



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

DIANA BALDIN

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS NA PROTEÇÃO DE FEIJOEIRO AO
CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM**

LARANJEIRAS DO SUL

2014

DIANA BALDIN

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS NA PROTEÇÃO DE FEIJOEIRO AO
CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientador: Profº Dr. Gilmar Franzener

LARANJEIRAS DO SUL

2014

DGI/DGCI - Divisão de Gestão de Conhecimento e Inovação

Baldin, Diana

Extrato etanólico de própolis na proteção de feijoeiro ao cretamento bacteriano comum/ Diana Baldin.
-- 2014.
43 f.

Orientador: Gilmar Franzener.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Agronomia , Laranjeiras do Sul, PR, 2014.

1. Fitopatologia. 2. Agroecologia. 3. Controle
alternativo de doenças. I. Franzener, Gilmar, orient.
II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

DIANA BALDIN

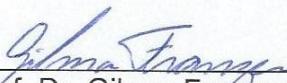
**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS NA PROTEÇÃO DE FEIJOEIRO AO
CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia com Ênfase em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Laranjeiras do Sul (PR)

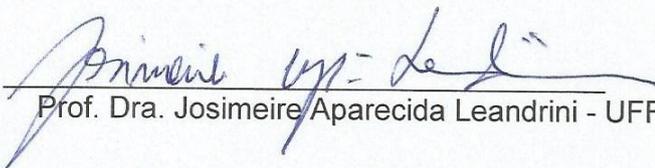
Orientador: Prof. Dr. Gilmar Franzener

Aprovado em: 12/12/2014

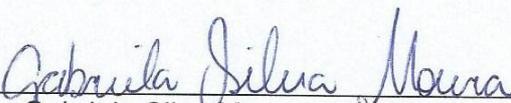
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Gilmar Franzener – UFFS



Prof. Dra. Josimeire Aparecida Leandrini - UFFS



Prof. Dra. Gabriela Silva Moura – UFFS

RESUMO

A própolis é uma resina produzida pelas abelhas com função de proteger a colmeia. A atividade antimicrobiana da substância já foi comprovada, principalmente na saúde humana. Contudo, existem poucos estudos referentes à ação da própolis na proteção de plantas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo verificar o potencial de extratos etanólicos de própolis oriundos de diferentes regiões paranaenses no controle do crestamento bacteriano comum, doença causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, assim como na indução de fitoalexina em feijoeiro. O experimento foi conduzido em laboratório e casa de vegetação, utilizando a variedade IPR-Colibri. O extrato etanólico de própolis (EEP) foi avaliado nas concentrações: 0,1; 0,5; 1; 2,5 e 5%, sendo obtidos da região de Laranjeiras do Sul, Maringá e Marechal Cândido Rondon. Foram realizados ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* sobre a bactéria e indução da fitoalexina faseolina e o efeito local e sistêmico sobre a severidade da doença em plantas de feijoeiro. Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, além da análise de regressão. Os resultados dos ensaios *in vitro* foram semelhantes para as três regiões, e se apresentaram de forma linear com redução no crescimento da *X. axonopodis* pv. *phaseoli* de até 97% em relação as testemunhas. Na indução de faseolina, as concentrações de 5% de EEPs não autoclavados apresentaram o maior acúmulo nas três regiões, com 45,67, 38,9 e 48,7% a mais que a testemunha água destilada, de Laranjeiras do Sul, Maringá e Marechal Cândido Rondon, respectivamente. Os extratos autoclavados não apresentaram diferença significativa ao mesmo tempo que reduziram drasticamente em relação aos não autoclavados. Os resultados obtidos no experimento *in vivo* mostraram que não há interação entre os fatores. Os trifólios tratados apresentaram menor área lesionada nas concentrações 1 e 2,5% de EEP, enquanto os trifólios não tratados apresentaram menor área com a doença nas concentrações 0,5 e 1% do extrato. Estes resultados indicam o potencial do EEP de diferentes regiões do Paraná como antimicrobiano direto sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, bem como indutor de faseolina em hipocótilos de feijoeiro. Em relação às plantas, os EEP reduziram a severidade da doença seja por atividade antimicrobiana ou por indução de resistência, indicando potencial no controle da doença.

Palavras-chave: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Fitoalexinas. Mecanismos de defesa. Controle alternativo.

ABSTRACT

Propolis is a resin produced by bees in the hive protecting function. The antimicrobial activity of the substance has already been proven, especially on human health. However, there are few studies concerning the action of propolis on plant pathogens. Thus, this study aimed to investigate the potential of propolis ethanolic extracts (PEE) originating from Paraná regions in the control of bacterial blight, a disease caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, as well as the resistance induction in bean. The experiment was conducted in laboratory and greenhouse, using the variety IPR-Colibri. The PEE was evaluated at concentrations of 0.1; 0.5; 1; 2.5 and 5%, taking place of the Laranjeiras do Sul, Maringá and Marechal Cândido Rondon region. Antimicrobial activity assays were performed *in vitro* on bacteria and induction of phytoalexins, and in the local and systemic effect on disease severity in bean plants. The tests were conducted in a completely randomized design with four replications and subjected to analysis of variance and means compared by the Scott-Knott test at 5% probability, in addition to regression analysis. The results of *in vitro* assays were similar for the three regions, and presented in a linear equation. The test with the bacteria showed that the PEE 5% of Laranjeiras do Sul trees reduced the growth of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 97% over the control. In phaseolin induction, the concentrations of 5% of PEE autoclaved showed the highest accumulation in the three regions, with 45.67, 38.9 and 48.7% more than the distilled water, for Laranjeiras do Sul, Maringá and Marechal Cândido Rondon, respectively. The autoclaved extracts showed no significant difference while drastically reduced compared to non-autoclaved. The results obtained in the *in vivo* experiment showed reduction on the disease severity. The treated trefoil showed lower area injured at concentrations of 1 and 2.5% PEE, while the trefoil not treated had a lower area with the disease at concentrations 0.5 and 1% of the extract. These results indicate the potential of PEE from different regions of Paraná as a direct antimicrobial about *X. axonopodis* pv. *phaseoli* and phaseolin inductor in bean hypocotyls. With regard to plants, the PEE reduced the severity of the disease is by antimicrobial activity or resistance induction indicating potential for disease control.

Keywords: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Phytoalexins. Defense mechanisms. Alternative control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Própolis Bruta utilizada nos experimentos.....	23
Figura 2. Folha sintomática de feijoeiro utilizada no isolamento da bactéria.	24
Figura 3. Placa de Petri contendo o inóculo da bactéria.	24
Figura 4. Placas de Petri contendo os hipocótilos tratados.	26
Figura 5. Crescimento da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> sobre diferentes concentrações dos extratos etanólicos de própolis não autoclavados. Testemunhas: meio caldo nutriente (CN) e caldo nutriente+3% álcool.	28
Figura 6. Indução de faseolina em hipocótilos de feijoeiro pelas diferentes concentrações dos extratos etanólicos de própolis não autoclavados. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (ASM).	31
Figura 7. Indução de faseolina em hipocótilos de feijoeiro pelas diferentes concentrações dos extratos etanólicos de própolis autoclavados. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (ASM).	32
Figura 8. Porcentagem de área lesionada pela doença sobre diferentes concentrações do extrato etanólico da região de Laranjeiras do Sul. Testemunhas: água destilada+3% de álcool e Acibenzolar-S-metil (ASM).	34
Figura 9. Sintomas do crestamento bacteriano comum em plantas de feijoeiro aos dez dias após a inoculação da bactéria.	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	OBJETIVOS	9
1.1.1	Objetivo geral	9
1.1.2	Objetivos específicos	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	A CULTURA DO FEIJOEIRO	10
2.2	CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJOEIRO	11
2.3	CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM PLANTAS	12
2.3.1	Indução de resistência	13
2.3.2	Controle alternativo do crestamento bacteriano comum	15
2.4	A PRÓPOLIS	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS	23
3.2	ISOLAMENTO, MANUTENÇÃO E PREPARO DO INÓCULO DO FITOPATÓGENO	24
3.3	ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	25
3.4	ENSAIO DE INDUÇÃO DE FITOALEXINAS	25
3.5	ENSAIO EM PLANTAS DE FEIJOEIRO	26
3.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS RESULTADOS	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA SOBRE <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	28
4.2	INDUÇÃO DE FASEOLINA EM FEIJOEIRO	30
4.3	AValiação em plantas de feijoeiro	33
5	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta grande importância mundial por ser componente básico da alimentação, principalmente dos brasileiros. A cultura é produzida em diferentes tipos de propriedades. Embora seja também produzido em grandes fazendas, seu cultivo é mais importante em pequenas unidades produtivas de agricultura familiar (EMBRAPA, 2005).

Dentre os problemas fitossanitários que mais afetam a cultura do feijoeiro encontram-se as doenças, como o crestamento bacteriano comum que é causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Essa representa a principal doença bacteriana na cultura, comumente levando a severas perdas na produção.

O controle dessa doença é muito difícil. Envolve a utilização de sementes saudáveis, o que no Brasil não é tão empregado devido à existência de poucas variedades resistentes. Eliminar plantas hospedeiras próximas à área de cultivo também é fundamental, contudo se a bactéria se instalar no feijoeiro o seu controle fica mais difícil. O controle químico ainda é o método mais utilizado para o controle dessa doença, embora apresente baixa eficiência. Além disso, utilização de defensivos químicos muitas vezes acarreta em uso indiscriminado e pode levar a resistência dos fitopatógenos a determinado princípio ativo ou mecanismo de ação.

Diante do impacto negativo ao ambiente e a saúde humana pelo uso excessivo de produtos químicos, além das dificuldades de controle com tais produtos, várias alternativas vêm sendo buscadas para proteção de plantas. Como possível alternativa tem-se utilizado a própolis, que é uma resina fabricada pelas abelhas, com suas secreções salivares e partes de plantas. A função da própolis nas colmeias é proteger o ninho através da higienização de favos e paredes internas, vedar frestas, regular a temperatura da colônia, dentre outras utilidades.

Na saúde humana, a própolis já tem efeito comprovado como antioxidante, antiinflamatória, antitumoral, imunostimulantes, além de outros benefícios incluindo a atividade antimicrobiana direta (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011).

Para os pequenos produtores, a própolis pode representar importante alternativa pela facilidade de extração, utilização, redução do impacto ambiental e nos gastos com insumos externos, e também a possibilidade de geração de renda extra pela venda deste ou de outros produtos derivados das abelhas.

Entretanto, são escassos os estudos sobre o potencial da própolis no controle de doenças em plantas, apesar da ação comprovada como antimicrobiana de patógenos humanos e também animais. No caso de bactérias fitopatogênicas, os estudos são mais restritos, pois são microrganismos de difícil controle se comparados a fungos, por exemplo. Sobre a ativação de mecanismos de defesa existem menos estudos ainda.

Diante disso, acredita-se que a própolis possa representar uma importante alternativa no controle de doenças bacterianas em plantas cultivadas, representando alternativa ecológica e contribuição para sustentabilidade de agroecossistemas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Verificar o potencial de extratos etanólicos de própolis no controle do cretamento bacteriano comum e na indução de resistência em feijoeiro, buscando colaborar com o controle alternativo de doenças em plantas através de alternativas ecológicas.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Verificar a atividade antimicrobiana direta do extrato etanólico de própolis obtido de diferentes regiões paranaenses sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*;
- b) Avaliar o efeito do extrato etanólico de própolis autoclavado e não autoclavado na indução da fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijoeiro;
- c) Avaliar o efeito local e sistêmico do extrato etanólico de própolis no controle da *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em plantas de feijoeiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO

Dentre os alimentos mais antigos da humanidade está o feijão. O grão é originário das Américas e contém registros de domesticação de 10.000 a. C.. Foi disseminado pelo mundo em função das guerras, visto que era alimento fundamental para os guerreiros, além de exploradores contribuírem para o uso e cultivo da planta (MAPA, 2014).

O feijoeiro é uma planta herbácea, dicotiledônea da família Fabaceae, que pode apresentar hábito de crescimento determinado ou indeterminado e ciclo de vida variando de 60 a 120 dias. Seus grãos fazem parte dos componentes básicos da dieta alimentar da população brasileira, sendo indispensável fonte proteica para os humanos, principalmente para países em desenvolvimento de regiões tropicais e subtropicais (EMBRAPA, 2005).

Em relação ao cultivo, a safra do feijoeiro divide-se em três. Primeiro ocorre a safra das águas, ou seja, período em que a sementeira e a colheita recebem chuvas abundantes, sendo sua ocorrência na região Centro-Sul nos meses de agosto a dezembro e no Nordeste, de outubro a fevereiro. A segunda safra é definida por safra seca, pois é realizada no período com menor índice de chuvas no Brasil, ou seja, de dezembro a março. Por fim, a terceira é conhecida como safra irrigada, isto é, referente à colheita do feijão irrigado, plantado de abril a junho na região Centro-Sul (MAPA, 2014).

Segundo dados da Embrapa (2005), no Brasil o feijão é produzido por pequenos agricultores, com poucos insumos externos, e utilizado principalmente para autoconsumo da família. Porém, esse fator vem mudando nos últimos anos, onde se verifica um aumento de interesse de produtores maiores, que fazem uso de altas tecnologias, como irrigação, tratamentos e colheita mecanizada, além de cultivos de grande escala.

Por esse motivo, o Brasil está entre os maiores produtores de feijão na atualidade. Estatísticas da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) (2012) apontaram o Brasil como terceiro maior produtor de feijão (contabilizando três safras) do mundo, atingindo produtividade de 2.794,854 toneladas de grãos, perdendo apenas para o Myanmar (3.900,000 toneladas) e a

Índia (3.630,000 toneladas), ambos países asiáticos. Em relação aos valores obtidos com a produção, o Brasil passa para segunda colocação, onde arrecadou 1.603.930 milhões de dólares internacional. Previsões feitas pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) estimaram que na safra passada (junção das três safras 2013/2014) o Brasil produziu 3.511,100 toneladas em uma área de 3.359,2 hectares.

Em nível de estado, a CONAB (2013) relata valores de produção, área e rendimento do feijoeiro em uma série histórica a partir de 1970. Comparando resultados mais antigos e atuais, em 1970 o Paraná obteve produção de 729,695 toneladas de grãos em 790,139 hectares, com rendimento de 924 kg/ha. Já em 2012, a área plantada reduziu para 471,109 hectares, produzindo 701,952 toneladas de grãos, com rendimento de 1.490 kg/ha, representando o aumento da tecnologia empregada no cultivo da planta.

2.2 CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJOEIRO

Os fatores bióticos e abióticos são muito influentes no feijoeiro, pois a cultura é muito vulnerável à ação destes agentes que ocasionam oscilações na produtividade (BIANCHINI et al., 2005). Nos bióticos, encontram-se as doenças, que estão entre as principais causas de redução na produção das lavouras.

Dos agentes causais das doenças, as bactérias vêm apresentando importância dentro das espécies de expressão econômica no Brasil, devido à gravidade nas culturas, facilidade de disseminação, além de dificuldades no controle (SILVA; PASCHOLATI; BEBENDO, 2007).

O crestamento bacteriano comum, causado pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) representa uma das doenças de maior importância na cultura no feijoeiro, muitas vezes provocando significativas reduções na colheita (DIAZ, 2000). Sua ocorrência foi registrada no Brasil a partir de 1938. Atualmente está disseminada na maioria dos países, gerando prejuízos de até 45%. Sua incidência ocorre principalmente nas regiões úmidas e quentes, sendo problema nos estados brasileiros do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, principalmente na safra das águas (KIMATI et al., 2005).

A Embrapa (2005) aponta que o crestamento bacteriano comum ataca toda a parte aérea da planta, porém seus sintomas são mais visualizados nas folhas, sendo verificada a ocorrência de lesões secas e quebradiças, rodeadas por um halo

amarelo. A mais importante forma de propagação da doença é através das sementes, além de restos culturais servirem como fonte do inóculo. Secundariamente, a chuva, ventos, irrigação e insetos podem ser vetores de disseminação da bactéria. Ainda segundo dados da Embrapa (2005), constatou-se que o controle da enfermidade pode ser realizado a partir de práticas culturais (como sementes saudáveis), produtos químicos ou resistência genética.

O controle químico muitas vezes é taxado como mais preciso, e em diversos casos considerado a única medida eficiente e viável economicamente para que se obtenha alta produtividade e qualidade da produção (KIMATI et al., 2005). Entretanto, o controle químico do crestamento bacteriano comum do feijoeiro não vem apresentando boa eficácia, em virtude da baixa eficiência dos mesmos. Além disso, a utilização abusiva de agroquímicos pode selecionar isolados resistentes de fitopatógenos ao princípio ativo usado, bem como resulta em contaminação do meio ambiente e dos alimentos (GHINI; KIMATI, 2000).

Conforme Kimati et al. (2005), o emprego de sementes saudáveis é fundamental para o controle da doença. Contudo, a maioria das variedades cultivadas no Brasil são susceptíveis à bacteriose. Além disso, pequenas produções, principalmente de subsistência, como ocorre nas unidades familiares, possuem pouco emprego de tecnologias, com uso de sementes próprias, facilitando a sobrevivência da bactéria de um cultivo para outro.

Bianchini et al. (2005) relatam que a *X. axonopodis* pv. *phaseoli* sobrevive de 2 a 15 anos em sementes, no estado hipobiótico, interna ou externamente, permanecendo patogênica. Já no solo, estudos no Paraná concluíram que em restos culturais da superfície, a bactéria sobreviveu períodos variando entre 45 a mais de 180 dias. No caso de folhas enterradas (15 cm), o patógeno sobreviveu de 30 a 90 dias.

Outra forma de sobrevivência da bactéria é através de plantas espontâneas hospedeiras, tais como: *Acalypha alopoides*, *Ambrosia artemisifolia*, *Amaranthus* spp., *Chenopodium album*, *Cyperus rotundus*, *Physalis* sp., *Portulaca oleraceae*, *Sida rhombifolia* e *Vicia sativa* (BIANCHINI et al., 2005).

2.3 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM PLANTAS

O controle alternativo de doenças vem sendo pesquisado e utilizado no combate de diversos fitopatogênicos, o que contribui essencialmente com a agricultura familiar. Dentre seus métodos estão incluídos o controle biológico, a indução de resistência e o uso de produtos naturais com atividade antimicrobiana e/ou indutora de resistência (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2003).

Vários produtos naturais tem se mostrado eficientes no controle de determinada doença de planta por sua atividade antimicrobiana direta sobre o agente causal, como o controle do oídio da soja (*Erysiphe diffusa*) com óleo de Nim e extratos do cogumelo *Lentinula edodes* (ARRUDA et al., 2012). No entanto, o efeito pode se dar também, ou unicamente, sobre a planta, ativando mecanismos de defesa através da indução de resistência (BRAND et al., 2010).

2.3.1 Indução de resistência

Pascholati (2011) explica que a resistência de uma planta ao patógeno é definida pela capacidade do hospedeiro em atrasar ou evitar a entrada e/ou a atividade de um parasita em seus tecidos. Então, a indução de resistência na planta representa a produção de barreiras físicas e/ou químicas incitadas pela aplicação de agentes indutores (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007), que podem ser microrganismos saprofiticos, fitopatogênicos, metabólitos microbianos, extratos de plantas, produtos químicos como Acibenzolar-S-metil (ASM), etc. (CAVALCANTI et al., 2005).

Segundo Johal et al. (1995), a indução e expressão de resistência começa com a planta reconhecendo alguma característica química ou estrutural do patógeno, agente de estresse ou dano associado a invasor. A partir desse reconhecimento, ocorre a produção ou liberação de um composto sinalizador, sendo este o responsável pela resposta de defesa do vegetal.

Portanto, a planta possui mecanismos de defesa para reconhecimento e proteção contra fitopatogênicos. Esses mecanismos ou fatores de resistência são divididos em duas categorias: mecanismos de defesa pré e pós-formados. Ainda há uma subdivisão de cada mecanismo que podem ser estruturais, que atuam como barreiras físicas, ou bioquímicos, que compreendem a produção de substâncias tóxicas ao patógeno ou então criando condições adversas para o crescimento do mesmo na planta, ocorrendo na célula do hospedeiro (MAZARO, 2007).

Os mecanismos de defesa pré-formados são os que estão na planta antes da mesma entrar em contato com o patógeno, sendo exemplos destes as estruturas: cutícula, tricomas, fibras vasculares e adaptações nos estômatos. Além disso, substâncias químicas como fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, fotoxinas, inibidores protéicos e quitinases e β -1,3 glucanases, pertencem à classe dos pré-formados (STANGARLIN et al., 2011).

Já os pós-formados são compostos produzidos ou ativados pela presença do patógeno, estando em baixo nível ou ausentes antes da infecção do mesmo. Alguns exemplos são a formação de papilas, halos, lignificação, camada de cortiça, formação de tilose, deposição de goma, assim como compostos bioquímicos, tais como fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese e espécies reativas de oxigênio (PASCHOLATI, 2011).

A indução de fitoalexinas está cotada entre os fatores de resistência mais eficientes, pois ocasiona morte repentina de certo número de células da planta ao redor dos sítios de infecção (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996).

No caso do feijoeiro, a principal fitoalexina formada denomina-se faseolina. Alguns produtos naturais já mostraram potencial em induzir a síntese de faseolina em feijoeiro. Toillier (2008) verificou a atividade antibacteriana e indutora de resistência de extratos de *Pycnoporus sanguineus* (cogumelo orelha-de-pau). A conclusão foi que extratos do basidiocarpo do cogumelo controlam a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, tanto por atividade antibacteriana direta, quanto por indução das enzimas de defesa peroxidase e polifenoloxidase, que atuam na formação de fitoalexinas.

Já Vigo-Schultz (2008) constatou que a tintura etanólica de *Lippia alba* (erva cidreira), piraclostrobina e acibenzolar-S-metil apresentaram os maiores valores nos teores das enzimas polifenoloxidase, e peroxidase, o que provavelmente estejam relacionados com a indução de resistência de plantas de feijoeiro a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Brand et al. (2010) avaliaram o efeito de extratos aquosos autoclavados e não autoclavados de alho e alecrim sobre o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, causador da antracnose em feijoeiro, através da produção de faseolina e da severidade em plantas. Concluí-se que o extrato de alho não autoclavado é mais eficiente na redução do crescimento do fungo, enquanto os de alecrim são mais efetivos na indução de faseolina.

Assi (2005) trabalhou com o controle *in vivo* da antracnose em feijoeiro pelo extrato aquoso de basidiocarpo de *Pycnoporus sanguineus* concluindo que houve redução da severidade em 70% na folha tratada com extrato a 20%, sendo que o fungicida reduziu 73%. É possível que o controle tenha ocorrido por atividade antifúngica direta, ou por indução de resistência, visto que no momento da inoculação a atividade da peroxidase apresentava alta pela avaliação.

As rotas de formação e regulação da biossíntese de fitoalexinas, bem como as funções de cada via e suas interações ainda são desconhecidas e incompreendidas, necessitando de novos estudos para determinação dos mecanismos de regulação para desenvolver estratégias de manipulação e melhoria da resistência de plantas contra fitopatógenos (AHUJA; KISSEN; BONES, 2012). Os mesmos autores ainda citam que o conhecimento do modo de ação das fitoalexinas e os mecanismos utilizados pelos fitopatógenos para desvio desta linha de defesa devem revelar novas possibilidades de controle da produção de fitoalexinas em tecidos e fases específicas do desenvolvimento da planta.

2.3.2 Controle alternativo do cretamento bacteriano comum

Encontra-se na literatura algumas pesquisas envolvendo o controle alternativo da *X. axonopodis* em determinadas culturas, seja por ação direta contra o patógeno ou por indução de mecanismos de defesa na planta.

Kuhn et al. (2006) avaliaram o controle *in vitro* da *X. axonopodis* pv. *manihotis*, causadora da bacteriose ou murcha na cultura da mandioca, através do uso de extrato aquoso da *Curcuma longa* (cúrcuma). Contudo, a conclusão do trabalho foi que os extratos não apresentaram efeito curativo nas manivas avaliadas.

Souza et al. (2012) trabalharam com a mancha bacteriana (*X. axonopodis* pv. *vignicola*) em videira, onde buscaram verificar a sensibilidade *in vitro* da bactéria ao óleo essencial de *Lippia microphylla* (chá-de-tabuleiro). Os autores concluíram que concentrações acima de 0,2% inibem quase totalmente o desenvolvimento de colônias bacterianas.

Em outro estudo, Dal'Maso et al. (2012) testaram a atividade antibacteriana *in vitro* sobre a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, utilizando extratos hidroalcoólicos de cúrcuma, alecrim e orelha-de-pau. Os derivados das três espécies vegetais, desde que não autoclavadas, mostraram potencial no controle da bactéria.

Também procurando controlar a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, Vigo-Schultz (2008) verificou que as tinturas de *Lippia alba* (erva cidreira), *Lippia sidoides* (alecrim pimenta) e os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela) apresentaram atividade *in vitro* sobre os isolados da fitopatogênica.

Outros autores trabalharam com a cultura da soja, que pertence a mesma família do feijoeiro. Por exemplo, Mazaro et al. (2008) testaram extratos de *Eugenia uniflora* (pitangueira) na indução de fitoalexinas da soja, chegando a conclusão de que os preparados de pitangueira tem potencial para a indução de fitoalexinas gliceolinas em cotilédones. Já Arruda et al. (2012) trabalharam com extratos aquosos dos cogumelos *Agaricus blazei*, *Lentinula edodes* e *Pycnoporus sanguineus*, confirmando que as maiores concentrações dos extratos provocaram maior acúmulo de fitoalexinas nos cotilédones de soja.

No experimento de Matiello e Bonaldo (2013) verificou-se que extratos brutos das plantas medicinais Arruda (*Ruta graveolens*), Manjerona (*Origanum majorana*) e Carqueja (*Baccharis trimera*), são eficientes na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, mas para mesocótilos de sorgo apenas altas concentrações (15 a 50%) dos extratos de carqueja e manjerona induzem o acúmulo de fitoalexinas.

2.4 A PRÓPOLIS

Buscando um indutor de resistência com capacidade antibacteriana, a própolis está sendo estudada neste trabalho. O produto é uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomas e balsâmicas, de consistência, textura e coloração variada (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011). As abelhas, principalmente a espécie *Apis mellifera*, elaboram a própolis a partir da coleta de produtos existentes em partes da planta, como botões florais, brotos e exsudatos resinosos. A composição mais comum da própolis é de 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, incluindo resíduos orgânicos, porém pode haver diferenças entre própolis, visto que é composta por mistura de substâncias naturais (ADELMANN, 2005).

A importância da própolis para as abelhas se dá na sua função de vedar frestas e diminuir o tamanho da entrada da colmeia, o que reduz o ataque de pragas, além de protegê-las contra o frio. Também é um material antisséptico e

usado para cobrir os inimigos abatidos na parte interna da colmeia, e evitar que o mesmo apodreça e contamine o ninho (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011). As características da região ao redor da colmeia onde a substância é coletada fazem com que haja variações na composição da mesma, o que pode acarretar em diferenças nas atividades farmacológicas de uma própolis para outra (MENEZES, 2005).

Dentre as propriedades biológicas que a própolis possui, estão inclusos os efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antimutagênica, antiproliferativa, citotóxico, hepatoprotetor, antitumoral e, principalmente, atividade antimicrobiana (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011).

Segundo Liberato et al. (2010), os responsáveis pela atividade antimicrobiana da própolis são ácidos aromáticos, flavonoides e ésteres presentes em sua composição química natural.

Os principais estudos relacionados com a resina estão envolvidos na saúde humana e animal. Figueiredo et al. (1999) determinaram a quantidade máxima em que um enxaguante bucal a base de própolis, extratos vegetais e mel inibia 15 diferentes microrganismos. Os autores comprovaram a atividade antimicrobiana “*in vitro*” do enxaguatório.

Regalado (2009) avaliou a capacidade da própolis isolada ou associada ao fluoreto de sódio (NaF), no controle da cárie dentária e da gengivite em pacientes com aparelhos ortodônticos fixos metálicos. O resultado foi que a própolis quando associada ao NaF 0,05% é capaz de reduzir o acúmulo de biofilme e o risco à cárie dentária.

A bactéria *Streptococcus mutans*, causadora da cárie, também foi estudada por Nogueira et al. (2007) que comprovaram a ação preventiva e o controle do patógeno com o uso da própolis. Porém, o mesmo experimento realizado com *Lactobacilos casei* mostrou que a própolis não apresenta atividade para a bactéria.

Fernandes Júnior et al. (2006) investigaram o efeito antimicrobiano de extratos alcoólicos de própolis de três regiões sobre linhagens isoladas de infecções clínicas humanas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*). A conclusão foi que houve diferença entre as própolis das regiões e que bactérias Gram-positivas e levedura são mais sensíveis ao extrato se comparadas às Gram-negativas, grupo do qual pertence à *Xanthomomas*.

Sforcin et al. (2000) verificaram que para a bactéria *S. aureus* (gram-positiva) uma baixa concentração de própolis (0,4%) já inibiu seu desenvolvimento, enquanto a bactéria *E. coli* (gram-negativa) foi inibida com concentração muito maior de própolis (4,5 a 8%).

Bispo Junior et al. (2012) avaliaram o extrato etanólico de própolis sobre linhagens de *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, confirmando a capacidade dos extratos que controlaram 100% das cepas gram-positivas, 100% das fúngicas, porém apenas 62,5% das gram-negativas, apresentando eficiência de 76,9% em todas as espécies testadas.

Buscando controlar a bactéria *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans*, Oliveira et al. (2010) testaram extratos aquosos de própolis. O resultado foi positivo para o primeiro patógeno, porém os demais não foram influenciados pela atividade antimicrobiana da resina.

Na área animal, Loguercio et al. (2006), em estudo contra agentes causais da mastite bovina, avaliaram a atividade *in vitro* do extrato alcoólico de própolis do Rio Grande do Sul. Foram testadas 63 linhagens bacterianas (36 de *Staphylococcus coagulase-positivas* e 27 de *Streptococcus*), sendo que 90,5% das amostras apresentaram-se sensíveis ao extrato.

Também testando o efeito antibacteriano do EEP sobre *Staphylococcus* spp, principal agente causal da mastite bovina, Amarante (2011) confirmou alta atividade da resina, quando comparada a antimicrobianos convencionais.

Barbosa et al. (2014) também estudaram o efeito do EEP sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*, através da determinação do diâmetro médio da colônia de bactérias, em placa de Petri. Os resultados apontaram que conforme o aumento da concentração do extrato, menor o crescimento da colônia de *S. aureus*.

Andrade et al. (2012) também utilizaram o EEP em seus estudos que constatarem o controle do mesmo sobre a bactéria *Aeromonas hydrophila*, que é organismo patogênico para diversas espécies de peixes.

Pesquisando a atividade antibacteriana de extratos aquosos de própolis da Turquia, Yildirim et al. (2004) concluíram que o extrato tem efeito inibitório limitado sobre a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, causadora da infecção tuberculósica em suínos.

No caso da proteção de plantas, poucos estudos foram realizados com a própolis. Informações sobre o efeito da resina sobre a ativação de mecanismos de defesa das plantas são mais restritas ainda.

Dentre as pesquisas já realizadas encontra-se o estudo de Meneses, Durango e García (2009) que mostraram o potencial da própolis como antifúngica sobre causadores de podridões em pós-colheita de frutos, tais como o *Colletotrichum gloeosporioide* e o *Botryodiplodia theobromae*.

O fungo *Cercospora coffeicola*, causador da cercosporiose em cafeeiros, já foi analisado por Pereira, Souza e Godoy (2013), os quais apontam que as concentrações 1,0, 1,5 e 2,0% de EEP tiveram a menor incidência da doença, com comportamento quadrático. Além disso, os autores verificaram aumento da área foliar e número de folhas por parcela, conforme aumentou a concentração dos extratos.

Avaliando a influência de produtos alternativos sobre a os fungos causadores da Cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) e da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro em sistema orgânico de produção, Androcioni et al. (2012) concluíram que assim como o controle químico, o uso de produtos alternativos, incluindo extratos de própolis, mantiveram a área abaixo da curva da progressão da incidência dos fungos inferior ao obtido em cafeeiros sem controle.

Castro (2010) também estudou o efeito do EEP sobre os agentes causais da cercosporiose e da ferrugem em cafeeiro, comprovando que as concentrações de 0,1 e 0,2% de EEP não influenciaram a cercosporiose, porém a 0,1% de EEP o controle da ferrugem foi tão eficiente quanto o produto químico Amistar (estrobilurina).

Marini et al. (2012) constatou que extratos alcoólicos de própolis inibiram a germinação de esporos, que tendem a reduzir o tamanho dos tubos germinativos e inibir o crescimento micelial dos fungos *Phakopsora euvtis*, *Pseudocercospora vitis* e *Elsione ampelina*, agentes causais das doenças ferrugem, mancha da folha e antracnose, respectivamente, presentes na cultura da videira.

Baldin et al. (2013) estudaram o efeito do extrato etanólico de própolis na ativação de fitoalexinas em sorgo e sobre a atividade antifúngica do extratos sobre *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola*, causadores do mofo cinzento em morangueiro e mancha angular do feijoeiro, respectivamente. Sobre a ativação do mecanismo de defesa, o ponto máximo de atividade foi obtido na concentração de

2,9%, enquanto que com o aumento das concentrações testadas se observou a inibição do desenvolvimento dos tubos germinativos dos fungos.

Em estudo para avaliar produtos para o controle da doença fúngica requeima (*Phytophthora infestans*) em batatas produzidas em sistema de base ecológica, Medeiros et al. (2008) tiveram como melhores resultados na diminuição da severidade da doença o fungicida Metalaxyl e os tratamentos com calda Bordalesa + alhol e extrato de própolis 0,3%, sem diferença significativa entre eles. A própolis foi testada nas concentrações de 0,3% e 3%, mostrando que o aumento da concentração não causou efeito superior na redução da severidade do *P. infestans*.

Moraes et al. (2011) realizaram estudo com produtos alternativos para o controle do oídio em tomateiro, causado pelo fungo *Oidium* spp.. Os autores confirmaram que todos os produtos foram eficientes no controle do fitopatógeno, porém os que se mostraram mais eficientes na redução da severidade da doença foram: silicato de potássio, calda Viçosa, o fungicida sistêmico Tebuconazole e o extrato alcoólico de própolis.

Barbosa e Vieira (2012) estudaram o potencial da própolis no controle do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco em mais de 400 espécies de plantas, muitas delas hortaliças de valor comercial. Nesse experimento, a própolis na concentração de 32ml/L apresentou maior capacidade inibitória do fungo em relação aos demais tratamentos, se aproximando dos valores obtidos com o fungicida Comet (piraclostrobina).

Na cultura do feijoeiro, Pereira, Maia e Paula (2014) testaram a aplicação de EEP sobre a severidade da doença antracnose, o crescimento e a produtividade de variedade carioca. Os autores verificaram que na concentração de 4% de EEP diminuiu a severidade do fungo causador da doença em até 63%, além de ter aumentado teores foliares de vários nutrientes e a produtividade em até 33%.

Prado et al. (2012) testaram diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis no controle da mela do feijoeiro nos estádios iniciais da cultura. Nesse caso o resultado não foi positivo, pois a incidência da doença nas diferentes diluições do extrato não diferiu significativamente da testemunha, levando os autores à conclusão de que o uso de EEP não combate a mela do feijoeiro.

Com relação às doenças bacterianas, também existem poucos estudos, visto que esses fitopatógenos possuem controle mais difícil se comparado a outros microrganismos. Bianchini e Bebendo (1998) avaliaram o efeito do extrato aquoso

de própolis sobre *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, concluindo que o meio de cultura com 10% do extrato inibiu totalmente o desenvolvimento das bactérias, ao mesmo tempo que inibiu parcialmente a *Erwinia chrysanthemi* e não apresentou efeito sobre *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Bregagnoli (2006) utilizou em seu estudo antimicrobianos naturais para redução da contaminação na fermentação etanólica na produção de cachaça orgânica. Entre os tratamentos que apresentaram melhor resultados estão à solução de ampicilina e extrato de própolis, os quais proporcionaram maiores índices de viabilidade celular, menos concentração de bactérias, além da baixa produção de glicerol, concluindo que o extrato de própolis tem potencial no controle de bactérias contaminantes.

Vargas et al. (2004) afirmam que a maioria dos resultados encontrados da atividade antibacteriana da própolis são mais eficientes contra bactérias gram-positivas. O autor também cita que a estrutura da parede celular das gram-negativas é menos rígida, porém mais complexa quimicamente, tendo uma membrana externa de lipopolissacarídeos e proteínas na sua constituição determinando a antigenicidade, toxidade e patogenicidade, além de terem maior teor lipídico, que confere mais resistência desses organismos aos extratos de própolis, pois dificulta a lise celular.

Fischer et al. (2008) apontam que a própolis é tanto imunoestimulante como combatente direta de microrganismos, apesar de muitos estudos se mostrarem antagônicos possivelmente em função das diferenças metodológicas ou diversidade química entre as amostras de própolis, havendo necessidade de ampliar os estudos relacionados as propriedades da resina.

De acordo com Silva (2004) a diversidade nos resultados dos experimentos envolvendo extratos de própolis ocorre devido à complexa composição química da própolis, que tem influência do local de origem, floração apícola, época do ano em que ocorre a coleta da própolis, além da espécie da abelha.

Amarante (2011) afirma que por ser um produto natural, a própolis é muito importante para a saúde pública, visto que não deixa resíduos prejudiciais nos alimentos e causa pouca contaminação do meio ambiente. Dessa forma, extratos de própolis podem contribuir com o controle alternativo de doenças, podendo ser utilizados na agricultura orgânica e agroecológica. Além disso, o autor cita que a

resina é de fácil acesso, pois qualquer produtor que se interesse pode criar abelhas e retirar produtos, como a própolis, sendo uma nova fonte de renda, ou mesmo de economia com fungicidas externos à propriedade, o que contribui principalmente com os agricultores familiares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul e em casa de vegetação em propriedade particular no município de Porto Barreiro/PR.

3.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS

A própolis utilizada foi coletada de apiários da região de Laranjeiras do Sul, Maringá e Marechal Cândido Rondon, sendo avaliadas na forma de extrato etanólico. A extração da resina foi executada conforme metodologia proposta por Pereira et al. (2008). Para tanto, primeiramente foi realizada a retirada de impurezas e em seguida preparada a tintura com álcool etílico 70%, na proporção 16:84 de própolis bruta (Figura 1) e álcool (peso/peso), nessa ordem.

Figura 1. Própolis Bruta utilizada nos experimentos.



Depois de misturados os componentes em liquidificador, o extrato foi mantido em repouso por 30 dias, para então ser filtrado em papel quantitativo. Esse extrato deu origem aos preparados nas concentrações de 0,1, 0,5, 1, 2,5 e 5%, que posteriormente foram utilizados nos bioensaios. Foram aplicados extratos submetidos ou não a autoclavagem por 20 minutos a 120 °C a 1 atm.

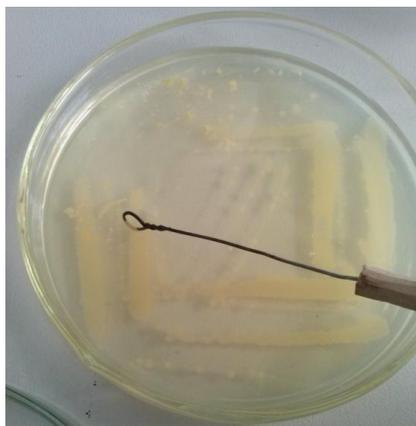
3.2 ISOLAMENTO, MANUTENÇÃO E PREPARO DO INÓCULO DO FITOPATÓGENO

A partir de folhas sintomáticas de feijoeiros coletadas na região de Laranejiras do Sul, foi isolada a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Figura 2). Esta foi cultivada em placas de Petri (Figura 3), contendo meio de cultura ágar nutriente (5 g peptona; 3 g extrato de carne; 15 g ágar bacteriológico e 1000 mL de água destilada) e mantidas a 28°C em escuro por 48 horas, momento em que foram usadas para o preparo do inóculo. Para tanto, foi preparada suspensão bacteriana em solução salina (NaCl 0,85%) com concentração ajustada para 1×10^8 UFC mL⁻¹, com base em curva de absorbância a 580 nm (KUNH, 2006). A manutenção da bactéria por períodos prolongados foi realizada através de inoculação e re-isolamento em plantas de feijoeiro.

Figura 2. Folha sintomática de feijoeiro utilizada no isolamento da bactéria.



Figura 3. Placa de Petri contendo o inóculo da bactéria.



3.3 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram realizados ensaios de atividade direta dos extratos das três regiões sobre a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, servindo como parâmetro de interpretação da atividade da própolis no controle da doença. Para o experimento, tubos de ensaio estéreis (capacidade 10 mL) foram autoclavados a 120 °C por 20 min. Em seguida, cada tubo de ensaio recebeu concentrações iguais para meio de cultura caldo nutriente e as concentrações 0,1, 0,5, 1, 2,5 e 5% dos extratos de própolis não autoclavados, mais 100 µL de suspensão bacteriana com 1×10^8 UFC mL⁻¹. , totalizando o volume final de 5 mL por tubo.

Os tubos foram mantidos por 48 horas a 27 °C em escuro e após determinada a absorbância a 580 nm. As testemunhas foram caldo nutriente e caldo nutriente com 3% de álcool.

3.4 ENSAIO DE INDUÇÃO DE FITOALEXINAS

A metodologia de Dixon et al. (1983), com certas modificações, foi utilizada para determinação da fitoalexina faseolina. Sementes de feijão variedade IPR-Colibri foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos. Após, foram lavadas em água destilada estéril, semeadas em areia esterilizada por autoclavagem (120 °C por 20 min. a 1 atm) e mantidas em câmara climatizada a 24°C em escuro durante sete dias.

A seguir, foram cortados 5 cm dos segmentos de hipocótilos estiolados das plântulas, lavados em água estéril e mantidos sobre papel absorvente por 30 minutos. Quatro segmentos de hipocótilo (aproximadamente 1g) foram transferidos para placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril, sendo os tratamentos pulverizados sobre os hipocótilos (Figura 4).

Figura 4. Placas de Petri contendo os hipocótilos tratados.



As placas de Petri foram mantidas a 25°C em escuro por 48 horas. Depois desse período, os hipocótilos foram transferidos para tubos de ensaio com 10 mL de álcool 70%, mantidos a 4°C por 48 horas para a extração da fitoalexina formada, sendo então agitados por uma hora. O teor de faseolina formada foi determinado em espectrofotômetro a 280 nm, após esse período. (BAILEY; BURDEN, 1983) Este ensaio teve como testemunhas água destilada e o ativador de plantas químico Acibenzolar-S-metil (ASM) na concentração de 50 mg L⁻¹ i. a..

3.5 ENSAIO EM PLANTAS DE FEIJOEIRO

Ensaio em plantas de feijoeiro foram realizados para avaliar o efeito protetor dos extratos etanólicos de própolis. Plantas da cultivar IPR-Colibri foram cultivadas em vasos (capacidade 3,8L) com mistura de solo, composto orgânico e areia, no volume de 2:2:1, respectivamente. Em cada vaso foram semeadas três sementes, sendo realizado desbaste 30 dias após a semeadura. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente.

Aos 60 dias após a semeadura, os tratamentos foram aplicados via aspersão no primeiro trifólio de cada planta. Devido aos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, apenas o extrato obtido na região de Laranjeiras do Sul foi utilizado no experimento em plantas, nas concentrações 0,1, 0,5, 1, 2,5 e 5% de EEP. Três dias após, foi realizada a inoculação com suspensão bacteriana de 1 x 10⁸ UFC mL⁻¹ no primeiro (tratado) e no segundo trifólio (não tratado)

A inoculação foi realizada por meio de aspersão com o inóculo, sendo estas mantidas em câmara úmida por 6 horas antes e 24 horas depois da inoculação, com umidade relativa de 100%, conforme Romeiro (2001). Após, as plantas permaneceram em casa de vegetação, sendo irrigadas diariamente.

A severidade da doença foi avaliada 10 dias após a inoculação, pela determinação da área lesionada, através do programa computacional QUANT v.1.0.1 (UFV) (VALE et al., 2001).

O ensaio em plantas teve como testemunha negativa água destilada+solução alcoólica (3% de álcool etílico) e testemunha positiva o ativador de plantas Acibenzolar-S-metil (ASM), na concentração de 50 mg L⁻¹ i. a..

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS RESULTADOS

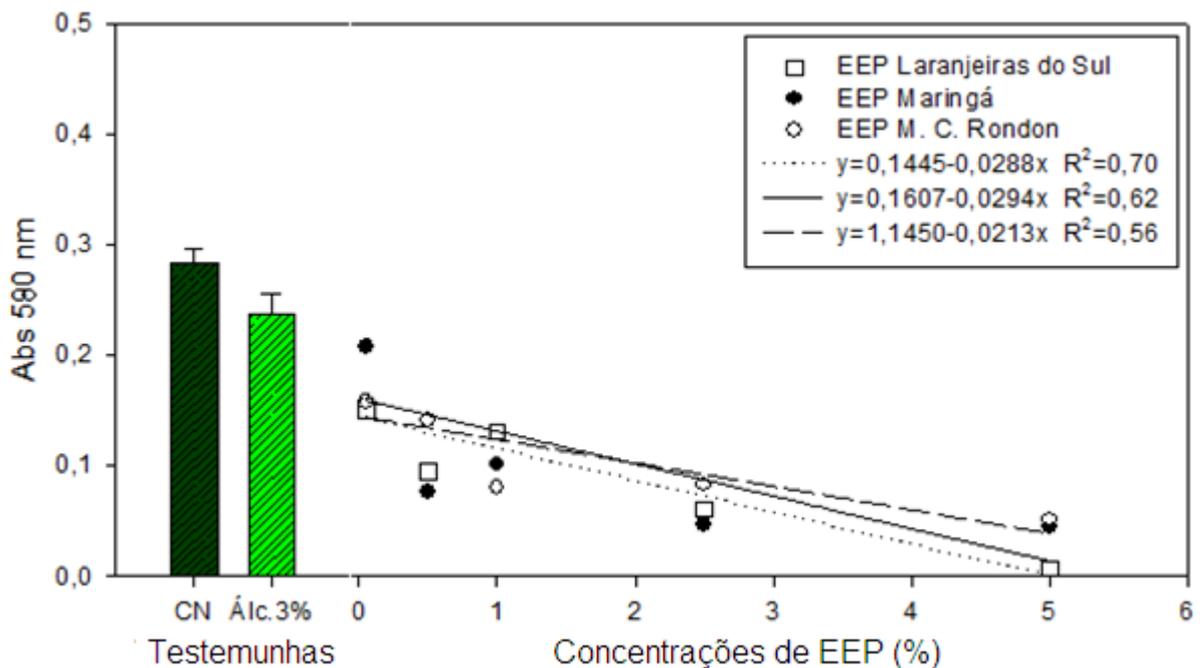
O delineamento utilizado para todos os ensaios foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os resultados obtidos foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade. Além disso, os dados passaram por análise de variância e, depois, análise de regressão para as concentrações de extratos e teste de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade para os dados qualitativos. O programa computacional Assistat (SILVA, 2013) foi utilizado como ferramenta auxiliar das análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA SOBRE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

A Figura 5 apresenta os resultados obtidos da atividade antibacteriana do EEP sobre o crescimento *in vitro* da *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Observou-se que o comportamento da fitopatogênica foi semelhante entre os extratos provenientes das três diferentes regiões do Paraná. Esses resultados foram próximos provavelmente pela semelhança de compostos ativos presentes nas própolis testadas, observando-se expressiva atividade antibacteriana sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli* independentemente da região de coleta da própolis.

Figura 5. Crescimento da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* sobre diferentes concentrações dos extratos etanólicos de própolis não autoclavados. Testemunhas: meio caldo nutriente (CN) e caldo nutriente+3% álcool.



Analisando o gráfico verificou-se redução drástica de forma linear no desenvolvimento da bactéria pelo aumento da concentração dos extratos testados. Pela equação de regressão, para cada 1% de aumento na concentração do extrato, há redução da absorbância de 0,0288 para Laranjeiras do Sul, 0,0294 para Maringá

e 0,0213 para Marechal Cândido Rondon, o que reflete na diminuição da multiplicação *in vitro* da bactéria.

Para a região de Laranjeiras do Sul, o melhor resultado foi obtido na maior concentração, 5% de EEP, que reduziu 97% o crescimento da bactéria *in vitro* em relação às testemunhas.

Pela comparação entre a testemunha meio caldo nutriente+álcool 3% e os tratamentos com a própolis, percebeu-se que o álcool teve leve influência sobre a bactéria, visto que é uma substância antimicrobiana. Porém a redução mais acentuada do crescimento da *X. axonopodis* pv. *phaseoli* ocorreu devido a substâncias presentes na própolis bruta. É possível que esse efeito da própolis venha contribuir no controle do crescimento bacteriano comum.

Embora sejam poucas as informações da ação da própolis sobre bactérias fitopatogênicas, o efeito sobre outras bactérias já é bem conhecido e documentado. Liberato et al. (2010), citados anteriormente, afirmam que a atividade antimicrobiana da própolis ocorre pela presença de ácidos aromáticos, flavonoides e ésteres em sua composição química. Grange e Davey (1990) também apontam que a atividade antibacteriana da própolis pode estar associada ao alto conteúdo de flavonoides na resina.

Diversos estudos já relataram o efeito antimicrobiano de extratos etanólicos de própolis sobre bactérias patogênicas de animais. Entre esses, Regalado (2009) comprovou a atividade do EEP 2,5% associado ao Fluoreto de sódio (NaF 0,05%) na redução do risco de cárie, causada pela bactéria *Streptococcus mutans* (Gram-positiva).

Bispo Junior et al. (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana de EEP proveniente do estado de Alagoas sobre as bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e o Fungo *Candida albicans*, todos causadores de infecções humanas. Os resultados foram que os extratos apresentaram atividade antimicrobiana em 100% das cepas Gram-positivas e 100% das fúngicas, enquanto apenas 62,5% das Gram-negativas.

Barbosa et al. (2014) estudaram o efeito do EEP (30%) sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*, principal causadora da mastite bovina, com intuito de obter controle alternativo ao convencional. Através da determinação do diâmetro médio da colônia de bactérias em placas de Petri, os autores observaram que conforme

aumentou a concentração do extrato, menor foi o crescimento da colônia de *S. aureus*.

Em seu estudo, Andrade et al. (2012) testou EEP 15% provenientes dos estados de Minas Gerais, Ceará e Pernambuco, com repouso de 45 dias sobre a bactéria *Aeromonas hydrophila*, (Gram-negativa) patogênica de peixes, concluindo que a bactéria foi sensível aos extratos.

Em plantas, além de existirem poucos estudos envolvendo a própolis no controle de doenças, a maioria destes foram realizados com fungos. Barbosa e Vieira (2012) verificaram o potencial da própolis no controle do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco em mais de 400 espécies de plantas, principalmente hortaliças de valor comercial. Os resultados foram que o EEP a 32 ml/L apresentou inibição do fitopatógeno que pode ser comparada ao fungicida com princípio ativo Piraclostrobina.

No caso do feijoeiro, Pereira, Maia e Paula (2014) comprovaram ação do EEP a 4% sobre o *Colletotrichum lindemuthianum*, causador da antracnose, enquanto Prado et al. (2012) não obtiveram resultado positivo com EEP sobre a mela do feijoeiro, causada pelo fungo *Thanatephorus cucumeris*.

Com bactérias, o estudo realizado foi de Bianchini e Bebendo (1998), que avaliaram o efeito do extrato aquoso de própolis sobre *Agrobacterium tumefaciens* (Gram-negativa) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* (Gram-positiva). A conclusão foi que a 10% do extrato houve inibição total de tais organismos. Porém houve apenas inibição parcial da *Erwinia chrysanthemi* (Gram-negativa) e não houve efeito sobre a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Gram-negativa). Nesse mesmo estudo, os autores comprovaram que o extrato aquoso de própolis a 10% controla a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

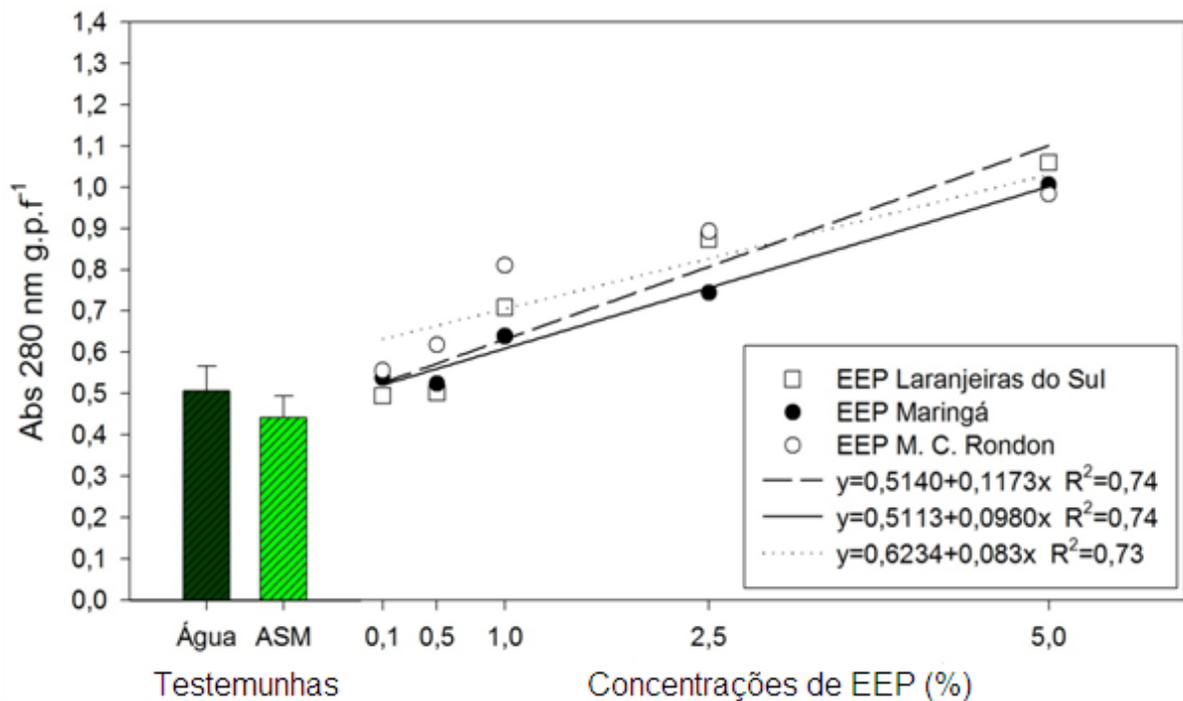
Silva (2004) cita que ocorrem divergências nos resultados dos experimentos com a própolis devido a sua composição química variar de acordo com a vegetação apícola, época de coleta da própolis e a espécie da abelha.

4.2 INDUÇÃO DE FASEOLINA EM FEIJOEIRO

Os resultados obtidos com as diferentes concentrações dos extratos etanólicos de própolis mostraram significativo efeito linear, indicando aumento da concentração da faseolina nos hipocótilos de feijoeiro conforme aumentou a

porcentagem dos extratos não autoclavados (Figura 6). O comportamento dos dados foi semelhante para a própolis das três regiões paranaenses, mostrando que a resina obtida de tais localidades tem potencial na indução de faseolina em feijoeiros.

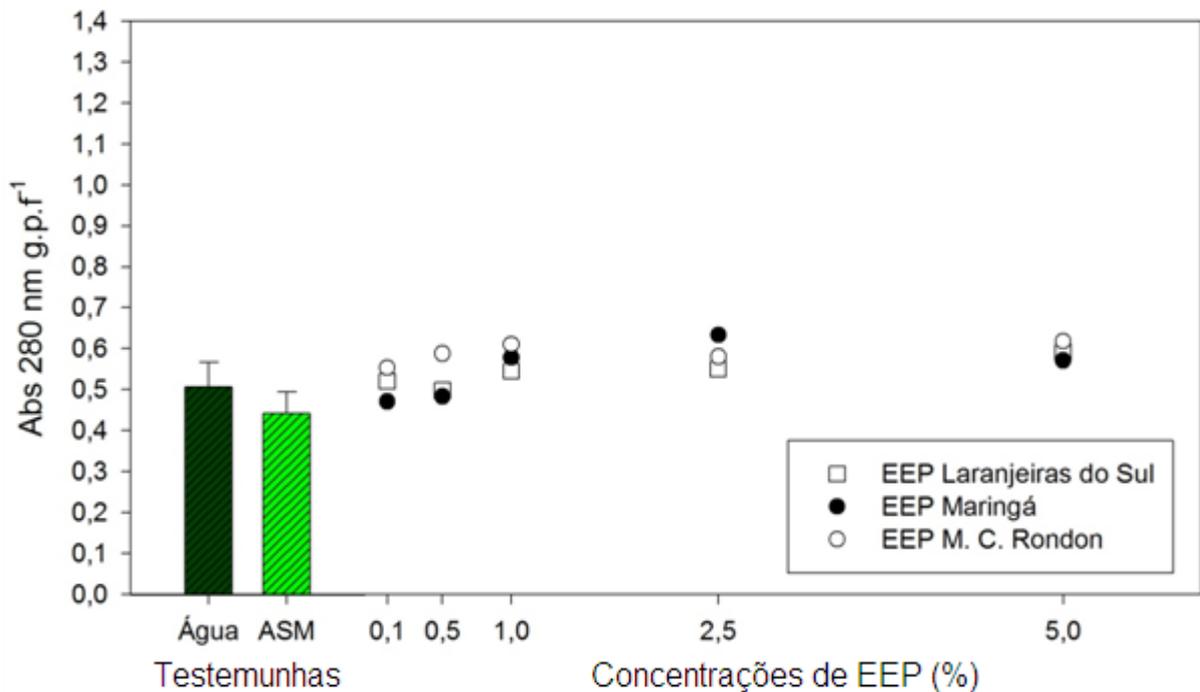
Figura 6. Indução de faseolina em hipocótilos de feijoeiro pelas diferentes concentrações dos extratos etanólicos de própolis não autoclavados. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (ASM).



Observa-se que na concentração de 5%, os extratos de própolis Laranjeiras do Sul, Maringá e Marechal Cândido Rondon induziram a síntese de faseolina em relação à testemunha acibenzolar-S metil em 45,67, 38,9 e 48,7%, respectivamente. Esse significativo efeito do extrato de própolis indica o efeito também sobre a fisiologia da planta, podendo ativar potenciais mecanismos de defesa.

Os EEPs autoclavados tiveram redução drástica no acúmulo de faseolina em relação aos não autoclavados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 7). Os resultados demonstram que os compostos da própolis responsáveis pela indução de fitoalexinas são termolábeis, ou seja, decompõem-se sob calor.

Figura 7. Indução de faseolina em hipocótilos de feijoeiro pelas diferentes concentrações dos extratos etanólicos de própolis autoclavados. Testemunhas: água destilada e acibenzolar-S-metil (ASM).



Prado Filho et al. (1962 *apud* BIANCHINI; BEBENDO, 1998) afirmam que a substância ativa da própolis responsável pela atividade antimicrobiana é termicamente estável, mesmo sendo submetida à temperatura de 100 °C por 30 minutos. Dessa forma, é possível que alguns compostos antimicrobianos sejam termoestáveis, enquanto algum composto indutor de faseolina seja termolábil, como foi observado no gráfico.

De acordo com Hammond-kosack e Jones (1996), a indução de resistência por meio de fitoalexinas está entre os mecanismos de defesa mais eficientes, devido à ocorrência de morte de células da planta próximas ao local de infecção.

Embora eficiente, os estudos envolvendo a indução de resistência em plantas são escassos, e no caso da própolis são praticamente inexistentes. Baldin et al. (2013) estudaram o efeito do EEP sobre a ativação *in vitro* de fitoalexinas em sorgo, comprovando a indução da fitoalexina deoxiantocianidina em mesocótilos estiolados, com ponto de máxima na concentração de 2,9% de EEP.

Outros estudos relatam o potencial indutor de fitoalexinas por outros produtos naturais, como derivados de plantas medicinais e cogumelos. Arruda et al. (2012) verificaram o acúmulo de fitoalexinas em hipocótilos de soja pela utilização de

extratos aquosos dos cogumelos *Agaricus blazei*, *Lentinula edodes* e *Pycnoporus sanguineus*. Mazaro et al. (2008) encontraram resultado positivo na indução de fitoalexinas em soja através de extratos aquosos de pitangueira.

Matiello e Bonaldo (2013) relataram que extratos brutos das plantas medicinais Arruda (*Ruta graveolens*), Manjerona (*Origanum majorana*) e Carqueja (*Baccharis trimera*), são eficientes na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, enquanto que altas concentrações (15 a 50%) de extrato de carqueja e manjerona induzem o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

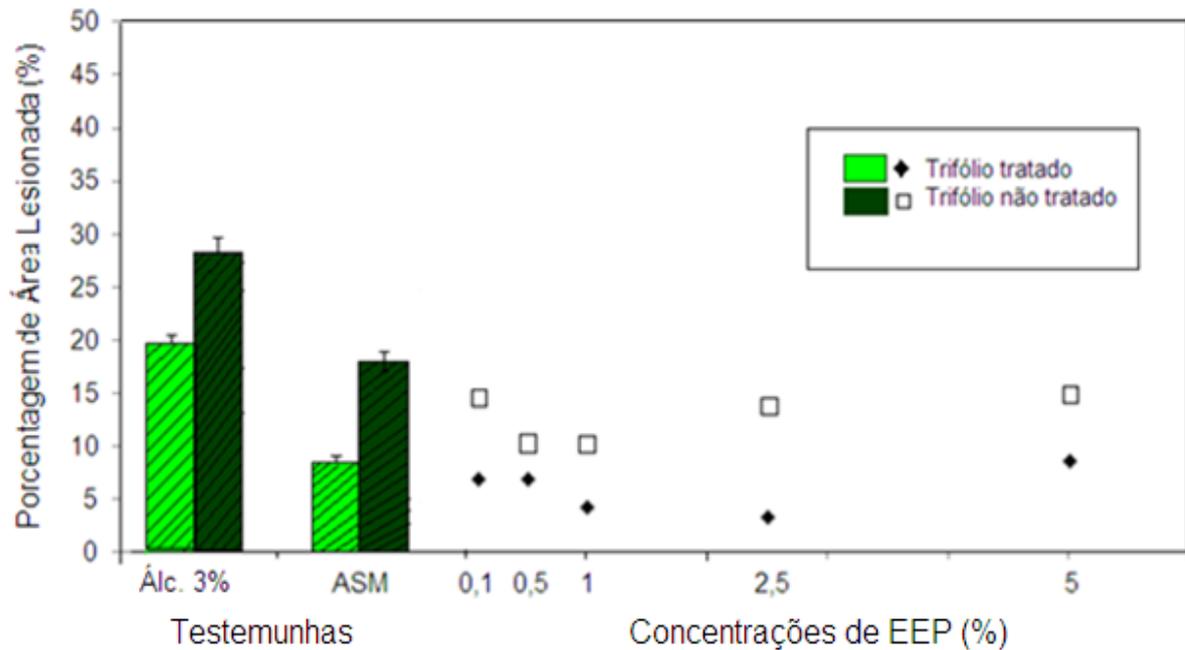
No caso da bactéria estudada, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, Toillier (2008) utilizou extratos do cogumelo orelha de pau (*Pycnoporus sanguineus*) no controle *in vitro* da fitopatogênica em feijoeiros, concluindo que os extratos do basidiocarpo do fungo controlam a bactéria com filtrado de cultura acima de 15% e para extrato nas concentrações de 1 a 20%

Estudos sobre a ativação de mecanismos de defesa, tanto com a própolis, quanto com outros produtos ainda são escassos, mostrando a importância de mais trabalhos relacionados com o tema para compreender possíveis mecanismos envolvidos.

4.3 AVALIAÇÃO EM PLANTAS DE FEIJOEIRO

A Figura 8 apresenta os resultados obtidos da severidade do crestamento bacteriano comum em plantas de feijoeiro. Para as folhas tratadas, a testemunha água destilada+álcool 3% apresentou a maior porcentagem de área lesionada (19,5%), seguida do EEP 5% (8,7% de severidade), com menor valor obtido com 1 e 2,5%, sendo 2,23 e 3,36% de área lesionada pela doença, respectivamente. No caso das folhas não tratadas, as duas testemunhas apresentaram maior área lesionada, 28,15% com o tratamento água destilada+3% de água e 17,99% com o acibenzolar-S-metil (ASM). A menor porcentagem de severidade da doença ficou com os EEP 0,5 (10,26%) e 1% (10,92%). O fato de não ter sido encontrada significativa equação de regressão sugere que o EEP apresenta efeito protetor em plantas de feijoeiro mesmo nas menores concentrações utilizadas.

Figura 8. Porcentagem de área lesionada pela doença sobre diferentes concentrações do extrato etanólico da região de Laranjeiras do Sul. Testemunhas: água destilada+3% de álcool e Acibenzolar-S-metil (ASM).



Comparando a média dos trifólios tratados e não tratados com 3% de álcool constata-se redução da severidade da doença com a presença do álcool, comprovando que o produto também contribuiu na diminuição da área lesionada pela doença.

De toda forma, além de contribuir com o controle da bactéria na planta, a preparação da tintura em álcool permite que a própolis seja conservada por mais tempo, sem necessidade de aquecimento, que pode prejudicar os compostos indutores de resistência presentes na resina. Além disso, o uso da própolis em forma de extrato permite um volume maior de produto, para aplicação em escala também maior.

Em todos os casos houve menor porcentagem de área lesionada nos trifólios tratados, comprovando que o efeito local é maior que o sistêmico, embora tenha ocorrido redução proporcional em menor quantidade nos trifólios não tratados para todos os tratamentos. Esses resultados indicam que a própolis tem potencial para reduzir a severidade da doença mesmo em folhas não tratadas.

Os resultados mostram que o EEP tem potencial no controle da *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, seja pela atividade antimicrobiana direta ou por ativação de

mecanismos de defesa na planta. Os sintomas do crestamento bacteriano comum em feijoeiro avaliados podem ser visualizados na Figura 9, que apresenta trifólios com leões necróticas da doença dez dias após a inoculação com a bactéria.

Figura 9. Sintomas do crestamento bacteriano comum em plantas de feijoeiro aos dez dias após a inoculação da bactéria.



Toillier et al. (2008) em seu estudo incluíram avaliações *in vivo* da severidade do crestamento bacteriano comum e da atividade de enzimas de defesa, com uso de extrato aquoso de micélio, basidiocarpo e filtrado do cogumelo *P. sanguineus* a 5 e 10%. Os resultados indicaram potencial dos extratos para controle da *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, com redução de 56% da severidade, que pode ter ocorrido tanto por atividade antimicrobiana direta, quanto por indução de resistência, principalmente pela ativação das enzimas de defesa peroxidase e polifenoloxidase.

Vigo-Schultz et al. (2008) verificaram que os tratamentos com tintura etanólica de erva cidreira e os produtos piraclostrobina e acibenzolar-S-metil reduziram a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) de folhas de feijoeiro inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Os autores apontam que isto pode estar relacionado com a indução de resistência, visto que esses folíolos também apresentaram os maiores teores de polifenoloxidase e peroxidase.

Em relação aos estudos *in vivo* com extratos de própolis, Pereira, Maia e Paula (2014) avaliaram o EEP sobre a severidade da doença fúngica antracnose, crescimento e a produtividade da cultivar de feijoeiro carioca IPR-139. Concluí-se que não houve influência na altura, número de folhas e área foliar das plantas,

enquanto a concentração de 4% reduziu a severidade da doença em até 63%, aumentos teores de nutrientes nas folhas e a produtividade em 33%.

Assi (2005) avaliando extrato aquoso de basidiocarpo de *Pycnoporus sanguineus* sobre a antracnose em feijoeiro verificou redução na concentração de 20% próxima ao controle químico, possivelmente pela presença da alta atividade da peroxidase no dia da inoculação do fungo.

Os extratos etanólicos de própolis reduziram a severidade do crestamento bacteriano comum por atividade antibacteriana direta e/ou por ativação de mecanismos de defesa vegetal, visto que os experimentos *in vitro* demonstraram eficiência da própolis tanto na atividade direta sobre a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, quanto na indução de faseolina em feijoeiro.

5 CONCLUSÃO

Os extratos etanólicos de própolis de diferentes regiões do Paraná apresentam efeito antimicrobiano direto sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e também induzem o acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro quando não autoclavado.

O extrato etanólico de própolis apresenta efeito protetor local e sistêmico em plantas de feijoeiro ao crestamento bacteriano comum, reduzindo a severidade da doença.

Embora os resultados tenham sido positivos, ainda há necessidade de estudos mais aprofundados sobre a ação da própolis nas plantas e os compostos que atuam de fato no controle direto ou indução de resistência.

A própolis além de ser um produto natural que não prejudica a saúde humana e o ambiente, é fácil de ser produzida e explorada, principalmente por pequenos agricultores que são os principais beneficiados com o controle alternativo de doenças.

REFERÊNCIAS

- ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante**. 2005. 186 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A.M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in Plant Science**. v.17, n. 2, fev. 2012.
- AMARANTE, J.F. **Composição química e atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis frente a isolados de *Staphylococcus spp.*, obtidos de mastite bovina**. 2011. 56 f.. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2011.
- ANDRADE, N.P.C. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos de própolis de Três estados brasileiros sobre *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.1, p.9-15, jan./mar., 2012.
- ANDROCIOLO, H.G. et al. Produtos alternativos no controle da *Hemileia vastatrix* (Berkeley & Broome) e *Cercospora coffeicola* (Berkeley & Cooke) em cafeeiros. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 187-197, maio/ago. 2012.
- ARRUDA, R.S. et al.. Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 2, 2012.
- ASSI, L. **Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus***. 2005. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2005.
- BALDIN, D. et. al. Extrato etanólico de própolis na indução de fitoalexinas em sorgo e na atividade antifúngica sobre *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 8., 2013. **Anais...** Porto Alegre: ABA, 2013. Disponível em: <http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/cad/article/viewFile/14607/9551>. Acesso em: 12 abr. 2014.
- BAILEY, J.A.; BURDEN, R.S. Biochemical changes and phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* following cellular browning caused by tobacco necrosis virus. **Physiological Plant Pathology**, v.3, n.1, p.171-177, 1983.
- BARBOSA, M. de S.; VIEIRA, G.H. da C. Potencial da própolis no controle do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* causador de doenças em hortaliças. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., 2012, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: UFMS, 2012. Disponível em: <<http://periodicos.uems.br/novo/index.php/enic/article/view/1831>>. Acesso em: 22 set. 2014.

BARBOSA, M. de S. et al. Uso da própolis no controle *in vitro* da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* causadora da mastite em vacas leiteiras. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v.71, n.2, p.122-126, 2014.

BIANCHINI, A. et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia II – Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 336-337. 2005.

BIANCHINI, L. BEBENDO, I.P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 1, Jan./Apr. 1998.

BISPO JUNIOR, W. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 03-10, jan./jun. 2012.

BRAND, S.C. et al. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.9, p.1881-1887, set. 2010.

BREGAGNOLI, F.C.R. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. 2006, 76 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

CASTRO, R. M. **Uso da própolis no controle da ferrugem e Cercosporiose no cafeeiro**. 2010. 38p. Trabalho de conclusão do curso superior de tecnologia em cafeicultura (graduação)-Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais-Campus Muzambinho, 2010. Disponível em: <http://www.muz.ifsuldeminas.edu.br/attachments/732_rubens%20castro.pdf>. Acesso em: 22 set. 2014.

CAVALCANTI, L.S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263p.

CONAB. **Série histórica da produtividade de grãos**. 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 05 abr. 2014.

DAL'MASO, E.G. et al. Eficiência de extratos hidroalcoólicos na inibição de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 45., 2012, Manaus. **Anais...** Manaus: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2012. Disponível em: <<http://webftp.cpaa.embrapa.br/site/Trabalhos/82.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

DIAZ, C.G. **Avaliação de danos causados por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2000. 79 p. (Tese de Doutorado) - Piracicaba. Universidade de São Paulo, ESALQ, 2000.

DIXON, R.A. et al. Phytoalexin induction in french bean: intercellular transmission of elicitation in cell suspension cultures and hypocotyl sections of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 71, n. 2, p. 251-256, 1983.

- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS (Brasil). Embrapa Arroz e Feijão. **Cultivo do feijão irrigado na região Noroeste de Minas Gerais**. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/>>. Acesso em: 05 abr. 2014.
- FAOSTAT (2012). Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. **Production de produits alimentaires et agricoles**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es&country=21>>. Acesso em: 05 abr. 2014.
- FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.294-297, jan-fev, 2006.
- FIGUEIREDO, E. et al. Determinação da diluição inibitória máxima de um enxaguatório bucal à base de própolis e extratos vegetais. In : REUNIÃO CIENTÍFICA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS, 16, 1999, Águas de São Pedro. **Anais...** São Paulo : SBPqO, 1999. Disponível em: <http://www.sbpqo.org.br/resumos/1999_b.html>. Acesso em: 07 maio 2014.
- FISCHER, G. et al. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.2, p.247-253, abr./jun. 2008.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.
- GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, p.159-160, 1990.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J.D.G. Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. **The Plant Cell**, v. 8, 1773-1791, out. 1996.
- JOHAL, C.S. et al. Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant-fungal interactions. **Canadian Journal Botany**, v. 73, n. 1, p. 468-474, 1995.
- KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas, v. 2. São Paulo: Editora Ceres, 2005. 275p.
- KUHN, O.J. et. al. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 13-20, jan./mar. 2006.
- LIBERATO, M.C.T.C. et al. Atividade antimicrobiana dos extratos de própolis de Alto Santo, Mombaça, Crato e Beberibe – Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA; 50.; 2010; Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Associação Brasileira de Química, 2010. Disponível em:<<http://www.abq.org.br/cbq/2010/trabalhos/7/7-30-6020.htm>>. Acesso em: 22 set. 2014

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 347-349, 2006.

MAPA. **Perfil do feijão no Brasil**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>>. Acesso em: 5 abr. 2014.

MARINI, D. et. al. Efeito antifúngico de extratos alcoólicos de própolis sobre patógenos da videira. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.2, p.305-308, 2012.

MATIELLO, J.; BONALDO, S.M. Atividade elicitora de fitoalexinas em soja e sorgo por extratos e tinturas de espécies medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, 2013.

MAZARO, S.M. **Indução de resistência a doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007, 105 p. Tese (Doutorado na área de Produção Vegetal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MAZARO, S.M. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciencia Rural**, v.38; n.7; out. 2008.

MEDEIROS, C.A.B. et al. Controle alternativo de requeima (*Phytophthora infestans*) em batata cultivada em sistema de base ecológica. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, jul./ago. 2008.

MENESES, E. A.; DURANGO, D. L.; GARCÍA, C. M. Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from colombian propolis. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2011-2017, 2009.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.405-411, jul./set. 2005.

MORAES, W.B. et al. Aplicação foliar de fungicidas e produtos alternativos reduz a severidade do oídio do tomateiro. **Nucleus**, v.8, n.2, out. 2011.

NOGUEIRA, M.A. et. al. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p.93-97, 2007.

OLIVEIRA, M.A. et. al. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato aquoso de Própolis. In: CONGRESSO CIENTÍFICO UNIARARAS, 5., 2010, Araras. **Anais...** Araras: Uniararas, 2010. Disponível em: <http://nourau.uniararas.br/pt_BR/document/list.php?tid=54>. Acesso em: 12 abr. 2014.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia I - Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 593-633. 2011.

PEREIRA, C. S. et al. Controle da cercosporiose e da ferrugem do cafeeiro com extrato etanólico de própolis. **Revista Ceres**, v. 55, n. 5, p. 369-376, 2008.

PEREIRA, C. S.; SOUZA, F.L.F.; GODOY, C.A.. Extrato etanólico de própolis no controle da cercosporiose e no desenvolvimento de mudas de cafeeiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 1, p. 170-178, 2013.

PEREIRA, C.S.; MAIA, L.F.P.; PAULA, F.S. Aplicação de extrato etanólico de própolis no crescimento e produtividade do feijoeiro comum. **Revista Ceres**, v. 61, n. 1, jan./fev. 2014.

PINTO, L. de M. A.; PRADO, N.R.T.; CARVALHO, L.B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.8, n.3, p.76 - 100, 2011. Disponível em: <<http://revistas.ufg.br/index.php/REF/article/viewFile/15805/9701>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

PRADO, R.J. et al. Uso de extrato etanólico de própolis como método alternativo no controle da mela do feijoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 45., 2012, Manaus. **Anais...** Manaus: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2012. Disponível em: <<http://webftp.cpaembrapa.br/site/Trabalhos/894.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2014.

REGALADO, F.F. **Ação da própolis de *Apis mellifera* no controle do risco de cárie dentária e gengivite em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico**. 2009, 82 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV. 2001, 279p.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 54-56, 2003.

SFORCIN, J.M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v.73, p. 243-249, nov. 2000.

SILVA, A.F. **Própolis: caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante**. 2004, 126 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

SILVA, F. de A. S. **Assistat**. Versão 7.6 beta (2013). Disponível em: <<http://www.assistat.com/indexp.html>>. Acesso em: 22 set. 2014.

SILVA, R.F., PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, n.32, p.189-196, 2007.

SOUZA, G.R. et al. Sensibilidade *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* ao óleo essencial de *Lippia microphylla*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 45., 2012, Manaus. **Anais...** Manaus: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2012. Disponível em: <<http://webftp.cpaa.embrapa.br/site/Trabalhos/878.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p 18-46, 2011.

STEPHANI, R.; SOUZA, A.B.PERRONE, I.T. Proteínas. **Food Ingredients Brasil**, n. 22, 2012.

TOILLIER, S.L. **Controle de crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnoporus sanguineus***. 2008. 59 f.. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2008.

VALE, F.X.R. et al. **Quantificação de doenças - Quant** versão 1.0.1. Viçosa: UFV. 2001. Software.

VARGAS et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p. 159-163, 2004.

VIGO-SCHULTZ, S.C. et al.. **Ação de tinturas etanólicas e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência ao crestamento bacteriano comum do feijoeiro**. 2008. 86 f.. Tese (Doutorado em Agronomia – Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp, Botucatu, 2008.

YILDIRIM, Z. et al. Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. **Pharmacological Research**, v. 49, n.3, p. 287-292, mar.2004.