

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA COM ÊNFASE EM AGROECOLOGIA**

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE NO CONTROLE DE
BACTERIOSES DO FEIJOEIRO**

**JONAS MARCELO JASKI
DR. GILMAR FRANZENER**

Relatório Final

**LARANJEIRAS DO SUL
2015**

JONAS MARCELO JASKI

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE NO CONTROLE DE
BACTERIOSES DO FEIJOEIRO**

Relatório final apresentando os resultados do projeto de pesquisa aprovado no edital n. 464/UFFS/2014, para avaliação pelo comitê assessor de pesquisa da UFFS.

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Franzener
Grupo de pesquisa: Agroecologia
Linha de pesquisa: Sistema de produção agroecológica

LARANJEIRAS DO SUL

2015

RESUMO

Uma substância que tem merecido muitos estudos nos últimos anos na área médica e farmacológica é a própolis, resina acumulada por abelhas. Embora tenha comprovada ação terapêutica, são escassos os estudos da própolis no controle de doenças em plantas, e praticamente inexistentes com a própolis verde. Assim, esse trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, indutora de fitoalexinas e protetora em plantas de feijoeiro às duas principais bacterioses da cultura, crestamento bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e o fogo selvagem (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*), considerados patossistemas muito importantes em ensaios dessa natureza. Foi avaliado o extrato etanólico de própolis verde nas concentrações de 0,1, 0,5, 1, 2,5 e 5%. O extrato etanólico de própolis verde foi avaliado nas concentrações: 0,1; 0,5; 1; 2,5 e 5% com duas testemunhas, água destilada e álcool 1%. Foram conduzidos ensaios de atividade antimicrobiana sobre os fitopatógenos, indução de fitoalexinas, efeito local e sistêmico sobre a severidade das bacterioses do feijoeiro. Ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. A própolis verde apresentou atividade antimicrobiana sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *P. syringae* pv. *tabaci* ocasionando drástica redução do desenvolvimento das duas bactérias e também induziu acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro, com aumento proporcional ao aumento da concentração do extrato. Ocorreu redução da área lesionada em folhas de feijoeiro tratadas com o extrato, com efeito local e sistêmico. A enzima polifenoloxidase foi ativada pela própolis verde a 5%, tendo ponto máximo de ativação 62,5 horas após a aplicação no primeiro trifólio. Houve aumento linear da produção da fenilalanina amônia-liase em plantas tratadas com própolis verde. O efeito para as duas enzimas foi local e sistêmico nas plantas. Conclui-se que a própolis verde demonstra grande potencial no controle do crestamento bacteriano e do fogo selvagem em feijoeiro.

Palavras-chave: Controle alternativo, fogo selvagem, crestamento bacteriano.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS	6
2.1 OBJETIVO GERAL	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
3.1 BACTERIOSES DO FEIJOEIRO.....	6
3.2 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM PLANTAS.....	7
3.3 PRÓPOLIS.....	9
3.3.1 Própolis verde	10
4 MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS.....	12
4.2 ISOLAMENTO, MANUTENÇÃO E PREPARO DO INÓCULO DOS FITOPATÓGENOS	12
4.3 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	13
4.4 ENSAIO DE INDUÇÃO DE FITOALEXINAS.....	14
4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR EM PLANTAS DE FEIJOEIRO	14
4.6 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA EM PLANTAS DE FEIJOEIRO.....	15
4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, TESTEMUNHAS E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	17
5.2 ENSAIO DE INDUÇÃO DE FITOALEXINAS.....	20
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR EM PLANTAS DE FEIJOEIRO	21
5.4 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA EM PLANTAS DE FEIJOEIRO.....	24
6 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXOS	1

1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta grande importância para agricultura familiar e para a soberania alimentar, sendo uma das principais leguminosas cultivadas no Brasil (GODINHO et al., 1998). O grão possui comprovadas propriedades nutritivas e terapêuticas, sendo desejável em dietas de combate à fome e à desnutrição (AIDAR, 2005).

As doenças ocorrem com frequência na cultura do feijoeiro, muitas vezes limitando a produção, dentre elas estão as doenças bacterianas crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e fogo selvagem (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*).

Essas doenças são de difícil controle devido ao cultivo do feijoeiro ser realizado em mais de uma época do ano, a dificuldade de obtenção de cultivares resistentes e o controle químico de baixa eficiência (VALARINI; MENTEN, 1992). Para diminuir a infestação das doenças deve-se utilizar sementes certificadas, porém na agricultura de subsistência os agricultores utilizam as sementes próprias, facilitando a perpetuação.

O controle químico favorece o surgimento de isolados resistentes, além de seu uso ser prejudicial para a sociedade e para meio ambiente devido à poluição causada pelos resíduos, como contaminação de alimentos e intoxicação de homens e animais. Esses efeitos têm levado a busca por métodos alternativos de controle de doenças de plantas (GHINI; KIMATI, 2000; SILVA, et al., 2010).

Dentre as substâncias com potencial antimicrobiano está a própolis, que é uma mistura complexa de substâncias que as abelhas coletam de várias plantas, elaboram e depositam em suas colmeias. A própolis verde é um dos tipos de própolis, extraída pelas abelhas principalmente a partir da planta conhecida como vassoura (*Baccharis dracunculifolia* DC.) e tem mostrado diversas propriedades medicinais, no entanto, informações de potencial efeito na proteção de plantas são praticamente inexistentes.

A própolis verde demonstrou atividade antibacteriana *in vitro* sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* (JARDIM, et al., 2014) e atividade antifúngica sobre *Candida albicans* (ABREU, 2008)

Por ser de fácil obtenção, podendo ser produzida pelas abelhas na própria unidade de produção familiar, a própolis pode ser uma alternativa para os pequenos

produtores rurais no controle de bactérias fitopatogênicas. Tendo em vista que o controle das doenças bacterianas é difícil e até mesmo o controle químico é mais dificultado, acredita-se que a própolis verde seja uma alternativa para o controle do cretamento bacteriano comum e do fogo selvagem no feijoeiro.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o conhecimento sobre o potencial da própolis verde como prática ecológica no controle alternativo de bacterioses do feijoeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a atividade antimicrobiana direta do extrato etanólico de própolis verde sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*;
- b) Avaliar o efeito da própolis verde em induzir a fitoalexina faseolina em feijoeiro;
- c) Avaliar o efeito protetor de própolis verde no controle do fogo selvagem e do cretamento bacteriano em plantas de feijoeiro.
- d) Avaliar o efeito da própolis verde na indução de enzimas de defesa do feijoeiro.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 BACTERIOSES DO FEIJOEIRO

A cultura do feijoeiro é difundida em todos os estados brasileiros, cultivada nos mais variados graus de tecnificação, desde cultura de subsistência até as de alta tecnologia (TORRES et al., 2009), sendo uma das principais leguminosas cultivadas no Brasil, largamente utilizada como fonte alimentar, apresentando grande importância para agricultura familiar e soberania alimentar (GODINHO et al., 1998).

Um dos principais fatores responsáveis pela baixa produtividade do feijoeiro é a ocorrência de doenças, que limitam a produção e reduzem a qualidade fisiológica, sanitária, nutricional e comercial. As doenças mais importantes de origem bacteriana são: crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith, 1897) e o fogo selvagem causado por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wolf & Foster) Young et al. (FERNANDES; SOUZA; RAMALHO, 2005).

Os sintomas do crestamento bacteriano ocorrem em toda a parte aérea da planta, o sintoma mais característico ocorre nas folhas, as quais apresentam manchas encharcadas, que aumentam e progridem para necróticas. As lesões necróticas apresentam um halo amarelado ao redor (SAETTLER, 1991). É comum que as lesões ocorram na parte marginal das folhas e progridam para o centro dos folíolos (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

Os sintomas típicos do fogo selvagem são manchas necróticas de cor marrom-clara, circundadas por pronunciados halos amarelados de margens bem definidas nas folhas. As lesões podem aumentar e causar crestamento foliar. Ocorre amarelecimento sistêmico e deformação de folíolos. Os sintomas podem ser confundidos com os do crestamento bacteriano comum, diferenciado pelo halo amarelado mais pronunciado no fogo selvagem (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

3.2 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM PLANTAS

O desenvolvimento de métodos alternativos de controle de doenças de plantas tem o objetivo de oferecer alternativas para diminuir a dependência dos agrotóxicos e contribuir para as práticas de agricultura adequadas às novas exigências de qualidade ambiental e de qualidade de vida da sociedade (BETTIOL, 2015).

O controle alternativo de doenças de plantas envolve o controle biológico, a indução de resistência e o uso de extratos naturais com propriedades antimicrobianas e ou indutoras de resistência (STANGARLIN et al., 2008). O controle biológico pode ser definido como o controle de um microrganismo pela ação de outro microrganismo antagônico (COOK & BAKER, 1983). Já a indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes nas plantas em

resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (RESENDE et al., 2001; CAVALCANTI et al., 2005).

Diversos extratos naturais, como derivados de plantas e microrganismos, têm mostrado potencial para o controle alternativo de doenças em plantas, ou por sua atividade direta sobre o fitopatógeno ou pela indução de resistência. (FRANZENER et al., 2003; STANGARLIN et al., 2008; SILVA et al., 2007).

As plantas são expostas a vários patógenos, como resultado apresentam um complexo mecanismo de defesa para reconhecer e se proteger, através da montagem de barreiras que restringem a invasão do patógeno (SBALCHEIRO, 2006).

Os estresses físico, químico e biológico são capazes de produzir esta resposta, atuando como indutores de resistência. Estes se ligam a receptores específicos na membrana celular vegetal, desencadeando mudanças metabólicas em seu interior, como a produção das fitoalexinas (STANGARLIN et al., 2010; GOUVEA et al., 2011).

As fitoalexinas são substâncias com ampla ação antimicrobiana pertencentes a diversos grupos químicos, dentre eles os isoflavonóides, alcalóides, flavonóides, terpenóides, cumarinas, sulfitos, glucosídios, taninos, purinas e ácidos graxos orgânicos. Estes compostos podem limitar o crescimento do patógeno. É provável também que as fitoalexinas atuem de forma direta sobre o agressor e causem a morte do tecido infectado (DEFFUNE, 2001), sendo capazes de impedir a atividade de agentes patogênicos (PURKAYASTHA, 1995)

As plantas possuem enzimas que atuam na defesa contra os fitopatógenos. A polifenoloxidase (PLO) tem grande importância, é envolvida nos mecanismos de defesa ou na senescência e geralmente é elevada em tecidos infectados (AGRIOS, 1997). A enzima também é responsável pela formação de quinonas e essas apresentam atividade antimicrobiana (MAYER; STAPLES, 2002).

A fenilalanina amônio-lisase (FAL) é responsável por catalisar a reação de eliminação não oxidativa da amônia da L-fenilalanina, formando o ácido *trans*-cinâmico (JONES, 1984). O ácido *trans*-cinâmico é precursor de compostos fenilpropanóides que realizam diversas funções nas plantas (RITTER; SCHULZ, 2004), dentre as funções o suporte mecânico da planta pela lignina e produção de antioxidantes (DIXON; PAIVA, 1995). O ácido *trans*-cinâmico também é precursor de flavonoides, que são moléculas sinalizadoras nas plantas (WEISSHAAR; JENKINS,

1998). A FAL ainda é importante como indicadora de estresses nas plantas, como exemplo a ação dos fitopatógenos (RITTER; SCHULZ, 2004).

3.3 PRÓPOLIS

A própolis consiste em uma mistura complexa de substâncias que as abelhas (*Apis mellifera* L.) coletam de várias plantas, elaboram e depositam em suas colmeias (LONGHINI et al., 2007). As abelhas utilizam a própolis para vedar frestas, recobrir superfícies irregulares ou insetos e eventuais invasores.

A própolis também protege a colônia de doenças devido a suas propriedades antimicrobianas (SALATINO et al., 2005). A composição química da própolis e sua sazonalidade está bem documentada. Estudos nesse sentido tem sido realizado em diferentes regiões do mundo (MARTIN; PILEGGI, 2004; SALATINO et al., 2005; SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010; VALENCIA et al., 2012), a composição mais comum 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, no entanto pode haver muitas variações, visto que é composta por mistura de substâncias naturais (ADELMANN, 2005).

Devido a composição química complexa, várias são as atividades biológicas relatadas na literatura para própolis, entre elas antimicrobiana (CABRAL et al., 2009; LONGHINI et al., 2007; MIORIN et al., 2003), citotóxica, anti-inflamatória (PEREIRA et al., 2002), imunomodulatória e antioxidante (MOHAMMADZADEH et al., 2007).

A própolis tem despertado grande interesse da sociedade nas últimas décadas por suas inúmeras propriedades terapêuticas e farmacológicas (SFORCIN, 2009), tendo merecido muitos e recentes estudos na área médica e farmacêutica. O estudo da própolis tem despertado tanto interesse nas últimas décadas que estudos também tem sido realizados para aumentar a produção e a qualidade da própolis (MANRIQUE; SOARES, 2002).

Recentemente estudos tem sido realizados para avaliar o potencial antitumor da própolis (CHEUNG et al., 2011; SOBOČANEC et al., 2011). Resultados obtidos indicam o potencial benéfico do uso de própolis na terapia anticâncer (SULAIMAN et al., 2012). Um aspecto interessante é o fato de, embora a própolis tenha sido alvo de numerosos estudos por suas propriedades terapêuticas e farmacológicas, são

escassos os estudos e informações do potencial da própolis na proteção de plantas e seu efeito sobre a planta.

Embora escassos, alguns trabalhos tem demonstrado o efeito antimicrobiano da própolis sobre agentes fitopatogênicos. Bianchini e Bedendo (1998) observaram efeito antimicrobiano sobre algumas espécies de bactérias fitopatogênicas. Resultados promissores também foram obtidos sobre fungos causadores de podridões em pós-colheita de frutos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* (MENESES et al., 2009) e *Penicillium italicum* (YANG et al., 2011).

Alguns estudos recentes demonstram o potencial da própolis no controle de fitopatógenos, o extrato etanólico de própolis reduziu a severidade da antracnose em feijoeiro, aumentando a produtividade em até 33% em experimentos conduzidos por Pereira; Maia; Paula (2014). O extrato induziu o acúmulo de fitoalexinas em feijoeiro e sorgo (BALDIN et al., 2014). O efeito da própolis no controle pós-colheita da antracnose e parâmetros de qualidade de manga foi testada por Mattiuz et al. (2015), que mostraram a eficácia da própolis para controlar a antracnose, sendo que na concentração de 1,5% a própolis atrasou o processo de amadurecimento e melhorou a qualidade pós-colheita.

As informações sobre o efeito de própolis na aplicação em plantas ainda são restritas. Em um dos poucos trabalhos nesse sentido, Pereira et al. (2008) indicaram potencial do extrato etanólico de própolis no controle da cercosporiose e da ferrugem do cafeeiro.

3.3.1 Própolis verde

No Brasil, alguns tipos de própolis já foram caracterizados e classificados pela coloração. A classificação é feita após o processamento e análise das amostras quanto à aparência e coloração dos extratos (PARK et al., 2000). Dentre estes tipos, se encontra a própolis verde.

Considerada um produto tipicamente brasileiro (NASCIMENTO et al., 2005) e merecendo grande destaque nos últimos anos, a própolis verde é extraída pelas abelhas principalmente a partir da planta conhecida como vassoura ou alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC.), muito comum no Paraná e em grande parte do território brasileiro (SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010).

No mercado internacional a própolis verde é altamente valorizada, no Japão é amplamente consumida como suplemento alimentar na profilaxia de doenças devido as suas ótimas características organolépticas e menor teor de poluentes ambientais (SOUSA et al., 2007), nesse país movimenta setecentos milhões de dólares ao ano (NASCIMENTO, 2005).

Conhecida internacionalmente como *green propolis*, a própolis verde tem mostrando diversas propriedades medicinais, com vários estudos sobre microrganismos e em animais (CHEUNG et al., 2011; NOKUCHI et al., 2006), tendo efeito antimicrobiano comprovado sobre fungos (FERNANDES et al., 2007; ABREU, 2008) e bactérias (PINTO et al, 2001; COSTA et al., 2008; ANDRADE et al. 2012), possuindo também atividade antioxidante sobre diferentes radicais livres (FONSECA, 2007). No entanto, informações de potencial efeito na proteção de plantas são praticamente inexistentes.

Os componentes da própolis verde a 95% em etanol foram relatados por Chang et al. (2008), consistiu principalmente de ácido cinâmico e derivados, flavonóides, ácido benzóico e alguns benzoatos aromáticos não hidroxilados, ácidos e ésteres alifáticos. Esse tipo de própolis possui um teor relativamente baixo de flavonóides, estes considerados comumente como responsáveis pelas propriedades terapêuticas de própolis (PEREIRA et al., 1999).

A artepillina C é um composto da classe dos fenólicos que é o principal componente da própolis verde e possui uma grande habilidade de sequestrar radicais livres (PAREDES-GUZMAN et al., 2003).

De acordo com Nascimento et al. (2008) o composto volátil mais abundante do extrato em diclorometano de própolis verdes é o 3-prenilcinamato de alila que é facilmente detectável via cromatografia gasosa, servindo como marcador químico deste tipo de própolis. Amostras de própolis marrons, preta e vermelha, oriundas de regiões onde há alecrim-do-campo, também contém o 3-prenilcinamato de alila em diferentes concentrações.

No estudo da própolis verde contra microrganismos Franesi (2007), verificou efetividade contra *Trichopyton rubrum*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Os extratos alcoólicos de própolis verde e vermelha apresentaram atividade antifúngica frente a *Trichophyton rubrum* (SIQUEIRA, 2008). A própolis brasileira também possui ação contra diferentes espécies de *Candida* (UZEL et al., 2005). O

extrato etanólico de própolis verde também mostrou efeito virucida, antibacteriano e antifúngico quando utilizado no tratamento de ovos de galinha embrionados (VILELA, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus de Laranjeiras do Sul, no Laboratório de Fitopatologia e na casa de vegetação localizada na área experimental do Campus.

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS

Foi utilizada própolis verde comercial, da região de Ribeirão Preto - SP, contendo extrato seco mínimo 11% p/v, com 30% de própolis verde *in natura*. A própolis foi avaliada na forma de extrato etanólico que consiste em uma das principais formas de emprego dessa resina. A partir desse extrato foram preparadas as concentrações de 0, 0,1, 0,5, 1, 2,5 e 5% e em seguida utilizadas nos bioensaios.

4.2 ISOLAMENTO, MANUTENÇÃO E PREPARO DO INÓCULO DOS FITOPATÓGENOS

As bactérias *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *P. syringae* pv. *tabaci* foram isoladas de folhas sintomáticas de feijoeiro cultivado no município de Laranjeiras do Sul-PR (Figura 1). O isolamento e cultivo das bactérias foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente (5 g peptona; 3 g extrato de carne; 15 g ágar bacteriológico e 1000 mL de água destilada), sendo mantidas a 28 °C em escuro por 48 horas quando foram utilizadas para preparo do inóculo (Figura 2). Para obtenção do inóculo foi preparada suspensão bacteriana em solução salina (NaCl a 0,85%) com concentração ajustada para 1×10^8 UFC mL⁻¹, com base em curva de absorbância a 580 nm. A inoculação foi realizada através de aspersão das plantas com o inóculo, sendo mantidas em câmara úmida por seis horas antes e 24 horas após a inoculação, com umidade relativa de 100% (ROMEIRO, 2001). A manutenção das bactérias por períodos prolongados foi realizada através de inoculação e re-isolamento em plantas de feijoeiro.

Figura 1: Folhas sintomáticas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (A) e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (B), utilizadas para o isolamento dos patógenos.

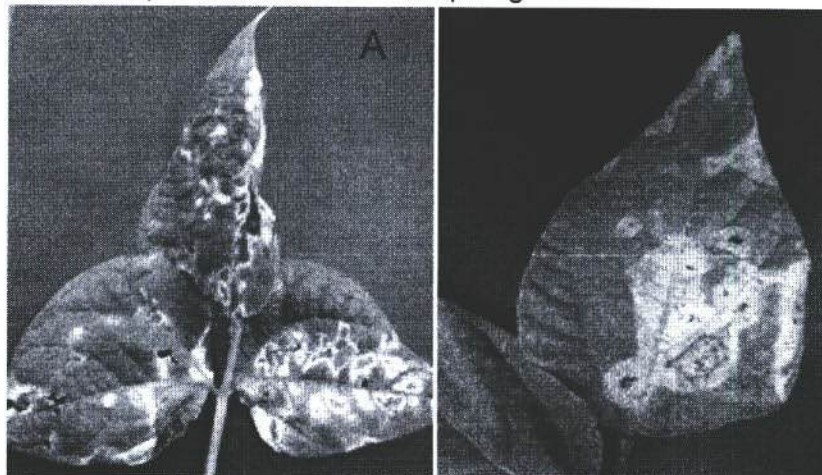
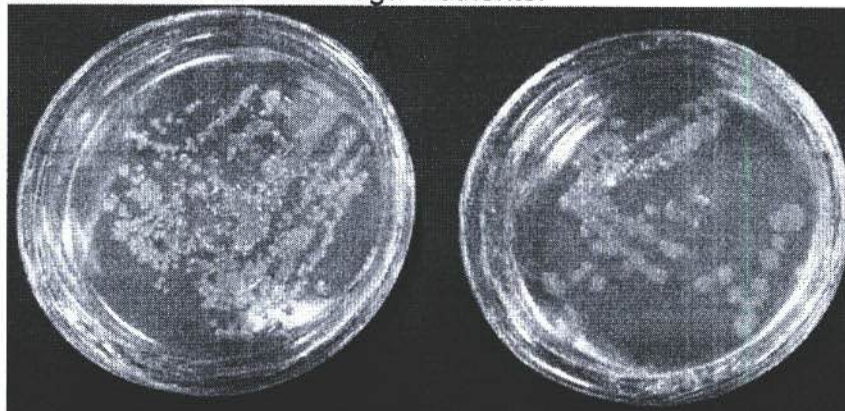


Figura 2: Inóculo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (A) e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, (B) em placas de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente.



4.3 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Ensaio de atividade direta dos extratos de própolis sobre os fitopatógenos em estudo foram desenvolvidos como parâmetro para interpretação da atividade no controle das doenças. Para o experimento de atividade antimicrobiana sobre os isolados bacterianos, tubos de ensaio estéreis (capacidade 10 mL) contendo concentrações iguais para meio de cultura caldo nutriente receberam as

concentrações de 0, 0,1, 0,5, 1, 2,5 e 5% dos extratos de própolis, totalizando o volume final de 5 mL por tubo. Cada tubo recebeu 100 µL de suspensão bacteriana com 10^8 UFC mL⁻¹ e foram mantidos sob agitação durante 48 horas a 27°C quando foi determinada a absorbância a 580 nm. Nesta determinação cada tratamento teve como amostra de referência (branco) uma repetição sem a bactéria.

4.4 ENSAIO DE INDUÇÃO DE FITOALEXINAS

A determinação da faseolina foi realizada conforme a metodologia proposta por Dixon et al. (1983), com algumas modificações. Sementes de feijão variedade Crioula carioca foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada estéril, semeadas em areia esterilizada por autoclavagem e mantidas em câmara climatizada a 24°C em escuro por sete dias. Após esse período, 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. Sobre os hipocótilos, serão pulverizados os tratamentos. As placas de Petri foram mantidas a 25°C em escuro por 48 horas. Após esse período os hipocótilos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de etanol 70%, sendo estes 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 medida em espectrofotômetro a 280 nm.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR EM PLANTAS DE FEIJOEIRO

Para avaliar o efeito protetor do extrato etanólico da própolis verde, plantas de feijoeiro cv. Crioula carioca foram cultivadas em vasos com capacidade para dois litros contendo mistura de solo, matéria orgânica e areia, no volume de 2:1:1. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação climatizada, utilizando-se uma planta por vaso. As plantas foram utilizadas nos bioensaios quando apresentarem dois trifólios.

Os tratamentos nas concentrações de 0, 0,5, 1, 2,5 e 5%, foram aplicados por aspersão até ponto de escoamento no primeiro trifólio do feijoeiro. Após três dias,

as folhas tratadas, bem como o segundo trifólio do feijoeiro, foram inoculadas por aspersão com suspensão de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (1×10^8 UFC mL⁻¹). Após o surgimento dos sintomas (10 dias) foi avaliada a severidade da doença com auxílio do programa computacional QUANT v.1.0.1 (UFV) (VALE et al., 2001).

4.6 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA EM PLANTAS DE FEIJOEIRO

Os tratamentos para avaliação da indução de resistência e síntese de enzimas de defesa foram aplicados quando as plantas apresentaram dois trifólios verdadeiros. Os tratamentos foram 5% de extrato etanólico de própolis verde e água destilada+solução alcóolica 1%, estes foram aplicados no primeiro trifólio. Os tratamentos foram pulverizados nas plantas, até o ponto de escorrimento.

Foram coletados 8 discos foliares (2 cm de diâmetro) de cada parcela, 4 discos do trifólio tratado e 4 discos do trifólio não tratado. Os discos foram coletados 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a aplicação dos tratamentos e acondicionados em papel alumínio, imediatamente transferidos para caixa de isopor contendo gelo e em seguida mantidos a -20°C até a realização das análises bioquímicas.

As amostras de tecido foliar foram maceradas em 24 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0) contendo 1% (p/p) de PVP (Polivinil-Pirrolidona), em almofariz de porcelana. Os homogeneizados foram centrifugados a 14.000g durante 20 min a 4°C. O sobrenadante obtido (extrato enzimático) foi utilizado para a determinação da atividade enzimática. Todo o material empregado foi mantido sob refrigeração.

A atividade de polifenoloxidase foi determinada conforme a metodologia proposta por Duangmal e Apenten (1999). Para tanto, o substrato para enzima foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8). A reação foi conduzida misturando-se 800 µL do substrato e 200 µL do extrato enzimático seguida de leituras em espectrofotômetro, a 420 nm. As leituras foram realizadas de forma direta por um período de 2 min. Os resultados foram expressos em absorbância min⁻¹ mg de proteína⁻¹.

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Umesha (2006), onde 100 µL do extrato enzimático foram acrescidos de 400 µL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 µL de solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 mL de tampão Tris-HCL 0,025 M (pH

8,8)). Incubou-se essa mistura a 40°C durante 2 horas. Ao final desse período adicionaram-se 60 µL de HCl 5 M para cessar a reação, seguindo-se a leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle (100 µL de extrato enzimático e 900 µL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)), a qual foi plotada em curva padrão para ácido trans-cinâmico e expressa em mg de ácido trans-cinâmico h-1 mg proteína-1.

4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, TESTEMUNHAS E ANÁLISE DOS RESULTADOS

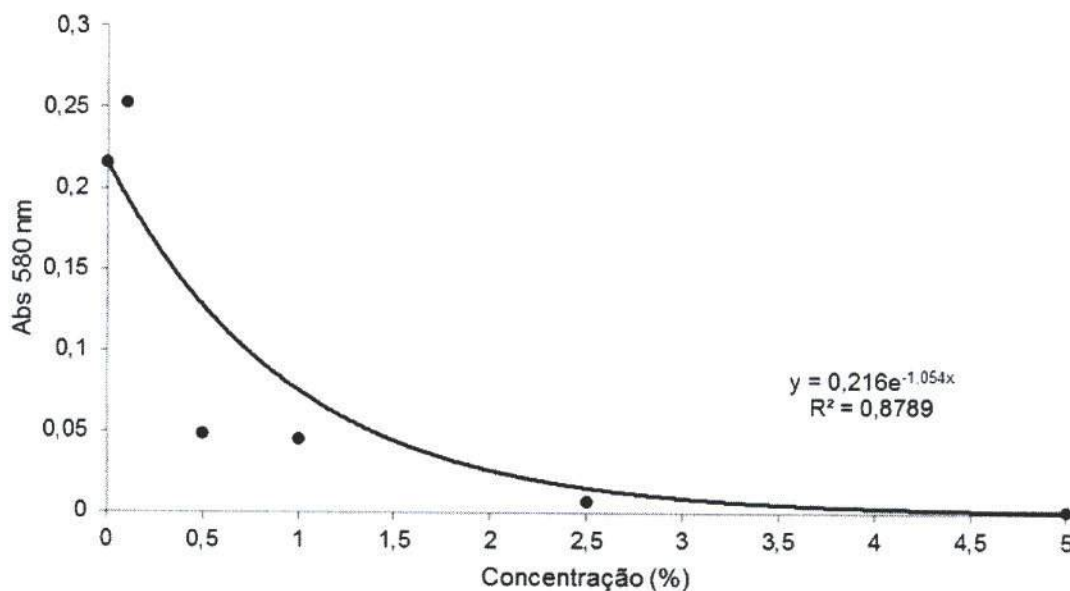
Todos ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e tiveram como tratamentos testemunha água destilada e água destilada+solução alcoólica 1%. Para análise estatística os resultados foram submetidos inicialmente a testes de normalidade e homogeneidade, sendo transformados quando necessário. Os resultados foram submetidos a análise de variância seguidos de análise de regressão para as concentrações de extratos de própolis utilizadas e teste de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade para os dados qualitativos. Análises foram realizadas com auxílio do programa computacional Sisvar (FERREIRA, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Observou-se drástica redução do desenvolvimento das duas espécies de bactérias com o aumento da concentração do extrato etanólico da própolis verde. A Figura 3 apresenta a curva exponencial referente ao desenvolvimento da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Figura 3: Atividade antimicrobiana de diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis verde sobre a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.



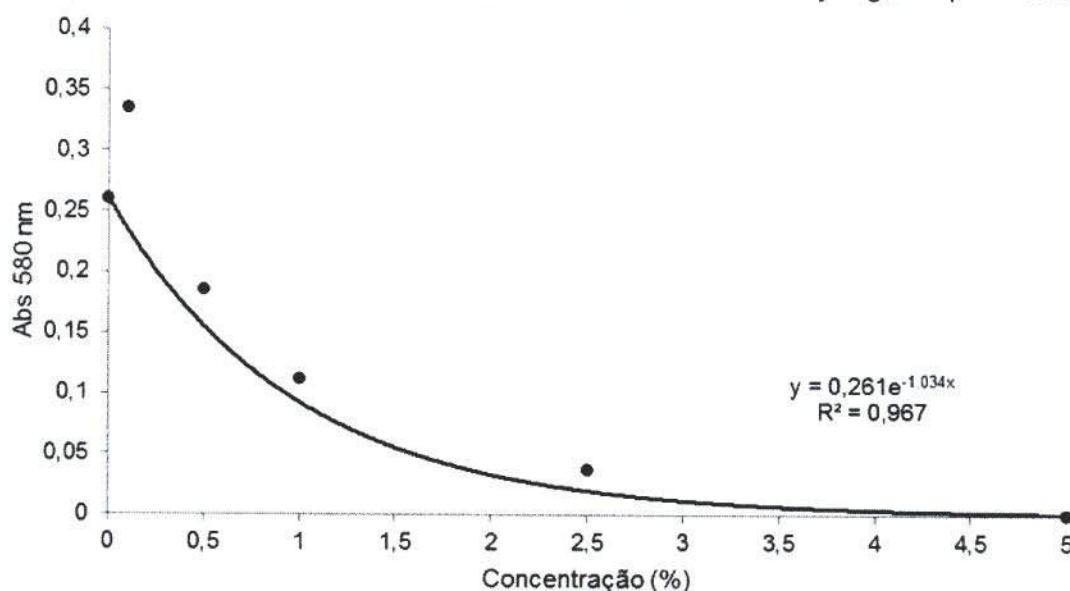
Com o aumento da concentração do extrato houve maior efeito inibitório. A curva que melhor representou os dados foi a exponencial, indicando que houve drástica inibição do crescimento bacteriano já em baixas concentrações do extrato de própolis verde, com total inibição na concentração de 5%.

Já na concentração de 0,5% a inibição foi de 77,31% em relação ao tratamento sem própolis (1% de álcool) e nas concentrações de 2,5% e 5% a inibição foi ainda mais expressiva sendo de 96,76% e 99,07%, respectivamente.

A Figura 4 mostra o efeito antimicrobiano direto do extrato etanólico da própolis verde sobre a bactéria *P. syringae* pv. *tabaci*. O efeito foi semelhante a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, onde a curva que representa o efeito antimicrobiano

também é a exponencial, mostrando que com o aumento da concentração da própolis maior foi o efeito sobre a bactéria.

Figura 4: Atividade antimicrobiana de diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis verde sobre a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.



Verificou-se expressiva inibição do crescimento da bactéria mesmo em baixas concentrações, sendo que a 2,5% o extrato de própolis reduziu 85,44% o desenvolvimento da bactéria e a concentração de 5% inibiu 99,62% em relação a testemunha. Esses resultados demonstram o expressivo efeito antimicrobiano direto da própolis verde sobre ambas fitobactérias do feijoeiro.

Estudos de atividade antimicrobiana com o uso da própolis verde ainda são escassos e sobre potenciais fitopatógenos são praticamente inexistentes. Dentre os poucos estudos, Costa et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis verde na proteção de dentes contra *Enterococcus faecalis*, o extrato da própolis verde teve grande atividade antimicrobiana quando combinada com outras substâncias testadas. Jardim et al. (2014) citados anteriormente demonstraram alto potencial antimicrobiano *in vitro* da própolis verde sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Andrade et al. (2012) testaram, *in vitro*, extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes. Os autores concluíram que a própolis verde apresentou maior potencial antimicrobiano, superior ao da própolis marrom na maioria dos isolados avaliados. Pinto et al. (2001)

verificaram efeito antimicrobiano da própolis verde sobre bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, isoladas do leite de vacas com mastite. Dentre os diferentes extratos testados pelos autores, o extrato etanólico foi o mais eficiente sobre as duas bactérias.

O potencial antifúngico foi comprovado por Abreu (2008) que demonstrou expressivo efeito do extrato etanólico da própolis verde sobre *Candida albicans*. e Fernandes et al. (2007) que avaliaram a atividade de extrato etanólico de própolis verde contra *Cryptococcus neoformans*, obtendo grande efeito inibitório do crescimento fúngico na concentração de 0,2 mg.mL⁻¹.

Em seu estudo Vilela (2010) comprovou o efeito virucida da própolis verde contra o *avipoxvirus* - APV em membrana de ovos embrionados de galinha. O mesmo autor mostrou o efeito antibacteriano e antifúngico da própolis verde, quando emergiu ovos destinados para incubação em solução com própolis, promovendo altas taxas de eclodibilidade. Nas concentrações de 2400 µg e 240 µg o extrato foi eficiente, sendo uma alternativa ao tratamento convencional com formaldeído. Esse efeito demonstra a importância do estudo com a própolis verde para os agricultores agroecológicos, que produzem no mesmo agroecossistema diversidade de espécies de plantas e animais.

Com a própolis marrom, mais comum, há maior número de estudos, e alguns voltados para agentes causais de doenças em plantas. Pereira; Maia e Paula (2014) demonstraram que o extrato etanólico de própolis reduz a severidade da antracnose do feijoeiro e que aumenta, conseqüentemente, a produtividade do feijoeiro, o extrato reduziu a área abaixo da curva de progresso da antracnose (AACPA) em 63%, em relação à do tratamento testemunha.

Contra agentes bacterianos da mastite bovina o extrato alcoólico de própolis promoveu efeito antimicrobiano sobre *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp., *in vitro* inibiu 94,4% e 85,2% dos microrganismos respectivamente, demonstrando percentuais de atuação superiores ou semelhantes aos produtos comumente utilizados na terapia dessa enfermidade (LOGUERCIO et al.2006).

A própolis marrom foi utilizada no estudo de Bianchini e Bebendo (1998), que avaliaram o efeito do extrato aquoso sobre *Agrobacterium tumefaciens* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. A 10% do extrato houve inibição total de tais organismos. Para *Erwinia chrysanthemi* houve inibição parcial e não houve efeito sobre *P. syringae* pv. *tabaci*.

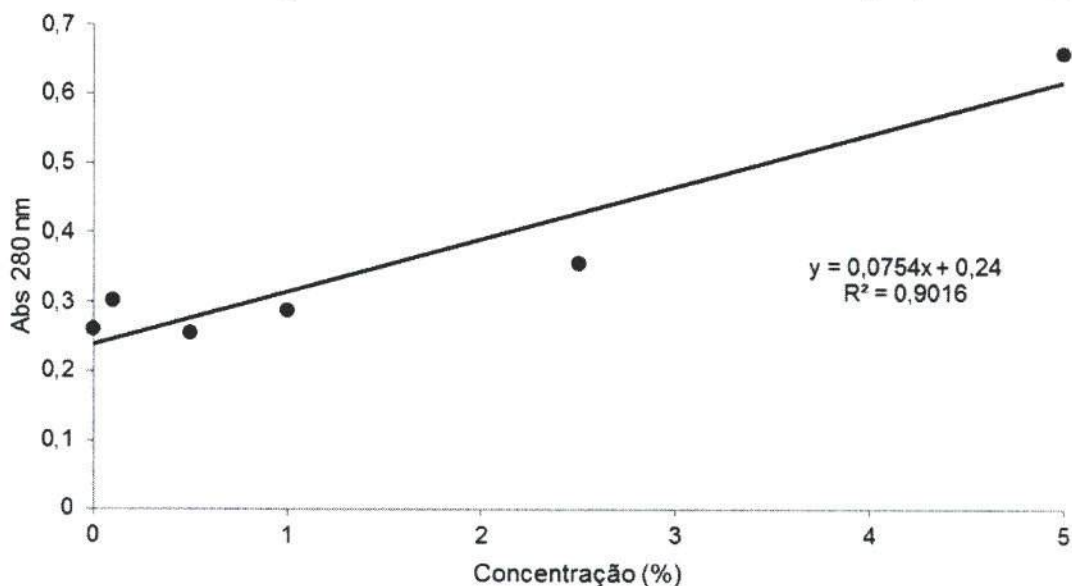
Bianchini e Bedendo (1998) ainda comprovaram que o extrato aquoso de própolis a 10% controla a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Baldin et al. (2014) testaram o extrato etanólico de própolis sobre *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e a própolis promoveu drástica redução no desenvolvimento da bactéria, mostrando efeito linear com maior atividade conforme aumento da concentração.

De acordo com Silva (2004) 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. O fato da própolis verde ser produzida pelas abelhas, na maior parte através da planta *Baccharis dracunculifolia* (SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010), pode explicar o maior efeito antimicrobiano sobre as bactérias testadas.

5.2 ENSAIO DE INDUÇÃO DE FITOALEXINAS

Na Figura 5 são apresentados os resultados referentes ao acúmulo da fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijoeiro tratados com as diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis verde. Observa-se que houve efeito significativo linear, mostrando que com o aumento da concentração da própolis, houve aumento da produção de faseolina nos hipocótilos.

Figura 5: Indução de faseolina em hipocótilos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis verde.



Na concentração de 5% de própolis verde ocorreu a maior produção de faseolina, sendo superior 151,53% em relação a concentração zero (álcool 1%).

Estudos com a própolis verde na indução de fitoalexinas ainda são praticamente inexistentes na literatura. Até mesmo com a própolis marrom existem poucos estudos. Guginski et al. (2011) verificaram o potencial do extrato não alcoólico de própolis em induzir fitoalexinas em cotilédones de soja (*Glycine max*), nas concentrações 0; 0,5; 1; 2; 4 e 8% o extrato induziu a fitoalexina gliceolina, sendo proporcional ao aumento das concentrações.

Baldin et al. (2014) testaram o potencial do extrato etanólico de própolis de três regiões do Paraná em induzir faseolina em hipocótilos de feijoeiro, os extratos induziram a síntese de faseolina de forma linear, onde maior foi o efeito com o aumento da concentração. Os estudos citados corroboram com os resultados encontrados neste trabalho, onde o aumento da produção da faseolina foi proporcional ao aumento das concentrações do extrato etanólico da própolis verde.

A indução de fitoalexinas em sorgo foi testada por Baldin et al. (2013), os resultados mostraram que o extrato etanólico de própolis induziu a síntese de fitoalexinas e o ponto de máxima atividade ocorreu na concentração de 2,9%.

Com o uso de outras substâncias, como extratos de plantas e óleos essenciais, a indução de fitoalexinas já foi comprovada. Bonaldo et al. (2005) mostraram que o extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora* induziu síntese de gliceolina em cotilédones de soja a partir de 10% do extrato. Mazaro et al. (2008) demonstraram que preparados de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) apresentam capacidade de indução de gliceolinas em cotilédones de soja, respondendo ao aumento das concentrações.

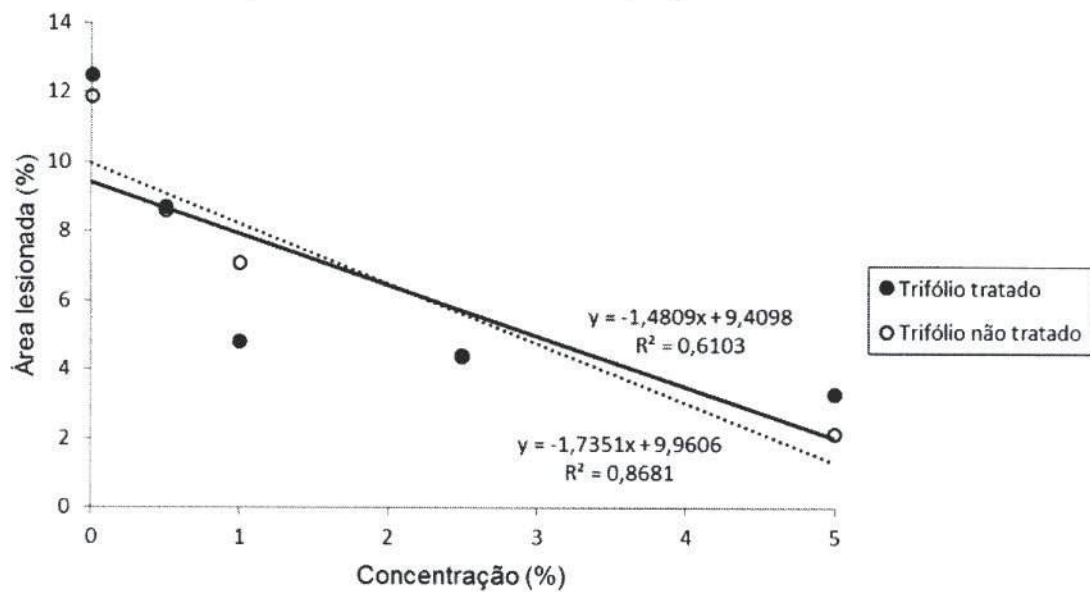
Arruda et al. (2012) observou em seu estudo que os extratos aquosos dos cogumelos *Agaricus blazei*, *Lentinula edodes* e *Pycnoporus sanguineus* induziram maior acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja. Preparados de *Calendula officinalis* L. também apresentaram capacidade de indução das gliceolinas em cotilédones de soja (MAZARO et al., 2013).

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR EM PLANTAS DE FEIJOEIRO

O efeito protetor da própolis verde em plantas de feijoeiro ao crestamento bacteriano comum (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*) é apresentado na Figura 6. Observa-se a porcentagem de área lesionada do primeiro (tratado) e do segundo

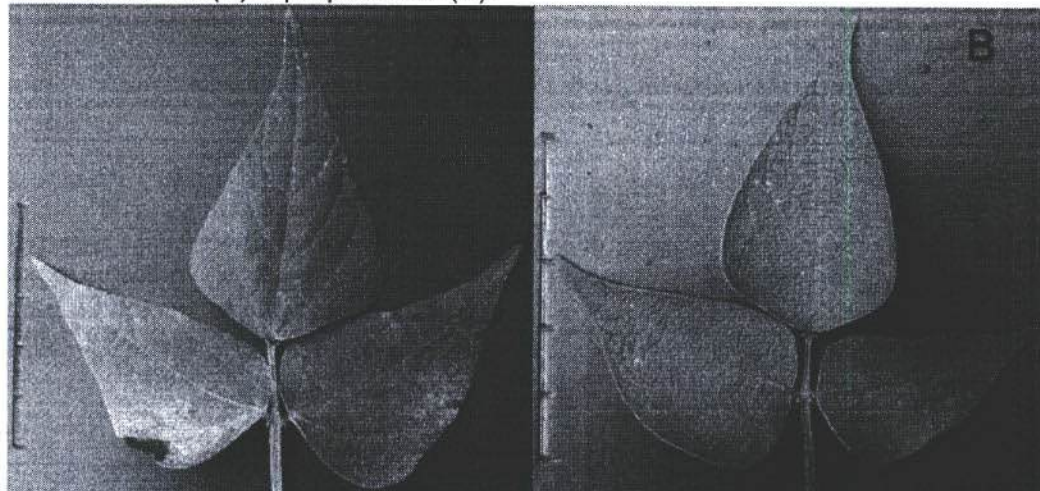
trifólio (não tratado). A porcentagem de área lesionada diminuiu quando aumentou a concentração do extrato aplicado, tanto no trifólio tratado quanto no trifólio não tratado, demonstrando o efeito sistêmico da própolis nas plantas.

Figura 6: Porcentagem de área lesionada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* no trifólio de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) tratado e não tratado por diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis verde.



Nos trifólios tratados com 5% de própolis verde, a área lesionada foi de 3,29% no primeiro e 2,16% no segundo trifólio, semelhante a concentração de 2,5% do extrato. Os sintomas avaliados estão na Figura 7, demonstrando um trifólio tratado com a testemunha álcool 1% e outro tratado com extrato etanólico de própolis verde a 5%.

Figura 7: Sintomas de crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) em trifólios de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) tratados com álcool 1% (A) e própolis 5% (B).



Foi também realizado experimento para avaliar o efeito da própolis verde na proteção de feijoeiro ao fogo selvagem causado pela bactéria (*P. syringae* pv *tabaci*), mas nesse caso a incidência e severidade da doença foi muito baixa não permitindo a obtenção de resultados significativos.

Em plantas, a própolis verde ainda é pouco estudada, merecendo maior atenção pelo alto potencial na saúde humana e animal e seu comprovado efeito antimicrobiano, dentre os estudos existentes, Pereira; Maia; Paula (2014) aplicaram o extrato etanólico de própolis marrom originária do litoral paranaense em plantas de feijoeiro e verificar o efeito sobre a severidade da antracnose, o crescimento e a produtividade. Os autores obtiveram resultados positivos, na concentração de 4% o extrato reduziu a severidade da antracnose em até 63%, aumentou os teores foliares de nitrogênio (N), magnésio (Mg), ferro (Fe), a área foliar e produtividade em até 33%. A produtividade do feijoeiro aumentou com a redução da severidade da antracnose pelo feito da aplicação do extrato.

O extrato etanólico de própolis marrom foi testado por Pereira; Souza; Godoy (2013) sobre a incidência de cercosporiose e o desenvolvimento de mudas de cafeeiro. A própolis aumentou a área foliar e o número de folhas nas plantas. Os autores atribuíram o aumento no desenvolvimento das mudas pela presença de nutrientes na própolis. Os mesmos autores mostraram redução na incidência da cercosporiose, atribuindo o controle da doença a provável formação de uma camada

de impedimento sobre as folhas com a cera da própolis e efeito indutor de resistência da resina.

Em plantas de cafeeiro em período de produção, a aplicação foliar do extrato etanólico de própolis mostrou efeito protetor, ocorreu diminuição da incidência de ferrugem, porém não reduziu a severidade das doenças (PEREIRA, 2007). Estudos nesse sentido são importantes para verificar a eficácia do extrato de própolis *in vivo*, tanto na redução da severidade das doenças quanto na produtividade das culturas.

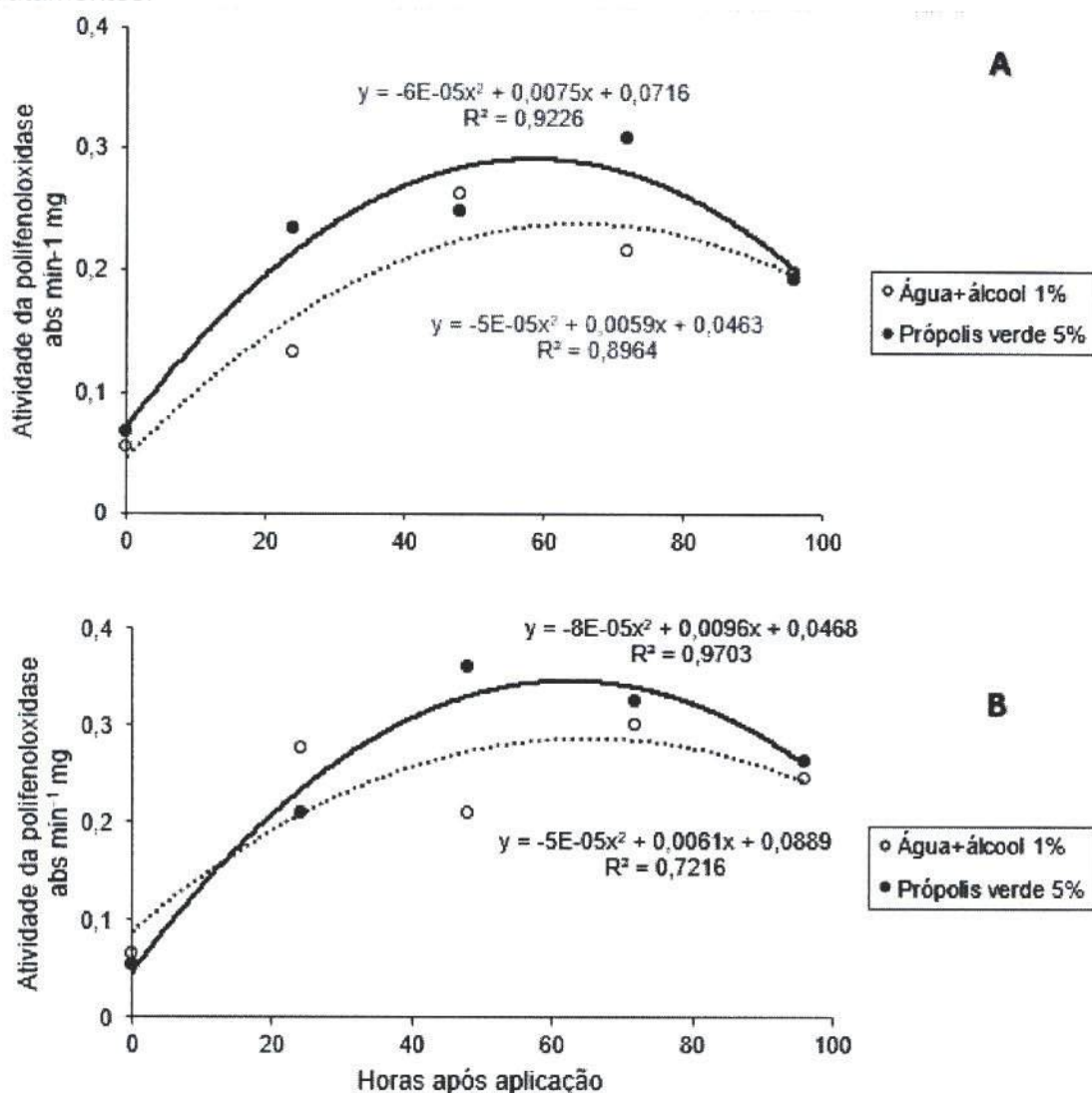
Outros produtos alternativos já foram utilizados em bioensaios nas plantas para controle de doenças. Com objetivo de avaliar o controle de pinta preta em tomateiro Balbi-Peña et al. (2006) utilizaram extratos de cúrcuma e curcumina em plantas nas condições de casa de vegetação e concluíram que os extratos são eficientes em diminuir a severidade da doença, sendo estes similares aos fungicidas cúpricos.

Extratos aquosos de cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* foram testados na proteção de plantas de tomate em condições de casa de vegetação contra *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* por Silva (2007). O autor mostrou que na concentração 10%, o extrato de *L. edodes* foi mais eficiente e diminuiu a porcentagem de folhas murchas causadas pelas duas bactérias e o peso fresco e seco das plantas e frutos foram superiores quando tratados com extrato de *A. blazei*.

5.4 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA EM PLANTAS DE FEIJOEIRO

A enzima polifenoloxidase (PFO) foi avaliada em trifólios tratados e não tratados de feijoeiro com extrato etanólico de própolis verde a 5%. Os resultados são apresentados na Figura 8. Observa-se que o extrato da própolis verde a 5% foi capaz de ativar a PFO em feijoeiro, sendo que a atividade da enzima foi semelhante quando aplicado o álcool 1%, demonstrando que possivelmente o álcool também ativa esta enzima nas plantas. O efeito foi observado no trifólio tratado, bem como no trifólio não tratado, evidenciando o efeito sistêmico tanto da própolis quanto do álcool na planta.

Figura 8: Atividade da enzima polifenoloxidase em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) no trifólio tratado (A) e não tratado (B) com extrato etanólico de própolis verde a 5% e álcool 1%, 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a aplicação dos tratamentos.



A equação significativa para todos os tratamentos foi quadrática, mostrando que a atividade máxima enzimática se situou entre 24 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos. Para própolis verde o ponto em que ocorreu a maior atividade da enzima foi 62,5 horas (0,3059 abs min⁻¹ mg) após a aplicação no primeiro trifólio e 60 horas (0,3348 abs min⁻¹ mg) no segundo trifólio. Para álcool 1% a equação mostrou ponto máximo 59 horas (0,2203 abs min⁻¹ mg) após a aplicação no primeiro trifólio. Mesmo a própolis 5% contendo baixa concentração de álcool (0,35%), o

efeito observado sobre a enzima foi superior ao do álcool 1% em alguns pontos nos gráficos.

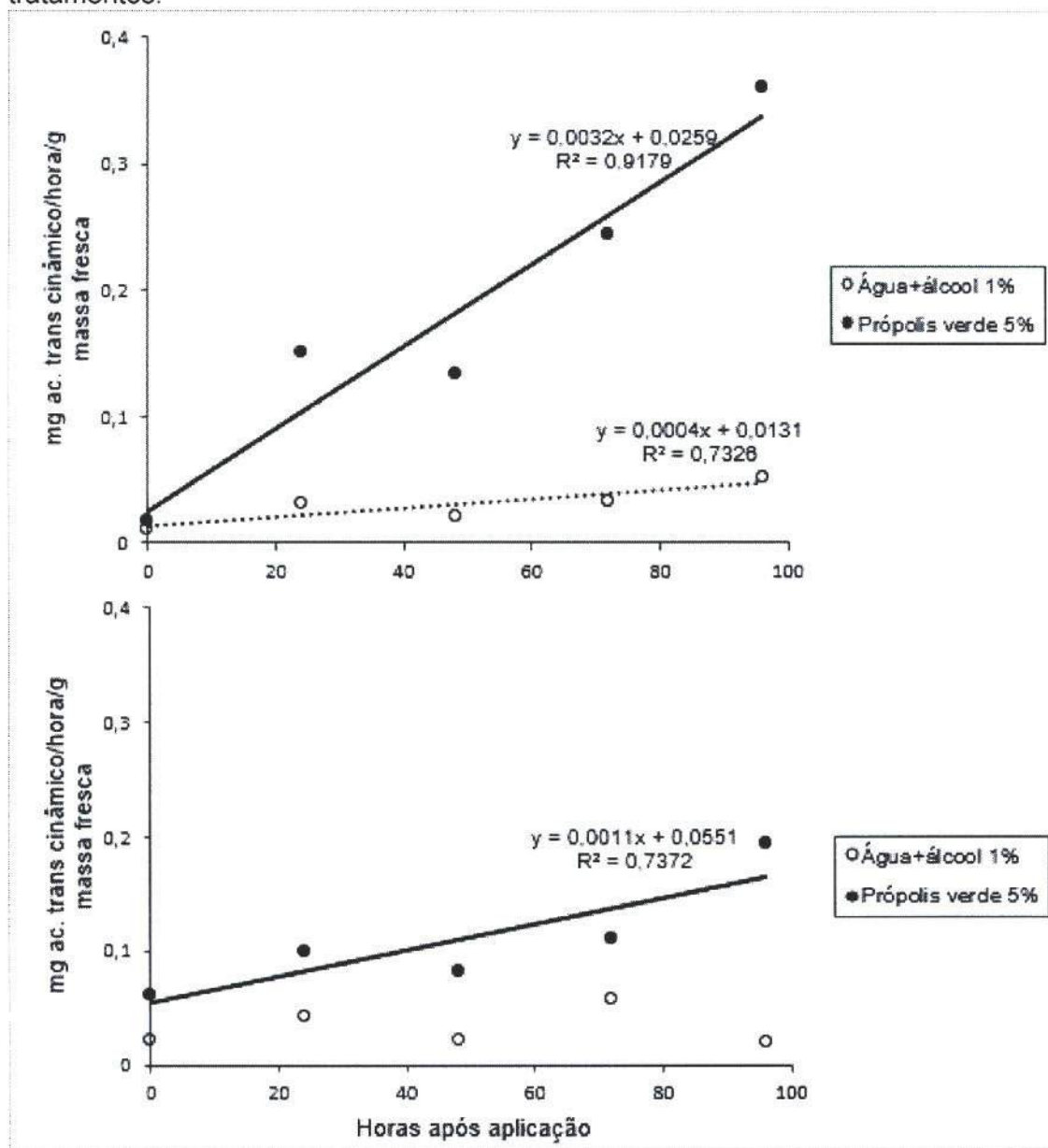
A capacidade da própolis em induzir enzimas de defesa nas plantas ainda é pouco estudada, mas outras alternativas tem demonstrado potencial indutor dessas enzimas relacionadas a defesa da planta Utilizando filtrado do basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*, Viecelli et al. (2009) verificaram o aumento da atividade da polifenoloxidase e peroxidase com a aplicação do filtrado do fungo em plantas de feijoeiro. Além disso, *P. sanguineus* reduziu a severidade da mancha angular do feijoeiro, local e sistemicamente.

Aumento da produção da PFO com a aplicação de tinturas de plantas medicinais foi estudada por Vigo et al. (2009). Os autores mostraram que tinturas de *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Mikania glomerata*, *Equisetum* sp. e *Hedera helix* aumentaram a síntese da enzima em plantas de feijão vagem. Os autores obtiveram bons resultados e destacaram a tintura de *L. alba*, que mostrou os maiores teores de polifenoloxidase, peroxidase e proteínas solúveis totais.

A enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) foi avaliada em plantas de feijoeiro após a aplicação de álcool 1% e própolis verde a 5%, os resultados estão apresentados na Figura 9. Os gráficos mostram que houve aumento linear da produção da FAL em plantas tratadas com própolis verde nos dois trifólios avaliados, no entanto, no trifólio tratado ocorreu efeito mais expressivo. A aplicação de álcool 1% mostrou leve efeito linear no primeiro trifólio, porém muito abaixo da própolis.

Os resultados da FAL são expressos em mg de ácido trans-cinâmico/hora/g massa fresca, já que a enzima forma como produto, o ácido trans-cinâmico quando catalisa a reação de eliminação da amônia da L-fenilalanina (JONES, 1984). Assim, os resultados obtidos sobre a indução da enzima fenilalanina amônia-liase são muito importantes devido a essa ser uma enzima chave para desencadear rotas metabólicas do metabolismo secundário em vegetais. A linha de tendência linear nos dois trifólios sugere que ocorre aumento do efeito local e sistêmico da própolis verde com o passar dos dias da aplicação.

Figura 9: Atividade da enzima felilalanina amônia-liase em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) no trifólio tratado (A) e não tratado (B) com extrato etanólico de própolis verde a 5% e álcool 1%, 0, 24, 48, 72 e 96 horas após a aplicação dos tratamentos.



Almeida et al. (2012) avaliaram a FAL em diferentes genótipos de soja, encontrando alta atividade de fenilalanina amônia-liase nos dois genótipos testados. Os autores atribuem a alta atividade da enzima, à expressão constitutiva de metabólitos secundários essenciais à estrutura celular, metabólitos de origem fenólica. Danner et al. (2008) mostrou aumento da atividade da FAL pelo uso de

eliciadores em pós-colheita de pêssego, e relacionaram a enzima à redução da área lesionada nos frutos.

Utilizando preparados de cavalinha (*Equisetum* sp.), Guimarães et al. (2015) não obtiveram efeito significativo entre os diferentes preparados e as concentrações testadas para atividade da FAL. Os autores evidenciaram a possibilidade de que a ativação da FAL tenha ocorrido em intervalos não observados. De acordo com Rodrigues et al. (2006), existe a possibilidade da síntese da FAL ocorrer tardiamente, contribuindo para explicar o maior efeito do extrato de própolis verde 72 horas após a aplicação, com possível aumento do efeito com o passar dos dias, conforme a linha de tendência linear dos gráficos.

6 CONCLUSÃO

O extrato etanólico de própolis verde demonstrou atividade antimicrobiana sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e também induziu acúmulo de fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijoeiro.

Na proteção de plantas de feijoeiro o a própolis verde promoveu diminuição da área lesionada pelo cretamento bacteriano (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*) possuindo efeito local e sistêmico.

O extrato etanólico de própolis verde induziu a formação das enzimas polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase, com efeito local e sistêmico em plantas de feijoeiro.

A própolis verde apresenta potencial no controle do cretamento bacteriano e do fogo selvagem em feijoeiro tanto por atividade direta sobre potenciais fitobactérias do feijoeiro como induzindo mecanismos de defesa.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. P. L. **Estudo comparativo da atividade anti-inflamatória e antifúngica de extratos de própolis vermelha e verde**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Fortaleza, 2008.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.
- AIDAR, H. **Cultivo do Feijoeiro Comum**. Embrapa Arroz e Feijão. Sistemas de Produção, 2. Versão eletrônica Jan/2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 07/06/2015
- ALMEIDA, H. O. et al. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem asiática da soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.47, n.2, p.163-172, fev. 2012
- 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
- 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**. Vol 28, No 2, 2012.
- BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em Tomateiro por Extratos de Curcuma longa e Curcumina - II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**. 31(4), 2006
- BALDIN, D. et al. Atividade Antifúngica e Indução de Resistência em Sorgo e Feijoeiro pelo Extrato Etanólico de Própolis. **Anais do SEPE**. Vol. IV, 2014
- BALDIN, D. et al. Indução de faseolina em feijão e na atividade antibacteriana sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* pelo extrato etanólico de própolis. **Cadernos de Agroecologia**. v.9, p.1 - , 2014.
- BALDIN, D. et al. Extrato etanólico de própolis na indução de fitoalexinas em sorgo e na atividade antifúngica sobre *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Cadernos de Agroecologia**. v.8, p.1 - , 2013.
- BIANCHINI, A; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. **Doenças do Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)** In: KIMATI, et al. Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 380-383.
- BIANCHINI, L.; BEDENDO, I.P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p 149-152.1998.

BETTIOL, W. *Árvore do Conhecimento. Agricultura e Meio Ambiente. Controle Alternativo*. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 13/06/2015

BONALDO, S. M. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, Piracicaba: FEALQ, p. 11- 28, 2005

BONALDO, S.M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira** 29:128-134. 2004.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

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

CHEUNG, K.-W.; SZE, D. M.-Y.; CHAN, W. K. Brazilian green propolis and its constituent, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4 T cells expansion and activation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 463-71, 18 nov 2011.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. St. Paul: APS Press, 1983. 539p.

COSTA et al. Avaliação da Ação Antimicrobiana da Própolis de Substâncias Utilizadas em Endodontia sobre o *Enterococcus faecalis*. **Pesquisa Brasileira Odontopediatria Clínica Integrada**, João Pessoa, 2008.

DANNER, M. A. et al. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.7, p.793-799, jul. 2008

DEFFUNE, G.: **Semioquímicos, fitoalexinas e resistência sistêmica vegetal na agricultura orgânica: a explicação dos defensivos agrícolas**. In: Hortibio: 1º Congresso Brasileiro de Horticultura Orgânica, Natural, Ecológica e Biodinâmica. Resumos. Botucatu-SP: Agroecológica, p. 33-43, 2001.

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.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, West Yorkshire, v. 64, p. 351-359, 1999.

FERNANDES, C. F.; SOUZA, F. F.; RAMALHO, A. R. **Doenças do feijoeiro-comum em Rondônia**. Recomendações técnicas, 93. Porto Velho, RO. Embrapa, 2005.

FERNANDES, F. F. et al. The in vitro antifungal activity evaluation of propolis 12g ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 2, p. 93-95, 2007.

FERREIRA, D.F. SISVAR: **Sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 5.0**. Lavras: DEX/UFLA, 2007. CD-ROM. Software.

FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Ribeirão Preto, 169 p. 2007

FRANZENER, G. et al. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, v.25, p.503-507, 2003.

GODINHO, V. P. C.; UTUMI, M. M.; PRADO, E. E. **Introdução e avaliação de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo carioca em Vilhena**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 1998 3 p.

GOUVEA, A. et al. Efeito de extratos vegetais em soja sob condições de laboratório e campo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.6, n.2, p. 70-78, 2011.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

GUGINSKI, C. A. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a doses de extrato não alcoólico de própolis. In: **Anais do 44º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Bento Gonçalves, RS. 2011.

GUIMARÃES, S. S. et al. Potencial de preparados de cavalinha (*Equisetum* sp.) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max* L.) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani* Kuhn, *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**. vol.17 no.1 Botucatu jan./mar. 2015

INOKUCHI, Y. et al. Brazilian green propolis protects against retinal damage in vitro and in vivo. Evidence-based complementary and alternative medicine : **eCAM**, v. 3, n. 1, p. 71–7, mar 2006.

ITO, M. F. Principais Doenças da Cultura da Soja e Manejo Integrado. 1º Encontro Técnico Sobre as Culturas da Soja e do Milho no Noroeste Paulista. **Revista Nucleus**, Edição Especial, 2013 v. 10, n. 3.

JARDIM, D. M. Avaliação in Vitro da Atividade Antibacteriana de Diferentes Própolis. **MICROAL**. Blucher Food Science Proceedings, n.1, vol.1. São Paulo: Editora Blucher, 2014.

JONES, D.H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry** 23: 1349-1359, 1984

- KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.83-89, 2003.
- LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.347-349, fev. 2006
- LONGHINI, R et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.
- MANRIQUE, A.J.; SOARES, A.E.E. Início de um programa de seleção de abelhas africanizadas para melhoria na produção de própolis e seu efeito na produção de mel. **Interciencia**, v.27, n.6, p.312-316, 2002.
- MARTIN, M. P.; PILEGGI, R. A quantitative analysis of Propolis : a promising new storage media following avulsion. **Dental Traumatology**, v. 20, p. 85-89, 2004.
- MATTIUZ, B. H. Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of 'Kent' mango. **Scientia Horticulturae**, Vol. 184, Pages 160-168, March 2015
- MAZARO, S. M. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1824-1829, out, 2008.
- MAZARO, S. M. et al. Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução da síntese de fitoalexinas e no efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea*, *in vitro*. **Revista brasileira de plantas medicinais**. vol.15 no.2 Botucatu, 2013.
- MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry** 60:551-565, 2002.
- 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.
- MIORIN, P. L. et a. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 913-920, nov 2003.
- MOHAMMADZADEH, S. et al. Antioxidant power of Iranian propolis extract. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 729-733, jan 2007.
- MOURA, G. S. et al. Atividade antimicrobiana e indutora de fitoalexinas do hidrolato de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, .2, supl. I, p.309-315, 2014.
- NAGAI, T. et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, p. 29-33, 2003.

NASCIMENTO, A. V. J. Própolis Verde - Produção, Mercado, Tendências e Padronização. **Primeiro Seminário Apícola sobre Própolis Verde**. Muzambinho, Brasil. 2005

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Sacharomyces cerevisiae* e outros genes bióticos na proteção de plantas contra patógeno**. Piracicaba, Tese (Livre Docência), 123p – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 1998.

PAREDES-GUZMAN, J.F., et al. Estudo das própolis que contém Artepillin C. **Mensagem Doce**, v. 74, p. 9-16, 2003.

PARK, Y.K. et al. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**. 58:3-7, 2000.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

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.; MAIA, L. F. P.; PAULA, F. S. de. Aplicação de extrato etanólico de própolis no crescimento e produtividade do feijoeiro comum. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n.1, p. 098-104, jan/fev, 2014

PEREIRA, A. S. et al. Study of propolis by High Temperature High Resolution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Z Naturforsch**, 1999.

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

PEREIRA, C. S. et al. Extrato etanólico de própolis (EEP) no controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk e Br.). **SPCB - Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. v. 5. 2007, Águas de Lindóia, SP

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**. 8(1): 170-178, 2013.

PURKAYASTHA, R. P. Progress in phytoalexin research during the past 50 years. In: DANIEL, M.; PURKAYASTHA, R. P. (Ed.) **Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action**. New York: Marcel Dekker, 1995.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CAMPOS, V.P. Resistência de cafeeiro a *Meloidogyne exigua*. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 34, São Pedro, 2001. **Fitopatologia Brasileira**, v.26 (Supl.), p.499, 2001.

- RITTER, H.; SCHULZ, G.E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Cell** 16, 3426-3436, 2004.
- RODRIGUES, A.A.C. et al. Indução de Resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em Caupi: Eficiência de Indutores Abióticos e Atividade Enzimática Elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV. 2001, 279p.
- SAETTLER, A. W.; SHAAD, N. W; ROTH. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. 2. ed. Saint Paul: APS Press, 1995.
- SALATINO, A. et al. **Origin and chemical variation of brazilian propolis. Evidence-based complementary and alternative medicine** : eCAM, v. 2, n. 1, p. 33-38, mar 2005.
- SALOMAO, K.; DANTAS, A. P.; BORBA, C. M. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 87-92, fev 2004.
- SCHUSTER, M L., SAYRE, R. M. A Coryneform bacterium induces purple colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* L. and other legumes. **Phytopathology**, Saint Paul , v. 57, p. 1064, 1967.
- SFORCIN, J.M. **Própolis e imunidade: comprovações científicas**. São Paulo: UNESP, 2009, 67p.
- 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, M.B. et al. **Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas**. IN: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PALLINI, A. Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. Viçosa: EPAMIG, Cap.3, p.33-54, 2010.
- SILVA, R. F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)**. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2007.
- SIMÕES-AMBROSIO, L. M. C. et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1102-8, dez 2010.
- SOBOČANEC, S.; BALOG, T.; ŠARIĆ, A. Antitumor effect of Croatian propolis as a consequence of diverse sex-related dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) protein expression. **Phytomedicine**, v. 18, n. 10, p. 852-8, 15 jul 2011.

SOUSA, J. P.B. et al. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, . 2007

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.16, p.265-304, 2008.

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

SULAIMAN, G. M.; AD'HIAH, A. H.; AL-SAMMARRAE, K. W. Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis in vitro and in vivo. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1632-41, maio 2012.

TORRES, J. P. et al. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro provenientes do Estado do Paraná, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p.136-139, 2009.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica** 34:68-71. 2006.

VALARINI, P. J.; MENTEN, J. O. Inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e seu efeito sobre a qualidade sanitária e germinação. **Summa Phytopatológica**, v. 17, p. 227-231, 1991.

VALARINI, P. J., MENTEN, J. O. M. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: método para detecção em sementes de feijão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v. 4, n. 17, p. 373-383, 1992.

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

VIECELLI, C. A. et al. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, vol. 34, 2, 087-096, 2009.

VIGO, S. C. et al. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o cretamento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**. vol.35 no.4 Botucatu Oct./Dec. 2009.

VILELA, C. O. **Atividade antimicrobiana de extrato etanólico de própolis verde**. Pelotas, 2010. -100f. : il.- Dissertação (Mestrado em Veterinária Preventiva) – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

WEISSHAAR, B.; JENKINS, G.I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. **Current Opinion in Plant Biology** 1: 251-257, 1998.

YANG, S. Z.; PENG, L. T.; SU, X. J.. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 210-215, jul 2011.

Jonas Marcelo Joli


GILMAR FRANZENER
Professor Adjunto
SIAPE 1836269
UFFS - Campus Laranjeiras do Sul