14607 - Extrato etanólico de própolis na indução de fitoalexinas em sorgo e na atividade antifúngica sobre *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola*

Propolis ethanolic extract in the induction of phytoalexins in sorghum and antifungal activity against Botrytis cinerea and Phaeoisariopsis griseola

BALDIN, Diana[1]; SCARIOT, Eliziane[2]; TELAXKA, Fábio J.[3]; JASKI, Jonas M.[4]; FRANZENER, Gilmar[5]

1 Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, Campus Laranjeiras do Sul-PR, diana_baldin@hotmail.com; 2 UFFS, lizi.scariot@hotmail.com; 3 UFFS, fabio1910@live.com; 4 UFFS, jonasmjaski@hotmail.com; 5 UFFS, gilmar.franzener@uffs.edu.br

Resumo: A própolis tem sido bastante estudada para fins terapêuticos na saúde humana mas ainda são escassas as informações de seu potencial na proteção de plantas. Assim, esse trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de extrato etanólico de própolis (EEP) na ativação de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo e na atividade direta sobre os fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola*. Foram avaliadas as concentrações de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0% de EEP. O EEP induziu a síntese de fitoalexinas como ponto de máxima atividade na concentração de 2,9%. O EEP não afetou a germinação de esporos dos fitopatógenos mas promoveu inibição no desenvolvimento dos tubos germinativos com o aumento da concentração utilizada. Estes resultados mostram o potencial da própolis tanto através da atividade direta sobre potenciais fitopatógenos como ativando mecanismos de defesa vegetal.
Palavras-chave: Defesa vegetal; *Botrytis cinerea; Phaeoisariopsis griseola*.

Abstract: Propolis has been widely studied for therapeutic purposes in human health but there is still little information of their potential in plant protection. Thus, the aim of this work was evaluate the effect of propolis ethanol extract of (PEE) on the activation of phytoalexins in etiolated sorghum mesocotyls and the activity against plant pathogenic fungi *Botrytis cinerea* and *Phaeoisariopsis griseola*. Was evaluated the concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0% of PEE. The PEE induced the phytoalexin synthesis as a point of maximum activity at a concentration of 2.9%. The PEE did not affect germination of pathogens but promoted inhibition in the development of germ tubes with increasing concentration. These results show the potential of propolis on both direct activity on potential pathogens and activating plant defense mechanisms.
Keywords: Plant defense; *Botrytis cinerea; Phaeoisariopsis griseola*.

Introdução

A própolis é uma mistura complexa de substâncias que as abelhas coletam de várias plantas, elaboram e depositam em suas colméias (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).

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

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 indução de mecanismos de defesa vegetal. Assim, o maior conhecimento sobre esses mecanismos podem contribuir para emprego da própolis como alternativa em sistemas agroecológicos.

Embora escassos, alguns trabalhos tem demonstrado o efeito antimicrobiano da própolis sobre agentes fitopatogênicos, como efeito antimicrobiano sobre algumas espécies de bactérias fitopatogêncas (BIANCHINI; BEDENDO, 1998) e 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). Efeito de própolis sobre plantas foi avaliado por Pereira et al. (2008; 2013) observando potencial do extrato etanólico de própolis no controle da cercosporiose e da ferrugem do cafeeiro.

Diante disso, esse trabalho teve por objetivo avaliar o potencial do extrato etanólico de própolis na indução de fitoalexinas, que representam importante mecanismo de defesa vegetal, e o efeito direto sobre os fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola*, agentes causais do mofo cinzento em morangueiro e da mancha angular do feijoeiro, respectivamente.

Metodologia

O trabalho foi conduzido em laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Laranjeiras do Sul-PR.

A própolis foi obtida de apiários do oeste do Paraná. A extração foi realizada conforme Pereira et al. (2008), com algumas adaptações. Para tanto, utilizou-se álcool etílico 70%, sendo a proporção com base em peso/peso de própolis bruta e álcool de 16:84%, respectivamente. Após a mistura dos componentes, o extrato foi mantido em “repouso” por 15 dias, sendo a seguir filtrado em papel de filtro e diluído em concentrações de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5 e 5% que foram utilizadas nos bioensaios.

Para avaliar o potencial efeito indutor de defesas em plantas foi conduzido ensaio em mesocótilos estiolados de sorgo. Para tanto, sementes da cultivar Brandes, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio e colocadas em papel de germinação, umedecidas e incubadas em escuro à 28 ºC durante quatro dias. Após os mesocótilos foram excisados 0,5 cm acima do nó escutelar e colocados em tubos para microcentrífuga (volume de 1,5 mL) (três mesocótilos/tubo), contendo alíquota de 1,4 mL de cada tratamento, sendo em seguida mantidos em câmara úmida, a 25ºC sob luz fluorescente, durante 60 horas. Após esse período foram retirados dos tubos, secos em papel absorvente e os 5 mm basais de cada mesocótilo foram descartados. A porção superior (2,0 cm) foi pesada e cortada em pequenos segmentos (0,5 cm). Estes foram acondicionados em tubos para microcentrífuga contendo 1,5 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v/v) e mantidos no metanol por 96 horas na temperatura de 4ºC para extração dos pigmentos. Após foi determinada a absorbância em espectrofotômetro a 480 nm.

O efeito antifúngico do EEP foi avaliado sobre os fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola*. Para tanto, uma alíquota de 35 µL da suspensão de esporos (1 x 10^4 conídios mL^{-1}) e outra de 35 µL dos tratamentos foram colocadas em cada um dos recipientes (“poçinhos") de uma placa usada em teste de ELISA. As placas foram incubadas em escuro a 25ºC por 20 horas quando a germinação de esporos foi paralisada com 15 µL de azul algodão de lactofenol. A determinação da porcentagem de germinação foi realizada através da contagem de 100 esporos por parcela em microscópio ótico. Também foi avaliada o tamanho médio dos tubos germinativos.

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância seguida de análise de regressão para as concentrações de extratos de própolis utilizadas com auxílio do programa computacional Sisvar.

Resultados e discussões

O extrato etanólico de própolis apresentou efeito indutor de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (Figura 1). Houve comportamento quadrático para as concentrações testadas, com ponto de máxima na concentração de 2,9% do EEP. É possível que a redução na atividade em concentrações superiores a essa possa ocorrer devido a maior presença do etanol utilizado como solvente no preparo do extrato.

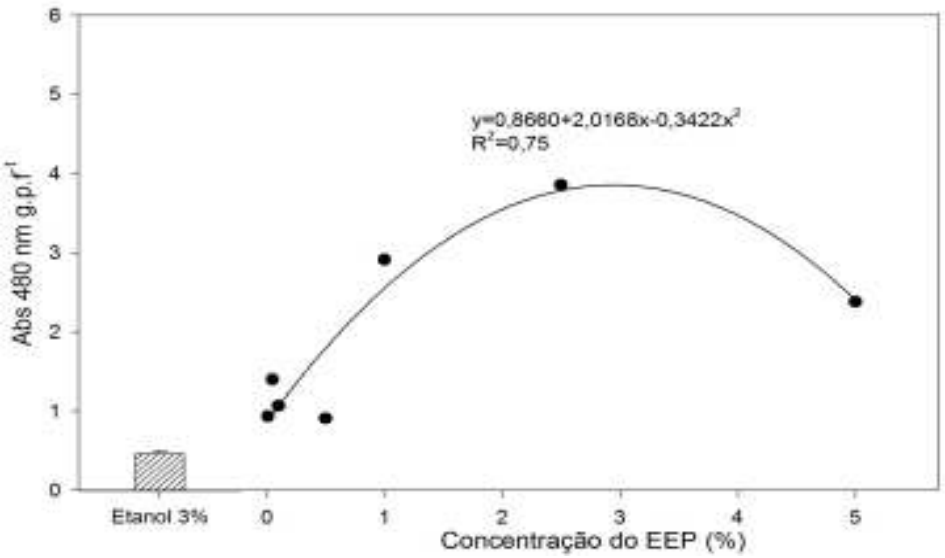

FIGURA 1. Atividade indutora de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo por diferentes concentrações extrato etanólico de própolis (EEP).

Mesocótilos estiolados de sorgo são considerados excelentes ferramentas em estudos envolvendo a ação eliciadora de moléculas de origem biótica ou abiótica (CAVALCANTI et al., 2005). Embora as informações da atividade indutora de defesas em plantas por derivados da própolis sejam escassas, espera-se que esses resultados contribuam para desencadear novos estudos nesse sentido.

Os resultados do efeito do EEP na germinação de conídios dos fungos *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola* são apresentados na Figura 2. Não houve efeito significativo das diferentes concentrações do EEP sobre a germinação de ambos

fitopatógenos avaliados. No entanto, sobre o tamanho dos tubos germinativos (Figura 3) houve significativa redução no desenvolvimento dessas estruturas com o aumento da concentração do EEP para ambos os fungos, com maior efeito sobre *B. cinerea* para o qual houve inibição de 61,9% em relação a testemunha representada por etanol 3%. Embora o EEP não tenha inibido a germinação, o processo infeccioso pode ser afetado pela inibição no desenvolvimento do tubo germinativo.

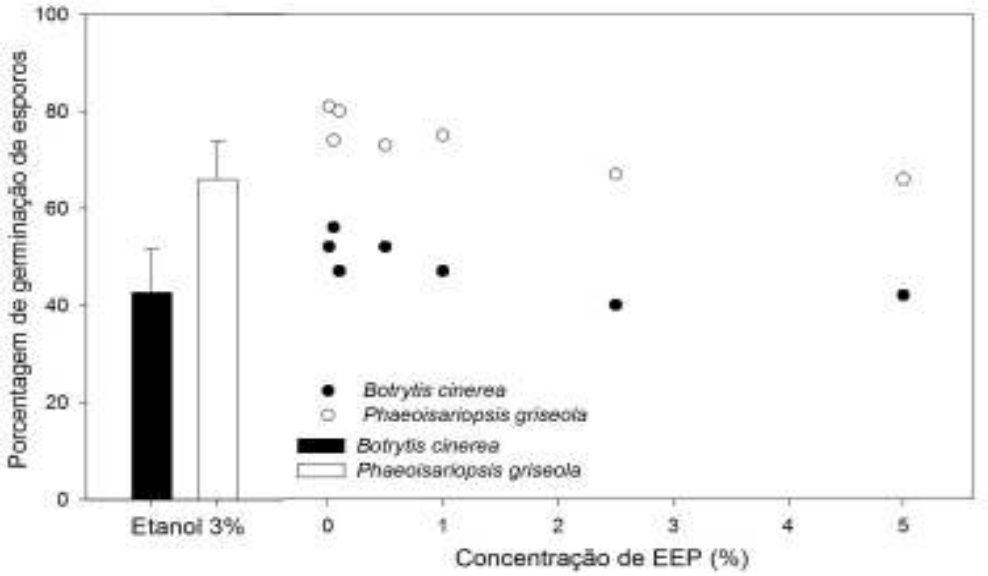

FIGURA 2. Porcentagem de germinação de esporos de *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola* pelo tratamento com extrato etanólico de própolis (EEP).

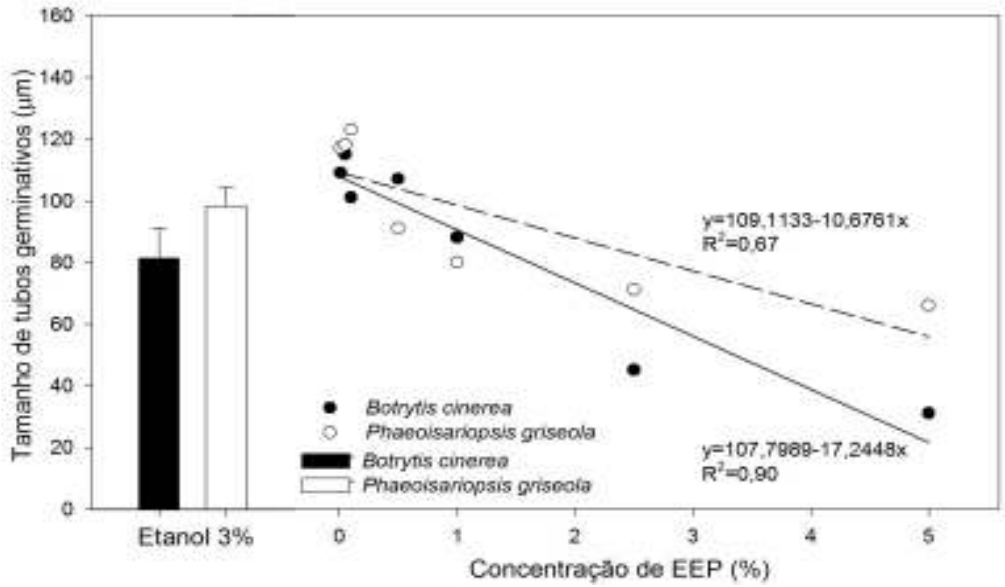

FIGURA 3. Tamanho de tubos germinativos de *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola* pelo tratamento com extrato etanólico de própolis (EEP).

Alguns trabalhos já mostraram o potencial antimicrobiano da própolis sobre outros fitopatógenos, como algumas bactérias fitopatogêncas (BIANCHINI; BEDENDO, 1998) e os fungos *Colletotrichum gloeosporioides, Botryodiplodia theobromae* (MENESES et al., 2009) e *Penicillium italicum* (YANG et al., 2011).

Conclusões

O extrato etanólico de própolis apresenta efeito indutor de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e atividade antifúngica sobre os fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea* e *Phaeoisariopsis griseola* mostrando potencial no controle de doenças em plantas, tanto por ação direta como podendo induzir mecanismos de defesa.

Agradecimentos

À Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS pela bolsa de iniciação científica concedida pelo Edital 262/UFFS/2012.

Referências bibliográficas:

BIANCHINI, L.; BEDENDO, I.P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p 149-152.1998.

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.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S. et al. (Eds). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos.** Piracicaba:FEALQ. 2005. p.81-124.

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.

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.

MOHAMMADZADEH, S.; et al. Antioxidant power of Iranian propolis extract. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 729-733, jan 2007.

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.

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.

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.