanol 70 % e de etanol 35 % - não se observaram diferenças nos seus crescimentos (Figura 14).

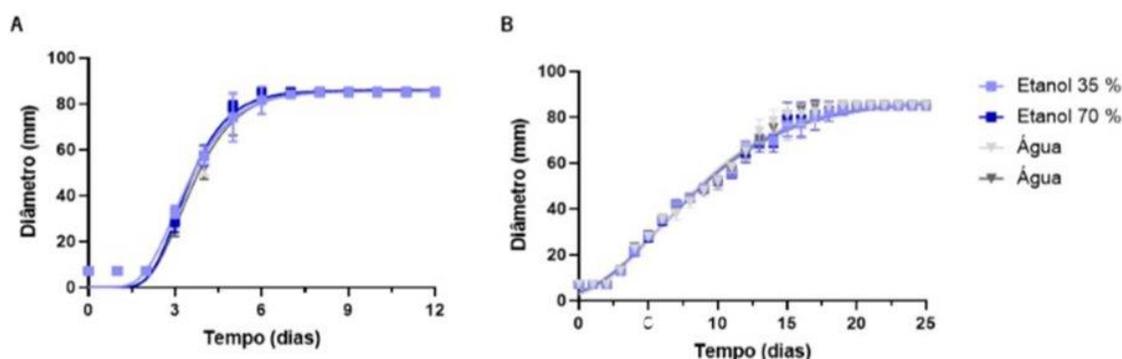


Figura 14. Crescimento micelial de *B. cinerea* (A) e de *P. expansum* (B) ao longo do tempo na presença de etanol 35 %, etanol 70 % e água. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

Com efeito, para cada um dos fungos testados, os parâmetros taxa específica de crescimento (μ) (mm dia^{-1}), diâmetro máximo atingido pelo micélio (Y_{max}) (mm) e o tempo de inflexão (T) (dias) revelaram-se estatisticamente idênticos nas diferentes situações controlo (Figura 15), demonstrando assim que todos os controlos apresentaram o mesmo comportamento, sendo iguais entre si. Desta forma, optou-se por fazer a junção dos diferentes controlos e usar a média dos seus valores em cada experiência para representar o controlo solvente, embora experimentalmente se tenha continuado a realizar todos os controlos.

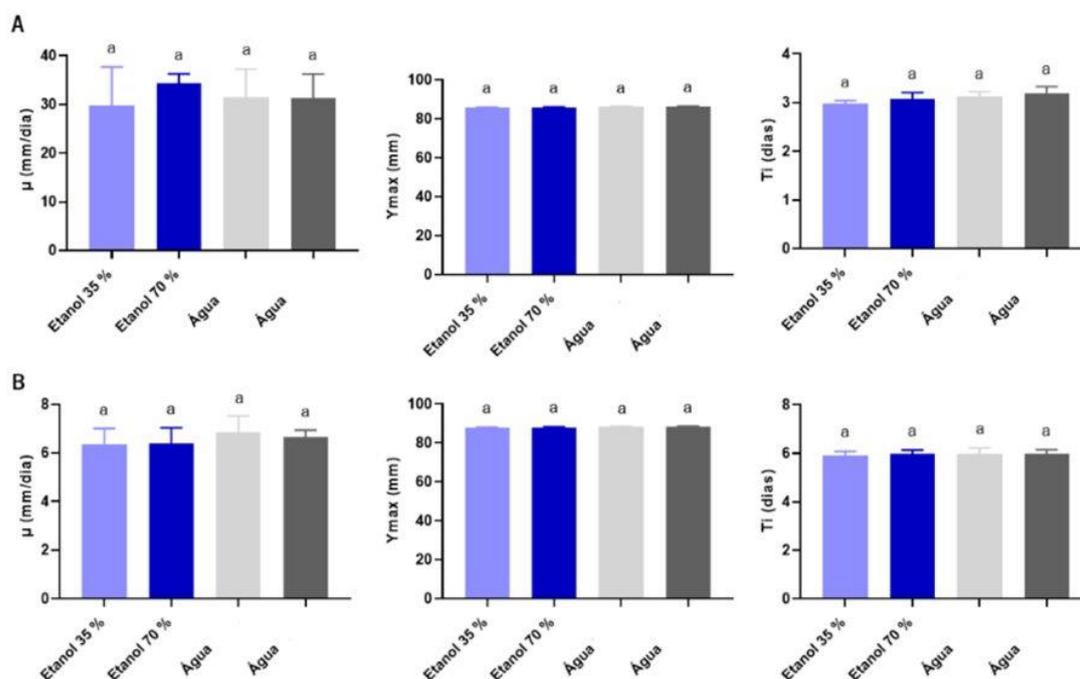


Figura 15. Parâmetros cinéticos avaliados segundo o modelo de Gompertz: μ - taxa específica de crescimento (mm dia⁻¹), Y_{max} - Diâmetro máximo atingido pelo micélio (mm) e T_i - Tempo de inflexão (dias) para o crescimento de *Botrytis cinerea* (A) e *Penicillium expansum* (B) na presença de etanol 35 %, etanol 70 % e água. Os resultados são apresentados como média + DP (n≥3). A análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para análise de significância. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

B. cinerea revelou-se mais sensível que *P. expansum* ao extrato hidroalcoólico de própolis e à calda de própolis (Figura 16). Com efeito, a suscetibilidade de *B. cinerea* é particularmente notória até ao sétimo dia do ensaio, com Cr18.EEf₃₅ a exibir um maior efeito no atraso do crescimento do fungo, enquanto em *P. expansum* demonstrou ser o extrato hidroalcoólico de própolis a exibir um maior efeito no atraso do crescimento fúngico. Porém, apesar do maior efeito da calda de própolis no atraso do crescimento de *B. cinerea*, nenhum destes tratamentos conseguiu inibir o crescimento do fungo, atingindo este o máximo de crescimento possível (diâmetro da placa - 85 mm) ao final de dez dias. Em contrapartida, o mesmo não aconteceu para *P. expansum*, uma vez que os micélios tratados com calda de própolis ou com extrato hidroalcoólico nunca chegam a ocupar a totalidade da superfície da placa, demonstrando assim que ambos os tratamentos não só atrasam o crescimento do fungo como são capazes de inibir o seu crescimento (Figura 16).

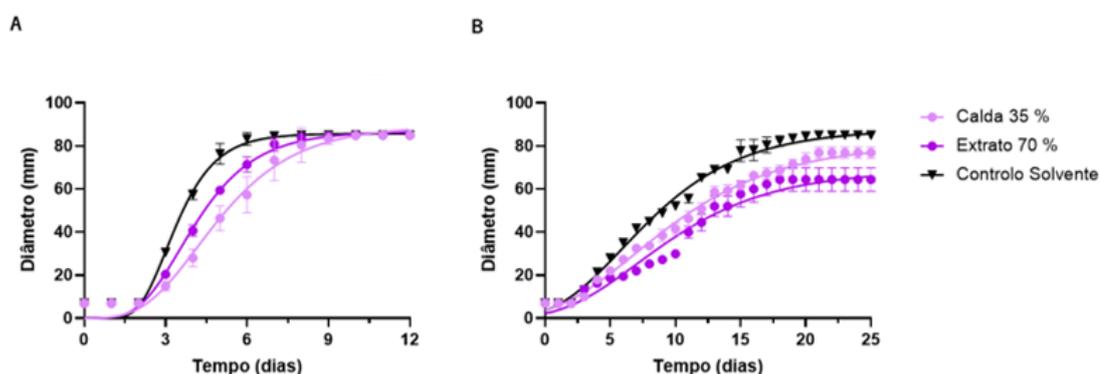


Figura 16. Crescimento de *B. cinerea* (A) e *P. expansum* (B) ao longo do tempo na presença do extrato hidroalcoólico de própolis e da calda de própolis. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

Relativamente ao fungo *Botrytis cinerea*, foi no terceiro dia que se observou o máximo de inibição, quer pela calda (82,35 %) quer pelo extrato de própolis (75,95 %). A partir deste dia, em ambos os tratamentos, os micélios continuaram a crescer, embora sempre com uma velocidade inferior à observada no controlo, acabando por atingir o limite da placa ao nono/décimo dia. Assim, e embora não seja possível dizer que Cr18.EEf₇₀ e Cr18.EEf₃₅ inibiram completamente o crescimento de *B. cinerea*, foi clara a indução de um retardamento do seu crescimento micelial. Este efeito pode ser visualizado na Figura 17, verificando-se entre o terceiro e o sétimo dia uma diminuição na percentagem de inibição de 82,35 % para 13,73 % no caso de Cr18.EEf₃₅ e uma redução de 75,95 % para 4,84 % para o extrato a 70 %. Ainda assim, ambos os tratamentos exercem efeito inibitório no crescimento de *Botrytis cinerea*, e uma ação antifúngica.

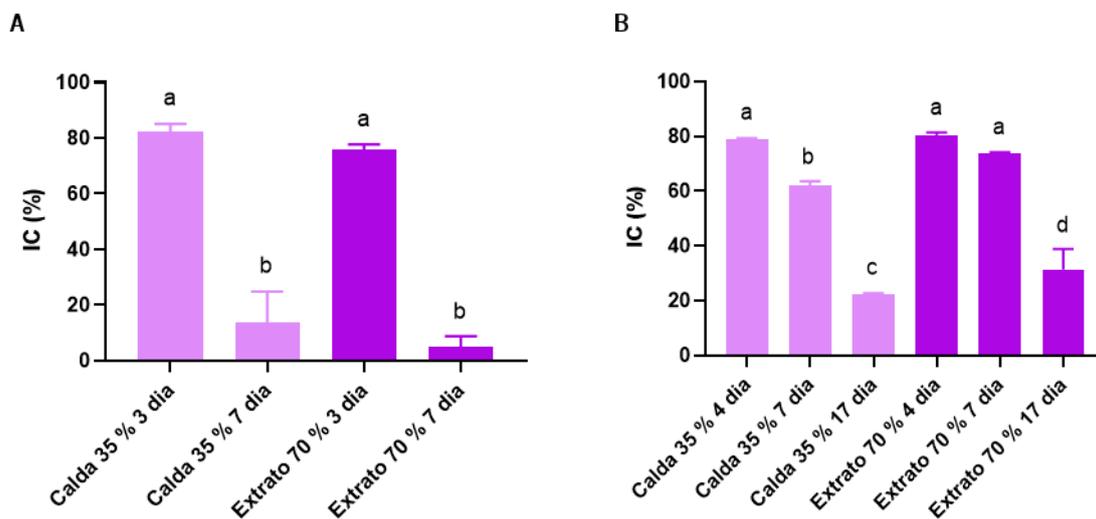


Figura 17. Efeito do extrato hidroalcoólico a 70 % e da calda de própolis na inibição do crescimento (IC) de *B. cinerea* (A) ao terceiro e sétimo dias e de *P. expansum* (B) ao quarto, sétimo e décimo sétimo dia. Os resultados são apresentados como média + DP (n≥3). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey para significância. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$).

Quanto ao fungo *Penicillium expansum*, foi no quarto dia que se observou o máximo de inibição, quer pelo extrato (80,39 %) quer pela calda (79,08 %) de própolis. A partir deste dia os micélios continuaram a crescer, ainda que ao sétimo dia a inibição causada pelo extrato (73,73 %) e pela calda (62,22 %) tenham sido superiores comparativamente à observada em *Botrytis cinerea* no mesmo tempo de crescimento. Todavia, apesar do fungo continuar a crescer, embora de uma forma mais lenta face ao controlo, nunca chegou a ocupar a totalidade da superfície da placa, apresentando no décimo sétimo dia uma inibição de 31,37 % na presença de Cr18.EEf₇₀ e de 22,35 % no tratamento com a calda. Assim, também em *Penicillium expansum* o extrato e a calda de própolis apresentam efeito antifúngico.

Após a utilização do modelo de Gompertz para caracterizar o crescimento micelar dos fungos *B. cinerea* e *P. expansum*, através da avaliação e cálculo da taxa específica de crescimento (μ), do diâmetro máximo atingido pelos fungos (Y_{max}) e do tempo de inflexão (T), procedeu-se à análise estatística destes parâmetros. Verificaram-se diferenças significativas na taxa específica de crescimento de ambos os fungos quando tratados com própolis (face ao controlo), embora sem diferenças entre os dois tratamentos, tendo assim ambos os tratamentos o mesmo efeito neste parâmetro (Figura 18 A e B). Quanto ao diâmetro máximo atingido pelo micélio do fungo (Y_{max}), enquanto *B. cinerea* atinge o limite máximo da placa ao fim de alguns

dias, independentemente de ser tratado com Cr18.EEf₇₀ ou Cr18.EEf₃₅, o mesmo não se observa para *P. expansum*. Neste fungo, observam-se diferenças entre os dois tratamentos utilizados (Figura 18 C e D) e, embora o tratamento com calda não apresente diferenças significativas face ao controlo, esperando-se que a dado momento tanto o micélio tratado com calda como o micélio não tratado (controlo) atinjam o limite máximo da placa, já os micélios tratados com Cr18.EEf₇₀ não chegaram a atingir esse máximo de crescimento e, segundo o modelo de Gompertz, nunca serão capazes do crescimento ocupar toda a superfície da placa. Assim, podemos inferir que o extrato de própolis é capaz de inibir o crescimento deste fungo causador da podridão do bolor azul, uma das principais doenças pós-colheita de maçãs em todo o mundo (Baert *et al.*, 2007) e que Cr18.EEf₇₀ poderá vir a ser utilizado em estratégias de combate a *P. expansum*. Relativamente ao tempo de inflexão (T_i), nos micélios de *B. cinerea* tratados com extrato e calda de própolis existem diferenças significativas, apresentando a calda um maior efeito no atraso do crescimento do fungo por comparação com o controlo. Relativamente a *P. expansum* não se observam diferenças significativas entre os dois tratamentos, que exercem o mesmo efeito no atraso do crescimento do fungo (Figura 18 E e F).

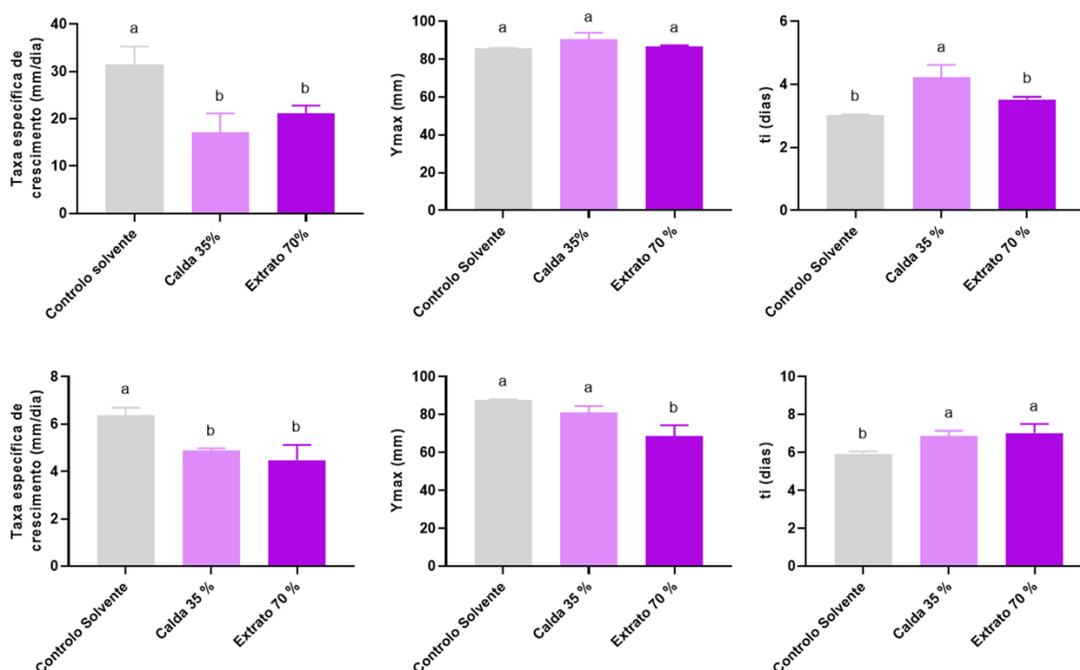


Figura 18. Parâmetros cinéticos do crescimento micelar dos fungos *B. cinerea* (I) e *P. expansum* (II) avaliados segundo o modelo de Gompertz: taxa específica de crescimento (mm dia⁻¹) (A, B), Y_{max} ou diâmetro máximo atingido pelo micélio (mm) (C, D) e T_i ou Tempo de inflexão (dias) (E, F). Os resultados são apresentados como média + DP (n≥3). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey para análise de significância. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

Em suma, embora Cr18.EEf₃₅ e Cr18.EEf₇₀ tenham apresentado alguns efeitos distintos sobre *B. cinerea* e *P. expansum*, nomeadamente em alguns parâmetros cinéticos de crescimento, ambos os tratamentos foram eficazes na redução do seu crescimento, demonstrando assim ter ação antifúngica contra os fungos testados. *P. expansum* revelou-se o fungo mais suscetível aos tratamentos, sendo o extrato de própolis mais ativo que a calda de própolis. Já para *B. cinerea*, apesar da atividade do extrato ser perceptível mais precocemente, ambos os tratamentos revelam eficácia semelhante, indicando assim que ambos podem ser utilizados no controlo ou no retardar do aparecimento da doença causada por este fungo. Em suma, Cr18.EEf₃₅ e Cr18.EEf₇₀ podem atrasar o avanço das doenças causadas por cada um destes fungos e, ainda, no caso do extrato hidroalcoólico de própolis, inibir o crescimento de *P. expansum*.

A suscetibilidade de *Botrytis cinerea* a extratos de própolis já foi avaliada e relatada (Moura *et al.*, 2016; Loebler *et al.*, 2018). Ensaio realizado por Loebler e colaboradores (2018) reportaram uma redução de 75 % no crescimento deste fungo após dez dias na presença de um extrato hidroalcoólico (70 %) de própolis de diferentes regiões de Portugal, uma inibição bastante superior à observada neste trabalho. Ainda assim, Cr18.EEf₇₀ apresenta uma inibição (75,95 %) bastante semelhante à descrita por esses investigadores, mas apenas para o terceiro dia de crescimento do fungo, a partir do qual vai diminuindo até não ser exercido qualquer efeito.

Em *P. expansum* foram relatadas percentagens de inibição do crescimento entre 5 % a 96 % para extratos etanólicos de própolis português de várias regiões (Sánchez *et al.*, 2016). Embaby e colaboradores (2019) também obtiveram percentagens de inibição de 76 % e 84,5 % após três dias de tratamento com 0,5 % de extrato etanólico de própolis. Desta forma, Cr18.EEf₇₀ e Cr18.EEf₃₅ possuem uma eficácia superior à reportada por Sánchez e colaboradores (2016) mas semelhante à descrita por Embaby e colaboradores (2019). Tendo em conta que *Penicillium expansum* é uma das doenças de podridão pós-colheita economicamente mais importantes e comuns (Zhong *et al.*, 2018), esta forte ação antifúngica encontrada em Cr18.EEf₇₀ e Cr18.EEf₃₅ abre perspectivas para a sua utilização no controlo de doenças pós-colheita em vez da utilização de fungicidas convencionais.

1.2. O extrato Cr18.EEf₇₀ e a solução Cr18.EEf₃₅ possuem atividade antibacteriana

Segundo a OMS a resistência de uma gama ampla de agentes microbianos infecciosos representa uma ameaça global de enormes proporções para a saúde humana, animal, ambiental e também para a economia e para o desenvolvimento (OMS 2022). O aparecimento de estirpes cada vez mais resistentes, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Silva *et al.*, 2012), tem levado à procura de produtos naturais como fontes de novas moléculas bioativas. O própolis, tal como mencionado anteriormente, é um produto natural que apresenta atividade antimicrobiana (Afrouzan *et al.*, 2018) pelo que se achou pertinente avaliar a atividade antibacteriana de Cr18.EEf₇₀ e Cr18.EEf₃₅. Esta atividade foi avaliada através da observação da presença/ausência de crescimento bacteriano em meio LBA previamente espalhado com Cr18.EEf₇₀ ou com Cr18.EEf₃₅.

As bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* não cresceram na presença de Cr18.EEf₇₀, contrariamente à bactéria Gram-negativa *E. coli*, cujo crescimento não foi inibido pelo extrato de própolis do Caramulo (Tabela 2), embora se tivesse constatado um menor crescimento de *E. coli* na presença de Cr18.EEf₇₀ do que na sua ausência.

Tabela 2. Atividade antibacteriana do extrato e da calda de própolis preparados com amostras de própolis do Caramulo recolhidas em 2018. A atividade antibacteriana foi avaliada por observação da presença (+) ou ausência (-) de crescimento em meio LBA suplementado com Cr18.EEf₇₀ e com Cr18.EEf₃₅.

| Bactérias | Cr18.EEf ₃₅ | Cr18.EEf ₇₀ |
|------------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> | — | — |
| <i>Bacillus megaterium</i> | — | — |
| <i>Bacillus subtilis</i> | — | — |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | — | — |
| <i>Escherichia coli</i> | + | + |

A calda de própolis revelou-se também ativa contra as bactérias Gram-positivas *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* e *S. aureus* mas incapaz de inibir o crescimento de *E. coli* (Tabela 2). Os resultados obtidos neste trabalho comprovam que o própolis do Caramulo possui maior atividade contra bactérias Gram-positivas e menor atividade antibacteriana contra bactérias Gram-

negativas, sugerindo assim que poderia ser utilizada como um antibiótico natural mais viável para o tratamento de infecções provocadas por bactérias Gram-positivas.

A menor atividade de Cr18.EEf₇₀ e Cr18.EEf₃₅, assim como de outros extratos de própolis contra *E. coli* deve-se a uma maior resistência das bactérias Gram-negativas, parcialmente atribuída à existência de enzimas hidrolíticas que têm a capacidade de quebrar ingredientes bioativos dos extratos de própolis, não sendo, portanto, tão sensíveis a este produto natural (Przybytek *et al.*, 2019). Outra explicação parece residir na presença de uma membrana externa neste tipo de bactérias, e que é capaz de inibir e/ou retardar a penetração do própolis em concentrações mais baixas. Tendo em conta que tanto Cr18.EEf₇₀ como e Cr18.EEf₃₅ parecem ter ação antibacteriana, seria agora importante definir a concentração inibitória mínima (MIC) para cada um destes tratamentos de própolis, não só porque um produto natural só é considerado agente antimicrobiano se apresentar uma MIC entre 100 e 1000 mg/mL (Popova *et al.*, 2013), mas sobretudo para averiguar qual das soluções de própolis – o extrato ou a calda – é mais ativa.

Na literatura encontra-se relatado que extratos de própolis nacional, como os extratos de própolis do Gerês, exibem propriedades antibacterianas, particularmente contra bactérias Gram-positivas (Freitas *et al.*, 2019, 2022a). Ensaios com extratos de própolis do Gerês de 2018 demonstraram a sua atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* (MIC de 50 µg/mL) mas menor atividade contra *E. coli* (Rafaela Oliveira 2022, comunicação pessoal), em linha com os resultados obtidos neste trabalho para própolis proveniente do Caramulo. Também em extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês recolhidas em 2017 (G17.EE) (Gomes 2019) se comprovou a forte atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus megaterium* (MIC de 50 µg/mL) e menor efeito contra *Staphylococcus aureus* (500 µg/mL). Um extrato etanólico de própolis do Pereiro (P17.EE) revelou idêntica atividade contra *Bacillus subtilis* (MIC de 50 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (MIC de 500 µg/mL), mas menor efeito contra *Bacillus cereus* e *Bacillus megaterium* (MIC de 100 µg/mL) (Gomes 2019). A atividade antibacteriana também é uma propriedade de extratos de própolis europeu, oriundo da Alemanha, Irlanda e da República Checa, tendo todos revelado ação contra *Bacillus subtilis*, mas apenas o extrato da república Checa foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* (MIC = 600 µg/mL) (AL-Ani *et al.*, 2018). Vários trabalhos demonstraram a atividade antibacteriana do própolis contra bactérias Gram-positivas (Moreira 2017; Alves 2017; Gonçalves 2017). Ainda assim, é importante salientar que diferentes

metodologias são frequentemente adotadas nos ensaios antimicrobianos, como por exemplo no caso deste trabalho em que se fez o espalhamento dos tratamentos a testar sobre meio LBA e só depois se procedeu à inoculação das estirpes, bem como testadas diferentes estirpes e/ou gamas de concentrações diversas, dificultando a comparação de resultados entre diferentes trabalhos. Ainda assim, constata-se alguma diversidade nos valores de MIC, não só de amostras de própolis de locais muito distintos como entre amostras oriundas de locais semelhantes, o que decorre naturalmente da composição variável e complexa que o própolis apresenta e dos seus diferentes compostos bioativos, variáveis em tipo e em quantidade entre amostras (Santos *et al.*, 2002).

1.3. Avaliação do potencial antifúngico da calda Cr18.EEf₃₅ contra *Venturia inaequalis* em ensaio de campo com macieiras

Neste ensaio foram aplicados os tratamentos em macieiras instaladas em 3 talhões nas hortas comunitárias da Universidade do Minho, entre abril e junho de 2022, num total de 9 aplicações. Os tratamentos - calda de própolis (Cr18.EEf₃₅), enxofre (tratamento convencional utilizado no controlo do pedrado da macieira) e etanol 35 % (controlo solvente) - foram aplicados por pulverização de dez árvores por tratamento, dispersas pelos 3 talhões. Durante o período de ensaio foi feita regularmente a contagem do número de folhas totais de cada árvore e, semanalmente, a contagem de folhas afetadas por árvore tendo em consideração a escala de afetação apresentada na secção 1.4.2. de Material e Métodos, tendo-se estimado a percentagem de folhas afetadas quer por talhão quer por tratamento. O talhão 15 e o talhão 21 estavam sujeitos a um maior número de horas de exposição solar face ao talhão 25, que era mais resguardado do sol e de variações de temperatura. Por esta razão, os talhões 15 e 21 foram também os talhões que necessitaram de maior quantidade de água em cada rega, sendo o talhão 25 aquele que mantinha o solo húmido por mais tempo. A nível de plantas infestantes, o talhão 21 foi aquele que apresentou maior crescimento e cobertura de ervas daninhas, seguido pelo talhão 15 e, por fim, pelo talhão 25, que quase não necessitou de intervenções a nível da gestão de infestantes, o que corrobora observações de anos anteriores para os mesmos talhões (Pereira 2021). Desde cedo se notou que o talhão 15 era aquele que apresentava um maior desenvolvimento das macieiras, apresentando árvores mais robustas e aparentemente mais

frondosas, ao contrário do talhão 25 com macieiras menos desenvolvidas, enquanto as árvores do talhão 21 tiveram um comportamento intermédio (Figura 19).



Figura 19. Imagens do talhão 25 (A), talhão 21 (B) e do talhão 15 (C) presentes nas hortas comunitárias da UMinho, onde foram implementado o ensaio para avaliação da eficácia da calda de própolis (Cr18.EE₃₅). Cada talhão tinha 10 macieiras e os três tratamentos (calda de própolis, enxofre e etanol 35 %). Foto da autora (Juliana Silva).

Tendo em conta estas diferenças edafoclimáticas entre talhões considerou-se importante perceber se existia influência do fator talhão nos parâmetros em estudo: número de folhas totais, número de folhas afetadas, número de flores, número e peso de frutos e número de frutos afetados. Desta forma, começou por ser avaliar se existiam diferenças relativas ao desenvolvimento das macieiras, determinando o número total de folhas por árvore em cada talhão, e também o número de flores e o número e peso dos frutos (Figura 20). Embora o número total de folhas por árvore no talhão 15 fosse mais elevado, as diferenças não foram significativas (Figura 20 A). Relativamente ao total de flores encontradas por árvore, também não se encontraram diferenças significativas entre os três talhões (Figura 20 B). Já o mesmo não se verificou no número de frutos, havendo diferenças significativas entre os três talhões, sendo o talhão 21 aquele que apresentou o maior número de frutos e o talhão 25 aquele que apresentou o menor (Figura 20 C). Relativamente ao peso dos frutos, o talhão 21 apresentou frutos de maior peso comparativamente ao talhão 15, no entanto, e ao contrário do verificado para o número de frutos, o peso dos frutos no talhão 25 foi intermédio e não distinto dos registados nos talhões 15 e 21 (Figura 20 D).

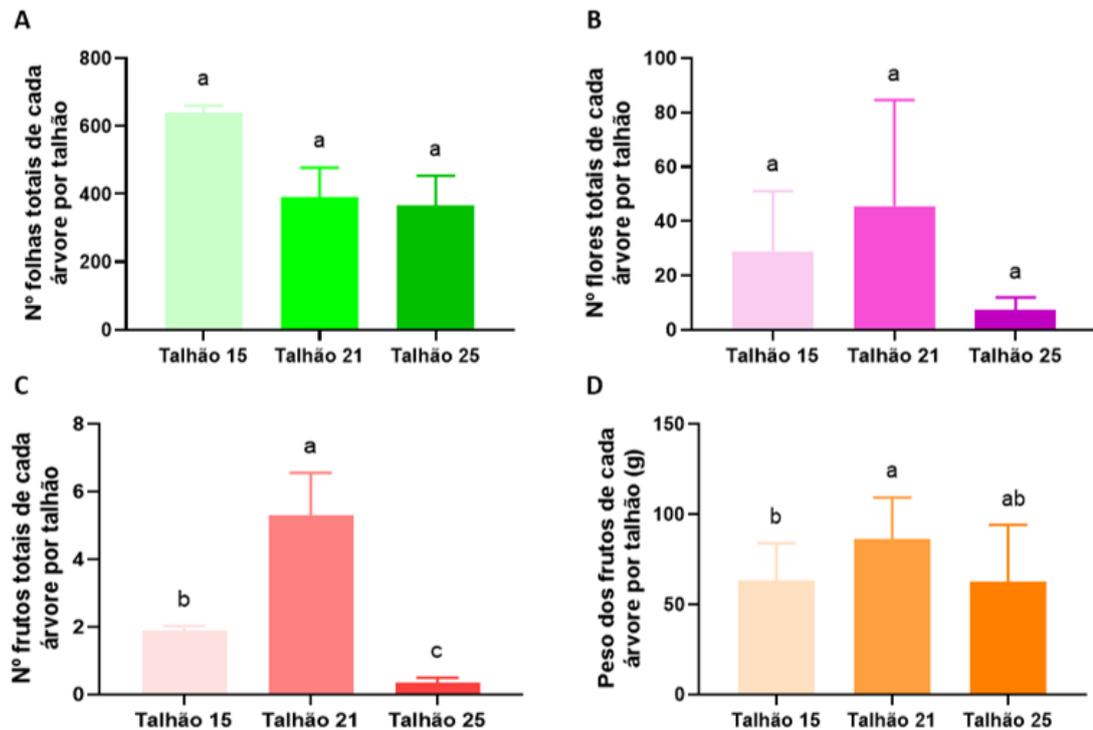


Figura 20. Análise do desenvolvimento das macieiras presentes nos talhões 15, 21 e 25 (no final do ensaio), tendo sido avaliados os parâmetros: número de folhas totais de cada árvore por talhão (A), número de flores totais de cada árvore por talhão (B), número de frutos totais de cada árvore por talhão (C) e peso dos frutos colhidos em cada talhão (D). Os resultados são apresentados como média + desvio padrão. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

De seguida analisou-se o possível efeito do fator talhão ao nível de sintomas de pedrado (Figura 21). Quanto ao número de árvores afetadas, o talhão 25 apresentou um valor significativamente mais baixo que os restantes que apresentaram valores semelhantes entre si (Figura 21 A). Relativamente à percentagem de folhas afetadas por árvore, no talhão 25 obteve-se um valor significativamente inferior ao obtido no talhão 15, não se registando outras diferenças significativas entre talhões (Figura 21 B).

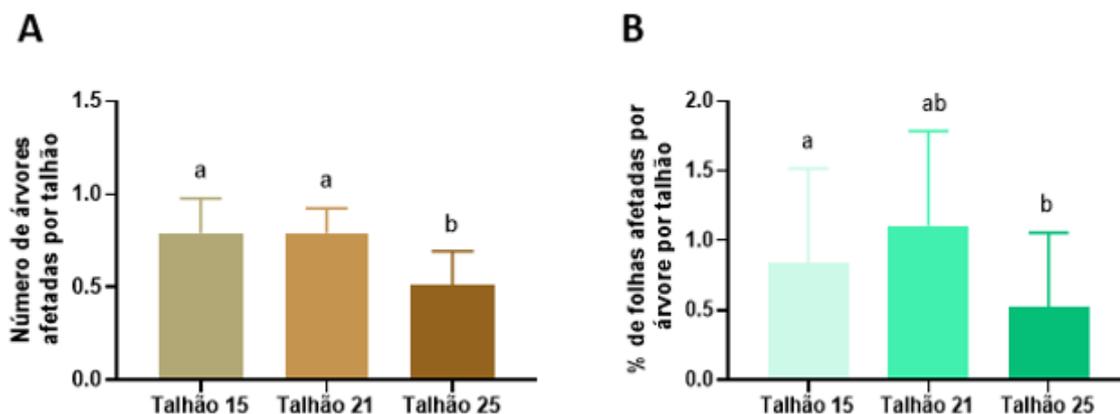


Figura 21. Análise de sintomatologia de pedrado das árvores presentes nos talhões 15, 21 e 25 das hortas da Universidade do Minho (até dia 4 de agosto de 2022, onde foram avaliados os parâmetros: número de árvores afetadas por talhão (A) e percentagem de folhas afetadas por árvore por talhão (B). Os resultados são apresentados como média + desvio padrão. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

As percentagens de folhas afetadas por árvore foram muito baixas em todos os talhões ao longo de todo o ensaio, sendo que o talhão que registou o maior valor foi o talhão 21 com cerca de 1,79 % de afetação. No talhão 15 a maior percentagem de folhas afetadas foi cerca de 1,74 %, e no talhão 25 cerca de 1,02 % (Figura 22).

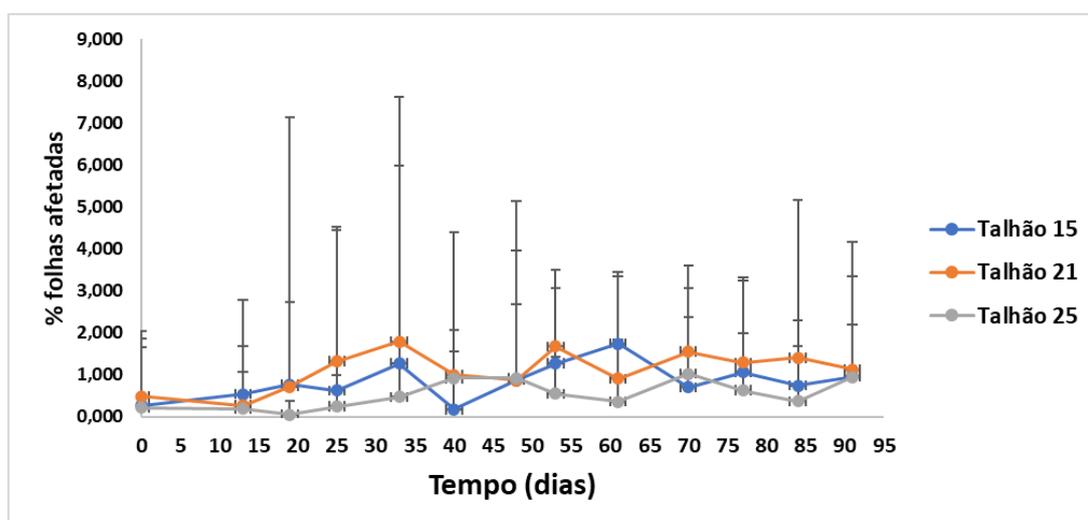


Figura 22. Percentagem de folhas afetadas ao longo do tempo (desde dia 5 de maio de 2021 até 4 de agosto de 2022) em cada tratamento por talhão onde A diz respeito ao talhão 15, B ao talhão 21 e C ao talhão 25. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão.

Considerando agora a porcentagem de folhas afetadas desagregadas por classe de afetação em cada talhão (Figura 23), percebeu-se que a porcentagem de folhas nas classes 1 e 2 eram muito baixas, cerca de 14,58 %, não havendo diferenças entre os talhões, estando a grande maioria das folhas afetadas nas classes 3 a 5 (cerca de 85,42 %), mas também não havendo diferenças significativas entre os talhões. Por fim, no parâmetro de frutos afetados apenas o talhão 21 apresentou frutos com pedrado da macieira (8 frutos).

Após esta análise, apesar de existirem algumas diferenças em alguns parâmetros de desenvolvimento das macieiras e incidência da doença pelo efeito do talhão, nomeadamente no número de frutos (Figuras 20 C) e número de árvores e porcentagem de folhas afetadas (Figura 21 B), foi possível perceber que o fator talhão não teve uma influência global muito significativa nem sobre a forma como a doença causada pelo fungo *Venturia inaequalis* progredia ao longo do tempo.

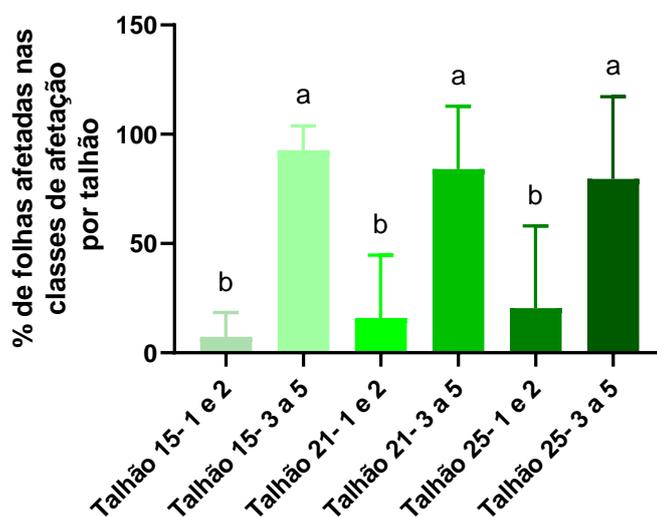


Figura 23. Porcentagem de folhas afetadas nas classes de afetação 1-2 e 3-5 por talhão. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

De modo a avaliar se a calda de própolis apresentaria um efeito promissor no combate ao pedrado da macieira relativamente ao tratamento convencional com enxofre foram analisados os mesmos parâmetros analisados anteriormente para estudar o efeito do fator “talhão”, mas agora isolando o fator “tratamento”.

Relativamente aos parâmetros associados ao desenvolvimento das macieiras (Figura 24), não se encontraram diferenças no número total de folhas por árvore (Figura 24 A), nem no número de flores (Figura 24 B), nem no número de frutos (Figura 24 C) entre tratamentos. O facto de não existirem diferenças significativas no número total de flores e de frutos demonstra que o aparecimento dos mesmos não foi condicionado pelos tratamentos aplicados. Relativamente ao peso médio dos frutos, e este foi maior com o tratamento enxofre comparativamente ao tratamento calda de própolis e etanol 35 % que não registaram diferenças significativas entre si (Figura 24 D).

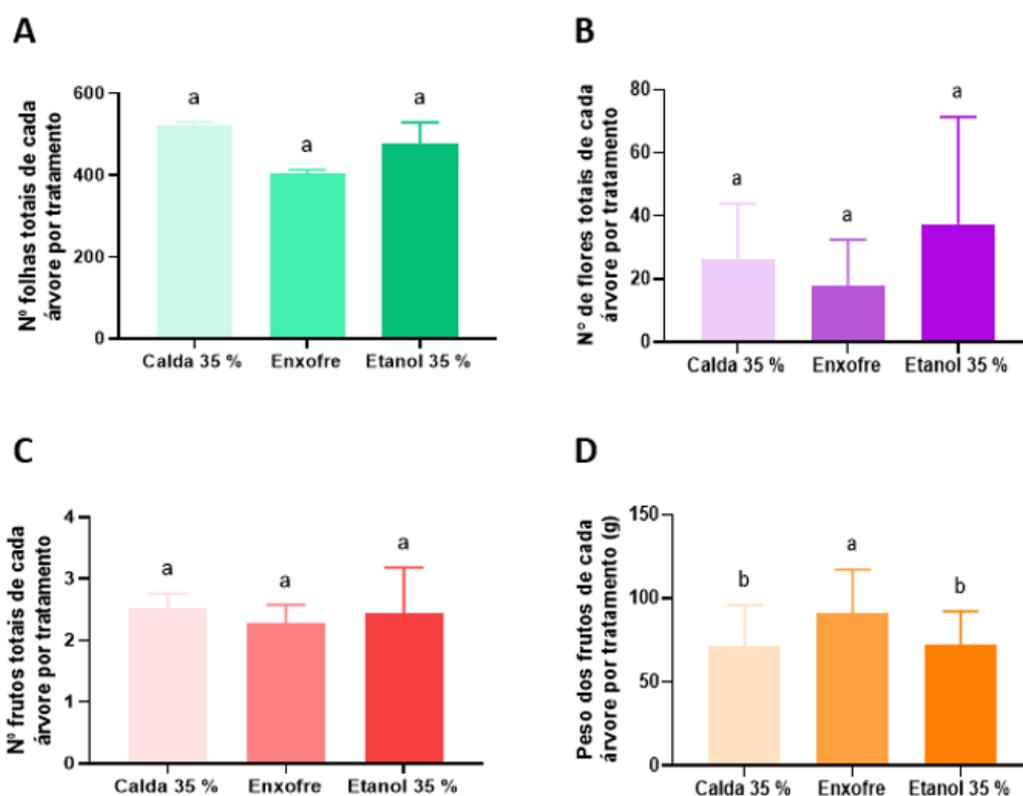


Figura 24. Análise do desenvolvimento das árvores presentes nos talhões 15, 21 e 25 (até final do ensaio), onde foram avaliados os parâmetros: número de folhas totais de cada árvore por talhão (A), número de flores totais de cada árvore por talhão (B), número de frutos totais de cada árvore por talhão (C) e peso dos frutos colhidos em cada talhão (D). Os resultados são apresentados como média + desvio padrão. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

Analisando agora o efeito dos tratamentos na sintomatologia da doença (Figura 25), não se verificaram diferenças significativas nem quanto ao número de árvores afetadas (Figura 25 A) nem quanto à percentagem de folhas afetadas (Figura 25 B). Assim sendo, embora a semelhança entre os tratamentos com calda de própolis e com enxofre possa sugerir eficácias semelhantes no controlo do pedrado da macieira, o fato do controlo solvente também ser semelhante, aliado aos muito baixos níveis de doença (Figura 25) também indica que ensaios com maior número réplicas e em pomares com maior incidência da doença devam ser realizados.

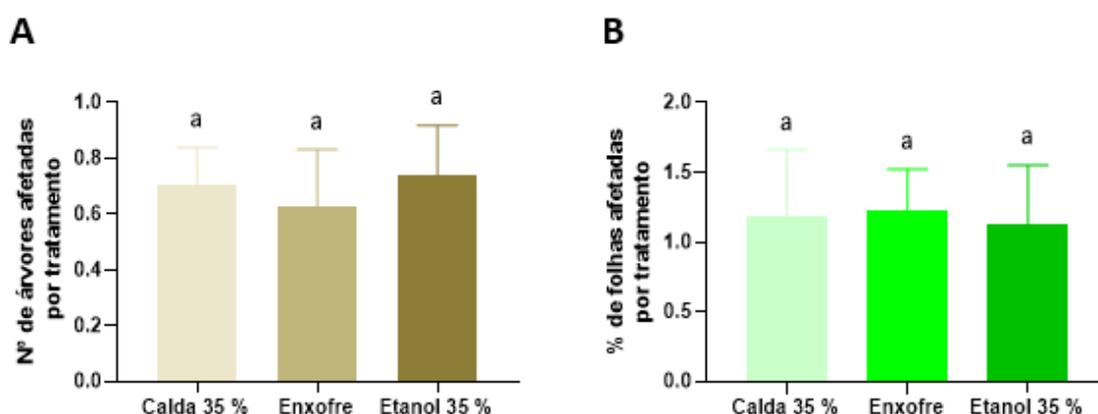


Figura 25. Análise do desenvolvimento das árvores presentes nos talhões 15, 21 e 25 (até ao final do ensaio), onde foram avaliados os parâmetros: número de árvores afetadas por tratamento (A) e percentagem de folhas afetadas por tratamento (B). Os resultados são apresentados como média + desvio padrão. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

As percentagens de folhas afetadas por árvore foram muito baixas ao longo de todo o ensaio, independentemente do tratamento, não havendo efeitos significativos: o valor mais elevado foi obtido com a calda de própolis com cerca de 2,11 % de folhas afetadas, no tratamento enxofre a maior percentagem foi cerca de 1,7 % e no tratamento etanol 35 % cerca de 1,87 % (Figura 26).

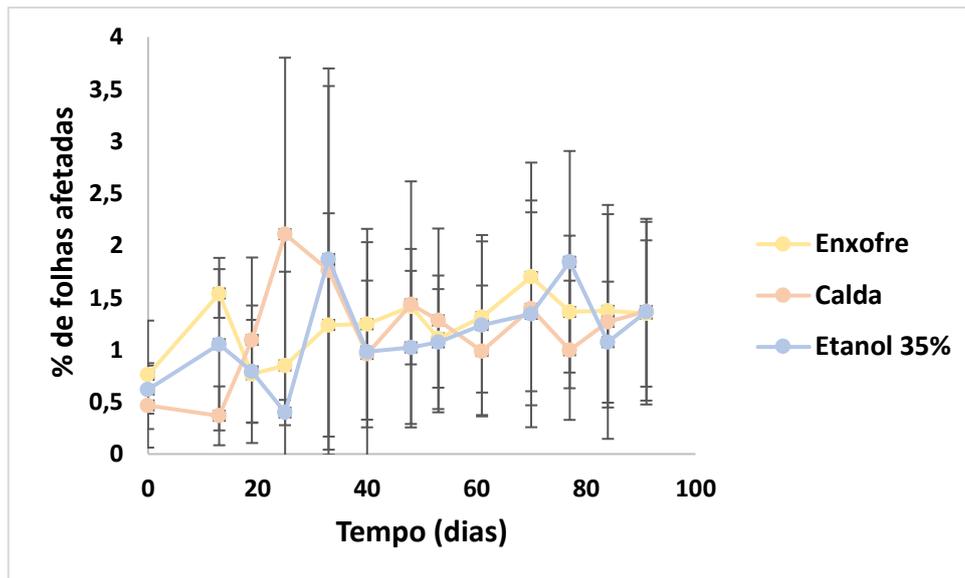


Figura 26. Percentagem de folhas afetadas por árvore ao longo do tempo (desde dia 5 de maio de 2021 até 4 de agosto de 2022) em cada tratamento tendo em conta a combinação dos 3 talhões. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=10).

Considerando agora a percentagem de folhas afetadas desagregadas por classes de afetação em cada tratamento (Figura 27), percebeu-se que a percentagem de folhas nas classes 1 e 2 eram novamente muito baixas relativamente às das classes 3 a 5, tal como anteriormente obtido para efeito do talhão onde a percentagem de folhas nas classes 1 e 2 era também inferior, sendo cerca de 14,58 % face à percentagem de folhas nas classes 3 e 5 com cerca de 85,42 %. Contudo, ao contrário do que se observou para o efeito do fator “talhão”, o fator “tratamento” teve um efeito significativo na distribuição destas percentagens. Assim, o tratamento com calda de própolis destacou-se significativamente do tratamento com etanol 35 %, visto a percentagem de folhas afetadas nas classes 3 a 5, as de nível de agressividade/evolução da doença mais grave/avançada, ser significativamente inferior. O tratamento com enxofre teve efeito intermédio, não se destacando significativamente dos outros dois tratamentos. Uma justificação possível para as diferenças encontradas com calda de própolis *vs* etanol 35% é que a aplicação de solvente pode levar a uma progressão mais acelerada da sintomatologia sendo que a calda (preparada no mesmo solvente) teve a capacidade de reverter/contrariar esse efeito. A integração destes resultados parece sugerir que a utilização da calda de própolis, provavelmente com um solvente com menor concentração alcoólica, poderá ser eventualmente mais eficaz que o tratamento convencional utilizado para no controlo da progressão do pedrado da macieira.

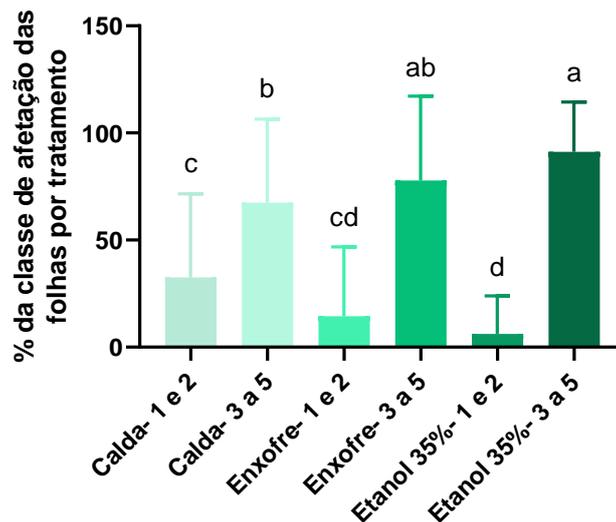


Figura 27. Percentagem de folhas afetadas nas classes de afetação 1-2 e 3-5 por tratamento. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

No parâmetro número de frutos afetados por árvore não foram encontradas diferenças significativas entre tratamentos (Figura 28).

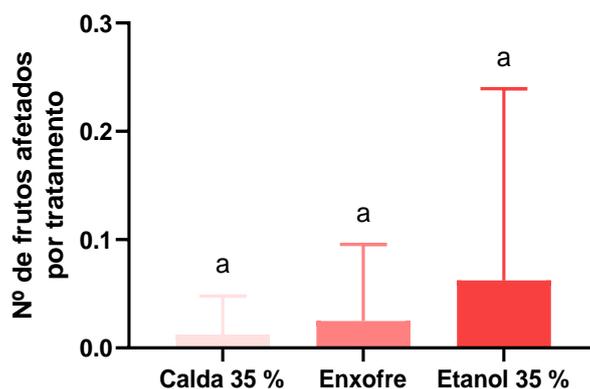


Figura 28. Número de frutos afetados por tratamento. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

Apesar de não se terem encontrado diferenças entre os tratamentos aplicados no parâmetro do número de frutos afetados, por observação dos frutos teve-se a percepção de que os tratamentos tiveram influência ao nível da severidade da sintomatologia da doença causada pelo

fungo *Venturia inaequalis*, uma vez que os frutos tratados com calda de própolis apresentaram lesões menos severas, com manchas mais pequenas e de cor mais clara que não apresentavam esporulação, face aos frutos tratados com etanol e enxofre (Figura 29). Os frutos tratados com enxofre foram aqueles que apresentaram sintomas mais severos evidenciando manchas com mais esporulação e de maior dimensão (Figura 29). Esta observação pode ser justificada pelo facto de a calda de própolis pulverizada poder atuar na defesa dos frutos contra o fungo *Venturia inaequalis* ao criar uma camada protetora que dificulta a entrada e esporulação do fungo, por ação de compostos antifúngicos (Pereira *et al.*, 2008) sendo este efeito semelhante ao realizado em frutas com cobertura de cera para preservação de frutas em pós colheita (Davis e Hofmann, 1973). Outra justificação possível para o baixo número de frutos afetados é que o própolis pode ter atuado como um indutor de resistência, fornecendo maior resistência às macieiras que foram pulverizadas com calda de própolis, através de algum mecanismo, que pode estar a promover o maior metabolismo de fenóis, o que consequentemente aumenta a resistência das plantas e dos frutos à doença pedrado da macieira (Cavalcanti 2000). Contudo visto o número de frutos obtidos neste ensaio ter sido muito baixo, serão necessários mais estudos com maior número de réplicas e em pomares com maior incidência da doença tal como atrás já referido.

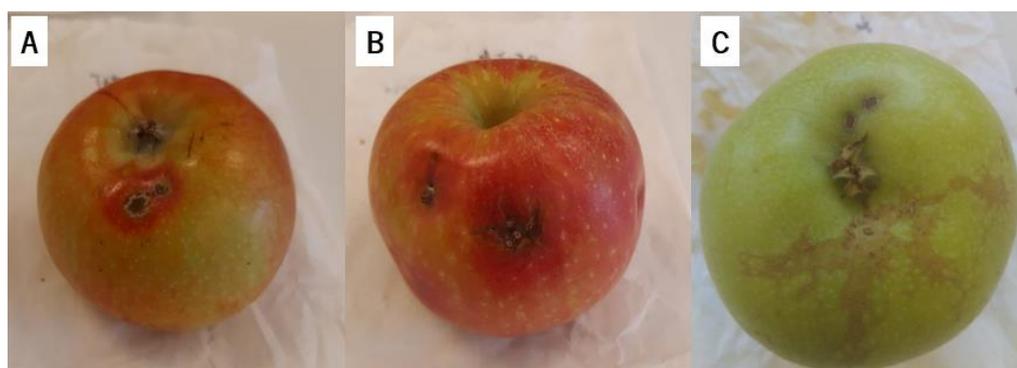


Figura 29. Maças colhidas do talhão 21 onde é possível verificar lesões indicativas de pedrado da macieira causado pelo fungo *Venturia inaequalis* nos três tratamentos. A - etanol 35 %; B - enxofre; e C - calda de própolis. Foto da autora (Juliana Silva).

Tendo em conta eficácias semelhantes entre a calda de própolis e a calda de enxofre, aliada a uma baixa persistência do extrato de própolis no solo e na água (sendo um produto natural), podemos acreditar que, futuramente, produtos à base de própolis possam constituir uma alternativa aos fungicidas agrícolas clássicos. Contudo, como neste ensaio o número de árvores

que apresentaram folhas afetadas pela doença, bem como as percentagens de folhas afetadas por árvore foram muito baixas, as hortas comunitárias da UMinho não serão o local mais indicado para realizar este tipo de ensaio, pois a baixa intensidade de pedrado da macieira não permite avaliar de um modo robusto os efeitos dos tratamentos. De facto, estudos realizados no tratamento do pedrado da macieira com enxofre revelaram valores de percentagem de folhas afetadas superiores face aos obtidos neste trabalho (DeLong *et al.*, 2018), sendo novamente um indicativo de que novos ensaios com a calda de própolis devem ser realizados em pomares onde a incidência da doença seja suficiente para permitir identificar (ou não) uma redução significativa da doença por ação dos tratamentos a estudar. Não obstante, extratos de própolis já demonstraram ser eficazes no controlo de fungos fitopatogénicos em várias culturas, como por exemplo, na cultura do cafeeiro onde se verificaram reduções de 66 e de 46 %, na incidência da ferrugem e da cercosporiose, respetivamente, com a aplicação de até 4 % de extrato etanólico de própolis, com 16 % de própolis bruta no extrato (Pereira *et al.*, 2008). Trabalhos realizados em tomateiros utilizando extrato de própolis em diferentes concentrações contra a doença pinta preta causada pelo fungo *Alternaria solani* e contra a doença septoriose causada pelo fungo *Septoria lycopersici* revelaram percentagens de inibição até 78 % para *S. lycopersici* na concentração mais elevada (3,0 %) e de 55,4 % para *A. solani* na mesma concentração (Lopes 2018). Pereira e colaboradores (2014) utilizando extratos de própolis a 4 % contra a antracnose provocada por *Colletotrichum lindemuntianum* no feijoeiro comum verificaram a redução da severidade da doença em cerca de 63 % com o extrato etanólico. Também na cultura da soja, extratos de própolis de 3 % mostraram-se eficazes no combate da doença ferrugem asiática causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Rempel 2016). Ainda, na cultura de milho extratos etanólicos de própolis de 8 e 10 % contra a ferrugem polissora causada pelo fungo *Puccinia polysora* apresentaram reduções da severidade da doença para metade (Silva *et al.*, 1980).

Assim sendo, e tendo em conta a eficácia de extratos de própolis em diversas culturas contra variadas doenças causadas por fungos fitopatogénicos, torna-se relevante realizar novos ensaios com a calda de própolis tendo como objetivo perceber efetivamente a sua eficácia, visto que pelos ensaios realizados ao longo deste trabalho a calda revelou ter um efeito semelhante ao enxofre ou até conseguir mitigar a velocidade de progressão das lesões nas folhas afetadas.

2. Potencial antioxidante da calda de própolis Cr18.EEf₃₅

Uma das bioatividades atribuídas ao própolis é a atividade antioxidante (Silva-Carvalho *et al.*, 2015). A capacidade antioxidante de Cr18.EEf₃₅, quando avaliada pelo método do DPPH, é traduzida pelo valor de EC₅₀ de 36,52 ± 1,80 µg EAG/ mL (Tabela 2). Em comparação com os extratos de própolis do mesmo local obtidos em anos anteriores - nomeadamente 10,90 ± 0,57 µg EAG/ mL para o extrato Cr18.EE₇₀ e 9,58 ± 0,66 µg EAG/ mL para Cr18.EE (Pereira 2021), a calda revela menor potencial antioxidante o que já era esperado uma vez que resulta de uma diluição que levará a que exista apenas metade dos compostos encontrados na mistura. Por outro lado, embora outros trabalhos relatem que amostras brutas de própolis assim como extratos etanólicos não perdem a sua atividade após alguns anos de conservação (Peixoto *et al.*, 2021; 2022), não é de descartar essa possibilidade de perda da atividade antioxidante de Cr18.EE₇₀ após 1 ano de conservação a 4 °C, o que consequentemente se refletiria na atividade antioxidante da calda de própolis (preparada especificamente para este trabalho) pelo que teria sido importante reavaliar a atividade antioxidante destes extratos.

Tabela 3. Capacidade antioxidante de Cr18.EEf₃₅, Cr18.EE₇₀ e Cr18.EE avaliada segundo o método DPPH. Os resultados são expressos em EC₅₀ (µg/mL), como média ± desvio padrão (n=3), e o ácido gálico foi usado como padrão.

| Extratos | DPPH (µg/mL) | Referências |
|------------------------|------------------|----------------|
| Cr18.EEf ₃₅ | 36,52 (±1,80) | — |
| Cr18.EE ₇₀ | 10,90 (±0,57) | Pereira (2021) |
| Cr18.EE | 9,58 (±0,66) | Pereira (2021) |

A literatura tem comprovado o elevado poder antioxidante do própolis português, como no caso de extratos de própolis do Gerês em vários anos (com valores de EC₅₀ variando entre 14,41 e 20,10 µg/mL) (Freitas *et al.*, 2019) e do sul de Portugal (27 a 31 µg/mL) (Miguel *et al.*, 2010). Comparativamente, a calda de própolis preparada no âmbito deste trabalho exibe um potencial antioxidante bem aquém do exibido por tais extratos. Contudo, por comparação com valores obtidos para própolis de outras regiões do globo como de várias regiões do Brasil, que registaram valores EC₅₀ entre 30,65 ± 0,02 e 100,32 ± 0,03 µg/mL (Salgueiro e Castro, 2016; Salgueiro *et al.*, 2016), própolis da Tailândia com valores entre 17,9 a 108,05 µg/mL (Lu *et al.*, 2003), ou própolis coreano que apresentou valores entre 43,4 e 269 µg/mL extrato (Wang *et*

al., 2016), a calda de própolis apresenta ainda assim maior capacidade antioxidante. Ainda, apesar do menor potencial antioxidante da calda de própolis do Caramulo, os valores de EC_{50} encaixam-se na gama de valores referidos para amostras de várias regiões de Portugal (8 a 93 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Falcão *et al.*, 2013).

O ensaio ABTS foi também utilizado para avaliar o potencial antioxidante da calda de própolis, obtendo-se um valor de EC_{50} de $30,30 \pm 1,33 \mu\text{g}/\text{mL}$ para Cr18.EEf₃₅ (Tabela 2), em linha com os resultados obtidos no ensaio anterior. Apesar de o ensaio ABTS ser também um método para avaliar o potencial antioxidante, poucos são os resultados obtidos com este método para própolis nacional. Ainda assim, dos resultados conhecidos, sabe-se que G18.EE apresentou um valor de $9,83 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Rafaela Oliveira 2022, comunicação pessoal) e G19.EE de $10,53 \pm 0,18 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Freitas *et al.*, 2022b), revelando assim uma capacidade antioxidante superior à da calda de própolis. Porém, tendo em conta valores obtidos com este mesmo método ABTS para própolis de várias regiões do Brasil (EC_{50} variando entre $84,86 \pm 0,01$ e $246,83 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Salgueiro e Castro, 2016), a calda de própolis aqui estudada apresenta potencial antioxidante superior ao da própolis brasileira.

3. Determinação do teor de polifenóis, flavonoides e ortodifenóis da calda de própolis do Caramulo

A composição fenólica é um dos parâmetros mais importantes para a valorização comercial do própolis, por refletir a sua qualidade em termos de potencial bioativo, pelo que se procedeu à determinação dos teores desses compostos fenólicos (polifenóis totais (TPT), flavonoides totais (TFT) e ortodifenóis totais (TOD) em Cr18.EEf₃₅ (Tabela 4). O teor de polifenóis totais de Cr18.EEf₃₅ foi inferior ao teor de polifenóis totais de Cr18.EEf₇₀ e de Cr18.EE já anteriormente determinados (Pereira 2021). Estes valores já eram esperados uma vez que a calda de própolis é uma diluição de um extrato, o que faz com que os compostos fenólicos extraídos na calda de própolis sejam os mesmos, mas se encontrem em menor quantidade que em Cr18.EEf₇₀. Ainda assim, seria importante voltar a medir o teor de compostos fenólicos nos extratos testados por Pereira (2021), uma vez que esses extratos foram estudados em 2020 e o resultado obtido por outro operador.

Tabela 4. Teores de polifenóis totais (TPT), flavonoides totais (TFT) e ortodifenóis totais (TOD) dos extratos do própolis do Caramulo recolhido em 2018. Os TPT e TOD foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/ g) e o TFT em miligramas de quercetina por grama de extrato (mg EQ/ g). Os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n=3).

| Extrato | TPT (mg EAG/ g) | TFT (mg Q/ g) | TOD (mg EAG/ g) | Referências |
|------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------|
| Cr18.EEf ₃₅ | 64,74 ($\pm 2,09$) | 25,73 ($\pm 1,01$) | 80,57 ($\pm 14,76$) | — |
| Cr18.EE ₇₀ | 166,31 ($\pm 5,42$) | 69,33 ($\pm 4,60$) | 353,87 ($\pm 19,86$) | Pereira (2021) |
| Cr18.EE | 150,39 ($\pm 6,29$) | 65,44 ($\pm 1,61$) | 314,17 ($\pm 13,09$) | Pereira (2021) |

Os valores de TPT obtidos para Cr18.EEf₃₅ são inferiores aos valores encontrados para outros extratos etanólicos de própolis proveniente do interior centro de Portugal, com 151 mg EAG/ g (Moreira *et al.*, 2008). Extratos provenientes do Gerês do ano 2018, G18.EE e G18.EE₇₀ também apresentaram valores de TPT (224,60 \pm 10,86 e 255,30 \pm 3,26 mg EAG/ g extrato respetivamente) superiores aos obtidos para a calda de própolis (Freitas *et al.*, 2022b), assim como G15.EE (175,8 \pm 17,0 mg EAG/ g de extrato) (Gonçalves 2017). Ainda assim, Maia (2014) obteve valores mais próximos dos valores aqui obtidos para a calda de própolis para um extrato etanólico a 70 %, variando entre 70 e 141 mg EAG/ g. Salgueiro e colaboradores (2016) obtiveram também valores de TPT nesta gama, compreendidos entre 6,86 \pm 0,02 e 122,68 \pm 0,05 mg EAG/ g, para várias amostras de própolis verde e de extratos comerciais de própolis verde de diferentes regiões do Brasil, assim como Andrade *et al.*, (2017), que reportaram valores entre 55,74 \pm 0,48 e 91,32 \pm 0,49 mg EAG/ g extrato para diferentes EE de própolis do nordeste do Brasil, ou valores de TPT de 31,2 mg EAG/ g para própolis da Tailândia (Kumazawa *et al.*, 2014). Ainda assim, analisando os valores encontrados na literatura para diferentes extratos de própolis de diferentes regiões de Portugal e da Europa, como por exemplo para extratos de própolis provenientes de diferentes partes da Hungria (104,6 a 286,9 mg EAG/ g extrato; Molnár *et al.*, 2017) e da Croácia (136,14 mg EAG/ g; Bojic *et al.*, 2018), pode concluir-se que a calda de própolis é menos rica nestes compostos. No entanto, já era expectável que os valores de TPT da calda de própolis do Caramulo e de extratos de outras regiões de Portugal e do mundo fossem diferentes e que viessem corroborar a informação já descrita na literatura de que condições climáticas distintas (Falcão *et al.*, 2010), o tipo de vegetação envolvente (Katalinic *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2010) e as condições de recolha (Sheng *et al.*, 2007) influenciam a composição química do própolis.

De igual modo, os valores de TFT de Cr18.EEf₃₅ foram inferiores ao teor de flavonóides totais de Cr18.EEf₇₀ e de Cr18.EE calculados anteriormente por Pereira (2021) (Tabela 3). Extratos de própolis do Gerês do ano de 2018, G18.EE e G18.EE₇₀ também apresentaram maiores valores de TFT ($44,74 \pm 1,26$ e $48,56 \pm 0,64$ respectivamente) (Freitas *et al.*, 2022b). Gomes (2019) obteve para extratos etanólicos de própolis do Gerês e do Pereiro valores de TFT de $36,76 \pm 1,142$ e de $24,76 \pm 1,401$ mg EAG/ g extrato respectivamente, assemelhando-se os valores de TFT das amostras de própolis do Pereiro aos da calda de própolis. Ainda assim, Cr18.EEf₃₅ apresenta genericamente valores de TFT muito inferiores aos obtidos para amostras de própolis europeu, como exemplificado pelos valores de TFT entre 128 e 178 ± 2 µg EQ/ mg extrato obtidos para amostras de própolis oriundas da Polónia (Kurek-Górecka *et al.*, 2012) e de $220 \pm 2,5$ mg EQ/ g extrato para amostras de própolis provenientes de outras regiões do globo, o TFT da calda de própolis é superior ao obtido para extratos de própolis verde e extratos comerciais de própolis verde provenientes de diferentes regiões do Brasil (variando entre $0,63 \pm 0,01$ mg EQ/ g extrato e $9,71 \pm 0,01$ mg EQ/ g extrato) (Salgueiro *et al.*, 2016).

O TOD tem sido um parâmetro pouco avaliado em extratos de própolis, mas tendo em conta os valores obtidos para os extratos Cr18.EE₇₀ ($353,87 \pm 19,86$ mg EAG/ g) e Cr18.EE ($314,17 \pm 13,09$ mg EAG/ g) (Pereira 2021), a calda de própolis apresenta teores bastante inferiores ($80,57 \pm 14,76$ mg EAG/ g) aos dos extratos de própolis provenientes da mesma região (Tabela 4). Gomes (2019) obteve para extratos de própolis oriundos do Gerês e do Pereiro valores de $467,3 \pm 9,250$ mg EAG/ g extrato e de $303,2 \pm 5,563$ mg EAG/ g, respectivamente, valores estes também bastantes superiores aos obtidos para Cr18.EEf₃₅. Freitas *et al.*, (2022b) obteve valores de $263,05 \pm 15,19$ mg EAG/ g para G18.EE e $367,71 \pm 18,86$ mg EAG/ g para G18.EE₇₀, uma vez mais bastantes superiores ao teor obtido para a calda de própolis neste trabalho.

Tendo em conta os teores de substâncias fenólicas de Cr18.EEf₃₅ (Tabela 4) poderíamos antecipar uma menor capacidade antioxidante face a outros extratos provenientes também do Caramulo, no caso Cr18.EE₇₀ (Pereira 2021) e Cr18.EE (Pereira 2021) uma vez que maiores valores de compostos fenólicos estão associados a uma maior atividade antioxidante (Duthie *et al.*, 2000; Molyneux 2004) o que foi comprovado nos resultados obtidos para a calda de própolis, uma vez que esta apresenta menor capacidade antioxidante face aos extratos Cr18.EE₇₀ e Cr18.EE.

4. Efeito da aplicação de resíduo de própolis no crescimento de plantas de alface – ensaio de campo

4.1. Avaliação de parâmetros de crescimento

O ensaio com alfaces da variedade Maravilha das quatro estações decorreu ao longo de 36 dias e os resultados relativos ao peso final total das plantas, bem como da parte aérea e radicular, encontram-se na Figura 30.

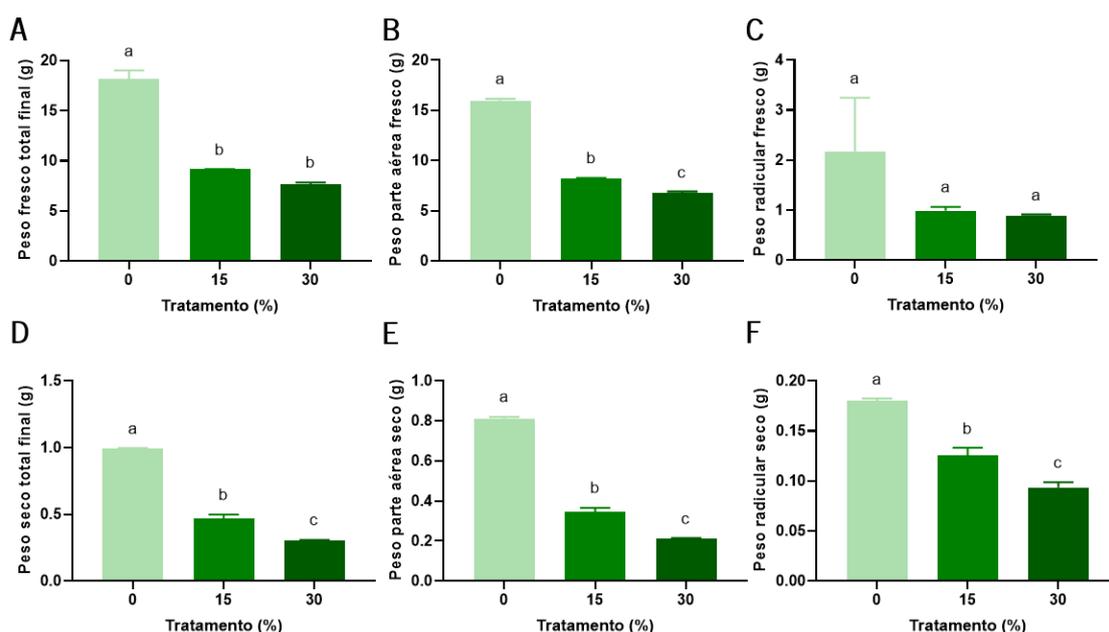


Figura 30. Parâmetros de crescimento avaliados nas alfaces no final do ensaio com resíduo de própolis no solo. A - peso fresco total, B - peso fresco da parte aérea, C - peso fresco a parte radicular, D - peso seco total, E - peso seco da parte aérea e F - peso seco da parte radicular. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão (n=10). Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

Como se pode observar, o tratamento com resíduo de própolis teve um efeito muito significativo no crescimento das alfaces, medido como peso fresco total (Figura 30 A) ou peso seco total (Figura 30 D). Embora seja visível uma resposta dependente da dose, apenas no peso seco total se verificaram diferenças significativas entre os 3 tratamentos (0, 15 e 30 %) (Figura 30 A e D). Este efeito do tratamento dependente da dose foi também observado para o peso da parte aérea (Figura 30 B e E) e da parte radicular (Figura 30 F) determinadas isoladamente. A

exceção foi no peso fresco da parte radicular onde não se verificaram quaisquer diferenças entre grupos, provavelmente devido ao elevado desvio-padrão ocorrido no controlo (Figura 30 C). Independentemente desta questão, o efeito inibitório exercido pelo resíduo de própolis teve sempre mais impacto no peso seco do que no peso fresco (Figura 30 D, E, F *vs* A, B, C). Ao comparar as razões “valor no tratamento 30 %/valor no tratamento 0 %” entre pesos secos e pesos frescos, verificou-se que a redução era sempre maior para peso seco: 31 % *vs* 42 % para peso total e 26 % *vs* 42 % para o peso da parte aérea, para o peso da parte radicular não foi realizada este cálculo pelas razões (desvio-padrão) atrás apontadas. Outro aspeto interessante é que a parte aérea parece ter sofrido maior inibição de crescimento do que a parte radicular (Figura 30 B, E *vs* C, F). Ao comparar as razões “valor no tratamento 30 %/valor no tratamento 0 %” entre pesos da parte aérea e pesos da parte radicular, mas apenas para o peso seco pelas razões apontadas, verificou-se que a redução de crescimento foi de facto muito maior na parte aérea: 26 % *vs* 52 %. Desta forma, é possível afirmar que o resíduo de própolis aplicado no solo possui efeito inibitório no crescimento de plantas de alface e com maior expressão na parte aérea.

A partir dos valores de pesos frescos e secos finais das alfaces calculou-se ainda o conteúdo em água tendo sido possível verificar um aumento dependente da dose de resíduo de própolis aplicado no solo (Figura 31). Este aumento permite-nos perceber que o resíduo de própolis aplicado no solo promove o aumento do teor de água nas plantas o que é essencial na manutenção da turgescência celular, para que haja um aumento do volume celular e crescimento da planta, abertura dos estômatos e movimentos de folhas e flores (Kramer e Turner, 1980).

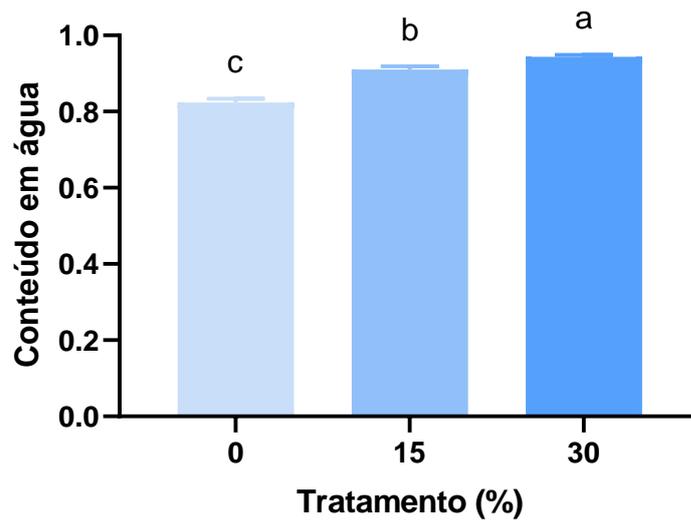


Figura 31. Conteúdo em água das alfaces por tratamento. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão (n=10). Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$).

A Figura 32 mostra a evolução da área foliar total das alfaces em cada tratamento ao longo do ensaio, sendo visível o efeito inibitório da aplicação de resíduo de própolis no solo.

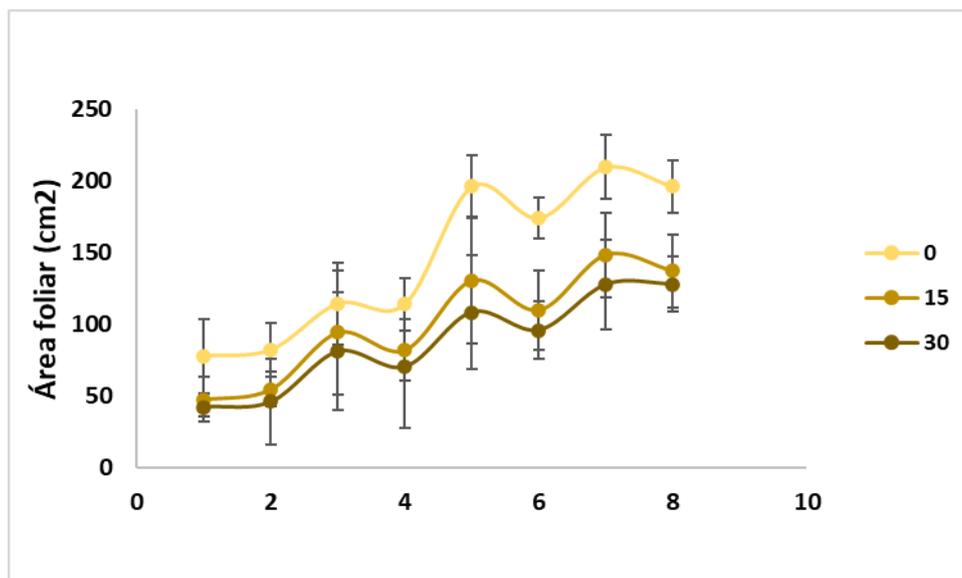


Figura 32. Evolução da área foliar total das alfaces nos três tratamentos (0, 15 e 30%) ao longo do período de ensaio. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=10). Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p>0,05$).

Após análise estatística específica para amostragem final foi possível perceber que com a aplicação da maior concentração de resíduo (30 %) a área foliar das alfaces foi significativamente inferior àquela obtida sem aplicação de resíduo (Figura 33 A). Já relativamente ao número de folhas totais de cada alface, não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 33 B).

Globalmente, estes resultados parecem indicar que o impacto da aplicação de resíduo de própolis no crescimento das alfaces se possa dar mais por um efeito inibitório da divisão e/ou expansão celulares do que pela diferenciação e novos órgãos (folhas).

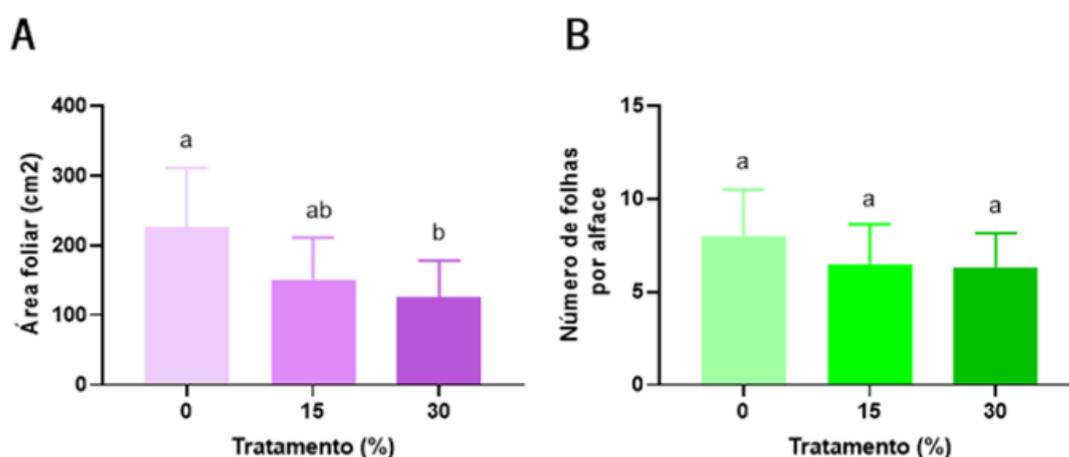


Figura 33. Evolução do crescimento das alfaces no ensaio com resíduo de própolis aplicado no solo, onde A corresponde à área foliar das alfaces e B corresponde ao número de folhas totais de cada alface nos três tratamentos. Os resultados são apresentados como média + desvio padrão (n=10). Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

Assim sendo, e tendo em conta o objetivo do ensaio, que era perceber se o resíduo de própolis poderia ter uma “segunda vida”, no caso da cultura da alface podemos afirmar que o resíduo de própolis não funcionou como bioestimulante. Contudo, a forte diminuição registada no crescimento das plantas de alface parece sugerir que este resíduo possa ter uma ação herbicida quando aplicado no solo. Deste modo, seria importante realizar novos estudos com o intuito de avaliar esta potencialidade do resíduo da extração de própolis como bioherbicida, de forma a reutilizarmos um resíduo natural que neste momento não tem utilidade, mas que poderá reentrar no sistema, eventualmente, como produto de interesse na gestão de infestantes.

Na literatura não foi possível encontrar informação referente a aplicação de resíduos de extração de própolis no solo para avaliar o crescimento de plantas ou para testar a influência deste produto quando aplicado no solo em diferentes concentrações. Assim, este estudo apresenta-se como um estudo pioneiro e por isso mesmo carece da realização de mais ensaios para perceber qual a sua influência no solo, nomeadamente na microflora, bem como em diferentes espécies de plantas. Desta forma, o resíduo de própolis aplicado no solo poderá ter efeito na microflora terrestre, nomeadamente em fungos, podendo atuar como um fungicida natural, na medida em que se sabe que a própolis possui efeito antifúngico contra vários fungos fitopatogénicos (Burdock 1998; Bogdanov 2016; Castro 2006; Galletti *et al.*, 2017), sendo assim de grande interesse também estudar o efeito do resíduo de própolis aplicado no solo.

4.2. Avaliação da capacidade redutora total (CRT) e do efeito bloqueador do radical livre DPPH

Neste trabalho a capacidade redutora total (CRT) foi avaliada de acordo com o protocolo adotado por Ferreira (2011) em ensaios sobre o efeito da aplicação de borra de café no solo no crescimento de plantas de alface. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 5, sendo visível o aumento muito significativo de CRT com a dose aplicada.

Tabela 5. Capacidade redutora total (CRT) de alfaces crescidas com diferentes concentrações (0 %, 15 % e 30 %) de resíduo de própolis aplicado no solo. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato e alface (mg EAG/ g) e são apresentados como a média \pm desvio padrão (DP). Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

| Extrato | CRT (mg EAG/ g) |
|---------|--|
| 0 % | 429,34 ^c ($\pm 39,38$) |
| 15 % | 505,30 ^b ($\pm 28,63$) |
| 30 % | 597,55 ^a ($\pm 45,98$) |

Na literatura não foi possível encontrar informação referente a resultados de capacidade redutora total de resíduos de própolis, ainda assim comparando estes valores com os valores de CRT obtidos para ensaios de borra de café aplicada no solo em diferentes concentrações, foi

possível verificar que, ao contrário do que aconteceu com a borra de café fresca, que com o aumento da concentração da borra de café leva a uma diminuição de CRT, no caso do resíduo de própolis, o aumento da concentração levou a um aumento de CRT. Ainda assim, os valores de CRT obtidos para o resíduo de própolis foram um pouco inferiores aos valores obtidos para a borra de café que variaram entre 700 e 1000 mg EAG/ g (Ferreira 2011).

Outra abordagem à capacidade antioxidante da alface, agora através do método do Efeito Bloqueador do Radical Livre DPPH e expressa pelo parâmetro EC_{50} verificou-se um resultado análogo ao anterior. Assim, e como se pode observar na Tabela 6, EC_{50} diminui de modo significativo com o aumento da dose de resíduo.

Tabela 6. Atividade antioxidante determinada pelo método DPPH de extratos de alfaces crescidas com os tratamentos de resíduo de própolis aplicado no solo de 0 %, 15 % e 30 %. Os resultados estão expressos em EC_{50} (mg/mL), como média \pm desvio padrão (DP). Ácido gálico foi usado como padrão para os ensaios DPPH. Notação relativa à análise estatística: para cada variável, valores médios com letras iguais não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

| Extrato | EC_{50} (mg/mL) |
|---------|--------------------------------------|
| 0 % | 26,42 ^a ($\pm 1,70$) |
| 15 % | 22,52 ^b ($\pm 1,94$) |
| 30 % | 17,59 ^c ($\pm 0,66$) |

Comparando os valores EC_{50} neste estudo, com os resultados obtidos por ensaios com borra de café fresca aplicada no solo, é possível verificar que também no ensaio com borra de café se verificou um aumento da atividade antioxidante com o aumento da concentração de borra aplicada. A gama de valores de EC_{50} também foi semelhante, sendo que para concentrações mais elevadas (20 % a maior concentração utilizada) variaram entre 20 e 9 mg/mL (Ferreira 2011), e para o caso do resíduo de própolis, nas concentrações testadas (15 e 30 %), se obtiveram valores de 22,42 e 17,59 mg/mL, respetivamente (Tabela 6). Este aumento da capacidade antioxidante avaliada através do método da capacidade redutora total e do efeito bloqueador do radical livre DPPH com o aumento da concentração de resíduo de própolis aplicado pode ser explicado pelo facto de o própolis ser rico em compostos fenólicos (Kumazawa

et al., 2004) que são responsáveis pela capacidade antioxidante conferida ao própolis (Park *et al.*, 1998).

Outra explicação para o aumento da capacidade antioxidante das alfaces (aumento da CRT e diminuição de EC₅₀) com o aumento da dose de resíduo de própolis aplicado no solo, poderá ser explicada pela indução da formação de compostos com atividade antioxidante nas plantas, uma vez que as plantas, em geral, produzem compostos fenólicos como resposta a stresses (Hossain *et al.*, 2010), podendo assim o resíduo de própolis funcionar como um stress. Não se pode excluir, contudo, a possibilidade de ter havido a absorção de alguns compostos a partir da solução do solo, ou ser uma resposta secundária por efeito indireto de compostos em microrganismos da rizosfera.

Por fim, embora o resíduo de própolis aplicado no solo tenha efeito no crescimento de alfaces, seria importante estudar concentrações que pudessem não ter efeito significativo no crescimento das culturas, mas que pudessem potenciar a qualidade nutricional do alimento, neste caso antioxidante, para além de poder controlar o estado sanitário, nomeadamente, através do controlo de doenças causadas por fungos fitopatogénicos do solo.

CAPÍTULO IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Ao longo dos anos, tem-se registado uma crescente procura de produtos naturais para aplicação em diversos setores e áreas comerciais, tendo como objetivo principal uma maior sustentabilidade dos processos e segurança dos produtos e, assim, gerar mais confiança por parte dos consumidores cada vez mais informados e ambientalmente responsáveis. O própolis é um exemplo desses produtos naturais e o seu aproveitamento, devido às diversas propriedades biológicas que apresenta, remonta a tempos imemoriais, tendo sido utilizado na medicina tradicional desde então. O amplo espectro de propriedades biológicas deste produto da colmeia chamou a atenção da comunidade científica já há décadas, mas, mais recentemente, essa investigação ganhou impulso, bem como o interesse dos apicultores, o que abriu caminho a uma maior exploração deste produto natural. Nos últimos anos, a utilização do própolis estendeu-se a áreas como a farmacêutica, cosmética, nutracêutica e, mais recentemente, também ao setor alimentar e agrícola, em particular, no controlo de fungos fitopatogénicos. Ainda assim, o própolis é um produto pouco aproveitado e valorizado devido à falta de informação das suas potencialidades quer por parte dos consumidores quer por parte dos apicultores e da comunidade em geral.

Neste contexto, e de forma a obter mais informação sobre as potencialidades do própolis português, mais concretamente da própolis do Caramulo (Cr), os principais objetivos deste trabalho foram: i) avaliar o potencial antifúngico desta calda de própolis (Cr18.EEf₃₅) e do extrato etanólico de própolis a 70 % (Cr18.EEf₇₀) que lhe deu origem contra os fungos *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*, ambos causadores de podridões em maçãs no pós-colheita, neste caso em ensaios *in vitro* e ii) avaliar o potencial antifúngico da calda de própolis (Cr18.EEf₃₅) contra o pedrado da macieira, uma doença causada pelo fungo *Venturia inaequalis*, num ensaio de campo. A seleção da macieira e da maçã prendeu-se com o facto de esta ser uma das culturas com maior expressão não só em Portugal, mas em todo o mundo, e pelo facto da produção, armazenamento e comercialização da maçã enfrentar vários desafios, concretamente o ataque de fungos fitopatogénicos que conduzem a elevadas perdas, alimentares e económicas, sendo necessário contrariar o agravamento do desperdício alimentar.

Os resultados relativos à avaliação da atividade antifúngica de Cr18.EEf₃₅ e de Cr18.EEf₇₀ contra *B. cinerea* e *P. expansum* demonstraram que *P. expansum* foi mais suscetível aos tratamentos que *B. cinerea*, que embora tenha apresentado igualmente um atraso no crescimento radial em placa, este crescimento não foi completamente inibido como no caso de *P. expansum*. Concluiu-se ainda que o extrato hidroalcoólico de própolis (Cr18.EEf₇₀) foi mais

efetivo que a calda de própolis (Cr18.EEf₃₅) contra este mesmo fungo, uma vez que conseguiu impedir o crescimento da colónia micelial de *P. expansum* antes de atingir o limite das placas. No caso de *B. cinerea* ambos os extratos foram igualmente eficazes, apresentando Cr18.EEf₃₅ e Cr18.EEf₇₀, respetivamente, um máximo de inibição de 82,35 % e 72,95 % ao terceiro dia após inoculação. Desta forma, é possível prever que Cr18.EEf₇₀ possa fazer parte de uma solução adequada no controlo da doença podridão do bolor azul causada por *P. expansum*.

Em relação à atividade antibacteriana, Cr18.EEf₃₅ e Cr18.EEf₇₀ exibiram espectros de atividade idênticos contra as bactérias Gram-positivas testadas. Seria agora necessário definir valores de MIC, de forma a perceber se as atividades antibacterianas demonstradas são elevadas ou moderadas. Já contra a única bactéria Gram-negativa testada, *E. coli*, ambos os extratos se revelaram menos ativos uma vez que se verificou sempre crescimento nas concentrações testadas.

Relativamente aos resultados da aplicação dos tratamentos nas macieiras plantadas nas hortas comunitárias da UMinho, os valores semelhantes de percentagem de folhas afetadas, número de árvores afetadas e número de frutos afetados com pedrado da macieira em todos os tratamentos aplicados - calda de própolis (Cr18.EEf₃₅), calda de enxofre e etanol 35 % (solvente da calda) - sugerem que a calda de própolis possa ter uma eficácia semelhante à da calda de enxofre, o tratamento antifúngico atualmente utilizado. A calda de própolis demonstrou ainda ser capaz de mitigar a progressão da doença pedrado da macieira uma vez que apresentou menor percentagem de folhas afetadas nas classes 3 a 5 face ao solvente, no caso etanol 35 %. Adicionalmente, a observação de que Cr18.EEf₃₅ permanece na folha mesmo após a queda de chuva, sugere que possa ter um efeito mais duradouro e prolongado no tempo e, assim, haver a possibilidade de se fazerem menos aplicações, sendo assim mais vantajoso, uma vez que se pode poupar produto, e eventualmente obter o mesmo efeito que com o fungicida convencional. Relativamente ao rendimento da cultura de maçã nas hortas, também não se registaram diferenças significativas entre os três tratamentos aplicados, uma vez que o número de frutos existentes não diferiu significativamente entre os vários tratamentos, demonstrando assim que a calda de própolis não interfere na produtividade das árvores, enfatizando uma vantagem de Cr18.EEf₃₅ face aos fungicidas comerciais convencionais. No seu conjunto, estas observações levam a crer que, futuramente, produtos à base de extratos de própolis possam constituir uma melhor alternativa aos fungicidas agrícolas clássicos utilizados, potenciando assim um melhor

aproveitamento do própolis e também uma agricultura mais sustentável e ambientalmente responsável mantendo a segurança dos produtos para os consumidores finais.

Relativamente ao teor de polifenóis e de flavonóides totais, os valores obtidos encontram-se dentro da gama indicada na literatura, ainda que sejam valores baixos em relação aos dos extratos etanólico (com etanol absoluto) e hidroalcoólico (com etanol a 70 %) provenientes do mesmo local, realçando a boa qualidade da calda de própolis em estudo, já que é esta classe de compostos a principal fração da própolis e aquela a que se atribuem as suas bioatividades. De facto, a capacidade antioxidante da calda de própolis não se distinguiu muito da encontrada por investigadores em anos anteriores para amostras do mesmo local extraídas com etanol a 70 %, embora os valores de EC_{50} (obtidos nos ensaios DPPH e do ABTS) da calda de própolis tenham sido um pouco mais elevados devido à diluição. Embora estes resultados suscitem a ideia de que a aplicação de calda de própolis possa ainda acrescentar propriedades nutricionais interessantes aos frutos, mais estudos teriam de ser feitos para avaliar a permanência dos compostos na casca, bem como na partição casca e mesocarpo.

Quanto ao ensaio utilizando resíduo de extração de própolis aplicado no solo para perceber se este produto poderia ter efeito no crescimento de plantas e de forma a dar-lhes uma “segunda vida”, contribuindo assim para uma melhor gestão de resíduos e de aditivos, foi possível perceber que o resíduo de própolis não só não teve efeito bioestimulante, como teve um efeito inibitório do crescimento em alfaces. Os resultados demonstraram uma clara redução, dependente da dose, na área foliar total das alfaces, no peso fresco e seco total, sendo proporcionalmente maior a redução no peso da parte aérea do que na parte radicular. Não obstante, podemos supor que o resíduo de própolis aplicado no solo poderá ter efeito contra o crescimento de plantas infestantes, possuindo assim um efeito herbicida, que deveria ser estudado e comprovado através da realização de novos ensaios contra espécies infestantes de interesse.

Relativamente à capacidade redutora total (CRT) de alfaces crescidas com diferentes concentrações de resíduo de própolis (0, 15 e 30 %) foi possível perceber um aumento significativo na CRT e dependente da dose aplicada. Os resultados obtidos com o ensaio DPPH, também uma medida da capacidade antioxidante, foram no mesmo sentido, tendo-se verificado uma diminuição significativa no EC_{50} em função ao aumento da dose aplicada. Estes resultados parecem indicar que a aplicação de resíduo de própolis no solo potencia a propriedade antioxidante das alfaces. Estudos posteriores serão necessários para se identificar os

mecanismos subjacentes, já que podem ser efeitos mais diretos (absorção, indução produção compostos antioxidantes nas plantas) ou mais indiretos (por exemplo, via impactos na microflora do solo).

O própolis é sem dúvida um produto fascinante que se apresenta bastante promissor para aplicação nas mais diversas áreas. Por isso mesmo, continua a ser crucial promover e agregar valor a este produto apícola e a todas as suas propriedades biológicas já conhecidas e que ainda poderão vir a ser conhecidas, de modo a contribuir para a valorização do produto em si, mas também para a valorização do próprio setor apícola. É também fundamental compreender melhor a cadeia da produção do própolis e definir políticas de incentivo à sua produção, para que se possa atender o possível mercado no setor agrícola. Não obstante, o própolis poderá ainda ser de enorme valor para os agricultores e também para os consumidores e para a comunidade em geral, na medida em que poderá ajudar na proteção das culturas ao mesmo tempo que se faz uma reutilização de um produto que de outra forma poderia ser descartado, havendo assim uma gestão mais sustentável de recursos, uma redução na produção de resíduos, uma agricultura mais sustentável e ambientalmente responsável.

Como perspectivas futuras, para além dos estudos que se foram sugerindo em cima, propõe-se a repetição do ensaio de campo para teste da eficácia da calda de própolis contra o pedrado da macieira, recorrendo a pomares com presença mais acentuada de doença, pois a percentagem de folhas afetadas por pedrado da macieira foi muito baixa (< 4%) no nosso ensaio, dificultando tirar conclusões robustas.

Nos ensaios antifúngicos com Cr18.EEf₃₅ e Cr18.EEf₇₀ seria também interessante testar mais fungos causadores de doença na maçã e na macieira, como *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryosphaeria dothidea* e a bactéria *Erwinia amylovora*.

Quanto aos efeitos de resíduos obtidos da extração de própolis seria importante que novos ensaios *in vitro* e *in situ* fossem realizados de forma a avaliar o seu potencial bioherbicida contra plantas infestantes, mas também avaliando o seu efeito contra espécies alvo.

CAPÍTULO V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbey, J. A., Percival, D., Abbey, Lord, Asiedu, S. K., Prithiviraj, B. e Schilder, A. (2019, March 4). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)– prospects and challenges. Biocontrol Science and Technology. Taylor and Francis Ltd.
- Abdelghany, T. e El-Sheikh, H. (2018). Mycology.
- Adelman J. (2005). Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêutica) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Afolayan, A. J. e Meyer, J. J. (1997). The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. Journal of ethnopharmacology, 57(3), 177-181.
- Afrouzan, H., Azar, T., Zakeri, S. e Ali, E. H. (2018). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. Iranian Biomedical Journal, 22(1), 50-65.
- Agrios (2005). Plant Pathology, 5ª Edição, Department of Plant Pathology, University of Florida, USA.
- Al-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J. e Wink, M. (2018). Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. Medicines, 5(1), 2.
- Ambardekar, V. R., R. Mahadik, K., R. Paradkar, A. e M. Harsulkar, A. (2012). Enhancement of Hepatoprotective Efficacy of Propolis by Fabrication of Liposomes, as a Platform Nano Formulation for Multi-Component Natural Medicine. Current Drug Delivery, 9(5), 477-486.
- Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L. e Narain, N. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red própolis from Brazilian northeast region. Food Research International, 101, 129-138.
- Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H. e Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. Saudi Journal of Biological Sciences. Elsevier B.V.
- Anónimo (2015). Apple Scab. Department of Crop Sciences, University of Illinois Extension. Report on Plant Disease, 800: 1-4. Consultado em

http://extension.cropsciences.illinois.edu/fruitveg/pdfs/800-Apple_Scab-2015.pdf a 23-02-2022.

Araújo S.G.M. (2011). Análise a nível molecular da interação pedrado-macieira num hospedeiro resistente e num hospedeiro suscetível. Tese de mestrado em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

Ascenza (2020). Podridão cinzenta - *Botrytis cinerea* (Pers). Consultado em <https://www.ascenza.pt/articles/podridao-cinzenta-botrytis-cinerea-pers> a 23-04-2022.

Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Oosterlinck, M., Ahmed, M. M., Rajković, A., e De Meulenaer, B. (2007). Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. International Journal of Food Microbiology, 119(3), 170–181.

Bankova, V., Christov, R., Kujungiev, A., Marcucci, M. C., e Podov, S. (1995). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Brazilian Propolis. Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, 50(3–4), 167–172.

Bankova V.S., de Castro S.L. e Marcucci M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, 31(1): 3–15.

Bankova V. (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds (Review article). Journal of ApiProduct and ApiMedical Science, 1(2): 23-28.

Banskota AH., Tezuka Y. e Kadota S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytother Res; 15:561-571.

Barnes, S., e Shaw, M. (2003). Infection of commercial hybrid primula seed by *Botrytis cinerea* and latent disease spread through the plants. Phytopathology 93:573- 578.

Belete T. e Boyraz N. (2017) Critical Review on Apple Scab (*Venturia inaequalis*) Biology, Epidemiology, Economic Importance, Management and Defense Mechanisms to the Causal Agent. Journal of Plant Physiology & Pathology, 5(2).

Benzie, I. F. e Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry, 239(1), 70–76.

- Bértolo, D. F. Q. (2011). Aplicação de Quitosano na Redução do Escurecimento Enzimático em Sumo de Maçã Não Pasteurizado (Estabilizado por Hiperpressão). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Lisboa.
- Bogdanov, S. (2016). Propolis: biological properties and medical applications. The Propolis Book, Chapter 2, 1–33.
- Bojic, M., Antolić, A., Tomičić, M., Debeljak, Ž, e Maleš, Ž. (2018). Propolis ethanolic extracts reduce adenosine diphosphate induced platelet aggregation determined on whole blood. *Nutrition Journal*, 17(1), 52.
- Bonany, J., Buehler, A., Carbó, J., Codarin, S., Donati, F., Echeverria, G. e Schoorl, F. (2013). Consumer eating quality acceptance of new apple varieties in different European countries. *Food Quality and Preference*, 30(2), 250–259.
- Brent, K.J. e Hollomon (2007) - Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC Monograph n° 2. United Kingdom, 52 pp.
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P., De Bolle, M. F., Thevissen, K., De Samblanx, G.W. e Osborn R. W. (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Science* 16: 297–323.
- Brooks, C. e Cooley, J. (1917). Temperature relations of apple-rot fungi. *Journal of Agricultural Research* 8:139.
- Búfalo, M. C., Candeias, J. M. G. e Sforcin, J. M. (2009). In Vitro Cytotoxic Effect of Brazilian Green Propolis on Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma (HEp-2) Cells. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 6(4), 483–487.
- Bulger, M., Ellis, M. e Madden, L. (1987). Influence of temperature and wetness duration on infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and disease incidence of fruit originating from infected flowers. *Phytopathology* 77: 1225-1230.
- Burdock G.A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee própolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4): 347–363.
- Caccioni, D. R. L., Guizzardi, M., Biondi, D. M., Renda, A. e Ruberto, G. (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on

- Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. International Journal of Food Microbiology, 43(1-2), 73-79.
- Castaldo, S. e Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia, 73 (SUPPL. 1).
- Castro, S. L. (2006). Propolis: Biological and Pharmacological Activities. Therapeutic Uses of This Beeprodut. Annual Review of Biomedical Sciences, 3.
- Cavalcanti, L. S. (2000) Indução de resistência a *Verticillium dahlia* Kleb. em plântulas de cacauero (*Theobroma cacao* L.) cv. *Theobahia*, por Benzotiadiazole (BTH). 82 p. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- Chan, G.C., Cheung, K. e Sze, D.M. (2013). The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis. Clinical Reviews in Allergy e Immunology, 44, 262-273.
- Cheng, P. C. e Wong, G. (1996). Honey bee propolis: Prospects in medicine. Bee World, 77(1), 8-15.
- Chevalier M., Lespinasse Y. e Renaudin S. (1991). A microscopic study of different classes of symptoms coded by the Vf gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). Plant Pathology, 40: 249-256.
- Chien, P. J. e Chou, C. C. (2006). Antifungal activity of chitosan and its application to control post harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan* Hayata). Journal of the Science of Food and Agriculture, 86(12), 1964-1969.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A. e Viaud, M. (2007, December). Botrytis cinerea virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. FEMS Microbiology Letters.
- Coley-Smith, J., Verhoeff, K. e Jarvis, W. (1980). The biology of *Botrytis*. Academic Press Inc.(London) Ltd.
- Coutinho C. (2011). O pedrado das macieiras (*Venturia inaequalis* (Cke) Wint.). DRAP Norte. Ficha técnica 41: 1-3. Consultado em http://www.drapn.minagricultura.pt/drapn/conteudos/ft2010/ficha_tecnica_41_2011.pdf a 20-02-2022.

- Cushnie, T. P. T. e Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier.
- Davis, P. L. e Hofmann, R. C. (1973). Effects of coatings on weight loss and ethanol build up in juice of oranges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Washington. v. 21, n.3, p. 455 - 546.
- Davis, P. A., Polagruto, J. A., Valacchi, G., Phung, A., Soucek, K., Keen, C. L. e Gershwin, M. E. (2006). Effect of apple extracts on NF-kappaB activation in human umbilical vein endothelial cells. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 231(5), 594–598.
- D'auria, F. D., Tecca, M., Scazzocchio, F., Renzini, V. e Strippoli, V. (2003). Effect of propolis on virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of chemotherapy*, 15(5), 454-460.
- De Groot, A. C. (2013). Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*.
- DeLong, C. N., Yoder, K. S., Cochran, A. E., Kilmer, S. W., Royston, W. S., Combs, L. D. e Peck, G. M. (2018). Apple disease control and bloom-thinning effects by lime Sulfur, Regalia, and JMS Stylet-Oil. *Plant Health Progress*, 19(2), 143–152.
- Desamero, Mark Joseph M., Villablanca, Mikaela Angelica, Bariuan, Jussiaea V., Collantes, ThereseMarie A., Gobonseng, Delia T. Ang, Ang, Mary Jasmin C., Fajardo Jr, Alejandro C., Cervancia, Cleofas R. e Estacio, Maria Amelita C. (2017). Honey and própolis abrogate neurologic deficit and neuronal damage in the hippocampus and cerebral cortex of ischemic stroke rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 10(1), 7-15.
- Dimov, V., Ivanovska, N., Manolova, N., Bankova, V., Nikolov, N. e Popov, S. (1991). Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie*, 22(2), 155–162.
- Dimov, V., Ivanovska, N., Bankova, V. e Popov, S. (1992). Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water soluble derivative. *Vaccine*, 10(12), 817–823.
- Dos Santos, J. P. e Wamser, A. F. (2006). Fruit bagging effect on the damage caused by biotics and abiotics factors in an organic apple orchard. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(2), 168–171.

- Dossi, N., Toniolo, R., Impellizzieri, F., Tubaro, F., Bontempelli, G., Terzi, F., e Piccin, E. (2017). A paper-based platform with a pencil-drawn dual amperometric detector for the rapid quantification of ortho-diphenols in extravirgin olive oil. *Analytica Chimica Acta*, 950, 41-48.
- Droby, S. e Lichter, A. (2004). Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. Pages 349-367 in: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, London.
- Duthie, G. e Crozier, A. (2000). Plant-derived phenolic antioxidants. *Current opinion in lipidology*, 11(1), 43-47.
- Elad, Y. e Volpin, H. (1991). Heat treatment for the control of rose and carnation grey mould (*Botrytis cinerea*). *Plant Pathology*, 40(2), 278-286.
- Elad, Y. (1992). Reduced sensitivity of *Botrytis cinerea* to two sterol biosynthesis-inhibiting fungicides: fenetrazole and fenethanil. *Plant Pathology*.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., e Delen, N. (2004). *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Embaby E.M., Hazaa M.M., El-Dougdoug K.H., Abdel Monem M.O., Abd-Elgalil M.M. e Elwan E.E. (2019). Control Apple Fruit Decay by Using 'Ethanol Extract of Propolis' (EEP). *International Journal of Advances in Medical Sciences*, 4(3): 1-11.
- Embrapa Meio-Norte (2016). Sistema de Produção, 3 ISSN 1678-8818. Sistema de Produção: produção de mel. Consultado em https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistema%2Fproducao%2F6_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&p_r_p_76293187_sistemaProducaoId=4905&p_r_p_-996514994_topicId=5165 a 15-09-2021 a 21-12-21.
- Errampalli D. (2014). *Penicillium expansum* (Blue Mold). In *Postharvest Decay: Control Strategies*, p. 189-231. Academic Press.

- Eurostat (2021a). Do you eat fruit and vegetables daily? Consultado em <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/DDN-20190401-1> a 29/10/2021.
- Eurostat (2021b). Structure of orchards in 2017. Newsrelease 32/2019. Consultado em <https://ec.europa.eu/eurostat/documents/2995521/9603938/5-21022019-AP-EN/826b6eac-e1ce-43d2-816e-062b0be9859f> a 29/10/2021.
- Eurostat (2021c). Agriculture, forestry and fishery statistics. Statistical books. Imprimeries Bietlot Frères. Consultado em <https://ec.europa.eu/eurostat/documents/3217494/10317767/KS-FK19-001-EN-N.pdf/742d3fd2-961e-68c1-47d0-11cf30b11489> a 29/10/2021.
- Falcão S.I., Vilas-Boas M., Estevinho L.M., Barros C., Domingues M.R.M. e Cardoso S.M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396: 887-897.
- Falcão S.I., Freire C. e Vilas-Boas M. (2013). A Proposal for Physicochemical Standards and Antioxidant Activity of Portuguese Propolis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90: 1729-1741.
- FAOSTAT (2021). CROPS, Apples - Production quantities of Apples by country. Consultado em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> a 29/10/2021.
- Farré, R., Frasquet, I. e Sánchez, A. (2004). El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*.
- Ferreira, A. (2011). Influência da borra de café no crescimento e nas propriedades químicas e biológicas de plantas de alface (*Lactuca sativa L.*). Dissertação de mestrado, Escola superior Agrária de Bragança. Biblioteca Digital do Instituto Politécnico de Bragança.
- Ferretti, G., Turco, I., e Bacchetti, T. (2014). Apple as a Source of Dietary Phytonutrients: Bioavailability and Evidence of Protective Effects against Human Cardiovascular Disease. *Food and Nutrition Sciences*, 05(13), 1234–1246.
- Figueiredo, C. N., Souza, A. G., Magalhães, V. C., Sales, L., Neto, D. S., De Souza, J., Andrade, J. P. e Marbach, P. A. S. (2020). Diversidade taxonômica e identificação de *Penicillium*.
- FNAP (2010). Manual de produção de Pólen e Própolis, FNAP-Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, Lisboa, pp. 4-17.

- Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A. M., Cunha, A. e Aguiar, C. (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 481-493.
- Freitas, A. S., Cunha, A., Cardoso, S. M., Oliveira, R. e Almeida-Aguiar, C. (2019). Constancy of the bioactivities of propolis samples collected on the same apiary over four years. *Food Research International*, 119, 622–633.
- Freitas, A. S., Cunha, A., Oliveira, R. e Almeida-Aguiar, C. (2022a). Propolis antibacterial and antioxidant synergisms with gentamicin and honey. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 2733–2745.
- Freitas, A., Cunha, A., Parpot, P., Cardoso, S., Oliveira, R. e Almeida-Aguiar, C. (2022b). Propolis Efficacy: The Quest for Eco-Friendly Solvents. *Molecules*, 27(21), 7531.
- Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2004) Polyphasic Taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A Guide to Identification of Food and Air-Borne Terverticillate Penicillia and Their Mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49, 1-52.
- Galletti, J., Tobaldini-Valerio, F. K., Silva, S., Kioshima, É. S., Trierveiler-Pereira, L., Bruschi, M., e Estivalet Svidzinski, T. I. (2017). Antibiofilm activity of propolis extract on *Fusarium* species from onychomycosis. *Future microbiology*, 12(14), 1311-1321.
- Gauthier N. (2018). Apple scab. The Plant Health Instructor. Consultado em <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/AppleSca.aspx> a 24-02-2022.
- Gessler C., Patocchi A., Sansavini S., Tartarini S. e Gianfranceschi L. (2006). *Venturia inaequalis* resistance in apple. *Critical reviews in Plant Sciences*, 25: 473-503.
- Girardi, C. L., Valdebenito Sanhueza, R. M., Bender, R. J. e Cantillano, R. F. F. (2002). Manejo pós-colheita e rastreabilidade na Produção Integrada de Maçãs. Embrapa Uva e Vinho Circular Técnica 31.
- Gomes, A. J. P. (2019). Avaliação e caracterização de propriedades antifúngicas e antioxidantes de própolis português. Dissertação de mestrado, Escola de Ciências da Universidade do Minho. Repositório da Universidade do Minho.

- Gonçalves, R. B., (2017), Desenvolvimento de extratos de própolis português visando diferentes aplicações: o caso da aplicação oral. Dissertação de Mestrado, Escola de Ciências da Universidade do Minho. Repositório Universidade do Minho.
- Gonzalez, R., Corcho, I. e Ramirez., D. (1995). Hepatoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachlorideinduced liver injury in rats. *Phytotherapy Research*, v.9, p.14-17, 1995.
- GPP- Gabinete de Planeamento e Políticas (2007). Sub-fileira: Maçã. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 4-17 pp.
- Gullino, M.L. (1992). Chemical control of *Botrytis* spp. Em: Verhoeff, K., Malathrakis, N.E., Williamson, B. (Ed.). *Recent Advances in Botrytis Research*. Wageningen, The Netherlands: Pudoc Scientific Publishers. p. 217-222.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Lölliger, J. e Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*.
- Hammer, P. E. (1988). Postharvest Control of *Botrytis cinerea* on Cut Roses with Picro-cupric ammonium Formate. *Plant Disease*, 72(4), 347.
- Hampson, C. R. e Kemp, H. (2003). Characteristics of important commercial apples cultivares. Ferree, D. C. e Warrington, I. J. (Eds.) *Apples, botany, production and uses*. CABI Publishers, Cambridge, MA, EUA, p.61 – 90
- Hausbeck, M. K. e Moorman, G. W. (1996). Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. *Plant Disease*, 80(11), 1212–1219.
- Henríquez, C., Speisky, H., Chiffelle, I., Valenzuela,T., Araya, M., Simpson, R. e Almonacid, S., (2010). Development of an ingredient containing apple peel, as a source of polyphenols and dietary. *Journal of Food Science*, Chicago, n. 6, v.75, p.H172 – H181.
- Heo, M. Y., Sohn, S. J. e Au, W. W. (2001). Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutation research*, 488(2), 135–150.
- Hossain, M.B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A.B. e Brunton N.P. (2010). Effect of drying method on the antioxidant capacity of six *Lamiaceae* herbs, *Food Chemistry*, 123, 85-91.

- INE (2021). Consumo humanos de frutos per capita. Consultado em https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=000163&&xlang=pt c a 29/10/2021.
- Isidorov V.A., Bakier S., Pirožnikow E., Zambrzycka M. e Swiecicka I. (2016). Selective Behaviour of Honeybees in Acquiring European Propolis Plant Precursors. *Journal of Chemical Ecology*, 42(6): 475–485.
- Ivanovska, N. D., Dimov, V. B., Pavlova, S., Bankova, V. S. e Popov, S. S. (1995). Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. *Journal of Ethnopharmacology*, 47(3), 135–143.
- Jabir, F. A. (2017). The local Propolis as protective and therapeutic modulator on some biochemical parameters in diabetic nephropathic rats. *AL-Qadisiyah Medical Journal*, 11(19), 137-146.
- Jamar L. (2011). Innovative strategies for the control of apple scab (*Venturia inaequalis* [Cke.] Wint.) in organic apple production. Tese de doutoramento em Ciências Agronómicas e Engenharia Biológica. Université De Liege - Gembloux Agro-Bio Tech.
- Jones, A.L. e Aldwinckle, H.S. (1990) - Compendium of apple and pear diseases. APS Press, Minnesota, 100 pp.
- Kaliora, A. C., e Dedoussis, G. V. Z. (2007). Natural antioxidant compounds in risk factors for CVD. *Pharmacological Research*.
- Katalinic, V., Radić, S., Ropac, D., Mulić, R. e Katalinić, A. (2004). Antioxidative activity of própolis from Dalmatia (Croatia). *Ata médica Croácia: casopis Hravatske akademije medicinskih znanosti*, 58(5), 373-376.
- Kramer, P. J., e Turner, N. C. (1980). Drought, stress, and the origin of adaptations. In *Adaptation of plants to water and high temperature stress* (pp. 7–20).
- Kedare, S. B., e Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidante assay. *Journal of Food Science and Technology*.
- Keitt G. W., Leben C. C. e Shay J. R. (1948). *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. IV. Further studies on the inheritance of pathogenicity. *American Journal of Botany*, 35: 334-336.

- Kern, M., Tjaden, Z., Ngiewih, Y., Puppel, N., Will, F., Dietrich, H. e Marko, D. (2005). Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49 (4), 317–328.
- Kozlovskii, A. G., Zhelifonova, V. P. e Antipova, T. V. (2013, January). Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R. e Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 235–240.
- Kumazawa S., Hamasaka T. e Nakayama T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3): 329–339.
- Kumazawa, S., Murase, M., Momose, N., e Fukumoto, S. (2014). Analysis of antioxidante prenylflavonoids in different parts of *Macaranga tanarius*, the plant origin of Okinawan propolis. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(1), 16-20.
- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M. e Świerczek-Zięba, G. (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, 19(1), 78-101.
- Lee, K., Kim, Y., Kim, D., Lee, H. e Lee, C. (2003). Major phenolics in Apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:6516–6520.
- Llácer, G., López, M.M., Trapero, A. e Bello, A. (1996) - *Patología Vegetal – Tomo II*. Sociedade Española de Fitopatologia, 1165 pp.
- Lopes M., Nunes L.F., Falcão S.I. e Vilas-Boas M. (2017). Harmonização de metodologias de análise da própolis. *Revista de Ciências Agrárias*, 40 (Especial): 208-215.
- Loebler M., Sánchez C., Santos M., Vasilenko P., Duarte P., Cruz A. e Gonçalves M. (2018). Aplicação de extratos de própolis para conservação pós-colheita de morangos. *Vida Rural*: 38-40.
- Lopes, J. R. (2018). Extrato etanólico de própolis no controle alternativo da pinta preta (*Alternaria solani*) e da septoriose (*Septoria lycopersici*) no tomateiro. Dissertação de mestrado, Campus Laranjeiras do Sul. Universidade federal da Fronteira Sul.

- Lu, Li-Chang, Chen, Yue-Wen e Chou, Cheng-Chun (2003). Antibacterial and DPPH free radicalscavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11(4), 277-282.
- Luchi, V.L. (2002). A Cultura da macieira: Botânica e Fisiologia. Florianópolis, 59-102.
- Lustosa, S. R., Galindo, A. B., Nunes, L. C. C., Randau, K. P. e Rolim Neto, P. J. (2008). Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3), 447-454.
- MacHardy W. E. e Gadoury D. M. (1989). A revision of Mills's criteria for predicting apple scab infection periods. *Phytopathology*, 79: 304-310.
- MacHardy W.E. e Galoury D.M. (1986). Patterns of ascospore discharge by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 76: 985-990.
- Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S. e Lima J.L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1): 1-19.
- Maia S.I.C. (2014). Avaliação da atividade antioxidante de extratos de própolis e determinação de componentes com relevância fisiológica. Dissertação de Mestrado em Análises Clínicas. Universidade de Lisboa.
- Majeed M., Bhat N.A., Badri Z.A., Yousuf V., Wani T.A., Hassan M., Saleem M., Dorjey S. e Paswal S. (2017). Non-Chemical Management of Apple Scab- A Global Perspective. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB)*, 2(2): 912-921.
- Manara, L. R. B., Anconi, S. I., Gromatzky, A., Conde, M. C. e Bretz, W. A. (1999). Utilização da própolis em odontologia. *Rev. Fac. Odontol. Bauru*, 7 (3/4), 15-20.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2002). Manejo pós colheita e rastreabilidade na produção integrada de maçãs. Consultado em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir031.pdf> a 24-04-2022.
- Manrique, A. J. e Santana, W. C. (2008). Flavonoides, atividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 26 (2).

- Marcucci M.C. (1996). Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, 19: 529-536.
- Mari, M. e Guizzardi, M. (1998). The postharvest phase: Emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica*. Kluwer Academic Publishers.
- Markham, K. R., Mitchell, K. A., Wilkins, A. L., Daldy, J. A. e Lu, Y. (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*, 42(1), 205–211.
- Marquenie, D., Schenk, A., Nicolai, B., Michiels, C., Soontjens, C. e Van Impe, J. (2002). Use of UV-c and heat treatment to reduce storage rot of strawberry. Em *Acta Horticulturae* (Vol. 567, pp. 779–782). International Society for Horticultural Science.
- Marques, R. A. C. (2015), Contributos para a elucidação do modo de ação de própolis português: o caso do própolis do Pereiro. Dissertação de Mestrado em Genética Molecular. Universidade do Minho.
- Martinotti, S. e Ranzato, E. (2015, December 1). Propolis: A new frontier for wound healing? *Burns and Trauma*. Oxford University Press.
- Mazzuco, H. (1994). Utilização da própolis e álcool etílico no controle de *Salmonella* em rações avícolas. Master's Dissertation, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba.
- Matny O.N., AL-Warshan S.H.S. e Ali A.M. (2015). Antifungal Evaluation of Iraqi Propolis against *Penicillium expansum* and Mycotoxin Production in Apple. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(11): 399-405.
- McCann, M. J., Gill, C. I. R., O' Brien, G., Rao, J. R., McRoberts, W. C., Hughes, P. e Rowland, I. R. (2007). Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1224–1230.
- McLennan, S. V., Bonner, J., Milne, S., Lo, L., Charlton, A., Kurup, S. e Twigg, S. M. (2008). The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), 706–713.
- Menezes, H. (2005). Própolis: Uma revisão dos recentes estudos das suas propriedades farmacológicas. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 72(3), 405–411.

- Miguel M.G., Nunes S., Dandlen S.A., Cavaco A.M. e Antunes M.D. (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12): 3418–3423.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., e Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science (London, England: 1979)*, 84(4), 407–412.
- Molnár, S., Mikuska, K., Patonay, K., Sisa, K., Daood, H. G., Némedi, E. e Kiss, A. (2017). Comparative studies on polyphenolic profile and antimicrobial activity of propolis samples selected from distinctive geographical areas of Hungary. *Food Science and Technology International*, 23(4), 349-357.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
- Monti, M., Berti, E., Carminati, G. e Cusini, M. (1983). Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact dermatitis*, 9(2), 163.
- Moore D., Robson G.D. e Trinci A.P.J. (2019). Fungal diseases and loss of world agricultural production. *21st Century Guidebook to Fungi*, 2ª edição. Capítulo 14. Consultado em [http://www.davidmoore.org.uk/21st Century Guidebook to Fungi PLATINUM/Ch1401.htm](http://www.davidmoore.org.uk/21st_Century_Guidebook_to_Fungi_PLATINUM/Ch1401.htm) a 12/02/2022.
- Moorman, G. W. (1992). Residual Efficacy of Fungicides Used in the Management of *Botrytis cinerea* on Greenhouse-Grown Geraniums. *Plant Disease*, 76(4), 374.
- Moreira L., Dias L.G., Pereira J.A. e Estevinho L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 46(11): 3482–3485.
- Moreira, A. B. S. (2017). Desenvolvimento de uma linha de cosmética à base de própolis português. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas. Universidade do Minho.
- Moura G.S., Jaski J.M. e Franzener G. (2016). Potencial de extratos etanólicos de propólis e extratos aquosos de plantas espontâneas no controle de doenças pós-colheita do morango. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 11(5): 57-63.

- Muñoz, A., López-García, B., e Marcos, J. F. (2007). Comparative study of antimicrobial peptides to control citrus postharvest decay caused by *Penicillium digitatum*. Journal of agricultural and food chemistry, 55(20), 8170–8176.
- Nanaware, Sadhana, Shelar, Madhuri, Sinnathambi, Arulmozhi, Mahadik, K. R. e Lohidasan, Sathiyarayanan (2017). Neuroprotective effect of Indian propolis in -amyloid induced memory deficit: Impact on behavioral and biochemical parameters in rats. Biomedicine e Pharmacotherapy, 93, 543-553.
- Neto (2011). Efeito de ácidos fenólicos e sais inorgânicos no controle do bolor azul (*Penicillium expansum*) e mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em frutos de maçã. Monografia, Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Northover, J. (1986). Resistance of *Botrytis cinerea* to Benomyl and Iprodione in Vineyards and Greenhouses After Exposure to the Fungicides Alone or Mixed with Captan. Plant Disease, 70(5), 398.
- Nigro F., Ippolito A., Lattanzio V., Di Venere D. e Salerno M. (2000) Effect of ultravioleta-C light on postharvest decay of strawberry. Journal of Plant Pathology, Bologna, 82:29-37.
- Oliveira, A. C. P., Shinobu, C. S., Longhini, R., Franco, S. L. e Svidzinski, T. I. E. (2006). Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 101(5), 493–497.
- OMS (World Health Organization) (2021). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2021. World Health Organization. (p. 180).
- Osório, G. T.; Oliveira, B. S.; Piero, R. M. (2013). Efeito de agentes fumigantes sobre o bolor azul e o mofo cinzento em frutos de maçã. Tropical Plant Pathology, v. 38, n. 1, p. 63-67.
- Packer, J. F. e Da Luz, M. M. S. (2007). Evaluation and research method for natural products inhibitory activity. Revista Brasileira de Farmacognosia, 17(1), 102–107.
- Palou, L. (2014). *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). In: Postharvest Decay: Control Strategies (pp. 45–102). Elsevier Inc.
- Park, E. H., Kim, S. H. e Park, S. S. (1996). Anti-inflammatory activity of propolis. Archives of Pharmacal Research, 19 (5), 337–341.

- Park, Y. K. e Ikegaki, M. (1998). Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(11), 2230–2232.
- Park, Y. K., Ikegaki, M., Abreu, J. S. e Alcici, N. F. (1998). Estudo da preparação dos extratos de própolis e as suas aplicações *Food Science and Technology*, v. 18, n. 3.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., Moura, F. F. e Ikegaki, M. (1999). Atividade biológica do própolis. *Revista OESP – Alimentação*, v. 27.
- Park, Y. K., Alencar, M. S., Scamparini, A. R. P. e Aguiar, C. L. (2002). Propolis produced in south Brazil, Argentine and Uruguay: phytochemical evidence for the plant origin. *Red de Revistas Científicas de América Latina*, 32, 997–1003.
- Park, Y. K., Paredes-Guzman, J. F., Aguiar, C. L., Alencar, S. M. e Fujiwara, F. Y. (2004). Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(5), 1100–1103.
- Peixoto, M., Freitas, A. S., Cunha, A., Oliveira, R. e Almeida-Aguiar, C. (2021). Antioxidant and antimicrobial activity of blends of propolis samples collected in different years. *LWT Food Science and Technology*, 145(2021), 111311.
- Peixoto, M., Freitas, A. S., Cunha, A., Oliveira, R. e Almeida-Aguiar, C. (2022). Mixing propolis from different apiaries and harvesting years: towards propolis standardization? *Antibiotics*, 11(9), 1181.
- Pereira, A. S., Seixas, F. R. M. S. e Neto, F. R. A. (2002). Própolis; 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. *Quim. Nova*, v.25, n.2, p.321-326.
- Pereira C. S., Guimarães, R. J., Pozza E. A. e Silva, A. A. (2008). Controle da cercosporiose e da ferrugem do cafeeiro com extrato etanólico de própolis. *Revista Ceres, Viçosa*, v. 55, n. 5, p. 369-376.
- Pereira C.S., Maia L.F.P. e de Paula F.S. (2014). Aplicação de extrato etanólico de própolis no crescimento e produtividade do feijoeiro comum. *Revista Ceres*, 61(1): 98-104.
- Pereira, L. T. (2021). Própolis português como agente de biocontrole de doenças da maçã. Dissertação de mestrado, Escola de Ciências da Universidade do Minho. Repositório da Universidade do Minho.

- Perez-Illarbe, J., Hernandez, T. e Estrella, I. (1991). Phenolic Compounds in Apples: varietal differences. *Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung*, n. 6, p. 551-554.
- Petri, J.L. (2006). A cultura da macieira: Formação de flores, polinização e fertilização. Florianópolis, 229-260.
- Plaza, P., Usall, J., Teixidó, N. e Viñas, I. (2003). Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(4), 549–554.
- Popova, Milena, Dimitrova, Rosa, Al-Lawati, Hassan Talib, Tsvetkova, Iva, Najdenski, Hristo e Bankova, Vassya (2013). Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 158-166.
- Prasad R. (1998). Fertilizer urea, food security, health and the environment. *Current Science*, 75(7): 677-683.
- Przybyłek, I. e Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(11), 2047.
- Ramos, A. F. N. e Miranda, J. L. (2007). Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 13(4), 697710.
- Rao CV., Desai D., Kaul B., Amin S. e Reddy BS. (1992). Effect of caffeic acid esters on carcinogeninduced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chemico Biological Interactions*, 84: 277-290.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K. e Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. e Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Rempel, D. L. (2016). Doses de extrato etanólico de própolis no controlo de doenças da cultura de soja. Dissertação de mestrado, Instituto de ciências agrárias e ambientais. Universidade federal de Mato Grosso- Campus de Sinop.

- Ribas, P. P. e Matsumura, A. T. S. (2013). A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. *Revista Liberato*, 10 (14), 149–158.
- Roginsky, V., e Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235–254.
- Rossi V., Ponti I., Marinelli M., Giosuè S. e Bugiani R. (2000). A new model estimating the seasonal pattern of air-borne ascospores of *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. In relation to weather conditions. *Journal of Plant Pathology*, 82: 111-118.
- Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A. e Garbarino, J. A. (2004). Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life sciences*, 76(5), 545–558.
- Salgueiro, Fernanda B. e Castro, Rosane N. (2016). Comparison between chemical composition and antioxidant activity of different extracts of green propolis. *Quimica Nova*, 39(10), 1192.
- Samadi, Nazli, Mozaffari-Khosravi, Hassan, Rahmanian, Masoud e Askarishahi, Mohsen (2017). Effects of bee propolis supplementation on glycemic control, lipid profile and insulin resistance indices in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind clinical trial. *Journal of Integrative Medicine*, 15(2), 124-134.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., e Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270–276.
- Sánchez C., Duarte P., Vasilenko P., Santos M., Loebler M., Cruz A.S. e Gonçalves M. (2016). Potential application of Portuguese propolis to control blue mould disease in ‘Rocha’ pear. *Acta Horticulture*, 1144: 359-364.
- Santana, A.I.E. (2012). Aplicação de revestimentos comestíveis à base de quitina desacetilada de subprodutos da indústria de pescado em maçã Fuji de IV gama”. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche do Instituto Politécnico de Leiria.
- Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., Moreira, E. S. A. E Braga, F. C. (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*.

- Santos, C. R., Arcenio, F., Carvalho, E. S., Lúcio, E. M. R. A., Araújo, G. L., Teixeira, L. A. E Rocha, L. (2003). Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, 71-74.
- Sanzani, S. M., De Girolamo, A., Schena, L., Solfrizzo, M., Ippolito, A. e Visconti, A. (2009). Control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone. *European Food Research and Technology*, 228(3), 381–389.
- Sawicka, D., Car, H., Borawska, M. H. e Nikliński, J. (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia histochemica et cytobiologica*, 50(1), 25–37.
- Šeruga, M., Novak, I. e Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidante activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124(3), 1208–1216.
- Sforcin, J.M., Fernandes, A., Lopes, C. A., Bankova, V. e Funari, S. R. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1–2), 243–249.
- Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1–14.
- Silva, R. L. M., Dalmolin, R. F., Mariani, L., Martins, L. P., Junior, M. e Costa, N. (1980). Extrato etanólico de própolis no controlo de ferrugem polissora (*Puccinia polissora Underw.*) na cultura de milho (*Zea mays L.*).
- Silva, L. F. (2008) Fungos: um estudo sobre a sua ocorrência nos alimentos. 2008. 30 f. Monografia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.
- Silva, J. C., Rodrigues, S., Feás, X. e Estevinho, L. M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1790-1795.
- Silva, J. B., Paiva, K. A. R., Costa, K. M. F. M., Viana, G. A., Araújo, H. N., Bezerra, L. S. e Batista, J. S. (2019). Hepatoprotective and antineoplastic potencial of red própolis produced by the bees *Apis mellifera* in the semiarid of Rio Grande do Norte, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 39(9), 744–756.

- Silva-Carvalho, R., Miranda-Gonçalves, V., Ferreira, A. M., Cardoso, S. M., Sobral, A. J., Almeida Aguiar, C. e Baltazar, F. (2014). Antitumoural and antiangiogenic activity of portuguese propolis in vitro and in vivo models. *Journal of Functional Foods*, 11, 160-171.
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F. e Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Sharma, O. P. e Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202–1205.
- Sheng, J., Zhou, J., Wang, L., Xu, J. e Hu, Q. (2007). Antioxidant activity of ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian propolis. *European Food Research and Technology*, 225(2), 249–253.
- Spanos, G. A. e Wrolstad, R. E. (1990). Influence of Variety, Maturity, Processing, and Storage on the Phenolic Composition of Pear Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 817–824.
- Soares, D., Barreto, R. e Braun, U. (2009). Brazilian mycobiota of the aquatic weed *Sagittaria montevidensis*. *Mycologia* 101:401-416.
- Song, Y., Manson, J. A. E., Buring, J. E., Sesso, H. D. e Liu, S. (2005). Associations of Dietary Flavonoids with Risk of Type 2 Diabetes, and Markers of Insulin Resistance and Systemic Inflammation in Women: A Prospective Study and Cross-Sectional Analysis. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(5), 376–384.
- Sosa-Alvarez, M., Madden, L. e Ellis, M. (1995). Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. *Plant Disease* 79:609-615.
- Statista (2021a). Fresh fruit production worldwide 1990-2018. Consultado em <https://www.statista.com/statistics/262266/global-production-of-fresh-fruit/> a 29-10-2021.
- Statista (2020b). Population - statistics and facts. Consultado em https://www.statista.com/topics/776/population/#dossierSummary__chapter1 a 29-10-2021.

- Toledo, M. T. T. de, Abreu, M. N. e Lopes, A. C. S. (2013). Adesão a modos saudáveis de vida mediante aconselhamento por profissionais de saúde. *Revista de Saúde Pública*, 47(3), 540–548.
- Valença I, Morais-Santos, F, Miranda-Gonçalves, V., Ferreira, A. M., Almeida-Aguiar, C. e Baltazar, F. (2013). Portuguese propolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 184.
- Valente, M. J., Baltazar, A. F., Henrique, R., Estevinho, L. e Carvalho, M. (2011). Biological activities of portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 86–92.
- Van Ketel, W. G. e Bruynzeel, D. P. (1992). Occupational dermatitis in an accordion repairer. *Contact dermatitis*, 27(3), 186.
- Vidal, R., Hernandez-Vallejo, S., Pauquai, T., Texier, O., Rousset, M., Chambaz, J. e Lacorte, J. M. (2005). Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and lipoprotein secretion in Caco-2/TC7 enterocytes. *Journal of Lipid Research*, 46(2), 258–268.
- Vieira F.J.P. (2009). Resistência de *Venturia inaequalis* a estrobilurinas na Cova da Beira. Tese de Mestrado em Fruticultura Integrada. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico De Castelo Branco.
- Wang, H., Cao, G. e Prior, R. L. (1996); Total Antioxidant Capacity of Foods; *Journal Agricultural Food Chemistry*; n° 24; pg. 61- 65.
- Wang X., Sankarapandian K., Cheng Y., Woo S.O., Kwon H.W., Perumalsamy H. e Ahn Y.J. (2016). Relationship between total phenolic contents and biological properties of própolis from 20different regions in South Korea. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 16(1): 112.
- Watanabe, M. A., Amarante, M. K., Conti, B. J. e Sforcin, J. M. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 63(11), 1378–1386.

- Weng, M. S., Ho, Y. S. e Lin, J. K. (2005). Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: Involvement of p38 mitogen activated protein kinase. *Biochemical Pharmacology*, 69(12), 1815–1827.
- Wyatt, M. K. e Parish, M. E. (1995). Spore germination of citrus juice-related fungi at low temperatures. *Food Microbiology*, 12(C), 237–243.
- Woisky R.G. e Salatino A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2): 99-105.
- Wolfe, K., Wu, X. e Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 609–614.
- Zardo, D.M. (2007). Avaliação do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em maçãs e seus produtos. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*. Universidade Estadual da Ponta Grossa.

CAPÍTULO VI. ANEXOS

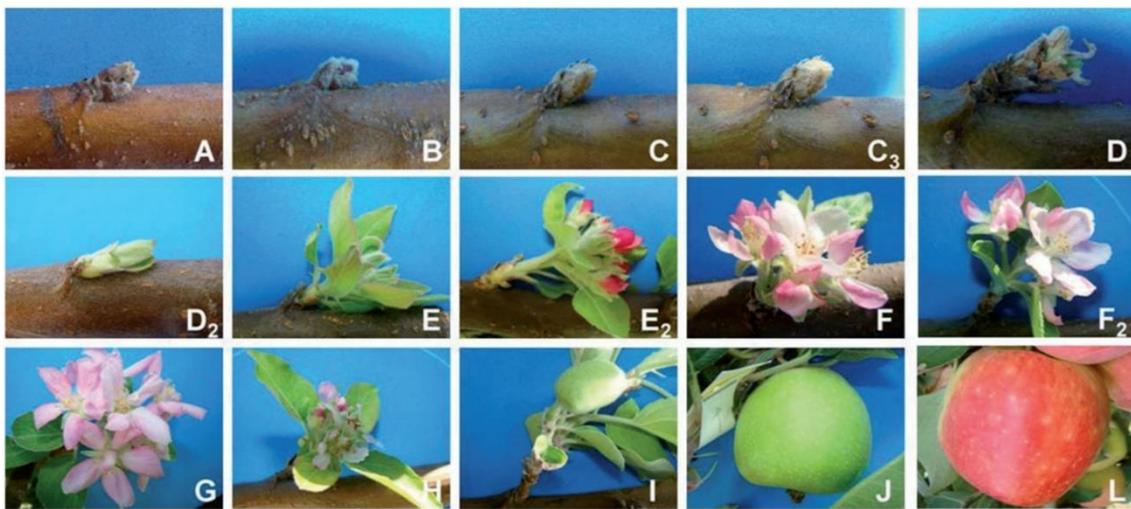
Anexo 1

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

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

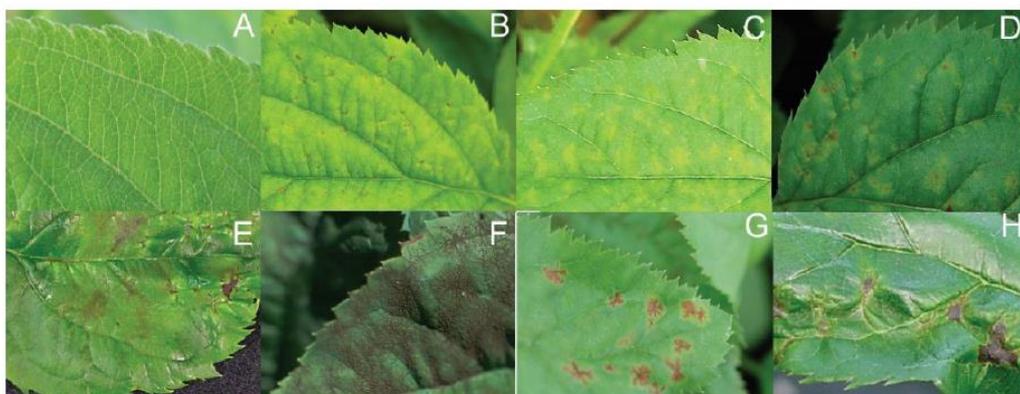
Anexo 2

Estados fenológicos em macieiras.



Anexo 3

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



Anexo 4

Tabela 7. Composição nutricional da maçã (adaptado de Ferretti *et al.*, 2014).

| Constituinte | Concentração (por 100 g de fruta fresca) |
|-------------------------|---|
| Potássio (mg) | 144,00 |
| Água (g) | 85,30 |
| Hidratos de Carbono (g) | 12,90 |
| Frutose | 6,75 |
| Glicose | 3,38 |
| Sacarose | 2,40 |
| Vitamina C (mg) | 12,00 |
| Fósforo (mg) | 12,00 |
| Folato (mg) | 9,00 |
| Cálcio (mg) | 7,00 |
| Magnésio (mg) | 6,00 |
| Fibras (g) | 2,70 |
| Gordura (g) | 0,60 |
| Ácidos orgânicos (g) | 0,50 |
| Pectina (g) | 0,50 |
| Proteína (g) | 0,30 |
| Vitamina B6 (mg) | 0,05 |
| Riboflavina (mg) | 0,05 |
| Tiamina (mg) | 0,01 |