



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PATO BRANCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



HOILSON FOGOLARI

**POTENCIAL DE EXTRATOS À BASE DE *Calendula officinalis* L. NA
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E NO EFEITO FUNGISTÁTICO SOBRE
Botrytis cinerea, IN VITRO.**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2010

HOILSON FOGOLARI

**POTENCIAL DE EXTRATOS À BASE DE *Calendula officinalis* L. NA
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E NO EFEITO FUNGISTÁTICO SOBRE
Botrytis cinerea, IN VITRO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção vegetal.

Orientador: Dr. Sérgio Miguel Mazaro
Co-Orientador: Dr. Idemir Citadin

PATO BRANCO

2010

F656p

Fogolari, Hoilson

Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução de resistência e no efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea*, *in vitro*. Hoilson Fogolari. -- 2010

55 f. : il. ; 30 cm

“Orientador: Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro”

“Co-orientador: Prof. Dr. Idemir Citadin”

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, 2010. Bibliografia.

1. Agronomia. 2. Plantas medicinais. 3. Culturas agrícolas. 4. Morango – cultivo. I. Mazaro, Sérgio Miguel. II. Citadin, Idemir. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD: 22:630



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco
Gerência de Ensino e Pesquisa
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 027

POTENCIAL DE EXTRATOS À BASE DE *Calendula officinalis* L. NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E NO EFEITO FUNGISTÁTICO SOBRE *Botrytis cinerea*, *IN VITRO*.

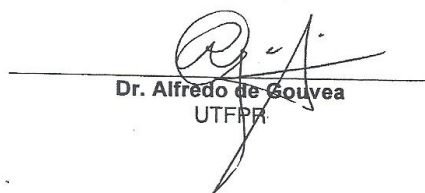
por

HOILSON FOGOLARI

Dissertação apresentada às quatorze horas do dia vinte e seis de maio de dois mil e dez como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Banca examinadora:



Dra. Rosângela Dallemole Giaretta
UNICENTRO


Dr. Alfredo de Gouveia
UTFPR


Dr. Américo Wagner Junior
UTFPR


Dr. Sérgio Miguel Mazaro
UTFPR
Orientador

Visto da Coordenação:


Prof. Dr. Idemir Citadin
Coordenador do PPGA

Dedico mais esta conquista à Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS por estar sempre presente em minha vida e iluminando meu caminho.

Aos meus pais Ivo e Salete por todo o apoio e dedicação, sempre me dando forças para não desistir.

Ao meu irmão Odinei pelo apoio e incentivo durante todo o mestrado.

A minha namorada Karina pela paciência, dedicação e por estar presente nos momentos mais importantes da minha vida.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram a seguir enfrente mesmo nos momentos que já havia desistido.

Ao meu orientador Sérgio Miguel Mazaro pela confiança e pela sua dedicação.

Ao meu co-orientador e coordenador do mestrado Idemir Citadin por suas colaborações.

Ao Prof. Américo, Juliano, Kelli, Lisonéia e a toda equipe do laboratório de Fitossanidade e Bioquímica da UTFPR – *Campus* Dois Vizinhos, por toda a ajuda e incentivo que me deram durante todo o período de análises.

Ao professor Álvaro do *Campus* de Dois Vizinhos por ter cedido suas aulas para que eu pudesse realizar meu estágio de docência.

E a todas as pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

FOGOLARI, Hoilson. Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução de resistência e no efeito fungistático à *Botrytis cinerea*, *in vitro*. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2010.

Diversos estudos vêm demonstrando o potencial de plantas medicinais no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungistática direta, quanto pela capacidade de induzir a defesa das plantas, indicando a presença de moléculas com características elicitoras. Nesse sentido foram desenvolvidos três experimentos no ano de 2009 e 2010, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* de Dois Vizinhos, com objetivos de avaliar o potencial de preparados a base de calêndula (*Calendula officinalis* L.) na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, na indução de resistência em frutos de morango e o efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea in vitro*. O delineamento experimental utilizado para os experimentos foi inteiramente casualizado com 15 tratamentos resultantes da combinação de três formas de extração (extrato alcoólico, infusão e maceração) e cinco concentrações (zero; 1,25; 2,5; 5 e 10%), sendo a concentração zero água destilada, em arranjo fatorial (3 x 5) com 4 repetições. O primeiro experimento avaliou o potencial fungistático dos preparados sobre *B. cinerea in vitro*. Em placas de Petri® foram adicionados no meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) os preparados nas diferentes concentrações. Após a solidificação, um orifício de 8 mm foi realizado no centro da placa e introduzindo-se 2µL da suspensão de conídios de *B. cinerea*. As placas foram mantidas em câmara de crescimento durante 7 dias a 25°C, e no sétimo dia mediu-se o diâmetro do halo de crescimento do fungo. O segundo experimento avaliou a indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta aos preparados à base de calêndula. Sementes de soja foram semeadas em areia autoclavada e mantidas em temperatura ambiente por 10 dias. Em seguida os cotilédones das plântulas foram removidos e na face abaxial destes foram aplicados os tratamentos. Após seguir os procedimentos metodológicos da técnica de extração, obteve-se via espectrofotometria a quantificação da fitoalexina gliceolina. O terceiro experimento avaliou o efeito dos preparados a base de *C. officinalis* sobre os parâmetros físico-químicos e bioquímicos de frutos de morango relacionados com a indução de resistência. Os frutos foram acondicionados em bandejas plásticas e pulverizados com os diferentes tratamentos. Após 6 horas da pulverização dos preparados foi pulverizada solução contendo cerca 10⁴ conídios do fungo *B. cinerea*. As avaliações foram realizadas após 3 dias da implantação do experimento. Os parâmetros avaliados foram: perda de massa, incidência de podridões, acidez titulável, firmeza de polpa e sólidos solúveis totais, e as bioquímicas foram: açúcares totais, antocianinas, flavonóides e atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL). Os resultados demonstraram que a maceração em todas as suas concentrações inibiu o crescimento do fungo *B. cinerea in vitro*, sendo que a partir de 2,5% observou-se inibição total. O tratamento com infusão na sua maior concentração (10%) também apresentou resposta positiva na inibição do crescimento de *B. cinerea*. Os preparados de *C. officinalis* apresentaram capacidade

de indução das fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja. Na aplicação dos preparados em pós-colheita de morangos, não ocorreu influência dos tratamentos sobre perda de massa, incidência de podridões, firmeza de polpa, acidez titulável, sólidos solúveis totais, açúcares totais e antocianina. Para flavonóides o extrato alcoólico em todas as concentrações e a infusão a partir de 5% estimularam sua produção. A atividade da enzima FAL foi estimulada pela aplicação dos extratos.

Palavras-chave: Morango. Calêndula. Indução de resistência. Plantas medicinais.

ABSTRACT

FOGOLARI, Hoilson. Potential of the extract *Calendula officinalis* L. in induction of resistance and fungistatic effect in the *Botrytis cinerea in vitro*. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2010.

Several studies have demonstrated the potential of medicinal plants in the pathogens control, through its direct fungistatic action or its ability to induce plant defense, it suggesting the presence of molecules with characteristics elicitors. Three experiments were carried out on 2009 and 2010, in the Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos city (PR – Brazil). The aim of this work was to evaluate prepared caledula (*Calendula officinalis* L.) potential for phytoalexins induction in the soybean cotyledons, resistance induction in the strawberry fruits and fungistatic effect of *Botrytis cinerea in vitro*. The experimental design was completely randomized with 15 treatments resulting from the combination of three forms of extraction (alcohol extract, infusion and maceration) and five concentrations (zero, 1.25, 2.5, 5 and 10%), with zero concentration distilled water in a factorial (3 x 5) with four replications the distilled water was used as control. The first experiment evaluated the potential fungistatic preparations in the *B. cinerea* control. The preparations with the different concentrations were put in Petri dishes with BDA culture media. After the media solidification, a hole of 8 mm was punched in the dishes Petri center and in this hole was introduced 2 μ L of spore *B. cinerea* suspension. The Petri dishes were kept in growth chamber for 7 days at 25°C. In the seventh day, the halo diameter fungus growth was evaluated. The second experiment evaluated the phytoalexins induction in the soybean cotyledons soybean as result of *C. officinalis* derivatives. Soybean seeds were sown in sterilized sand and it were kept at room temperature during 10 days. Then, the seedlings cotyledons were removed and on the abaxial part it was applied the treatments. After methodological procedures of extraction technique, it was obtained the phytoalexins glyceolin quantification by for spectrophotometry. The third study evaluated the *C. officinalis* solutions effect on the strawberry fruits physic-chemical and biochemical characteristics. The fruits were packed in plastic trays and it sprayed with different treatments. After six hours of the treatments spraying, it was sprayed a solution containing about 10⁴ spore of *B. cinerea* fungus. After 3 days, it was realized the evaluations. The mass loss, rots incidence, titratable acidity, flesh firmness, total soluble solids, totals sugars, anthocyanins, flavonoids and activity of phenylalanine-amoniase (PAL) were evaluated. The results showed that the maceration with all over the concentrations used, it inhibited of the *B. cinerea* fungus *in vitro* growth. Concentrations higher that 2.5%, presented total inhibition ability. Treatment with infusion using the highest concentration (10%) also showed positive response for *B. cinerea* growth inhibiting. The *C. officinalis* solutions presented induction capacity of the phytoalexins glyceolin in soybean cotyledons. It was observed that the solutions applied during the strawberry postharvest didn't influence in the physico-chemical characteristics (mass loss, rots incidence, titratable acidity, flesh firmness and total soluble solids). In the biochemical analyzes for totals sugars and anthocyanins

wasn't observed statistical difference among the treatments. The alcoholic extract all over the concentrations and the infusion with concentrations higher than 5% stimulated the flavonoids productions. The PAL enzyme activity was stimulated by the application of extracts.

Keywords: Strawberry. Calendula. Induction resistance. Medicinal plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Materiais utilizados para realização do experimento I (placas de Petri[®], tubos de ensaio, pipeta, becker, lamparina) UTFPR, *Campus Dois Vizinhos*, 2010.....27
- Figura 2:** Placa de Petri[®] contendo meio de cultura e preparado da *C. officinalis* com orifício central para inoculação do fungo *B. cinerea*. UTFPR, *Campus Dois Vizinhos*, 2010.....27
- Figura 3:** Plântulas de soja emergindo em areia autoclavada utilizando gerbox no Experimento II. UTFPR, *Campus Dois Vizinhos*, 2010.....29
- Figura 4:** Aplicação do preparado a base de *C. officinalis* nos cotilédones de soja. UTFPR, *Campus Dois Vizinhos*, 2010.....29
- Figura 5:** Frutos de morangueiro colocados em bandejas plásticas, após a pulverização da solução dos preparados utilizados e inoculação de *B. cinerea*. UTFPR, *Campus Dois Vizinhos*, 2010.....32
- Figura 6:** Fruto do morangueiro com sintomas de mofo cinzento, causado pelo fungo *B. cinerea*. UTFPR, *Campus Dois Vizinhos*, 2010.....33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Crescimento de *B. cinerea* em diferentes preparados e concentrações de *Calendula officinalis*. UTFPR, Dois Vizinhos, 2010.35
- Tabela 2:** Indução de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja pelos diferentes preparados e concentrações de *Calendula officinalis*. UTFPR, Dois Vizinhos, 2010.36
- Tabela 3:** Variáveis físico-químicas de morangos tratados com preparados extraídos da planta medicinal *C. officinalis*, UTFPR, Dois Vizinhos, 2010.37
- Tabela 4:** Variáveis bioquímicas de morangos tratados com diferentes preparados e concentrações da planta medicinal *C. officinalis*, UTFPR, Dois Vizinhos, 2010.40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1. Geral.....	16
2.2. Específicos	16
3 - EMBASAMENTO TEÓRICO	17
3.1. A CULTURA DA CALÊNDULA.....	17
3.2. PROPRIEDADES MEDICINAIS E BIOQUÍMICAS DA CALÊNDULA	17
3.3. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	19
3.4. Pós-colheita de morangos.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Obtenção dos preparados:	25
4.2 Obtenção e isolamento do <i>B. cinerea</i>	26
4.3. Experimento I – Avaliação, <i>in vitro</i> , do potencial fungistático dos preparados à base de <i>C. officinalis</i> sobre o fungo <i>B. cinerea</i>	26
4.4. Experimento II - Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a PREPARADOS À base de <i>C. officinalis</i>	28
4.5. Experimento III – Controle de podridões em pós-colheita de morangos pelo uso de preparados À base de <i>C. officinalis</i>	30
4.6. Análises estatísticas:	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1. Experimento I – Avaliação <i>in vitro</i> do potencial fungistático dos preparados a base de <i>C. officinalis</i> sob o fungo <i>B. cinerea</i>	34
5.2. Experimento II: Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados a base de <i>C. officinalis</i>	35
5.3. Experimento III – Controle de podridões em pós-colheita de morangos pelo uso de preparados a base de <i>C. officinalis</i>	37
6 CONCLUSÕES	41
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICES	51

1 INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas é ainda hoje muito utilizado quando surge a necessidade de controlar pragas e doenças. No entanto, com o uso desses produtos, obtém-se efeito positivo temporário, uma vez que com o passar do tempo os resultados para o meio ambiente e para a sociedade como um todo se tornam negativos, seja em decorrência da poluição causada pelos resíduos, ou pelo surgimento de patógenos resistentes aos ingredientes ativos dos mesmos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

A demanda mundial por alimentos isentos de agrotóxicos vem impulsionando pesquisas na busca de métodos alternativos ao controle de patógenos em plantas. Diversos trabalhos mostram o potencial de plantas medicinais no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungistática direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela capacidade de induzir a defesa das plantas com o acúmulo de fitoalexinas, indicando a presença de moléculas com características eliciadoras (BONALDO et al., 2004).

A *Calendula officinalis* L. está entre as diversas espécies usadas pela medicina popular e pesquisadas cientificamente, tendo seu uso descrito para tratamentos de processos febris, cânceres e antiinflamatório de pele em humanos e animais. As formas e apresentações são diversas, tais como: extratos, tinturas e bálsamos produzidos principalmente de suas flores (KRAG, 1976). Também estão descritos na literatura efeitos uterotônicos e estrogênicos (SHIPOCHLIEV, 1981), antimicrobiano (DE TOMMASI et al., 1990; 1991; ACEVEDO; LOPES; CORTES, 1993; KALVATCHEV; WALDER; GALZERO, 1997), antimutagênico (BOUCAUD-MAITRE; ALGEMON; RAYNAUD, 1988; ELIAS et al., 1990), atividade antioxidante (CETOKVIC et al., 2004) e antiedema (ZITTER-EGLESEER et al., 1997).

O estudo da *C. officinalis* torna-se importante dentro dos aspectos científicos pela sua diversidade de ingredientes ativos, os quais podem apresentar potencial para utilização na agricultura, ativando rotas de defesa, com a produção de metabólitos secundários como as fitoalexinas.

As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, produzidos pela planta em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos. O modo de ação sobre fungos inclui a granulação citoplasmática, desorganização dos

conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas, refletindo na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento micelial. As fitoalexinas possuem grande diversidade, sendo que mais de 300 tipos já foram caracterizados entre diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas, diterpenos, flavonóides, luteolinidina, apigenidina e apigeninidina (CAVALCANTI et al., 2005).

A primeira fitoalexina caracterizada quimicamente foi a pisatina, isolada de plantas de ervilha (*Pisum sativum*), sendo que desde sua descoberta, inúmeras fitoalexinas foram obtidas de plantas cultivadas como feijão, soja, ervilha, batata, tomate, alface, algodão, arroz, cevada, banana, entre outras (BRAGA, 2007).

Em soja, a fitoalexina gliceolina (pterocarpanóide) mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos, sendo que a utilização de cotilédones de soja mostra-se como excelente ferramenta para estudos envolvendo ação elicitora de moléculas de origem biótica e abiótica (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Apesar de mais de 300 fitoalexinas já terem sido isoladas, menos de 1% dos vegetais superiores foram analisados quanto à capacidade de produzir essas substâncias, sendo em sua maioria espécies cultivadas pelo homem. Assim, o estudo e síntese de fitoalexinas, especialmente em espécies medicinais, abrem perspectivas para descoberta de novos produtos naturais com atividade antimicrobiana e cujas estruturas podem servir como modelo para a síntese química de defensivos agrícolas naturais (BRAGA, 2007).

Nesse sentido trabalhos que busquem avaliar o potencial da *C. officinalis*, sejam na indução de resistência em plantas ou seu efeito fungistático sobre patógenos são necessários, razão desse trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliação do potencial de preparados a base de calêndula (*Calendula officinalis* L.) na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, na indução de resistência em frutos de morango e o efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea in vitro*.

2.2. ESPECÍFICOS

Avaliar diferentes concentrações de extrato alcoólico, infusão e maceração à base de calêndula como potencial fungistático no controle *in vitro* de *B. cinerea*;

Avaliar diferentes concentrações de extrato alcoólico, infusão e maceração à base de calêndula como potencial em ativar fitoalexinas em cotilédones de soja;

Avaliar diferentes concentrações de extrato alcoólico, infusão e maceração à base de calêndula como ativadores do metabolismo secundário do morango e potencial no controle da incidência de podridões.

3 - EMBASAMENTO TEÓRICO

3.1. A CULTURA DA CALÊNDULA

A calêndula (*C. officinalis*) vem sendo cultivada pelos egípcios, gregos, hindus e árabes, desde o século XII em virtude de suas propriedades medicinais (KRAG, 1976).

Existem cerca de 20 espécies pertencentes ao gênero *Calêndula*, cuja família abrange as Compositae (Asteraceae). As flores principalmente da *C. officinalis* e *C. arvensis* são usadas na medicina alternativa. Os nomes comuns desta espécie são calêndula, margarida de jardim, margarida do campo, maria dourada entre outros (BISSET, 1994).

A calêndula é uma planta auto-fecundável, anual, com flores amarelas ou douradas que florescem no outono, com distribuição na Europa Central, no Mediterrâneo, América do Norte e Europa (KRAG, 1976).

A espécie *C. officinalis* desenvolve-se bem sob luz plena, sendo que sua colheita inicia-se cerca de 2 meses após o plantio, com a produção prolongando-se por mais 2 a 3 meses, o que pode gerar uma produtividade média de 720 kg ha⁻¹ de flores secas (MARTINS et al., 2000). As recomendações de espaçamento para esta espécie são as mais variadas possíveis: 25 x 50 cm (MARTINS, et al., 2000); 20 x 30 cm (SARTÓRIO et al., 2000); 35 X 45 cm (LUZ; FERREDÁ; GOVÍN, 2001).

Para a *C. officinalis*, é necessário que se tenha adequado teor de matéria orgânica no solo e boa drenagem (MARTINS et al., 1995). Em relação à adubação, Corrêa et al. (1994), recomendam 5,0 kg/m² de esterco de curral curtido ou composto orgânico, ou 3,0 kg/ m² de esterco de aves.

3.2. PROPRIEDADES MEDICINAIS E BIOQUÍMICAS DA CALÊNDULA

Dentre os diversos usos medicinais da calêndula, estão o tratamento de processos febris, promotora de menstruação (abortivo), tratamento de cânceres e contra inflamações da pele nas mais diversas formas e apresentações, seja como

extratos, tinturas e bálsamos produzidos principalmente de suas flores (Krag, 1976).

Na Itália se faz uso folclórico da calêndula como antipirético e antiinflamatório, além de seu chá ser usado para lavagens, gargarejos e compressas no tratamento da conjuntivite, faringites e estomatites (MOZHERENKOV & SHUBINA, 1976; NEDELKA et al., 1988; FLEMING, 1998).

Na Índia a calêndula é usada topicamente no tratamento de hemorróidas e como cremes para tratamento homeopático de queimaduras leves (VIJAYASARATHY; SHARMA; PRAKASH, 1981).

Muitos trabalhos têm descrito potenciais clínicos benéficos diferentes. A calêndula tem sido usada contra úlceras e gastroduodenites (CHAKURSKI et al., 1981 a; CHAKURSKI et al., 1981 b), como sedativo (SAMOCHOWIEC, 1983; BRINKER, 1997), como imunoestimulante e antiinflamatório (YASUKAWA et al., 1993; DELLA LOGGIA et al., 1994; BEZAKOVA et al., 1996; ZITTERL-EGLSEER et al., 1997).

Entre os principio ativos já identificados na calêndula pode-se citar carotenóides (ZITTERL-EGLSEER et al., 1997); saponinas triterpênicas (DELLA LOGGIA, 1994; ALONSO, 1998); flavonóides e cumarinas (PANIZZA, 1997; HAMBURGER, et al, 2003); hidroxycumarinas (PDR, 2000); triterpenos pentacíclicos trihidroxialcoois (WILKOMIRSKI, 1985; DELLA LOGGIA, et al., 1994); taninos; poliacetilenos; esteróis; sesquiterpenos glicosídeo (PDR, 2000; HAMBURGER, et al., 2003); e óleo volátil rico em sesquiterpenos hidrocarbonetos e álcoois (RADULESCU et al., 2000; HAMBURGER, et al., 2003).

Como quase todas as plantas da família das Compositae, as reações alérgicas são possíveis, porém raras (GOLDMAN, 1974). Estudos de toxicidade crônica e aguda apresentaram algum efeito *in vitro* e em camundongos, demonstrando que é preciso cuidados quanto ao uso indiscriminado de seus produtos e derivados (POISINDEX, 1991; RAMOS et al., 1998). No entanto, o uso extensivo por diversos séculos e diferentes civilizações, demonstra que os efeitos benéficos tem se apresentado em números muito mais significativos do que aqueles com certo prejuízo (GOLDMAN, 1974; KRAG, 1976; RAMOS et al., 1998).

O interesse industrial a respeito da *C. officinalis* se tornou mais evidente quando se descobriu seu potencial na extração de óleo a partir das

sementes, e mais ainda rico em ácido graxo conhecido como calêndico (ácido 8T, 10T, 12C – octadecatrienóico) (MEIZEER ZU BEERENTRUP & ROBBELEN, 1987).

O uso potencial do óleo de calêndula na indústria se aplica principalmente aos processos de produção de tintas e cosméticos, além de ser um dos ácidos graxos muito pesquisados na Europa na busca de novas aplicações, bem como substituições de outros óleos mais onerosos e difíceis de serem obtidos (MUUSE; CUPERUS; DERKSEN, 1992; ROBBELEN; THOOBALD; PASCUAL, 1994).

3.3. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As plantas apresentam uma série de barreiras pré-formadas e pós-formadas como proteção natural. Os fatores de resistência pré-formados encontram-se presentes nas plantas mesmo antes do contato com o patógeno, enquanto os pós-formados, que estão ausentes ou apresentam-se em baixo nível antes da infecção, são produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno (TAIZ & ZEIGER, 2004). Esses fatores envolvidos nos processos de resistência são subdivididos em estruturais ou bioquímicos. Sendo que os estruturais atuam como barreiras físicas e os bioquímicos na produção de substâncias tóxicas ao patógeno ou criando condições adversas ao estabelecimento deste na planta (PASCHOLATI & LEITE, 1994).

As plantas ainda podem ter suas defesas ativadas pelo tratamento com agentes bióticos ou abióticos, os quais podem ser de natureza orgânica, inorgânica ou sintética. Esses agentes capazes de ativarem repostas de defesa nas plantas são chamados de elicitores e atuam como indutores de resistência (STICHER; MAUCH; METRAUX, 1997).

Em 1901 foi descrito por Ray & Beauverie o primeiro relato de indução de resistência em begônia pelo uso de esporos atenuados de *B. cinerea* e relacionaram a indução com as condições ambientais de cultivo, demonstrando que as plantas podem pré-condicionar defesas contra pragas e doenças (VALLAD & GOODMAN, 2004).

A partir desses trabalhos pioneiros, pesquisas com indução de resistência foram surgindo e se desenvolvendo pelo mundo, com as mais diversas

culturas (TERRY & JOYCE, 2004; BOSTOCK, 2005). Os primeiros estudos desenvolvidos no Brasil foram em 1970, no Instituto Biológico de São Paulo, contra *Hemileia vastatrix*, com o uso de *Saccharomyces cerevisiae*, goma xantana, *Bacillus thuringiensis* e uredosporos inativados de *H. vastatrix* (BONALDO, PASCHOALATI; ROMEIRO, 2005).

Desta forma, as plantas medicinais produzem em seu metabolismo secundário substâncias as quais podem exercer importantes funções na interação planta-patógeno, seja ativando rotas de defesa da planta ou pela ativação de metabólitos como as fitoalexinas, que podem atuar como substâncias fungistáticas à semelhança dos fungicidas sintéticos (VIGO-SCHULTZ et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2007). Tanto os extratos, as tinturas e/ou óleos essenciais destas plantas têm como vantagem o fato de não poluírem o ambiente e serem considerados como alternativa no controle de fitopatógenos em plantas cultivadas (STANGARLIN et al., 1999), seja com ação fungistática (FIORI et al., 2000; BONALDO et al., 2004) ou bactericida (KARAMAN et al., 2003; KUHN et al., 2006) ou pela indução de respostas de defesa da planta, através de fitoalexinas, peroxidases e proteínas relacionadas à patogênese (SCHWAN-ESTRADA, 2003; KAGADE et al., 2004), o que indica a presença de compostos com característica de elicitores.

Compreende-se como fitoalexinas, os metabólitos secundários antimicrobianos que são produzidos por uma planta em resposta a estresse físico, químico e biológico, possuindo grande diversidade, com mais de 300 tipos já caracterizados em diferentes classes de compostos químicos (GUIMARÃES et al., 2007).

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o uso de extrato bruto e óleos essenciais obtidos da flora nativa os quais têm demonstrado potencial para o controle de fitopatógenos, devido à ação fungistática direta sobre vários fitopatógenos ou através da indução de fitoalexinas que indicam a presença de compostos com características de elicitoras.

Alguns autores comprovaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de substâncias obtidas a partir de plantas medicinais, demonstrando-se que o extrato de rizomas frescos de gengibre é eficiente para oídio da ervilha (SINGH et al, 1991), assim como o extrato de capim limão a 10% inibe completamente o crescimento *in vitro* de patógenos do feijoeiro responsáveis por podridões radiculares (VALARINI; FRIGHETTO; MELLO, 1994).

Alguns óleos essenciais e seus componentes também possuem atividades antimicrobianas, podendo ser em certos casos mais eficientes que alguns fungicidas comerciais (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Conforme Thompson (1989), os óleos comerciais como anitol, cinamaldeído, eugenol, safrol e carvacol apresentaram respostas positivas, mostrando efeito fungicida permanente para fungos de armazenamento.

Bonaldo et al. (2004) verificaram que na indução de resistência em pepinos para *Colletotrichum lagenarium* houve redução no número e tamanho das lesões na primeira folha verdadeira da planta, quando esta foi tratada com extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* na concentração de 20%.

Vigo-Schultz (2006) realizou trabalho com o objetivo de avaliar o efeito da tintura vegetal de *Mikamia glomerata* (guaco), na inibição do crescimento bacteriano de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, na indução de resistência local e/ou sistêmica e, no acúmulo da enzima de defesa vegetal peroxidase em folhas de plantas de couve-flor tratadas. O autor concluiu que a tintura inibiu o crescimento bacteriano a partir da concentração de 250 mg L⁻¹, sendo que esta não apresentou diferença significativa na indução de peroxidases.

Em trabalho realizado por Guimarães et al. (2007), preparados de cravos da Índia apresentaram capacidade de indução na síntese de fitoalexinas, gliceolinas, em cotilédones de soja. O óleo essencial desta mesma planta apresentou maior efeito na indução de fitoalexinas.

Gomes et al. (2009), que avaliaram a eficiência de indutores de resistência abióticos no controle de doenças da videira sob condições de campo no Submédio do Vale do São Francisco, verificaram que existem diferenças entre os níveis de resistência entre as plantas em relação à incidência de doenças após o tratamento com diferentes indutores de resistência.

Medice, Alves e Assis (2007) avaliaram o efeito *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial de eucalipto citriodora, citronela, nim e tomilho sobre o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, agente da ferrugem asiática da soja, através da microscopia eletrônica de varredura. Os autores concluíram que os óleos de tomilho, eucalipto citriodora, citronela e nim, em todas as concentrações testadas, tiveram efeito direto na germinação de urediniosporos de *P. pachyrhizi* e foram capazes de reduzir a severidade da ferrugem da soja em plantas em casa-de-vegetação.

Mazaro et al. (2008a) identificaram que preparados de folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora*), possuem potencial para induzir fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja, proporcionalmente ao aumento das concentrações dos preparados e que o óleo essencial de pitangueira apresentou efeito na indução de fitoalexinas superior aos demais preparados.

3.4. PÓS-COLHEITA DE MORANGOS

O morangueiro é pertencente à família das Rosáceas e ao gênero *Fragaria*, sendo o morango uma infrutescência de grande apreciação comercial por sua aparência, aroma e sabor atrativo, bem como pelo seu valor nutritivo (REIS et al., 2008). O morango apresenta alta perecibilidade pós-colheita, característica natural da espécie, a qual pode ser agravada por podridões, principalmente causadas por *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, e *Penicillium digitatum* (MAZARO et al., 2008b). Sendo que o principal patógeno associado aos frutos, é o fungo *B. cinerea*, que causa a doença conhecida como mofo-cinza, cuja característica é a formação sobre os frutos de uma massa de micélio de cor cinza (COSTA & VENTURA, 2006).

Segundo Calegaro, Pezzi e Bender (2002) a rápida deteriorização pós-colheita do morango em temperatura ambiente pode ser atribuída à alta taxa respiratória do morango e ao aumento na produção de etileno, bem como a suscetibilidade a danos mecânicos. Destacam que podem ser observados ainda após a colheita alterações na cor, na firmeza de polpa e perda do brilho natural, o que diminui a sua atração diante do consumidor, dificultando a sua comercialização.

Nos últimos anos, para atender a demanda de frutas frescas têm-se aumentado consideravelmente a produção e a área de plantio, o que gera o aumento na oferta de frutas para o mercado, acarretando na necessidade de se conhecer a fisiologia pós-colheita das frutas no que se refere à preservação da qualidade, prolongamento no período de comercialização e na menor suscetibilidade ao ataque de doenças (ZAICOVSKI et al., 2006).

Para Mazaro et al. (2008b), a minimização destas perdas na pós-colheita pode acontecer com a diminuição dos danos mecânicos e a manutenção dos frutos em condições adequadas de armazenamento como, com uso de baixa

temperatura e alta concentração de CO₂. Embora a atmosfera controlada, com altas concentrações de CO₂, tem-se mostrado eficiente no retardo da maturação, tal tecnologia ainda não está acessível ao pequeno produtor de morango.

Para redução de podridões na pós-colheita de morango, principalmente na diminuição da fonte de inóculo, ocorre a aplicação de fungicidas pré-colheitas. No entanto, o controle químico possui limitações pela alta concentração de resíduos encontrados nos pseudofrutos na comercialização, no aumento da resistência dos patógenos e na falta de fungicidas mais eficientes para a cultura (PAULUS, 1990).

Atualmente, a demanda mundial por alimentos orgânicos certificados tem pressionado o modelo convencional agrícola a constantes reavaliações de seus métodos de produção. Os consumidores vêm demonstrando interesse em conhecer como os alimentos são produzidos, o sistema de produção adotado, valor nutricional, região e local de produção, além das propriedades funcionais e medicinais das frutas (ZAICOVSKI et al., 2006).

Na busca de métodos alternativos e eficientes para atender estas demandas, surge-se o uso de compostos naturais ou biodegradáveis, derivados de animais ou plantas, que possuem poder de indução à resistência natural ou com poder fungistático. Estes métodos alternativos vêm ganhando destaque e importância entre a comunidade científica e os fitopatologistas (ZAICOVSKI et al., 2006; MAZARO et al., 2008b).

O resveratrol, uma fitoalexina pertencente à classe dos polifenólicos, encontrada naturalmente em mais de 70 espécies de plantas vem sendo estudado como alternativa em pós-colheita de frutos para o controle na incidência de podridões pelo seus efeitos fitoterápicos (LATRUFFE; DELMAS, JANNINM, 2002). Na produção de morango cv. "Camarosa" o resveratrol mostrou-se eficiente na prevenção de podridões pós-colheita quando os morangos foram armazenados em atmosfera refrigerada 0±1°C (ZAICOVSKI et al., 2006).

Outro produto que vem sendo estudado é a quitosana, um polissacarídeo obtido da desacetilização da quitina, presente em invertebrados marinhos, insetos, fungos e leveduras (MATHUR & NARANG, 1990), com efeito fungistático e indutor dos mecanismos de defesa das plantas (TERRY & JOYCE, 2004). A quitosana, quando aplicada em morangos, tem demonstrado eficiência no controle de *B. cinerea* e *R. stolonifer* (EL GHAOUTH, 1992). Reddy et al. (2000) também relataram que a aplicação em pré-colheita de quitosana, além de controlar

B. cinerea em pós-colheita mantiveram a firmeza da polpa e a acidez titulável, sendo seu uso em pós-colheita tão eficiente quanto ao uso de fungicidas, induzindo enzimas de defesa e a síntese de fitoalexinas, inibindo o crescimento de fungos. Mazaro et al. (2008b) concluíram que a aplicação na pré-colheita de quitosana, em plantas de morangueiro, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0% retardaram a maturação dos frutos, manteve maior firmeza de polpa e acidez titulável e diminuiu a perda de massa. Observou-se também a diminuição da produção de etileno, do teor de açúcares redutores e mantiveram mais elevado os teores de polifenóis totais. Além de induzir, nas três concentrações avaliadas, maior resistência das plantas a patógenos, resultando na diminuição de podridão dos frutos em pós-colheita.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi dividido em três experimentos conduzidos nos anos de 2009 e 2010, no Laboratório de Fitossanidade e Bioquímica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *Campus* de Dois Vizinhos – PR.

Nos três experimentos conduzidos, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em fatorial 3 x 5, sendo três formas de extração dos preparados à base de capítulos florais de *C. officinalis*, obtidos por extração alcoólica, infusão e maceração e cinco concentrações (zero, 1,25; 2,5; 5 e 10%). Na concentração zero utilizou-se água destilada.

4.1 OBTENÇÃO DOS PREPARADOS:

Extrato alcoólico: Para obtenção deste extrato, 50 gramas de capítulos florais de *C. officinalis* desidratados foram imersos em 500 mL de álcool de cereais por 48 horas na ausência de luz. Após este período, foi feita a filtragem em papel filtro procurando-se separar a parte sólida da solução. O volume total da solução obtido após a filtragem foi de 389 mL. Na sequência foi removido o etanol presente na solução por meio do evaporador rotativo durante 1 hora e 30 minutos a temperatura de 60°C. O restante do resíduo da evaporação foi dissolvido em água destilada até completar o volume da solução de 389 mL. A partir desta solução pronta na concentração de 10% foram preparadas as demais (5; 2,5 e 1,25%) fracionando-se a mesma.

Infusão: Para a preparação da infusão, utilizou-se 500 mL de água destilada a qual foi previamente aquecida até a temperatura de 100°C e logo após adicionada sobre 50 gramas de capítulos florais de *C. officinalis* desidratados, deixando-se agir por 20 minutos em recipiente fechado. Na sequência, foi feita a filtragem em papel filtro para separação da parte sólida da solução, obtendo-se 170 mL de solução, a qual foi utilizada como extrato na concentração de 10%. Desta solução, foram preparadas as demais concentrações (5; 2,5 e 1,25%).

Maceração: No caso da maceração, triturou-se em liquidificador 50 gramas de capítulos florais da planta *C. officinalis* desidratados, com 500 mL de água fria destilada. Após a trituração deixou-se reservar por período de 8 horas e feita a filtragem em papel filtro separando-se a parte sólida da solução, o que permitiu obter 200mL de solução na concentração de 10%. A partir desta foram preparadas às demais concentrações (5; 2,5 e 1,25%).

4.2 OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DO *B. cinerea*

O isolado do fungo foi obtido a partir de morango infectados com *B. cinerea* provenientes de plantação comercial do município de dois vizinhos (PR). Após a coleta, este material foi levado para o laboratório e as estruturas do patógeno transferidos para placas de Petri[®], contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar), com auxílio de estilete e incubadas em câmara de crescimento a 25°C, por 7 dias no escuro.

A contaminação com outros fungos foi eliminada através de sucessivas repicagens até a obtenção de cultura pura. Foram adicionados 10 mL de água destilada nas placas de Petri[®], contendo as culturas, friccionando-se levemente as colônias com auxílio de um pincel para a obtenção da suspensão. Através de sucessivas diluições foi ajustada a concentração da suspensão de *B. cinerea* para 1×10^4 esporos mL⁻¹, contados com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico (WAGNER JÚNIOR et al., 2005).

4.3. EXPERIMENTO I – AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DO POTENCIAL FUNGISTÁTICO DOS PREPARADOS À BASE DE *C. officinalis* SOBRE O FUNGO *B. cinerea*

Para avaliação do potencial fungistático dos preparados a base de *C. officinalis* foi realizado uma avaliação, *in vitro*, (Figuras 1), utilizando uma suspensão aquosa de conídios de *B. cinerea* previamente calibrada. Em cada placa de Petri foram adicionados 18 mL de meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e 2 mL de determinado preparado, perfazendo-se assim na concentração de 10% do preparado no meio de cultura. Após a solidificação, foi realizado um orifício de 8 mm no centro da placa, no qual introduziu-se 2 µL da suspensão aquosa de conídios de

B. cinerea (Figura 2). As placas foram mantidas em câmara de crescimento por sete dias a 25°C. Após este período foram feitas duas aferições de diâmetro do halo de crescimento do fungo, com o auxílio de paquímetro digital. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em fatorial 3 x 5 (forma de extração x concentração dos preparados) com 4 repetições e 1 placa por parcela.

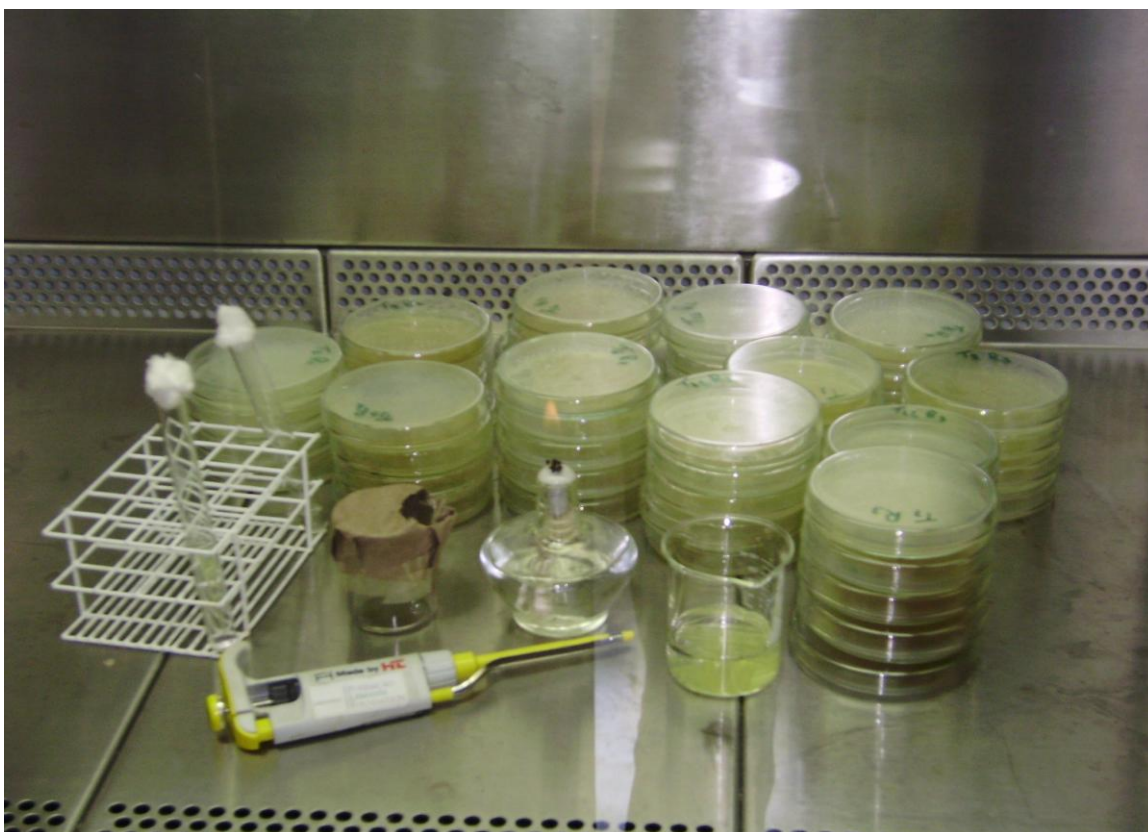


Figura 1: Materiais utilizados para realização do experimento I (placas de Petri[®], tubos de ensaio, pipeta, becker, lamparina) UTFPR, *Campus Dois Vizinhos*, 2010.

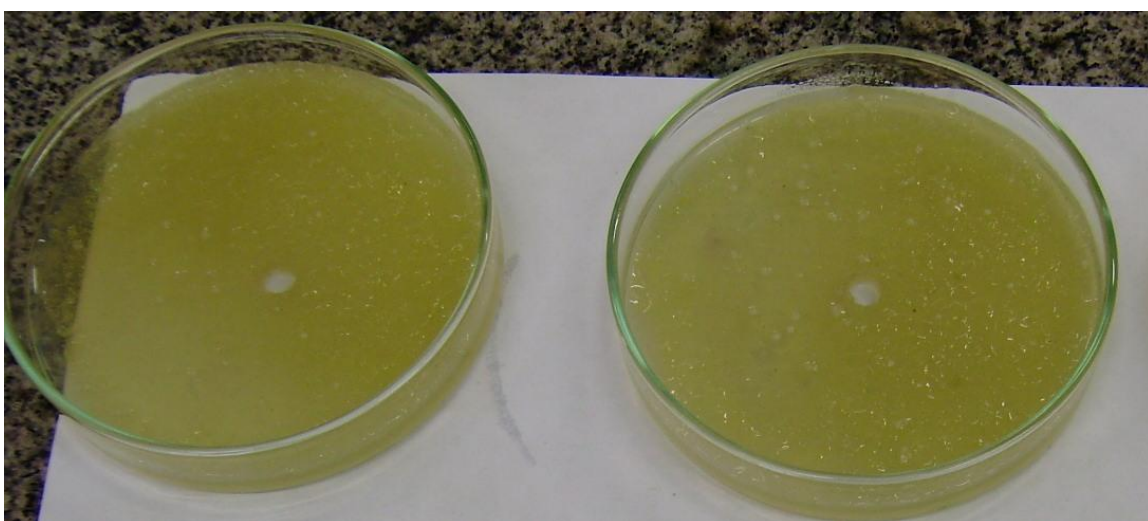


Figura 2: Placa de Petri[®] contendo meio de cultura e preparado da *C. officinalis* com orifício central para inoculação do fungo *B. cinerea*. UTFPR, *Campus Dois Vizinhos*, 2010.

4.4. EXPERIMENTO II - INDUÇÃO DE FITOALEXINAS EM COTILÉDONES DE SOJA EM RESPOSTA A PREPARADOS À BASE DE *C. officinalis*

As sementes de soja cv. "COODETEC 205" foram semeadas em gerbox contendo areia autoclavada e mantidas em temperatura ambiente por 10 dias (Figura 3). Após a emergência das plântulas os cotilédones foram removidos e lavados com água destilada. Na face abaxial dos cotilédones foi feito um corte superficial e sobre esse corte, depositou-se 40 µL da preparação elicitora, no caso um dos preparados ou de água destilada utilizada como testemunha. Os cotilédones foram pesados e na sequência colocados em placas de Petri® (quatro por placa) previamente forradas com disco de papel filtro umedecidas com água destilada (Figura 4). As placas foram tampadas e mantidas em estufa, a 26°C, no escuro. Após o período de 20 horas, os cotilédones foram retirados das placas e colocados em tubos de plásticos contendo 15 mL de água destilada, e então, estes tubos foram submetidos a agitação magnética por 1 hora para a extração de gliceolina. A solução foi filtrada e a absorbância determinada em espectrofotômetro, marca NOVATÉCNICA, modelo UV – SP 2000 Spectrum a 285 nm.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em fatorial 3 x 5 (forma de extração x concentração do preparado), com 4 repetições, considerando-se cada placa de Petri® como parcela. As formas de extração dos preparados de *C. officinalis* foram por meio de extração alcoólica, infusão e maceração, ambos testados nas concentrações de zero; 1,25; 2,5; 5 e 10%.



Figura 3: Plântulas de soja emergindo em areia autoclavada utilizando gerbox no Experimento II. UTFPR, *Campus Dois Vizinhos*, 2010.



Figura 4: Aplicação do preparado a base de *C. officinalis* nos cotilédones de soja. UTFPR, *Campus Dois Vizinhos*, 2010.

4.5. EXPERIMENTO III – CONTROLE DE PODRIDÕES EM PÓS-COLHEITA DE MORANGOS PELO USO DE PREPARADOS À BASE DE *C. officinalis*

Neste experimento foram utilizados frutos de morangueiro da cv. “Aroma” oriundos de uma propriedade rural do município de Dois Vizinhos (PR). Os frutos após a colheita foram acondicionados em bandejas plásticas, utilizando-se 15 frutos por bandeja (Figura 5). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em fatorial 3 x 5 (forma de extração x concentração do preparado), com 4 repetições, considerando-se cada bandeja com 15 frutos uma parcela. Foram utilizados três formas de obtenção dos preparados (extrato alcoólico, infusão e maceração) diluindo-as e cinco concentrações (zero; 1,25; 2,5; 5 e 10%). Na concentração zero por cento foi aplicada água destilada. Os frutos foram pulverizados com 2 mL de um dos preparados, de acordo com sua forma de extração e concentração. Após 6 horas da pulverização dos preparados, efetuou-se a inoculação do fungo, através de pulverização sob os frutos de uma solução aquosa contendo 10^4 conídios/mL. As avaliações iniciaram após a primeira bandeja apresentar 50% dos frutos contaminados por fungos, cerca de 3 dias após a inoculação do mesmo. Foram avaliadas as variáveis podridões, físico-químicas (Perda de massa, firmeza de polpa, teor de sólidos solúveis totais e acidez titulável) e bioquímicas (açúcares totais, proteínas totais, antocianinas e flavonóides e atividade da enzima fenilalanina amônia-liase - FAL). Todas as variáveis foram analisadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Bioquímica da UTFPR - *Campus* Dois Vizinhos. As análises bioquímicas foram realizadas a partir de amostras coletadas dos mesmos pseudofrutos utilizados para as análises físico-químicas, as quais foram imediatamente armazenadas em freezer a -20°C após a coleta, até as avaliações.

A firmeza da polpa foi realizada em cinco frutos por parcela, sendo determinada em uma das faces de cada, com auxílio de penetrômetro TR, modelo RT – 327, ponteira de 8 mm de diâmetro. Os resultados foram expressos em $\text{libras}/\text{cm}^2$ e transformados para Newton.

O teor de sólidos solúveis totais dos frutos foi analisado a partir do suco extraído e analisado com o auxílio de um refratômetro Takemura.

Para análise da acidez titulável foram separadas amostras de polpa de cinco frutos, trituradas em almofariz. Em seguida, foram retirados 10 mL deste suco

e acrescentados 90 mL de água destilada. A partir desta solução foi avaliado o pH com auxílio de peagâmetro Tecnal, modelo TEC – 3MP. Posteriormente, para determinação da acidez, a solução foi titulada com NaOH 0,1N até atingir valor de pH 8,1. Para expressar a acidez em gramas de ácido cítrico por 100 mL de suco, foi realizado o seguinte cálculo (AOAC, 1997):

$$\text{g de ácido cítrico/100 mL} = \frac{64,02 \times N \times V_{\text{NaOH}}}{V_{\text{amostra}}}$$

sendo: N = normalidade e V = volume.

As concentrações de açúcares solúveis totais foram determinadas pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956). As amostras foram maceradas em almofariz contendo 5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5) centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g. Foram utilizados 20 μ L do extrato e adicionado 0,5 mL de fenol a 5,0 % + 2,5 mL ácido sulfúrico concentrado. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro, marca NOVATÉCNICA, modelo UV – SP 2000 Spectrum a 490 nm. A concentração de açúcares totais foi determinada por meio de curva padrão de glicose.

Para dosagem de proteínas totais, as amostras da polpa dos morangos foram maceradas em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, o material foi centrifugado (14.000g / 10 min a 4°C) e o sobrenadante coletado. Para quantificação do conteúdo total de proteínas das amostras foi empregado o teste de Bradford (1976). A leitura de proteínas totais foi em espectrofotômetro a 630 nm, utilizando soro albumina bovina como padrão.

Para a quantificação de flavonóides e antocianinas pesou-se 1 g da polpa de morango, macerado posteriormente em almofariz, juntamente com 25 mL da solução extratora, formada por etanol 95% + HCl 1,5 N (HCl 1,5 N = 125 mL de HCl P.A. + 875 mL de água destilada) na proporção de 85:15, ou seja, 850 mL de etanol 95% para 150 mL de HCl 1,5N quando para 1000 mL. Após a maceração, os extratos foram acondicionados em tubos de ensaio ao abrigo da luz e refrigerados por aproximadamente 4°C, durante período de 20 horas. Após este período, os extratos foram filtrados, lavados com mais 25 mL da solução extratora e deixados em repouso em frasco coberto por papel alumínio por 2 horas. Posteriormente retirou-se 1 mL da amostra o qual foi adicionado a 10 mL da solução extratora, em tubo de ensaio e agitado em vortex. Na sequência foi feita a leitura das amostras no

espectrofotômetro a 374 nm para obtenção da absorvância de flavonóides e a 535 nm para obtenção da absorvância de antocianinas.

Para quantificação da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), foi pesado 1,0 g de polpa de morango de cada um dos respectivos tratamentos. Após a pesagem, as amostras foram transferidas para almofariz previamente gelado, acrescentando-se 6,0 mL do tampão de extração, a 4°C, macerando-se a mistura completamente, e centrifugando-a em seguida a 6000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi diluído antes da análise da atividade enzimática e da determinação da proteína solúvel, pipetando-se 200 µL do mesmo e acrescentando-se 5 mL do tampão de extração (22,2 g de Tris; 0,37 g de EDTA; 85,5 g de sacarose; 10 g de PVP). Nesta solução completou-se o volume para 1000 mL de água destilada, após ajustar o pH para 8,0 com ácido clorídrico 2,0 N. A atividade da FAL foi avaliada com base na diferença de absorvância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (HYODO; KURADA; YANG, 1978). Para isto, foi pipetado em tubos de ensaio 1,5 mL de cada extrato enzimático, acrescentando-se 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina (49,6 mg mL⁻¹) ou água destilada na prova em “branco”. A mistura foi incubada a 40°C por uma hora, interrompendo-se a reação com banho de gelo e procedendo-se as leituras espectrofotométricas a 290 nm (RODRIGUES; BEZERRA; COELHO, 2006).



Figura 5: Frutos de morangueiro colocados em bandejas plásticas, após a pulverização da solução dos preparados utilizados e inoculação de *B. cinerea*. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, 2010.



Figura 6: Fruto do morangueiro com sintomas de mofo cinzento, causado pelo fungo *B. cinerea*. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, 2010.

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS:

Os dados das variáveis foram submetidos à análise de variância e quando significativos às médias foram comparadas pelo teste de Tukey para o fator qualitativo e análise de regressão para o fator quantitativo, a 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do software de análise estatística ASSISTAT.

Os dados perda de massa e incidência de podridões sofreram transformação ($x = \arccos \sqrt{x/100}$) antes da realização da análise estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. EXPERIMENTO I – AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL FUNGISTÁTICO DOS PREPARADOS A BASE DE *C. officinalis* SOB O FUNGO *B. cinerea*

Na Tabela 1 os resultados observados demonstraram influência significativa dos preparados da planta medicinal *C. officinalis* sobre a redução do crescimento do fungo *B. cinerea*. Ao comparar as diferentes formas de obtenção do preparado observou-se que nas concentrações destes de 2,5% e 5,0% o processo de maceração foi superior estatisticamente ao obtido por extrato alcoólico e infusão.

Estes resultados obtidos possibilitam afirmar que a *C. officinalis* produz ingredientes ativos eficientes no controle *in vitro* de *B. cinerea*.

Resultados semelhantes destacaram o preparado a base de maceração em comparação com extrato alcoólico e infusão no estudo de Padilha et al. (2007), avaliando o potencial da planta medicinal alfava-cravo (*Ocimum basilicum*) na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja. Os autores destacaram o benefício dessa técnica, tendo à maceração a vantagem de ser utilizada pelo pequeno produtor, pois é uma técnica adaptável à pequena propriedade por não ser necessário a utilização de equipamentos sofisticados para preparação da mesma.

No entanto quando se diluiu o preparado na concentração de 10%, a maceração não diferenciou-se estatisticamente da forma de extração por infusão, mesmo não apresentando desenvolvimento do fungo *B. cinerea*.

O mesmo foi observado na concentração do preparado de 1,25%, no qual o processo de extração por maceração não diferiu estatisticamente do extrato alcoólico nas médias obtidas para o diâmetro do halo de crescimento de *B. cinerea*.

Quando se avaliou cada forma de extração do preparado, no extrato alcoólico as médias de diâmetro do halo de crescimento do *B. cinerea* foram semelhantes estatisticamente entre si. Porém, para infusão a maior média foi obtida com a concentração de 10% do preparado e para maceração a partir da concentração de 1,25%.

Os preparados obtidos por extrato alcoólico nas cinco concentrações e de infusão até 5% não demonstraram efeito positivo na inibição de *B. cinerea*. Possivelmente, isto esteja relacionado ao fato que a técnica de obtenção do extrato alcoólico, o qual aquece o preparado a 60° C para extração do álcool, e infusão, aonde utiliza-se água fervente, podem fazer com que ocorra a desestruturação de alguma molécula ou composto de ação antimicrobiana.

Tabela 1: Crescimento de *B. cinerea* em diferentes preparados e concentrações de *Calendula officinalis*. UTFPR, Dois Vizinhos, 2010.

Preparados	Concentração				
	0%	1,25%	2,5%	5%	10%
Médias de diâmetro do halo de crescimento <i>B. cinerea</i> (mm)					
Extrato alcoólico	20,0 aA*	10,4 abA	11,9 aA	17,3 aA	18,6 aA
Infusão	20,0 aA	18,1 aA	14,2 aA	18,6 aA	3,2 bB
Maceração	20,0 aA	5,3 bB	0 bB	0 bB	0 bB
CV (%)	41,86				

* Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Esses resultados observados com a *C. officinalis* no controle de *B. cinerea* vem corroborar com os propostos por diversos autores (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000; BONALDO et al., 2004; VIGO-SCHULTZ, 2006; GUIMARÃES et al., 2007; GOMES et al. 2009; MEDICE, ALVES e ASSIS, 2007), os quais citam o potencial de plantas medicinais no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungistática direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas, indicando a presença de moléculas com características elicitoras.

5.2. EXPERIMENTO II: INDUÇÃO DE FITOALEXINAS EM COTILÉDONES DE SOJA EM RESPOSTA A DERIVADOS A BASE DE *C. officinalis*

Os preparados da *C. officinalis* apresentam estatisticamente ação significativa na indução das fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja (Tabela 2). Esse efeito pôde ser observado, entre os preparados, independente da forma de extração e da concentração destes.

De acordo com os resultados obtidos para a absorvância de fitoalexina gliceolina observa-se que para a concentração de 1,25% do preparado os processos

de extração por infusão e maceração assemelharam significativamente entre si. Na concentração de 2,5% as formas de extração do preparado não diferiram estatisticamente entre si. Já para a concentração 5% do preparado os processos de extração por extrato alcoólico e maceração foram estatisticamente iguais entre si e superiores a infusão. E para a concentração de 10% do preparado comportaram-se estatisticamente iguais os processos de extração por infusão e maceração.

Quando realizou-se avaliações das concentrações utilizadas de acordo com a forma de extração, obteve-se superioridade para absorvência nas concentrações de 2,5; 5 e 10% para extrato alcoólico e 1,25; 2,5; 5 e 10% para infusão e maceração.

Tabela 2: Indução de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja pelos diferentes preparados e concentrações de *Calendula officinalis*. UTFPR, Dois Vizinhos, 2010.

Preparados	Concentração				
	0%	1,25%	2,5%	5%	10%
Absorvência de fitoalexina gliceolina (285nm)/g.p.f					
Extrato alcoólico	0,282 aC*	0,447 bBC	0,577 aAB	0,767 abA	0,565 bAB
Infusão	0,282 aC	0,685 aAB	0,717 aAB	0,617 bB	0,935 aA
Maceração	0,282 aD	0,787 aBC	0,587 aC	0,935 aAB	1,120 aA
CV (%)	18,21				

* Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Resultados semelhantes foram observados por Bonaldo et al. (2004) utilizando diferentes concentrações (0,1; 1; 5; 10; 15; 20 e 25%) de extrato de eucalipto, demonstrando que a produção de fitoalexinas deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo foi mais expressiva nas concentrações acima de 10% e gliceolina em cotilédones de soja acima de 15%. Bem como trabalhos realizados por Stangarlin et al. (1999) em diversas espécies como cânfora, poejo, romã, cardo santo e pitangueira também foram observados maior síntese de fitoalexinas em concentrações mais elevadas desses extratos.

Dados semelhantes foram observados por Mazaro et al. (2008a) com preparados de pitangueira, entre eles extrato alcoólico, infusão e maceração, nas suas maiores concentrações, possibilitando maior indução de fitoalexinas em cotilédones de soja. Em mesocótilos de sorgo a produção de fitoalexinas também apresentou um sensível acúmulo quando foram aplicados hidrolatos de *Helietta*

apiculata, *Conyza canadensis* (L.) e *Cymbopogon nardus* (L.), principalmente nas maiores concentrações (FRANZENER et al. 2007).

Conforme relatado por Mazaro et. al. (2008a), possivelmente, concentrações mais elevadas fazem com que a percepção de sinais derivados do elicitor seja mais eficiente, causando alterações no metabolismo celular, como ativação de proteínas G, aumento no fluxo de íons através da membrana plasmática, atividade de quinases e fosfatases e a produção de mensageiros secundários, ativando rotas metabólicas, entre elas a síntese de fitoalexinas.

5.3. EXPERIMENTO III – CONTROLE DE PODRIDÕES EM PÓS-COLHEITA DE MORANGOS PELO USO DE PREPARADOS A BASE DE *C. officinalis*

Considerando-se a influência da aplicação dos preparados sobre as variáveis físico-químicas observou-se que estes não diferiram entre si sobre incidência de podridões, firmeza de polpa e sólidos solúveis totais. Para perda de massa e acidez titulável, apesar da análise de variância mostrar-se significativa, não houve diferenças estatísticas quando comparou-se as médias entre si (tabela 3).

Tabela 3: Variáveis físico-químicas de morangos tratados com preparados extraídos da planta medicinal *C. officinalis*, UTFPR, Dois Vizinhos, 2010.

Preparados	Concentração				
	0%	1,25%	2,5%	5%	10%
	Perda de massa (%)				
Extrato alcoólico	2,76 aA*	3,34 aA	3,36 aA	2,88 aA	3,18 aA
Infusão	2,76 aA	3,18 aA	3,24 aA	2,58 aA	2,93 aA
Maceração	2,76 aA	3,48 aA	3,02 aA	2,63 aA	2,87 aA
CV (%)	7,96				
	Incidência de Podridões (%)				
Extrato alcoólico	65,00 ^{ns}	64,99 ^{ns}	60,00 ^{ns}	51,66 ^{ns}	68,33 ^{ns}
Infusão	65,00 ^{ns}	54,99 ^{ns}	58,33 ^{ns}	48,33 ^{ns}	55,00 ^{ns}
Maceração	65,00 ^{ns}	56,66 ^{ns}	60,00 ^{ns}	55,00 ^{ns}	53,33 ^{ns}
CV (%)	16,88				
	Firmeza de polpa (N)				
Extrato alcoólico	14.44 ^{ns}	13.98 ^{ns}	15.10 ^{ns}	13.40 ^{ns}	12.25 ^{ns}
Infusão	14.44 ^{ns}	11.65 ^{ns}	13.50 ^{ns}	13.32 ^{ns}	15.55 ^{ns}
Maceração	14.44 ^{ns}	15.71 ^{ns}	12.81 ^{ns}	12.75 ^{ns}	14.34 ^{ns}
CV (%)	8.33				
	Acidez total (g.ac/100g MV)				
Extrato alcoólico	1.0550 aA	1.0875 aA	1.0075 aA	1.0525 aA	1.0075 aA
Infusão	1.0550 aA	1.0325 aA	1.0375 aA	1.0650 aA	1.0200 aA
Maceração	1.0550 aA	1.0750 aA	1.0550 aA	1.0825 aA	1.0200 aA

CV (%)	7,49				
	Sólidos solúveis totais (°Brix)				
Extrato alcoólico	6,66 ^{ns}	6,64 ^{ns}	6,65 ^{ns}	6,26 ^{ns}	6,42 ^{ns}
Infusão	6,66 ^{ns}	6,64 ^{ns}	6,44 ^{ns}	6,81 ^{ns}	6,43 ^{ns}
Maceração	6,66 ^{ns}	6,84 ^{ns}	6,78 ^{ns}	6,45 ^{ns}	6,75 ^{ns}
CV (%)	4,30				

* Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

^{ns} Não significativo ao Teste F.

Observou-se que a perda de massa ocorreu dentro da normalidade para a cultura, não diferindo estatisticamente da testemunha nenhum dos tratamentos testados. Conforme Mazaro et al. (2008b), a perda de massa fresca em morangos é causada principalmente pela perda de água do fruto através dos processos de transpiração e respiração. O morango, devido à sua epiderme fina e ao seu alto teor de umidade, tem alta susceptibilidade à perda de água, em função da transpiração frente às baixas umidades relativas do ar e às altas temperaturas, resultando em desidratação do fruto.

O percentual de redução dos frutos podres não sofreu interferência dos preparados testados, sendo que para todos os preparados a incidência de podridões foi elevada. Possivelmente, os fungos fitopatogênicos tiveram uma capacidade patogênica elevada, favorecida pela inoculação em pós-colheita. Com isso a pressão de inóculo, a agressividade do patógeno, as condições favoráveis e a susceptibilidade dos morangos não permitiram observar qualquer efeito dos preparados sobre a incidência de podridões. Sendo o mofo-cinzento o principal patógeno estudado em pós-colheita de morangos e o grande desafio das pesquisas nessa área.

A firmeza de polpa é uma variável muito importante em frutos, conforme Mazaro et al. (2008b) a perda de firmeza é dependente da degradação da parede celular e turgidez dos tecidos. Durante a maturação ocorre um incremento de enzimas, principalmente a poligalacturonase, a pectinase e a celulase, degradando os principais constituintes da parede celular, como a transformação de protopectinas em pectinas solúveis. A perda de firmeza nesse experimento ocorreu dentro da normalidade da pós-colheita de morangos.

As médias de acidez titulável e sólidos solúveis totais apesar de não terem apresentado diferenças entre si, de acordo com a forma de extração e

concentração dos preparados são variáveis importantes na retenção da maturação dos morangos e na preservação da sua qualidade.

Conforme Mazaro et al. (2008b) a perda da acidez está relacionada ao processo natural de maturação dos frutos, pois ocorre uma utilização dos ácidos orgânicos, principalmente cítrico e málico em morangos, como substrato no processo respiratório via ciclo de Krebs. Os ácidos orgânicos e os açúcares são importantes componentes do sabor e aroma e a relação açúcares/acidez é freqüentemente utilizada como um índice de qualidade e de aceitabilidade, pelo consumidor, para frutas (MORAES, 2005). Os sólidos solúveis totais mantiveram-se dentro da normalidade na vida pós-colheita dos morangos. Nestes parâmetros também não ocorreram alterações ou comportamentos anormais em função da aplicação dos tratamentos.

Nas análises bioquímicas (Tabela 4) realizadas para açúcares totais e antocianinas foram semelhantes estatisticamente entre si para os fatores estudados e a interação destes. Para os flavonóides obteve-se diferença estatística na interação (forma de extração x concentração do preparado). O extrato alcoólico em todas as concentrações e a infusão a partir de 5% estimularam a produção destas substâncias. Para a maceração as médias obtidas para flavonóides assemelharam-se estatisticamente entre si, independente da concentração do preparado. Porém, ao avaliar os valores para flavonóides obtidos nas concentrações de 1,25; 2,5; 5 e 10% observaram-se superioridade quando o preparado foi obtido por extrato alcoólico. No entanto, não diferiram estatisticamente nas formas de extração por maceração e infusão, respectivamente.

Os flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas, onde são os responsáveis pelo aspecto colorido das folhas, flores e frutos (MOON; WANG; MORRIS, 2006). Entre suas principais propriedades biológicas destacam-se a atividade antioxidante, protegendo os organismos dos raios ultravioletas, poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, estresses, dentre outros (VOLP et al., 2008).

Para a enzima fenilalanina amônia-liase – FAL obteve-se diferença significativa na interação (formas de extração x concentração do preparado). O extrato alcoólico a 10%, a infusão a 5 e 10% e a maceração a 5% estimularam a produção desta substância.

Tabela 4: Variáveis bioquímicas de morangos tratados com diferentes preparados e concentrações da planta medicinal *C. officinalis*, UTFPR, Dois Vizinhos, 2010.

Preparados	Concentração				
	0%	1,25%	2,5%	5%	10%
	Açúcares totais (mg/g.tecido)				
Extrato alcoólico	877,2451 ^{ns}	913,094 ^{ns}	758,470 ^{ns}	878,890 ^{ns}	743,361 ^{ns}
Infusão	877,245 ^{ns}	795,468 ^{ns}	771,002 ^{ns}	969,846 ^{ns}	842,604 ^{ns}
Maceração	877,245 ^{ns}	931,075 ^{ns}	851,149 ^{ns}	904,250 ^{ns}	880,805 ^{ns}
CV (%)	7,12				
	Antocianinas (mg/100g)				
Extrato alcoólico	33,136 ^{ns}	31,664 ^{ns}	25,147 ^{ns}	28,413 ^{ns}	30,921 ^{ns}
Infusão	33,136 ^{ns}	30,801 ^{ns}	29,660 ^{ns}	24,574 ^{ns}	23,749 ^{ns}
Maceração	33,136 ^{ns}	32,834 ^{ns}	29,257 ^{ns}	33,108 ^{ns}	30,604 ^{ns}
CV (%)	11,35				
	Flavonóides (mg/100g)				
Extrato alcoólico	6,3688 aC*	24,1452 aAB	18,2113 aB	24,8242 aAB	27,6339 aA
Infusão	6,3688 aC	7,4236 bC	11,1599 aBC	17,6487 aAB	23,8425 aA
Maceração	6,3688 aA	7,4816 bA	12,5355 aA	8,4429 bA	10,1386 bA
CV (%)	15,15				
	FAL (UAbs/min/mg prot)				
Extrato alcoólico	0.6757 aB	0.9971 aB	1.1320 aB	0.9227 bB	2.0809 aA
Infusão	0.6757 aB	0.9160 aAB	0.9290 aAB	1.3713 abA	1.2618 bA
Maceração	0.6757 aB	1.0220 aAB	1.1306 aAB	1.4298 aA	0.8330 bB
CV (%)	26,12				

* Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

^{ns} Não significativo.

Os resultados da atividade da FAL foram bastante interessantes, pois ocorreu estímulo da mesma pela aplicação dos preparados, bem como no aumento dos flavonóides, sendo os mesmos, produtos da ativação da rota metabólica dos fenilpropanóides, aonde possui a FAL como enzima chave. Conforme Cavalcanti et al. (2005) a FAL atua na desaminação da L-fenilalanina, formando ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico), os quais estão presentes na formação de ésteres, cumarinas, flavonóides e ligninas. Possivelmente a fenilalanina amônialiase é a enzima mais estudada no metabolismo secundário vegetal, pois está situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário e a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2004).

6 CONCLUSÕES

O preparado a base de maceração de *Calendula officinalis* em todas as suas concentrações inibe o crescimento do fungo *B. cinerea in vitro* sendo que a partir de 2,5% desse preparado apresenta capacidade de inibição total. O tratamento com infusão a 10% também apresenta resposta positiva na inibição do crescimento de *B. cinerea*;

Os preparados extrato alcoólico, infusão e maceração de *C. officinalis* apresentam capacidade de indução das fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja;

A aplicação dos preparados extrato alcoólico, infusão e maceração a base de *C. officinalis* em pós-colheita de morangos, não interfere sobre os parâmetros físico-químicos perda de massa, incidência de podridões, firmeza de polpa, acidez titulável e sólidos solúveis totais e sobre os bioquímicos açúcares totais e antocianinas.. Já para flavonóides o extrato alcoólico em todas as concentrações e a infusão a partir de 5% estimulam a produção dessa substância. A atividade da enzima FAL foi estimulada pela aplicação dos extratos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugere-se a realização de novos trabalhos que busquem avaliar outras técnicas de inibição de *B.cinerea in vitro* por *C. officinalis*;

Trabalhos moleculares devem ser realizados buscando identificar os gens envolvidos verso os princípios ativos pertencentes à calêndula na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja;

Em pós-colheita sugerem-se novos trabalhos considerando cultivares, grau de maturação dos frutos, condições de armazenamento, pressão de inóculo e outros patógenos.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, J., LOPEZ, J., CORTES, G.. In *vitro* antimicrobial activity of various plants extracts used by purpecha against some enterobacteriaceae. **International Journal Pharmacognosy**. v31, p. 61, 1993.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. Washington D.C. 11^a ed., p.144-196, 1970.

ALONSO JR. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis Ediciones, p. 327-330, 1998.

BEZAKOVA, L. et al. Inhibitory activity of isorhamnetin glycosides from *Calendula officinalis* L. on the activity of lipoxygenase. **Pharmazie**, v. 51, p. 126, 1996.

BISSET,N.G. Herbal drugs and phytopharmaceutics. Stuttgart: **MedPharm CRC Press**, p. 566, 1994.

BONALDO, S. M. et al. Fungitoxidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.2, p.128-134, 2004.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.11-28, 2005.

BOSTOCK, R.M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.545-580, 2005.

BOUCAUD-MAITRE, Y., ALGEMON, O., RAYNAUD, J. Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts. **Pharmazie**, v. 43, p. 220,1988.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitycal Biochemistry**, Orlando, v.72, p.248-254, 1976.

BRAGA, M.R. Fitoalexinas e a defesa das plantas. Acesso em 22/jul/2007. On line. Disponível na Internet: [www.sbg.org.br/ PN-NET/texto5/defesa.htm](http://www.sbg.org.br/PN-NET/texto5/defesa.htm).

BRINKER, F.J. Herb contraindications and drug interactions: with appendices addressing specific conditions and medicines. Sandy, Or.: **Eclectic Institute**, p.146, 1997.

CALEGARO, J. M.; PEZZI, E.; BENDER, R. J. Utilização de atmosfera modificada na conservação de morangos em pós-colheita. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1049-1055, ago. 2002.

CAVALCANTI, L.S. et al. 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, p.81-124. 2005.

CETKOVIC, G.S. et al. Antioxidant properties of marigold extracts. **Food Research International** . 2004.

CHAKURSKI, I. et al. Tratament of chronic colitis with an herbal combination of *Taraxacum officinalis*, *Hipericum perforatum*, *Melissa officinalis*, *Calendula officinalis* and *Foeniculum vulgare*. **Vutr Boles**, v. 20, p. 51, 1981a.

CHAKURSKI, I. et al. Tratament of duenal ulcers and gastroduodenitis with a herbal combination of *Symphitum officinalis* and *Calendula officinalis* with and without antacids. **Vutr Boles**, v. 20, p. 44, 1981b.

CORRÊA, Cirino Junior, et al. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2 ed. Jaboticabal, FUNEP, 162p.1994.

COSTA, H.; VENTURA, J.A. Manejo Integrado de Doenças do Morangueiro. In: III ENCONTRO NACIONAL DO MORANGO E II ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2006, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, **Documentos**, v. 167, v.1. p.17-28. 2006.

DE TOMMASI, N. et al. Structure and in *vitro* antiviral activity of triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. **Planta Medica**, v. 57, p. 250, 1991.

DE TOMMASI, N. et al. Structure and in *vitro* antiviral activity of sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis*. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 830, 1990.

DELLA LOGGIA, R. et al. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**, v. 60, p. 516, 1994.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analitycal Biochemistry**, Orlando, v.28, p.350-356, 1956.

EL GHAOUTH, A. et al. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, São Paulo, v.82, p.398-402, 1992.

ELIAS, R. et al. Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L. and *Hedera helix* L. **Mutagenesis**, v. 5, p. 327, 1990.

FIORI, A. C. G. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.148, p.483-487, 2000.

FLEMING, T. (ed). **PDR for herbal medicines**. Montvale, NJ: Medicinal Economics Company, Inc., p. 660 -661.1998.

FRANZENER, G. et al. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 29-38, jan./mar. 2007.

GOLDMAN, I. Anaphylactic shock after gargaling with infusion of *Calendula*. **Klinicheskaya Meditsina**. 52: 142 p. 1974.

GOMES, E.C.S.; PEREZ, J.O.; BARBOSA, J. Resistência induzida como componente do manejo de doenças da videira. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 6, n. 2, 2009.

GUIMARÃES, S.S. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja (*Glycine max*) em respostas a derivados de capítulos florais de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* L.) In: I Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária da UTFPR - ExpoUT, 2007, Dois Vizinhos. **Anais do I Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária** UTFPR. Dois Vizinhos: MASTERGRAF GRÁFICA E EDITORA LTDA, v. 1, 2007.

HAMBURGER M. et al. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). **Fitoterapia**, 74: 328-338. 2003.

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S. F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**. v.62, p.31-35, 1978.

KAGADE, S. et al. Antimicrobial activity and induction of resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.65, p.91-100, 2004.

KALVATCHEV, Z.; WALDER, R.; GALZARO, D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. **Biomed Pharmacother**. 51: 176 p.1997.

KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.85, n.2/3, p.231-235, 2003.

KRAG, K. Plants used as contraceptives by the North American Indians: an ethnobotanical study. **Botanical museum**. Cambridge, MA: Harvard University, 1177 p. 1976.

KUHN, O. J. et al. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v.27, n.1, p.13-20, 2006.

LATRUFFE, N. et al. Molecular analysis on the chemopreventive properties of resveratrol, a plant polyphenol microcomponent. **International Journal of Molecular Medicine**, Philadelphia, v.10, n.6, p.755-760, 2002.

LUZ, L. A. de la; FERRADÁ, C.R.; GOVÍN, E.S. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.1, p.23-27, 2001.

MARTINS, Ernane Ronie et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 220 p. 2000.

MARTINS, Ernane Ronie (org) et al. **Plantas Medicinais**. Viçosa: UFV, IP. Univ., 220p, 1995.

MATHUR, N. K.; NARANG, C.K. Chitin and Chitosan, Versatile Polysaccharides from Marine Animals. **Journal of Chemical Education**, Madison, v.67, n.11, p.938-942, 1990.

MAZARO, Sérgio 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, 2008a.

MAZARO, Sérgio M. et al. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-smetil. **Revista Brasileira De Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 185-190, Março 2008b.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R.T. de. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd.. **Ciência e agrotecnologia**. Lavras, vol.31, n.1, p.83-90. 2007.

MEIZER ZU BEERENTRUP, H.; ROBBELEN, H. *Calendula* and *Coriandrum* – New potential oil crops for industrial uses. **Fat Science Technology**. 6: 227 p. 1987.

MOON Y. J.; WANG X.; MORRIS M. E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in Vitro**; 20(2):187-210; 2006.

MORAES, I.V.M. Morango processado minimamente e conservado sob refrigeração e atmosfera controlada. Campinas, 2005. 98p. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.

MOZHERENKOV, V.P.; SHUBINA, L.F. Treatment of chronic conjunctivitis with *Calendula*. **Medical Sestra**, 35: 33 p. 1976.

MUUSE, B.G.; CUPERUS, F.P.; DERKSEN, J.T.P.. Composition and physical properties of oils from new oilseed crops. **Industrial Crops and Products**. 1: 57, 1992.

NEDELKA, A. et al. Experimental study of the effectivity of eye ointments. **Oftalmologicheskii Zhurnal**, 43: 429 p. 1988.

PADILHA, T. R. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja (*Glycine max*) em resposta a derivados de folhas de alfavaca-cravo (*Ocimum basilicum*). In: I Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária da UTFPR - ExpoUT, 2007, Dois Vizinhos. **Anais do I Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária UTFPR**. Dois Vizinhos: MASTERGRAF GRÁFICA E EDITORA LTDA, v. 1. p. 26-29. 2007.

PANIZZA, S. **Plantas que curam**: cheiro de mato. 2. ed., São Paulo: IBRASA, 279 p. 1997.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.1-51, 1994.

PAULUS, A.O. Fungal diseases of strawberry. **HortScience**, Alexandria, v.25, p.885-889, 1990.

PDR FOR HERBAL MEDICINE. 2nd ed. New Jersey: Montvale, p. 497-99. 2000.

POISINDEX. *Calendula arvensis*. **Healthcare series**. Vol. Series 99: Micromedex, 1991.

RADULESCU V; DONEANU C; T. LOLOIU. G.C. Investigation of chemical composition of *Calendula officinalis* . **Revue Roumaine de Chimie**. 2000.

RAMOS, A. et al. Genotoxicity of na extract of *Calendula officinalis* L.. **Journal Ethnopharmacology** 61: 49 p. 1998.

REDDY, M.V.B. et al. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.20, p.39-51, 2000.

REIS, K. C. dos et al. Efeito de diferentes sanificantes sobre a qualidade de morango cv. oso grande **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 196-202, jan./fev., 2008.

ROBBELEN, G.D.; THEOBALD, D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. Variability, selection and performance of *Calendula officinalis* and *Euphorbia lagascae* fro

industrial seed-oil uses. In: Alternative oilseed and fibre crops for cool and wet regions of Europe. **Proceedings of a workshop**. 60 p. 1994.

RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B. indução de resistência a *Fuzarium oxysporum f. SP. tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira** 31:492-499. 2006.

SAMOCHOWIEC, L. Pharmacological study of saponosides obtained from *Aralia manschurica* Rupr. Et Maxm. And *Calendula officinalis* L. on central nervous system. **Herba Polonica**, 29: 151 p. 1983.

SARTÓRIO, M.L. et al. **Cultivo orgânico de plantas medicinais**. Viçosa- MG: Aprenda Fácil, 260 p. 2000.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extrato e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência - plantas medicinais. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 2003, São Pedro. **Anais...** São Pedro: [s.n.], 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v.30, n. 1-2, p. 129-137, 2000.

SHIPOCHLIEV, T. Uterotonic action of extracts from a group of medicinal plants. **Veterinarno Meditsinski Nauki**. 18: 94 p. 1981.

SINGH, U. P. et al. Control of powdery mildew of peã by ginger extract. **Indian Phytopathology**, v. 44, p. 55-59, 1991.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência**, Brasília, v.6, n.11, p.16-21, nov./dez. 1999.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Gainesville, v.35, p.235-270, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.32, p.1-13, 2004.

THOMPSON, D. P. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. **Mycologia**, v. 81, p 151-153, 1989.

VALARINI, P. J.; FRIGHETTO, R. T.S.; MELLO, I. S. Potencial da erva medicinal (*Cymbopogon citratus*) no controle de fitopatógenos do feijoeiro. **Revista de Agricultura**, v. 69, p. 139-150, 1994.

VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science**, v.44, p.1920-1934, 2004.

VIGO-SCHULTZ, S. C. et al. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris pv. campestris*) em couve-flor. **Seminário de Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 515-524, out./dez. 2006.

VIJAYASARATHY, V.; SHARMA, L.; PRAKASH, A. Indigenous drug treatment for hemorrhoids. **Probe**, 1981.

VOLP A. C. P. et al. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**; 23:141-9, 2008.

WAGNER JÚNIOR, A. et al. Peach flower reaction to inoculation with *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. **Journal of the Pomological Society**, Blacksburg, v.59, n.03, p.141-147, 2005.

WILKOMIRSKI, B. Pentacyclic triterpene triols from *Calendula officinalis* flowers. **Phytochemistry**, 24: 3066-3067, 1985.

YASUKAWA, K. et al. Inhibitory effect of edible plant extracts on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced ear edema in mice. **Phytotherapy Research**, 7: 185 p 1993.

ZAICOVSKI, C.B. et al. Resveratrol na qualidade pós-colheita de morangos "camarosa" **Revista Brasileira De Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 443-446, out-dez, 2006.

ZITTERL-EGLSEER, K. et al. Antioedematous activities of the main triterpene diol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). **Journal Ethnopharmacology**, 57: 139 p. 1997.

ÍNDICE DE APÊNDICES

APÊNDICE 01 – Quadro de análise de variância para o potencial fungistático dos preparados a base de <i>C. officinalis</i> sob o fungo <i>B. cinerea</i> , <i>in vitro</i>	52
APÊNDICE 02 – Quadro de análise de variância para indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a preparados a base de <i>C. officinalis</i> . ..	52
APÊNDICE 03 – Quadro de análise de variância para perda de massa dos pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de <i>C. officinalis</i>	52
APÊNDICE 04 – Quadro de análise de variância para incidência de podridões em pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de <i>C. officinalis</i>	52
APÊNDICE 05 – Quadro de análise de variância para firmeza de polpa de pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de <i>C. officinalis</i>	53
APÊNDICE 06 – Quadro de análise de variância para acidez total da polpa de pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de <i>C. officinalis</i>	53
APÊNDICE 07 – Quadro de análise de variância para sólidos solúveis totais em pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de <i>C. officinalis</i>	53
APÊNDICE 08 – Quadro de análise de variância para açúcares totais de pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de <i>C. officinalis</i>	53
APÊNDICE 09 – Quadro de análise de variância para o teor de antocianinas em pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de <i>C. officinalis</i>	54
APÊNDICE 10 – Quadro de análise de variância para flavonóides em pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de <i>C. officinalis</i>	54
APÊNDICE 11 – Quadro de análise de variância para fenilalanina amônia-liase (FAL) em pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de <i>C. officinalis</i>	54

APÊNDICES

APÊNDICE 01 – Quadro de análise de variância para o potencial fungistático dos preparados a base de *C. officinalis* sob o fungo *B. cinerea*, *in vitro*.

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Preparados (F1)	2	1388.30449	694.15225	28.0581 **
Concentração (F2)	4	1179.96026	294.99007	11.9237 **
Interação F1xF2	8	1066.92474	133.36559	5.3907 **
Total	59			
CV% =	41,86			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 = p < .05$)

^{ns} não significativo ($p \geq .05$)

APÊNDICE 02 – Quadro de análise de variância para indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a preparados a base de *C. officinalis*.

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Preparados (F1)	2	0.46210	0.23105	17.0294 **
Concentração (F2)	4	2.40219	0.60055	44.2628 **
Interação F1xF2	8	0.67073	0.08384	6.1794 **
Total	59			
CV% =	18,21			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 = p < .05$)

^{ns} não significativo ($p \geq .05$)

APÊNDICE 03 – Quadro de análise de variância para perda de massa dos pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de *C. officinalis*.

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Preparados (F1)	2	0,90663	0,45332	0,7228 ^{ns}
Concentração (F2)	4	9,99939	2,49985	3,9859 **
Interação F1xF2	8	1,29999	0,16250	0,2591 *
Total	59			
CV% =	7,96			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 = p < .05$)

^{ns} não significativo ($p \geq .05$)

APÊNDICE 04 – Quadro de análise de variância para incidência de podridões em pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de *C. officinalis*.

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Preparados (F1)	2	158,73470	79,36735	1,1001 ^{ns}
Concentração (F2)	4	370,65760	92,66440	1,2844 ^{ns}
Interação F1xF2	8	236,53443	29,56680	0,4098 ^{ns}
Total	59			
CV% =	16,89			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 = p < .05$)

^{ns} não significativo ($p \geq .05$)

APÊNDICE 05 – Quadro de análise de variância para firmeza de polpa de pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de *C. officinalis*.

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Preparados (F1)	2	1.00156	0.50078	0.0979 ns
Concentração (F2)	4	10.42066	2.60516	0.5093 ns
Interação F1xF2	8	66.52707	8.31588	1.6258 ns
Total	59			
CV% =	16,33			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

^{ns} não significativo ($p \geq .05$)

APÊNDICE 06 – Quadro de análise de variância para acidez total da polpa de pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de *C. officinalis*.

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Preparados (F1)	2	0.00320	0.00160	0.2605 ns
Concentração (F2)	4	0.02319	0.00580	0.9429 ns
Interação F1xF2	8	0.01030	0.00129	0.2093 *
Total	59			
CV% =	7,49			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

^{ns} não significativo ($p \geq .05$)

APÊNDICE 07 – Quadro de análise de variância para sólidos solúveis totais em pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de *C. officinalis*.

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Preparados (F1)	2	0.29433	0.14716	0.4567 ns
Concentração (F2)	4	0.36426	0.09106	0.2826 ns
Interação F1xF2	8	0.93520	0.11690	0.3628 ns
Total	59			
CV% =	8,59			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

^{ns} não significativo ($p \geq .05$)

APÊNDICE 08 – Quadro de análise de variância para açúcares totais de pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de *C. officinalis*.

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Preparados (F1)	2	31334.60702	15667.30351	1.0555 ns
Concentração (F2)	4	118093.69265	29523.42316	1.9890 ns
Interação F1xF2	8	90180.80857	11272.60107	0.7594 ns
Total	59			
CV% =	14.20			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

^{ns} não significativo ($p \geq .05$)

APÊNDICE 09 – Quadro de análise de variância para o teor de antocianinas em pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de *C. officinalis*.

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Preparados (F1)	2	116.56470	58.28235	1.3600 ns
Concentração (F2)	4	252.57935	63.14484	1.4735 ns
Interação F1xF2	8	219.16931	27.39616	0.6393 ns
Total	59			
CV% =	21,81			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

^{ns} não significativo ($p \geq .05$)

APÊNDICE 10 – Quadro de análise de variância para flavonóides em pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de *C. officinalis*.

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Preparados (F1)	2	1287.54991	643.77495	36.0660 **
Concentração (F2)	4	1327.62007	331.90502	18.5942 **
Interação F1xF2	8	784.39582	98.04948	5.4930 **
Total	59			
CV% =	29,81			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

^{ns} não significativo ($p \geq .05$)

APÊNDICE 11 – Quadro de análise de variância para fenilalanina amônia-liase (FAL) em pseudofrutos de morangueiro pulverizados com preparados a base de *C. officinalis*.

F.V	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Preparados (F1)	2	0.25255	0.12628	1.6153 ns
Concentração (F2)	4	3.56201	0.89050	11.3911 **
Interação F1xF2	8	3.71328	0.46416	5.9374 **
Total	59			
CV% =	26,12			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

^{ns} não significativo ($p \geq .05$)