

Aplicação de extratos de própolis para conservação pós-colheita de morangos

Nos últimos anos, o estudo de compostos naturais bioativos para utilização em conservação pós-colheita de frutas tem despertado um grande interesse na comunidade científica. O morango é um fruto altamente perecível, delicado, e apresenta um curto período de conservação. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de extratos de própolis na qualidade e na conservação pós-colheita do morango.

Marcella Loebler (INIAV, I.P. e DCTB/METRÍCs, FCT/UNL); Claudia Sánchez, Mário Santos, Paula Vasilenko (INIAV, I.P.); Paula Duarte, Ana Cruz, Margarida Gonçalves (DCTB/METRÍCs, FCT/UNL)



As doenças de pós-colheita reduzem drasticamente a qualidade dos frutos, o que causa um aumento de custos e a redução das margens na cadeia de produção, armazenamento e distribuição. Tradicionalmente, o controlo dos problemas microbiológicos e fisiológicos dos frutos durante o período de pós-colheita é realizado através da aplicação de fungicidas, refrigeração e utilização de atmosferas controladas. No entanto, a crescente restrição ao uso de fungicidas sintéticos, devido aos riscos que representam para a saúde e para o ambiente, assim como a crescente preocupação dos consumidores em relação à segurança dos alimentos que consomem, tem estimulado o estudo de métodos alternativos aos químicos para o controlo de doenças de pós-colheita e para a conservação da qualidade nutricional e organolética dos produtos hortofrutícolas. Neste âmbito, têm-se estudado diversas estratégias, tais como a utilização de agentes antagonistas, a aplicação de tratamentos físicos, tratamentos térmicos, ultrassons, sais orgânicos ou inorgânicos e utilização de substâncias naturais com propriedades antimicrobianas. Entre os produtos naturais que têm vindo a ser estudados encontram-se extratos de plantas aromáticas e medicinais, quitosano, óleos essenciais, podendo, igualmente, destacar-se a utilização de extratos de própolis. O própolis é

uma substância resinosa produzida pelas abelhas *Apis mellifera* a partir de diferentes exsudatos de plantas, como secreções de árvores, folhas e flores, misturados com as enzimas da sua saliva. Esta resina é utilizada pelas abelhas para proteção da colmeia contra a proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias (Bankova *et al.*, 2014). O própolis é popularmente e cientificamente reconhecido devido às suas propriedades biológicas, que incluem ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (Kumazawa *et al.*, 2004; Sforcin, 2016). O própolis apresenta um amplo espectro de atividade antimicrobiana, que inclui atividade contra diversas espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, incluindo fungos fitopatogénicos, como o *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* e *Penicillium expansum* (Meneses *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2016). A composição do própolis é variável, dependendo da flora da região onde é produzido. Da mesma forma, as propriedades biológicas do própolis, em particular a sua atividade antifúngica, também podem variar com a origem do mesmo, uma vez que estão diretamente relacionadas com os compostos bioativos presentes na sua composição.

Entre os pequenos frutos, os morangos (*Fragaria × ananassa* Duch.) diferenciam-se por serem os mais atraentes e com maior procura nos mercados internacionais. Em Portugal, o morango destaca-se por ser o pequeno fruto mais cultivado e comercializado, sendo altamente apreciado, não só pelo seu sabor e aroma, mas também pela sua riqueza nutricional, baixo teor de lipídios (0,5%), baixas calorias (aproximadamente 35 kcal/100 g) e preço bastante acessível (Sousa *et al.*, 2014). Estes frutos são também uma excelente fonte de vitamina C e muito ricos em compostos fenólicos, incluindo flavonoides e ácidos fenólicos. No entanto, um dos principais problemas associados à produção e comercialização de morango é o facto de ser um fruto altamente perecível e com um período de conservação pós-colheita muito reduzido. O morango é um fruto não climatérico e, devido às suas condições fisiológicas, tem uma elevada tendência à perda de humidade. A sua epiderme túrgida e a elevada taxa de respiração tornam este fruto suscetível a danos mecânicos e à invasão de microrganismos patogénicos, especialmente fungos, tais como o *Botrytis cinerea*, responsável pela podridão cinzenta, o *Colletotrichum spp.*, que provoca a antracnose e o *Rhizopus stolonifer*, que origina a podridão aquosa.



Figura 1 – Rede com própolis (esquerda) e aspeto do própolis após extração da rede (direita)

Valorização do própolis como agente antimicrobiano

Tendo presente o potencial antimicrobiano do própolis e o facto de tratar-se de um produto natural, no âmbito do projeto PRODER “Pro-Fruta: Valorização do subproduto própolis como agente natural para o controlo de doenças em pós-colheita”, avaliou-se a potencialidade do mesmo para ser utilizado como tratamento pós-colheita de morangos. Esta utilização poderia resultar altamente vantajosa, permitindo, não só reduzir a presença de resíduos de pesticidas nos produtos alimentares, como também diminuir os resíduos destes compostos que são dispersos no ar, solo e água. Para além deste ponto, a aplicação de tratamentos com própolis teria ainda a vantagem de poder permitir a produção de fruta naturalmente enriquecida com componentes antioxidantes, representando um benefício nutricional para os consumidores.

No início do estudo foram colhidas amostras de própolis de diferentes regiões de Portugal (Figura 1). A partir destas amostras, foram preparados extratos alcoólicos por extração mediante maceração com álcool etílico 70%. Seguidamente, os extratos de própolis foram caracterizados segundo o teor em compostos fenólicos (método de Folin-Ciocalteu) e a atividade antioxidante (métodos de DPPH e FRAP). Entre os diferentes extratos analisados, selecionou-se para o estudo um que apresentou atividade antioxidante significativa de acordo com o teste DPPH ($18\,024,5 \pm 176,7$ mg/L equivalente de Trolox) e elevado poder antioxidante de redução férrea ($264,9 \pm 4,1$ mmol equivalente de FeSO_4/L de extrato, segundo o método FRAP). O extrato apresentou também um elevado teor de compostos fenólicos ($17\,248,1 \pm 219,3$ mg equivalente de ácido gálico/L), o que o identifica como um potencial agente de biocontrolo, já que numerosos estudos científicos associam a relevante atividade antimicrobiana dos extratos de origem vegetal ao seu elevado teor de polifenóis.

Atividade antifúngica *in vitro* dos extratos

Os fungos fitopatogénicos *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* spp. destacam-se devido à sua elevada incidência no período de pós-colheita do morango. Estes fungos são responsáveis pela podridão dos frutos e estão diretamente associados com o dano físico dos mesmos. Assim, com o objetivo de avaliar o efeito antifúngico dos extratos de própolis contra estes agentes patogénicos, foram realizados testes

in vitro de inibição, em placas de Petri com meio PDA e diferentes concentrações do extrato. Os resultados obtidos mostraram que todas as concentrações de própolis estudadas inibiram o crescimento de *B. cinerea* e *Colletotrichum* (Figura 2).

Nas concentrações máximas testadas, o extrato de própolis inibiu cerca de 80% o crescimento de ambos os fungos, ao final de 10 dias de incubação a 20 °C. Observou-se uma relação direta entre a concentração do extrato de própolis e a eficácia da inibição, ou seja, quanto maior a concentração do extrato, menor o diâmetro do micélio do fungo (Figura 3).

Atividade antifúngica *in vivo* dos extratos

Tendo em conta a elevada percentagem de inibição obtida nos testes *in vitro*, procedeu-se à avaliação da eficácia antifúngica *in vivo* do extrato de própolis. Para este estudo foi utilizado o extrato alcoólico original (A), e um extrato aquoso obtido por evaporação de (A) e dissolução em solução aquosa (B). Os tratamentos com os extratos foram aplicados imediatamente após colheita, mediante pulverização, tendo os frutos sido posteriormente mantidos durante 12 dias em câmaras a 2 °C

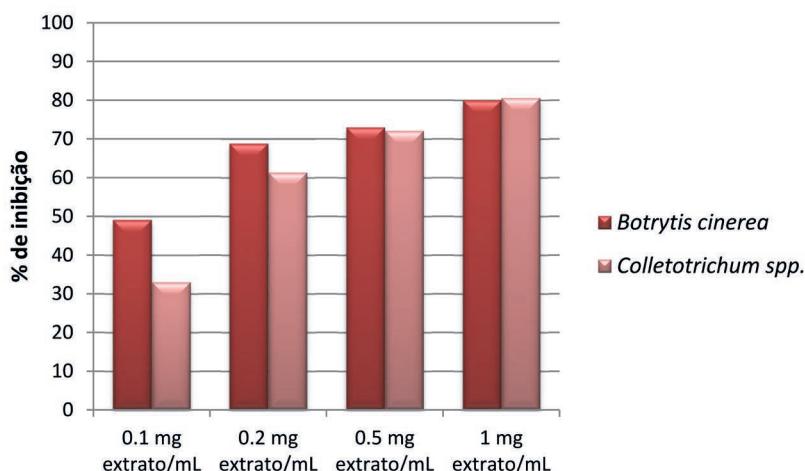


Figura 2 – Percentagem de inibição do crescimento dos fungos *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* spp. na presença de diferentes concentrações de extrato de própolis

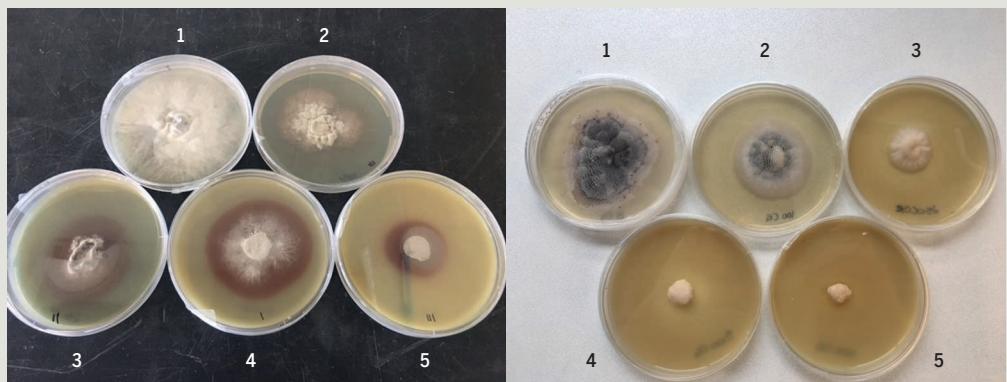


Figura 3 – Aspetto do micélio após 10 dias de incubação a 20 °C. Ensaio de inibição *in vitro* de *Botrytis cinerea* (esquerda) e *Colletotrichum* spp. (direita) com diferentes concentrações de extrato de própolis: 1) controlo; 2) 0,2 mg de extrato/mL; 3) 0,5 mg de extrato/mL; 4) 1 mg de extrato/mL; 5) 2 mg de extrato/mL



Figura 4 – Aspetto externo do controlo e dos frutos tratados com o extrato de própolis, após 12 dias de conservação no frio



Figura 5 – Sinais de toxicidade observados nos frutos tratados com o extrato etanólico de própolis

e 90% HR. Durante o período de conservação foram avaliados diferentes parâmetros indicadores de qualidade, assim como a incidência de podridões.

Em geral, os frutos tratados com extratos de própolis mantiveram a sua qualidade físico-química durante um período de tempo mais prolongado que o controlo (sem tratamento). Não foram observadas diferenças significativas na cor, teor de sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}$) ou acidez total dos morangos tratados, o que indica que o própolis não afeta negativamente as características dos frutos. No entanto, verificou-se que os morangos tratados com os extratos apresentaram uma menor perda de humidade que o controlo. Observou-se uma diferença de cerca de 22% entre os frutos tratados com o extrato A e o controlo. A incidência de podridões, nomeadamente a podridão cinzenta causada por *Botrytis*

cinerea, foi também consideravelmente inferior nos morangos tratados com própolis (Figura 4). Contudo, o tratamento com extrato alcoólico mostrou um certo efeito de citotoxicidade, que se manifestou com o aparecimento de manchas escuras na epiderme dos frutos (Figura 5), muito provavelmente devido ao efeito do etanol nos tecidos do fruto. Este efeito verificou-se também na polpa dos frutos, que apresentou uma cor acastanhada e textura mole (Figura 5). No entanto, os morangos tratados com extratos aquosos apresentaram uma cor vermelha característica e textura firme.

Finalmente, determinou-se o teor de compostos fenólicos, bem como a atividade antioxidante dos frutos (Tabela 1), no tempo 0 (imediatamente após a aplicação) e no fim do armazenamento. Os morangos tratados com extrato de própolis apresentaram um teor em

compostos fenólicos superior ao controlo no tempo e no final do período de armazenamento. Os frutos tratados com este extrato também apresentaram uma atividade antioxidante consideravelmente superior. Este resultado sugere que a aplicação do extrato de própolis possa contribuir beneficamente para o teor de compostos antioxidantes nos frutos.

Conclusão

Os resultados preliminares demonstraram que o extrato de própolis tem um elevado potencial antifúngico *in vitro* contra *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* spp. Quando aplicado como tratamento pós-colheita em morangos, permitiu manter durante mais tempo a qualidade dos frutos e diminuiu as perdas de água, e consequentemente a perda de peso e turgência. A utilização do própolis tem ainda a vantagem de poder permitir a produção de fruta valorizada com componentes antioxidantes, acrescentando importantes benefícios nutricionais para os consumidores, ao mesmo tempo que poderia ser uma forma de valorizar um produto apícola que é pouco valorizado pela maioria dos apicultores, podendo, assim, contribuir para a dinamização deste setor. ☺

Agradecimentos

Trabalho realizado no âmbito do Projeto “ProFruta: Valorização do subproduto própolis como agente natural para o controlo de doenças em pós-colheita” (PA54101, PA54102 e PA54103), financiado pelo Estado Português através da Medida 4.1 Cooperação para Inovação do programa PRODER. Parceiros: BeeCaramulo Lda., INIAV, FCT/UNL e COTHN.

Bibliografia

- Bankova, V. et al., 2014. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*, 8:28.

Kumazawa, S. et al., 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84:329-339.

Meneses, E.A. et al., 2009. Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from Colombian propolis. *Química Nova*, 32:2011-2017.

Sánchez, C. et al., 2016. Potential application of Portuguese propolis to control blue mould disease in 'Rocha' pear. *Acta Horticulturae* 1144:359-364.

Sforcin, J.M., 2016. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research*, 30 (6):894-905.

Sousa, M.B. et al., 2014. Influência do azoto na qualidade agronómica e na capacidade antioxidante de frutos de morango. "VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas: Innovar y Producir para el Futuro" (F.G.UPM, ed.), pp.1087-1092, Madrid.

Yang, S. et al., 2010. Control of citrus green and blue molds by Chinese propolis. *Food Science and Technology*, 19:1303-1308.

TABELA 1 – TEOR EM COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS MORANGOS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, IMEDIATAMENTE APÓS A APLICAÇÃO DO EXTRATO (T₀) E NO FINAL DO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO (T_f)

Amostra	Compostos fenólicos ($\mu\text{g EAG/g}$)	Atividade antioxidante ($\mu\text{g EAA/g}$)
Controlo (T0)	$21,655 \pm 0,021$	$149,020 \pm 0,078$
Controlo (Tf)	$22,399 \pm 0,069$	$141,565 \pm 6,744$
Extrato de própolis (Tf)	$29,725 \pm 0,281$	$163,711 \pm 3,333$

EAG: equivalentes de ácido gálico; EAA: equivalentes de ácido ascórbico