

Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução da síntese de fitoalexinas e no efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea*, *in vitro*.

MAZARO, S.M.^{1*}; FOGOLARI, H.¹; WAGNER JÚNIOR, A.¹; CITADIN, I.²; SANTOS, I.²

¹Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Dois Vizinhos, Estrada para Boa Esperança, Km 4, CEP:85.660-000, Dois Vizinhos, PR. sergio@utfpr.edu.br (autor corresp.), ²UTFPR, Campus Pato Branco, Via do Conhecimento, Km 1, Caixa Postal 571, CEP:85.501-970, Pato Branco, PR.

RESUMO: Foram desenvolvidos três experimentos com o objetivo de avaliar o potencial de preparados a base de calêndula (*Calendula officinalis* L.) na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, na indução de mecanismos de resistência em frutos de morango, e o efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea in vitro*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, para 15 tratamentos resultantes da combinação de três formas de extração (extrato alcoólico, infusão, e maceração) em cinco concentrações (zero; 1,25; 2,5; 5; e 10%). Os resultados demonstram que 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 ocorreu alteração no teor de flavonóides, bem como a atividade da enzima FAL foi estimulada pela aplicação dos extratos; no entanto, não foi constatado o controle de podridão dos frutos. O efeito fungistático foi observado na extração por maceração em todas as suas concentrações reduzindo o crescimento do fungo *B. cinerea in vitro* sendo que, a partir de 2,5%, observou-se inibição total. A extração por infusão também apresentou resposta positiva na redução do crescimento de *B. cinerea*, com melhor resposta na concentração de 10% do preparado.

Palavras-chave: Morango, Plantas medicinais, Gliceolina, Controle alternativo de doenças.

ABSTRACT: Potential of *Calendula officinalis* L. extracts in inducing phytoalexin synthesis and fungistatic effect on *Botrytis cinerea in vitro*. Three experiments were carried out to evaluate the potential of calendula (*Calendula officinalis* L.) extracts for phytoalexin induction in soybean cotyledons, resistance mechanism induction in strawberry fruits and fungistatic effect on *Botrytis cinerea in vitro*. Experimental design was completely randomized with 15 treatments resulting from the combination of three forms of extraction (alcohol extract, infusion and maceration) at five concentrations (zero, 1.25, 2.5, 5 and 10%). Results showed that *C. officinalis* extracts could induce the phytoalexins glyceollins in soybean cotyledons. In the application of extracts during the strawberry postharvest, there was a change in flavonoid content, as well as in the activity of the enzyme PAL, which was stimulated by the application of extracts; however, fruit rot control was not noted. Fungistatic effect was observed for the extract obtained by maceration at all used concentrations, reducing *in vitro* the growth of the fungus *B. cinerea*, and from 2.5% there was total inhibition. The extract obtained by infusion also showed a positive response in reducing *B. cinerea* growth, with better response at the concentration of 10% extract.

Key words: Strawberry, Medicinal plants, Glyceollin, Alternative control of diseases.

INTRODUÇÃO

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 (Bonaldi et al., 2004).

A *Calendula officinalis* L. está entre as diversas espécies usadas pela medicina popular e pesquisadas cientificamente, tendo seu uso descrito

Recebido para publicação em 09/08/2011

Aceito para publicação em 18/05/2012

para tratamentos de processos febris, cânceres e antiinflamatório de pele em humanos e animais, bem como efeito antimicrobiano (De Tommasi et al., 1991).

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 e dioxiantocianidinas (Cavalcanti et al., 2005).

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).

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. Assim, os objetivos do trabalho foram avaliar o potencial de preparados a base de calêndula (*C. officinalis*) na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, na indução de mecanismos de resistência em frutos de morango e o efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. *in vitro*.

MATERIAL 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, constituindo 15 tratamentos, 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. Para todos os tratamentos utilizou-se 4 repetições.

O extrato alcoólico foi obtido a partir de 50 gramas de capítulos florais de *C. officinalis* desidratados, os quais foram imersos em 500mL 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. 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. A partir desta solução pronta na concentração de 10% foram preparadas as demais (5; 2,5 e 1,25%) fracionando-se a mesma.

A infusão foi obtida utilizando 500mL 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, a qual foi utilizada como extrato na concentração de 10%. Desta solução, foram preparadas as demais concentrações (5; 2,5 e 1,25%).

Para a obtenção da maceração, triturou-se em liquidificador 50 gramas de capítulos florais da planta *C. officinalis* desidratados, com 500mL de água destilada fria. 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. A partir desta solução de 10% foram preparadas às demais concentrações (5; 2,5 e 1,25%).

O isolado do fungo foi obtido a partir de morangos 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 transferidas para placas de Petri®, contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar), com auxílio de estilete e incubadas em câmara de crescimento a 25 °C, por sete dias no escuro.

A descontaminação do fungo foi realizada através de sucessivas repicagens até a obtenção de cultura pura. Foram adicionados 10mL 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).

No primeiro experimento, avaliou-se a indução de fitoalexinas em cotilédones de soja

em resposta a preparados à base de *C. officinalis*. Sementes de soja cv. "COODETEC 205" foram semeadas em gerbox contendo areia autoclavada e mantidas em temperatura ambiente por 10 dias. 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 40µL 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 (parcela experimental) previamente forrada com disco de papel filtro umedecido com água destilada. 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 15mL de água destilada, e então, estes tubos foram submetidos a agitação magnética por 1 hora para a extração de gliccolina. A solução foi filtrada e a absorbância determinada em espectrofotômetro, marca NOVATÉCNICA, modelo UV – SP 2000 Spectrum a 285nm.

No segundo experimento avaliou-se o uso dos preparados à base de *C. officinalis* sobre a pós-colheita de morangos. Neste experimento foram utilizados frutos de morangueiro da cv. "Aroma" oriundos de uma propriedade rural do município de Dois Vizinhos (PR). Os frutos imediatamente após a colheita foram acondicionados em bandejas plásticas, utilizando-se 15 frutos por bandeja (parcela experimental). Os frutos foram pulverizados com 2mL de um dos preparados, de acordo com sua forma de extração e concentração. Após 6 horas da pulverização dos preparados, efetuou-se a inoculação, através de pulverização dos frutos de uma suspensão aquosa contendo 10⁴ conídios/mL de *B. cinerea*. As avaliações iniciaram após a primeira bandeja apresentar 50% dos frutos contaminados por fungos, cerca de três 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 perda de massa foi obtida pela diferença de massa nas amostras do dia da instalação do

experimento e do valor encontrado nas pesagens realizadas no final do experimento. A avaliação da incidência de podridões foi realizada pela análise visual e expressa em percentual de frutos, sendo consideradas frutos podres aquelas que apresentavam sintomas típicos (micélio aparente) de ataque de patógenos, sendo os patógenos identificados com o uso de lupas de mesa.

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 libras/cm² 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 foi extraído 10 ml de suco da polpa dos frutos e acrescentados 90 mL de água destilada. A determinação da acidez foi por titulação com NaOH 0,1N até atingir valor de pH 8,1 e expresso em gramas de ácido cítrico/100ml.

As concentrações de açúcares solúveis totais foram determinadas pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956). Para dosagem de proteínas foi empregado o teste de Bradford (1976). Para a quantificação de flavonóides e antocianinas pesou-se 1g 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 = 125mL 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 1mL da amostra o qual foi adicionado a 10mL 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 absorbância de flavonóides e a 535nm para obtenção da absorbância de antocianinas.

A determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase foi por quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, conforme metodologia descrita por Kuhn (2007).

No terceiro experimento avaliou-se, o potencial fungistático dos preparados à base de *C. officinalis* sobre *B. cinerea*, *in vitro*. Nessa avaliação foi utilizado uma suspensão aquosa de conídios de *B. cinerea* previamente calibrada, de 1 x 10⁴ esporos.

mL⁻¹. Em cada placa de Petri (unidade experimental) foram adicionados 18mL de meio de cultura BDA e 2mL 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 2µL da suspensão aquosa de conídios de *B. cinerea*. As placas foram mantidas em câmara de crescimento por sete dias a 25°C no escuro. Após este período foram feitas duas aferições de diâmetro ortogonais do halo de crescimento do fungo, com o auxílio de paquímetro digital.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados a base de *C. officinalis*

Os preparados da *C. officinalis* apresentaram estatisticamente ação significativa na indução das fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja (Figura 1). De acordo com os resultados obtidos, a maceração apresentou os melhores resultados em comparação com infusão e o extrato alcoólico. Para maceração a curva de regressão foi quadrática, com o ponto de máxima eficiência, em 9,73% do preparado. O extrato alcoólico também apresentou

curva quadrática com ponto de máxima eficiência em 6,10%. Já para a infusão o comportamento da curva foi cúbica, com ponto de máxima em 2,72% e de mínima em 7,28%.

Os resultados obtidos corroboram com os 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 maiores concentrações. 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.

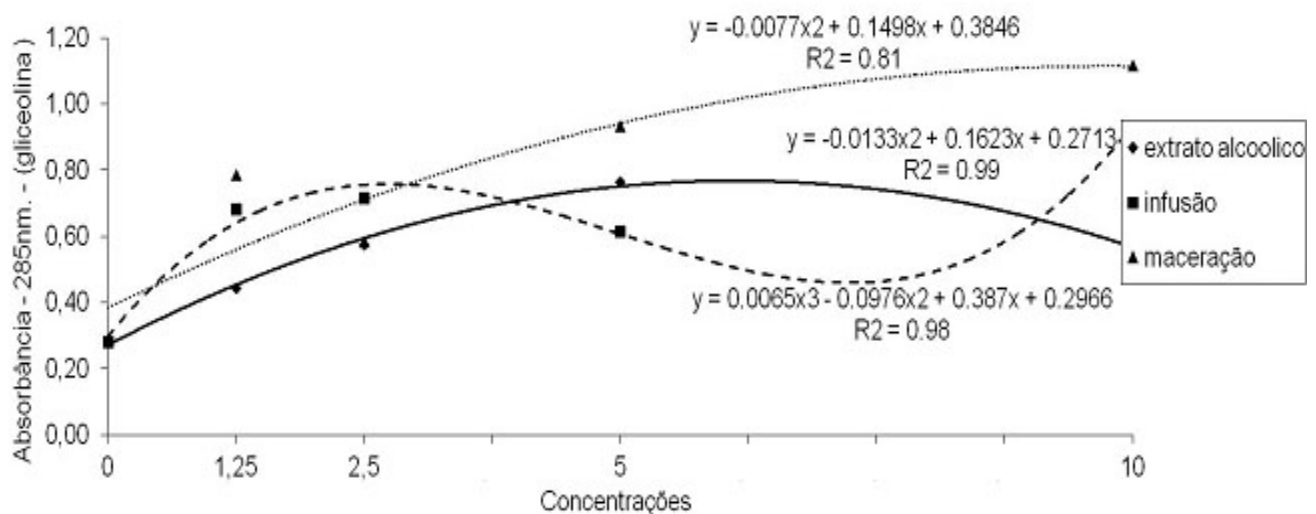


FIGURA 1. Absorbância de fitoalexina gliceolina (285 por grama de peso fresco) em cotilédones de soja pelos diferentes preparados e concentrações de *Calendula officinalis*. UTFPR, Dois Vizinhos, 2010.

TABELA 1. Perda de massa, incidência de podridões, firmeza de polpa, acidez e sólidos solúveis totais 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 ^{ns}	3,34 ^{ns}	3,36 ^{ns}	2,88 ^{ns}	3,18 ^{ns}
Infusão	2,76	3,18	3,24	2,58	2,93
Maceração	2,76	3,48	3,02	2,63	2,87
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	54,99	58,33	48,33	55,00
Maceração	65,00	56,66	60,00	55,00	53,33
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	11.65	13.50	13.32	15.55
Maceração	14.44	15.71	12.81	12.75	14.34
CV (%)	8.33				
Acidez (g.ac/100g MV)					
Extrato alcoólico	1.0550 ^{ns}	1.0875 ^{ns}	1.0075 ^{ns}	1.0525 ^{ns}	1.0075 ^{ns}
Infusão	1.0550	1.0325	1.0375	1.0650	1.0200
Maceração	1.0550	1.0750	1.0550	1.0825	1.0200
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	6,64	6,44	6,81	6,43
Maceração	6,66	6,84	6,78	6,45	6,75
CV (%)	4,30				

^{ns} Não significativo ao Teste F.

Experimento II – Características físico-químicas 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 perda de massa, incidência de podridões, firmeza de polpa, acidez titulável e sólidos solúveis totais (Tabela 1).

Observou-se que a perda de massa ocorreu dentro da normalidade para a cultura, não diferindo estatisticamente da testemunha em 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 sensibilidade 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, o fungo fitopatogênico inoculado, *Botrytis cinerea*, teve 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 suscetibilidade 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 Mazaró et al. (2008b) a perda de firmeza é dependente da degradação da parede celular e turgidez dos tecidos. Durante a maturação ocorre o 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, da sua qualidade, 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 Mazaró et al. (2008b) a perda da acidez está relacionada ao processo natural de maturação dos frutos, pois ocorre 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 frequentemente utilizada como 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 2) realizadas para açúcares totais e antocianinas, os dados não diferiram estatisticamente entre si para os fatores estudados e a interação destes, sendo que

os valores mantiveram-se dentro da normalidade.

Para os flavonóides obteve-se diferença estatística na interação (forma de extração x concentração do preparado). De acordo com os resultados obtidos, o extrato alcoólico apresentou os melhores resultados em comparação com infusão e a maceração. Para o extrato alcoólico a curva de regressão foi quadrática, com o ponto de máxima eficiência, em 7,7% do preparado. A infusão também apresentou curva quadrática com ponto de máxima eficiência em 16,26%. Já para a maceração o comportamento da curva foi cúbica, com ponto de máxima em 2,70% e de mínima em 7,69%.

Os flavonóides são estruturas polifenólicas de baixa massa 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 e 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). De acordo com os resultados obtidos, todos os preparados tiveram capacidade de induzir a atividade da FAL (Figura 3). Para maceração e infusão a curva de regressão foi quadrática, com o ponto de máxima eficiência, em 5,2% e 7,32% respectivamente. Já para o extrato alcoólico o comportamento da curva foi cúbica, com ponto de máxima em 2,54% e de mínima em 6,16%.

Os resultados da atividade da FAL foram bastante interessantes, pois ocorreu estímulo da mesma pela aplicação dos preparados, bem como

TABELA 2: 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	877,245 ^{ns}	913,094 ^{ns}	758,470 ^{ns}	878,890 ^{ns}	743,361 ^{ns}
Infusão	877,245	795,468	771,002	969,846	842,604
Maceração	877,245	931,075	851,149	904,250	880,805
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	30,801	29,660	24,574	23,749
Maceração	33,136	32,834	29,257	33,108	30,604
CV (%)	11,35				

^{ns} Não significativo ao Teste F.

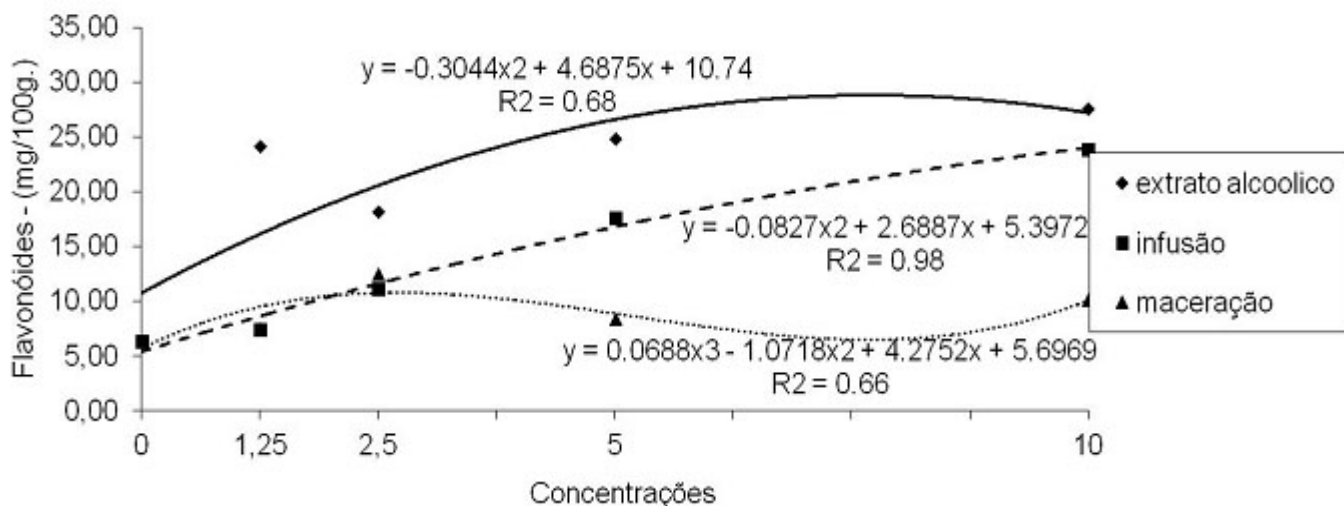


FIGURA 2: Teor de flavonóides em morangos tratados com diferentes preparados e concentrações da planta medicinal *C. officinalis*, UTFPR, Dois Vizinhos, 2010.

no aumento dos flavonóides, sendo os mesmos, produtos da ativação da rota metabólica dos fenilpropanóides, tendo 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 amônia-liase 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).

Experimento III – Avaliação *in vitro* do potencial fungistático dos preparados a base de *C. officinalis* sob o fungo *B. cinerea*

Na figura 4 os resultados observados demonstraram influência significativa dos preparados de *C. officinalis* sobre a redução do crescimento de *B. cinerea*. Ao comparar os diferentes preparados observou-se que a maceração apresentou destaque na inibição do crescimento do patógeno. Possivelmente, isto esteja relacionado ao fato de que a técnica de obtenção do extrato alcoólico, o qual aquece o preparado a 60° C para extração do álcool, e infusão, aonde se utiliza água fervente, podem fazer com que ocorra a desestruturação de alguma molécula ou composto de ação antimicrobiana.

Nas análises de regressão, para maceração,

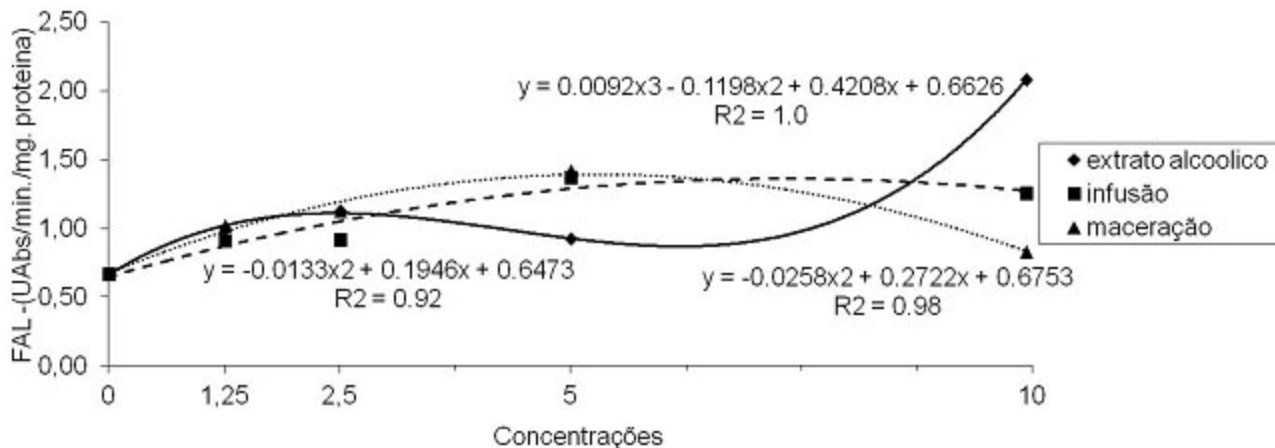


FIGURA 3. Atividade da enzima FAL em morangos tratados com diferentes preparados e concentrações da planta medicinal *C. officinalis*, UTFPR, Dois Vizinhos, 2010.

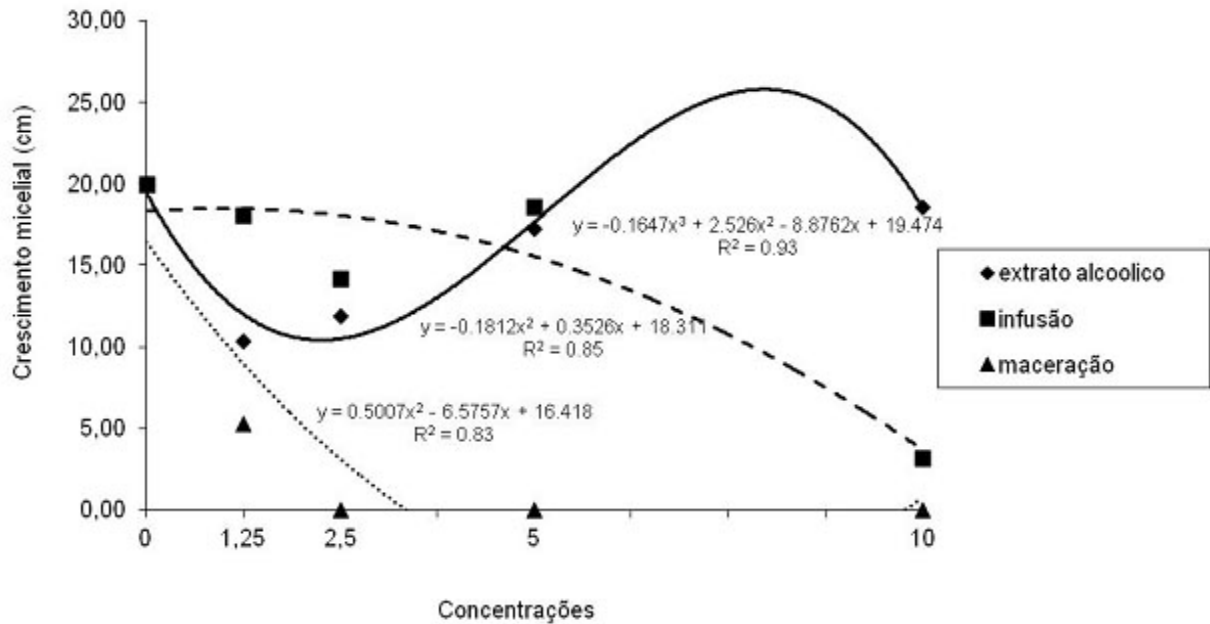


FIGURA 4. Crescimento micelial de *B. cinerea* (mm) em diferentes preparados e concentrações de *Calendula officinalis*. UTFPR, Dois Vizinhos, 2010.

a curva foi quadrática, com o ponto de máxima eficiência em 3,23% do preparado, impedindo o crescimento micelial a partir de 2,5% do preparado. A infusão também apresentou curva quadrática com ponto de máxima eficiência na maior concentração avaliada, ou seja, 10%. Já para o extrato alcoólico o comportamento da curva foi cúbica, com ponto de máxima em 2,26% e de mínima em 7,97%.

Estes resultados permitem 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 a maceração como 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.

O resultado observado com a *C. officinalis* no controle de *B. cinerea* vem corroborar com os propostos por diversos autores (Bonaldo et al., 2004; Vigo-Schultz et al., 2006; Gomes et al. 2009; Medice et al., 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.

CONCLUSÕES

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 seguintes parâmetros físico-químicos: perda de massa, incidência de podridões, firmeza de polpa, acidez titulável, sólidos solúveis totais, nem sobre os parâmetros bioquímicos açúcares totais e antocianinas. Já os flavonóides e a atividade da enzima FAL são estimuladas pela aplicação dos extratos.

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

REFERÊNCIA

- 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.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein

- utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.72, p.248-254, 1976.
- 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.
- DE TOMMASI, N. et al. Structure and *in vitro* antiviral activity of triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. **Planta Medica**, v. 57, p. 250, 1991.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.28, p.350-356, 1956.
- 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, 2007.
- GOMES, E.C.S. et al. Resistência induzida como componente do manejo de doenças da videira. **Engenharia Ambiental** - Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 2, 2009.
- KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Piracicaba, 2007, 140p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MAZARO, S. M. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de Pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1824-1829, 2008a.
- MAZARO, S. 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, 2008b.
- MEDICE, R. et al. 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.
- MOON Y. J. et al. 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.
- 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.
- 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.
- STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.6, n.11, p.16-21, 1999.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 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, 2006.
- VOLPA, C. P. et al. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**; 23:141-149, 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.