

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar



Dissertação

**Alterações bioquímicas e fisiológicas em couve submetidas à aplicação de
óleos essenciais e húmus de minhoca**

Camila Heidrich Medeiros

Pelotas, 2015

Camila Heidrich Medeiros

Alterações bioquímicas e fisiológicas em couve submetidas à aplicação de óleos essenciais e húmus de minhoca

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Dr. Gustavo Schiedeck (Embrapa Clima Temperado)

Co-orientadores: Dra. Ângela Diniz Campos (Embrapa Clima Temperado)

Dra. Roberta Marins Nogueira Peil

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M488a Medeiros, Camila Heidrich

Alterações bioquímicas e fisiológicas em couve submetidas à aplicação de óleos essenciais e húmus de minhoca / Camila Heidrich Medeiros ; Gustavo Schiedeck, orientador ; Angela Diniz Campos, Roberta Marins Nogueira Peil, coorientadoras. — Pelotas, 2015.

58 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Óleos essenciais. 2. Húmus de minhoca. 3. Resistência sistêmica. I. Schiedeck, Gustavo, orient. II. Campos, Angela Diniz, coorient. III. Peil, Roberta Marins Nogueira, coorient. IV. Título.

CDD : 635.3

Camila Heidrich Medeiros

Alterações bioquímicas e fisiológicas em couve submetidas à aplicação de óleos essenciais e húmus de minhoca

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 31 de Agosto de 2015

Banca examinadora:

Dr. Gustavo Schiedeck(Orientador)

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Carlos Rogério Mauch

Doutor em Agronomia pela Universidade Politécnica Valencia da Espanha.

Prof. Dr. Márcio Paim Mariot

Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas.

Aos meus pais, Rosani Ortiz Heidrich e Jorge Luis de Moura Medeiros (*in memoriam*), meu namorado Tiago e aos meus irmãos Aline e Gabriel pelo apoio e confiança ao longo de minha formação pessoal e profissional. **Dedico**

Agradecimentos

À Deus

À minha mãe pelo amor incondicional, incentivo constante, por nunca me deixar desistir, pelo exemplo que foi para mim durante todos esses anos e pelos esforços não medidos para que eu conseguisse chegar ao fim desta jornada.

À minha família, pelo carinho, pela compreensão, incentivo e pelos exemplos de humildade, coragem, dignidade e ética que sempre foram suporte e guia nas minhas decisões.

Ao meu namorado Tiago pela compreensão, amizade e apoio.

Ao programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” da Universidade Federal de Pelotas – FAEM/UFPel e demais colegas, pela oportunidade de aprendizado e vivências durante o período do curso.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária– Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, pela oportunidade concedida ao aprimoramento profissional e realização dos trabalhos, disponibilidade de infra-estrutura e mão-de-obra.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Ao orientador Pesquisador Dr. Gustavo Schiedeck pela confiança, orientação, ensinamentos, incentivo, dedicação, apoio e paciência para a realização do trabalho.

Aos amigos da Embrapa Clima Temperado Chaiane Signorini, Louise Ribeiro e Fabiane Gomes, entre outros, que de uma forma ou outra me ajudaram e me incentivaram durante este período em momentos bons e ruins.

Resumo

MEDEIROS, Camila Heidrich. **Alterações bioquímicas e fisiológicas em couve submetidas à aplicação de óleos essenciais e húmus de minhoca. 2015.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

O uso das práticas e conceitos ecológicos na agricultura é crescente nos últimos anos, principalmente nas unidades de produção familiar, devido a isto o processo de transição dos agroecossistemas convencionais para os de base ecológica, através de práticas mais sustentáveis vem ocorrendo nestas unidades de produção. Para que ocorra esta transição os óleos essenciais de plantas bioativas e o húmus de minhoca vêm sendo amplamente utilizados. O estudo teve como avaliar o efeito da aplicação de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e chinchilho (*Tagetes minuta* L.) e diferentes dosagens de húmus de minhoca na atividade de peroxidase, polifenoloxidase, teor de clorofila e proteínas totais além de produção de biomassa em plantas de couve manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*). Foram produzidas mudas de couve e estas foram transplantadas para vasos com volume de 100 L, estes continham diferentes níveis de adubação orgânica e adubação mineral além de gotejadores para irrigação diária. Em relação às dosagens utilizadas de húmus os tratamentos foram determinados a partir da relação entre o nitrogênio presente no húmus e a recomendação de adubação para a cultura do brócolis, a partir do valor encontrado foram calculados o restante dos tratamentos que foram os seguintes: T1: adubação NPK, T2: 50% da recomendação de húmus T3: 100% recomendação de húmus T4: 200% recomendação de adubação de húmus e T5: 400% recomendação de adubação de húmus. Após o transplante das mudas foi realizada a aplicação dos óleos essenciais, estes foram aplicados nas folhas semanalmente e com concentração 1%. Posteriormente as aplicações de óleo essencial foram realizadas a análise das enzimas e determinados o teor de proteínas, clorofila e biomassa das plantas. O uso de óleos essenciais proporcionou aumento da atividade de peroxidase, a aplicação de húmus não acarretou diferenças significativas na atividade enzimática. A enzima polifenoloxidase não foi alterada com a aplicação dos óleos essenciais e nem com o uso de doses crescentes de húmus. O teor de clorofila e a produção de biomassa foram superiores no tratamento com a maior dosagem de húmus. Em relação ao teor de proteína total apenas o uso da menor dosagem de húmus diferiu do restante dos tratamentos e o uso de óleos essenciais não influenciou no teor da mesma. A aplicação de óleos essenciais induziu mecanismos de defesa de plantas de couve manteiga.

Palavra-chave: óleos essenciais, húmus de minhoca, resistência sistêmica

Abstract

MEDEIROS, Camila Heidrich. **Biochemical and physiological changes in kale submitted the application of Essential Oils and vermicompost.** 2015 Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

The use of ecological concepts and practices in agriculture has increased in recent years, especially in family production units, because of this the process of transition from conventional agricultural ecosystems to the ecological basis through more sustainable practices is occurring in these production units. For this transition to occur essential oils of bioactive plants and earthworm castings have been widely used. The study was to evaluate the effect of the application of rosemary essence oil (*Rosmarinus officinalis* L.) and chinchilho (*Tagetes minuta* L.) and different vermicompost dosages in peroxidase activity, polyphenol, chlorophyll content and total protein in addition to production biomass plants of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). Cabbage seedlings were produced and these were transplanted to pots with volume of 100 L, they contained different levels of organic manure and chemical fertilizers as well as for daily drip irrigation. Regarding the dosages used húmus treatments were determined from the ratio of the nitrogen present in the húmus and fertilizer recommendation for broccoli culture, from the value found were calculated the rest of the treatments were: T1: NPK fertilizer, T2: 50% of húmus recommendation T3: 100% húmus recommendation T4: 200% húmus fertilizer recommendation and T5: 400% húmus fertilizer recommendation. After transplanting the application of essential oils was conducted, these have been applied in the leaves weekly and concentration 1%. Subsequently essential oil applications were performed the analysis of certain enzymes and protein content, chlorophyll and biomass plants. The use of essential oils provided increased peroxidase activity, the application of húmus did not cause significant differences in enzyme activity. The enzyme polyphenol oxidase has not changed with the application of essential oils and not with the use of increasing doses of húmus. The chlorophyll content and the production of biomass were higher in the higher dose treatment with húmus. In relation to total protein content just use less húmus dosage differed from the rest of the treatments and the use of essential oils did not influence the contents hereof. The application of essential oils induced defense mechanisms of cabbage plants butter.

Keyword: essential oils, vermicompost, systemic resistance

Lista de figuras

| | | |
|-----------------|---|----|
| Figura 1 | Modelo de balanço energético entre crescimento e mecanismos de defesa de plantas (GAYLER, 2004)..... | 19 |
| Figura 2 | Equipamento para extração de óleo essencial por arraste a vapor. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Julho de 2013..... | 27 |
| Figura 3 | Detalhe da semeadura de couve manteiga em bandejas de isopor de 72 células (A) e do sistema de produção de mudas em bandejas flutuantes. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Julho de 2013..... | 31 |
| Figura 4 | Aplicação da solução contendo óleo essencial de plantas bioativas, em plantas de couve manteiga. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Outubro de 2013..... | 34 |
| Figura 5 | Parte do pecíolo da folha utilizada para a determinação da atividade de enzimas. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Outubro 2013..... | 35 |
| Figura 6 | Efeito da aplicação de OE de chinchilho (<i>Tagetes minuta</i> L.) e alecrim, (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) ambos em concentração 1%, na atividade de PO, em pecíolo de Couve Manteiga (<i>Brassica oleraceae</i> L. var. <i>acephala</i>). Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014..... | 38 |
| Figura7 | Efeito da aplicação de OE de chinchilho (<i>Tagetes minuta</i> L.) e alecrim, (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) ambos em concentração 1%, na atividade de PFO, em pecíolo de Couve Manga (<i>Brassica oleraceae</i> L. var. <i>acephala</i>). Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação | |

| | | |
|------------------|--|----|
| | Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014..... | 38 |
| Figura 8 | Efeito do uso de húmus,na atividade de PO, em pecíolo de Couve Manteiga (<i>Brassica oleraceae</i> L. var. <i>acephala</i>). Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014..... | 40 |
| Figura 9 | Efeito do uso de húmus na atividade de PFO, em pecíolo de Couve Manteiga (<i>Brassica oleraceae</i> L. var. <i>acephala</i>). Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014..... | 40 |
| Figura 10 | Efeito do uso de diferentes dosagens de húmus no índice de clorofila a, b e total em plantas de couve manteiga (<i>Brássica oleraceae</i> L. var. <i>acephala</i>) Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014..... | 42 |
| Figura 11 | Efeito da aplicação de óleos essenciais de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) e chinchilho (<i>Tagetes minuta</i> L.) no teor de proteína total, em couve Manteiga (<i>Brassica oleraceae</i> L. var. <i>acephala</i>). Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014..... | 44 |
| Figura 12 | Efeito de diferentes doses de húmus no teor de proteína total, | |

em couve Manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014..... 44

Figura 13

Biomassa fresca média (g) (A) e Biomassa fresca média (g) (B) da parte aérea de couve-manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*) submetida à aplicações de óleo essencial de chinchilho (*Tagetes minuta* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) a 1%. Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro 2014..... 46

Figura 14

Biomassa fresca média (g) (A) e biomassa seca (g) (B) da parte aérea de couve-manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*) submetida à diferentes dosagens de húmus de minhoca proveniente de esterco bovino. Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro 2014..... 47

Lista de tabelas

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Tratamentos utilizados em experimento com couve manteiga em casa de vegetação durante o período de Julho a Outubro de 2013, Embrapa Clima Temperado – Estação experimental Cascata..... | 26 |
| Tabela 2 | Composição de óleo essencial de Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.), coletados na em horta na Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, coleta e extração em 11 de Setembro de 2013..... | 29 |
| Tabela 3 | Composição de óleo essencial de Chinchilho (<i>Tagetes minuta</i> L.), coletados na Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata. Coletada e extração no dia 17 de Maio de 2013..... | 30 |
| Tabela 4 | Variáveis físicas e químicas do substrato contido nos vasos utilizados para experimento com couve manteiga. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, 2013..... | 31 |
| Tabela 5 | Tabela 5 - Variáveis físicas e químicas do Húmus de minhoca produzido a partir de esterco bovino. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, 2013..... | 32 |
| Tabela 6 | Quantidades utilizadas de húmus de minhoca e NPK adicionados em cada tratamento em experimento com couve manteiga em casa de vegetação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2013..... | 32 |
| Tabela 7 | Volume de aplicação dos tratamentos (L), óleo essencial (mL) e quantidade de farinha utilizada (g) utilizados em cada aplicação em experimento com couve manteiga em casa de vegetação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2013..... | 33 |

Sumário

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Introdução | 14 |
| 2 | Revisão de Literatura | 15 |
| 2.1 | Mecanismos de Resistência das plantas | 15 |
| 2.1.1 | Resistência sistêmica Induzida | 16 |
| 2.1.2 | Proteínas..... | 17 |
| 2.1.3 | Clorofila..... | 18 |
| 2.1.4 | Polifenoloxidase..... | 20 |
| 2.1.5 | Peroxidase | 20 |
| 2.2 | Plantas bioativas..... | 21 |
| 2.2.1 | Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)..... | 21 |
| 2.2.2 | Chinchilho (<i>Tagetes minuta</i> L.)..... | 23 |
| 2.3 | Húmus de minhoca | 24 |
| 3.4 | A cultura da Couve (<i>Brassica oleraceae</i> L. var. <i>acephala</i>) | 25 |
| 3 | Metodologia..... | 25 |
| 3.1 | Tratamentos | 26 |
| 3.2 | Obtenção de óleos essenciais | 26 |
| 3.2.1 | Análise de composição dos óleos essenciais | 28 |
| 3.2.1.1 | Óleo essencial de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)..... | 28 |
| 3.2.2.2 | Óleo essencial de chinchilho (<i>Tagetes minuta</i> L.)..... | 29 |
| 3.3 | Preparo de mudas..... | 30 |
| 3.4 | Preparo dos vasos de cultivo | 31 |
| 3.6 | Análises Bioquímicas | 34 |
| 3.6.1 | Obtenção de extratos protéicos | 35 |
| 3.6.1.1 | Peroxidase e Polifenoloxidase | 35 |
| 3.6.1.2 | Proteína total..... | 36 |
| 3.6.2 | Clorofila..... | 36 |
| 3.7 | Delineamento experimental..... | 37 |
| 3.8 | Análise estatística | 37 |
| 4 | Resultados e discussão | 37 |
| 4.1 | Atividade de Peroxidase (PO) e Polifenoloxidase (PFO), com efeito de adição de óleo essencial (OE)..... | 37 |
| 4.2 | Atividade de Peroxidase (PO) e Polifenoloxidase (PFO), com efeito de uso de Húmus de minhoca. | 40 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 4.3 Teor de Clorofila..... | 41 |
| 4.4 Proteínas totais | 43 |
| 4.6 Produção de biomassa | 45 |
| 5 Conclusão | 48 |
| 6 Referências Bibliográficas | 49 |

1 Introdução

A utilização de práticas e conceitos ecológicos na agricultura é cada vez maior no decorrer dos últimos anos, principalmente nas unidades de produção familiar. Esta mudança está ocorrendo devido a diversos fatores, tais como a manutenção da biodiversidade, a elevada degradação do solo e meio ambiente, a preocupação com a segurança alimentar e saúde, qualidade de vida e aumento da renda. Devido a isto, muitos agricultores buscam iniciar um processo de transição dos agroecossistemas convencionais para os de base ecológica, através de práticas mais sustentáveis.

Segundo Gliessman (2000), três níveis fundamentais são estabelecidos no processo de transição agroecológica. No primeiro nível é realizada a redução do uso e consumo de insumos externos caros e prejudiciais ao meio ambiente. O segundo nível ocorre à substituição de insumos e práticas convencionais por práticas alternativas de menor impacto; neste nível da transição a estrutura básica do agroecossistema é pouco alterada, inclusive podendo ocorrer problemas similares aos dos sistemas convencionais. O terceiro e mais complexo nível da transição é representado pelo redesenho dos agroecossistemas, para que estes funcionem com base em um novo conjunto de processos ecológicos.

Neste contexto, o uso de óleos essenciais de plantas bioativas e de húmus de minhoca surgem como possibilidades de insumos alternativos para ser utilizado na segunda etapa da transição agroecológica. São classificadas como bioativas as chamadas plantas medicinais, aromáticas, condimentares, tóxicas, inseticidas, fungicidas, repelentes, atrativas, entre outras (SCHIEDECK, 2007). Estas plantas possuem compostos secundários que podem desempenhar funções importantes nas interações planta-patógeno, seja através de ação antimicrobiana ou também na ativação de mecanismo de defesa de plantas cultivadas (BONALDO, 2003), ou seja, funcionam como elicitores (STANGARLING et al., 2010). Dentre estas espécies destaca-se o chinchilho (*Tagetes minuta* L.) e o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), ambos de amplo conhecimento dos agricultores da região sul do Brasil e com potencial bioativo comprovado.

Os biofertilizantes e fertilizantes orgânicos são comumente utilizados por agricultores familiares que buscam produzir em sistemas de base ecológica. Dentre

estes se destaca o húmus de minhoca (vermicomposto), que é um adubo orgânico de fácil produção na propriedade familiar e também possui potencial elicitor, induzindo a produção de fitoalexinas (GONÇALVES et al., 2009) e compostos fenólicos totais (CAMPOS et al., 2006), além de ser uma excelente fonte de nutrientes.

O uso destes insumos alternativos e ativadores dos mecanismos de defesa são importantíssimos aliados de agricultores familiares para combater insetos e doenças em diversos cultivos. A agricultura familiar é caracterizada por uma grande variedade de espécies cultivadas, em que as brássicas possuem destaque e a couve manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*) é uma das mais importantes. Porém, ainda é necessário estudos para realização de manejo alternativo de doenças e insetos indesejados, assim o uso de plantas bioativas e do húmus de minhoca podem ser empregados em conjunto no intuito de minimizar os danos e, conseqüentemente, aumentar a renda de agricultores familiares que cultivam essa espécie de hortaliça.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de óleos essenciais e húmus de minhoca na atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, teor de clorofila e proteínas totais além de produção de biomassa em plantas de couve manteiga.

2 Revisão de Literatura

2.1 Mecanismos de Resistência das plantas

Para a fitopatologia, imunidade é regra e suscetibilidade é exceção, caso contrário todo patógeno possuiria a capacidade de infectar as plantas e, desta forma, a extinção das mesmas já haveria ocorrido, ou seja, isto não ocorre devido a mecanismos de defesas extremamente eficientes existentes nas plantas, que conseguem evitar a infecção de patógenos (AGRIOS, 2005).

Os mecanismos de defesa são comumente divididos em mecanismos pré-formados e pós-formados. Em relação aos pré-formados pode-se dizer que constituem uma resistência natural aos patógenos, ou seja, barreiras baseadas em mecanismos de defesa já existentes, normalmente são mecanismos estruturais de resistência que ocorrem independente da chegada do patógeno ao sítio de infecção

(BARROS, 2010). Estes mecanismos constituem-se em verdadeiras barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno (PASCHOLATI, 2008), tais como ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, adaptações de estômatos e fibras vasculares, bem como as substâncias bioquímicas pré-formadas como fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (AGRIOS, 2005).

Já os mecanismos pós-formados aumentam, ou são ativados, quando ocorre a infecção do patógeno ou o uso de algum composto que venha a ser benéfico às plantas. Estes mecanismos englobam substâncias que possuem a capacidade de inibir o desenvolvimento do patógeno ou ainda gerar condições que dificultam a sua sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (PASCHOLATI et al., 2008). Quando ativados ocorre a formação de papila, halo, lignificação, camada de cortiça, formação de tiloses e deposição de goma, sendo todos considerados mecanismos estruturais. Os compostos constituintes dos mecanismos bioquímicos pós-formados são fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio e proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR) (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI, 1995). Estes metabólitos secundários não estão relacionados com o crescimento e desenvolvimento das plantas e sim na defesa destas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Desta forma os mecanismos de defesa pós- formados necessitam de ativação para que sua ação se concretize e para isto se faz necessário o uso de indutores de resistência.

2.1.1 Resistência sistêmica Induzida

As plantas possuem diversas formas de defesa que são inativas, ou seja, as plantas podem ativar mecanismos de defesa que induzem a resistência (BONALDO et al., 2005; GUZZO et al., 2007; PASCHOLATI, 2007).

A ativação destes mecanismos de defesa adjacentes pode ocorrer devido à infecção localizada de algum patógeno ou ação de insetos, quando esta interação ocorre se dá a indução de resistência, neste caso chamado de resistência sistêmica adquirida (RSA), outra forma de resistência que pode ocorrer nas plantas é a resistência sistêmica induzida (RSI), esta ocorre quando se é aplicado um componente, produtos microbianos ou ainda através de compostos orgânicos ou inorgânicos (BONALDO et al., 2005), a ativação destes mecanismos proporciona as

plantas uma resistência não apenas no ponto de infecção ou de aplicação de produtos mas sim em toda a sua estrutura.

Do ponto de vista evolucionário estes sistemas de defesa latente se desenvolveram com a finalidade de economizar energia, isto ocorre, pois os mecanismos só são ativados no momento da infecção ou aplicação de produtos, sendo assim o gasto energético para as plantas é menor quando comparado com a resistência constitutiva, que independente da chegada do patógeno utiliza constantemente seus recursos energéticos para a sua defesa (KUNH, 2007).

Quando se é estudado indução de resistência sistêmica, diversas enzimas estão relacionadas, além de proteínas e outros compostos. Dentre estas enzimas destacam-se a Polifenoloxidase e Peroxidase.

2.1.2 Proteínas

As proteínas são primordiais para o crescimento e desenvolvimento das plantas e estão presentes em toda sua estrutura, uma vez que são constituintes de todo o material vegetal, logo, para que haja a ação enzimática é imprescindível a existência de proteínas, já que a natureza das enzimas é protéica, havendo assim total envolvimento das proteínas na indução de resistência. O teor de proteína do tecido vegetal quando este é desafiado ou tratado com um eliciador é uma das formas de indicação da ativação ou não dos mecanismos de defesa, a verificação da ativação de enzimas de indução de resistência é de extrema importância, porém os aspectos fisiológicos também devem ser levados em conta, já que estes também sofrem alterações e existe uma sinergia entre o metabolismo primário e secundário das plantas, sendo desta forma de grande importância o estudo dos teores de proteínas (VIECELLI et al. 2008).

Dentre a variada gama de proteína existem algumas que podem ser induzidas, estas são as proteínas chamadas de protetoras ou de defesa, e entre estas estão as proteínas relacionadas à patogênese (PR), que são subdivididas em diversos grupos tais como: β - 1,3-glucanases, quitinases, peroxidases, etc (DE WIT, 2007), estas podem agir diretamente no combate do agente agressor, ou ainda indiretamente, mantendo a estrutura e as funções celulares (MYSORE et al. 2004, JONES 2006).

Diversos estudos vêm constatando que tanto o estresse bióticos como o abióticos levam a alteração no padrão de expressão de proteínas das plantas, assim o correndo tanto a inibição quanto a indução da biossíntese de determinados constituintes protéicos (SOARES, 2007) e de que a ativação da síntese protéica leva a resistência da planta (LARCHER, 2000).

2.1.3 Clorofila

As clorofilas são os pigmentos naturais verdes mais abundantes presentes nas plantas, sua ocorrência se dá nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais, portanto estes pigmentos estão presentes em todas as células fotossintéticas, sendo assim para que ocorra o processo de fotossíntese estas se fazem imprescindíveis (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A fotossíntese é constituinte do mecanismo primário das plantas fotossintéticas, é neste processo que ocorre a formação de assimilados e conseqüentemente o acúmulo de reservas nas plantas, apesar das clorofilas serem imprescindíveis no metabolismo primário, também possuem extrema importância na indução de metabólitos do mecanismo secundário. Esta importância se dá, pois, para que ocorra a indução de resistência é necessário que haja o acúmulo de reservas, já que ocorre um gasto energético para a planta quanto esta necessita da ativação de suas defesas latentes (Figura 1) (GAYLER, 2004).

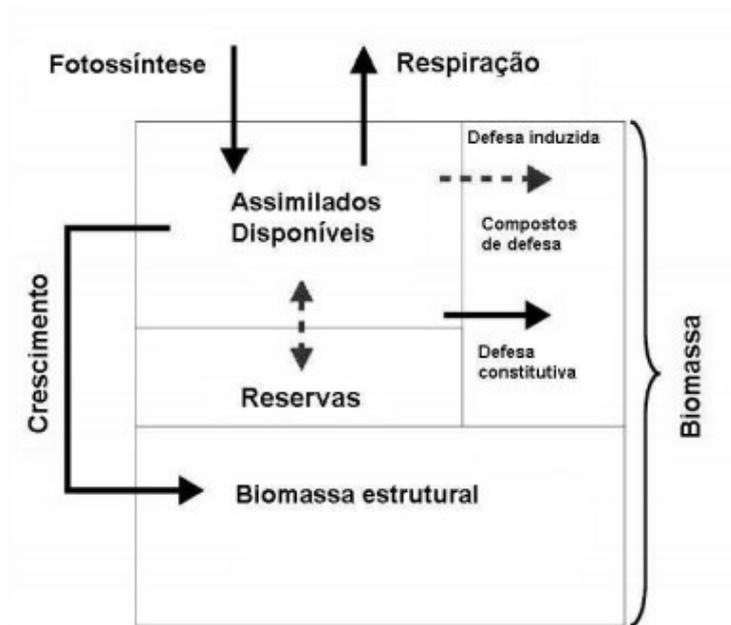


Figura 1 - Modelo de balanço energético entre crescimento e mecanismos de defesa de plantas (GAYLER, 2004).

A clorofila não é uma única molécula isolada, mas sim compreende uma família de substâncias semelhantes denominadas de clorofila *a*, *b*, *c* e *d*. Dentre estas, a que ocorre em maior abundância é a clorofila *a*, também caracterizada como a mais importante e que corresponde a aproximadamente 75% dos pigmentos verdes encontrados nos vegetais. A clorofila *b* difere da clorofila *a* por uma pequena variação estrutural, já as clorofilas *c* e *d* são encontradas apenas em algas (VOLP et al., 2009).

As clorofilas *a* e *b*, encontradas nas plantas também diferem na sua forma de ação: enquanto a clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a fase fotoquímica, que ocorre no primeiro estágio do processo fotossintético, já os demais pigmentos, como a clorofila *b*, auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, logo sendo chamados de pigmentos acessórios (STREIT et al., 2005).

Desta forma fica evidente a influência das clorofilas no processo de indução de resistência, uma vez que é necessário que haja o acúmulo de reservas, à serem gastas, para que o processo seja concluído.

2.1.4 Polifenoloxidase

As polifenoloxidases (PFO) ou fenol oxidase, catecolases, fenolases, catecol oxidase ou tirosinase, são enzimas que estão presentes em diversas espécies de plantas, além de serem encontradas em várias espécies de bactérias, fungos e algas (KUNH, 2007).

Nas plantas esta enzima está distribuída por toda a sua estrutura, envolvida diretamente na senescência. São responsáveis pela catálise da reação de oxidação de monofenóis para o-difenóis e oxidação destes o-difenóis para quinonas e, por essa razão, ocorrem em alta concentração em tecidos infectados, pois os fenóis presentes nos ferimentos sofrem uma oxidação devido a ação da enzima, formando as quinonas, que são mais tóxicas e possuem uma alta ação antimicrobiana, conferindo desta forma uma resistência para a planta (CAMPOS, 2003).

As PFO permanecem intracelularmente, em estado inativo, na sua grande maioria, situadas dentro de compartimentos dos tilacóides nos cloroplastos. No entanto, pequena porção pode estar presente na parede celular (MAYER, 1979; VAUGHN et al., 1984).

Quando ocorre o ataque de patógenos ou insetos, e conseqüentemente a ruptura celular, há a liberação da PFO, iniciando o processo de oxidação dos compostos fenólicos (MOHAMMADI, 2002; THIPYAPONG et al., 2004).

2.1.5 Peroxidase

As peroxidases (PO) são enzimas capazes de catalisar a transferência de hidrogênio de um doador para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estão presentes em tecidos de animais, plantas e microrganismos (ROSSI et al., 1997) e apresentam várias funções em relação à defesa celular, pois participam diretamente em diversas reações nas plantas, dentre elas as ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos e regulação da alongação de células e outras (KAO, 2003). Como existe a relação das PO com os processos de crescimento e diferenciação celular e mudanças morfogênicas em resposta aos estresses físico, químico e biológico, o aumento de sua atividade torna-se um fator de extrema importância para a determinação da adaptação ou não da espécie (PIZA et al., 2003).

O grupo das PO inclui enzimas capazes de catalisar a transferência do hidrogênio de um doador para o H₂O₂. Em plantas, a ação desse grupo de enzimas constitui uma proteção antioxidativa. A atividade da peroxidase pode aumentar em plantas submetidas a diversos tipos de estresse (SIEGEL et al, 1993).

Esta enzima está diretamente relacionada com a lignificação e a lignina com a resistência de plantas, uma vez que a parede celular torna-se mais resistente às enzimas digestivas dos agressores (LAGOS et al., 2009).

2.2 Plantas bioativas

São denominadas bioativas as plantas que produzem algum efeito sobre outro ser vivo, podendo ser desta forma enquadradas as plantas medicinais, aromáticas, condimentares, tóxicas, inseticidas, fungicidas e até mesmo as de caráter místico e religioso. Neste contexto, na maioria das vezes, o uso de plantas bioativas para o manejo de insetos e doenças em agroecossistemas é utilizada na forma de óleos essenciais, tinturas, infusões e decocções. Pois desta forma é possível que haja a extração de alguma substância do seu metabolismo secundário e assim sendo possível a pulverização destes produtos sobre cultivos comerciais (SCHIEDECK, 2012). Dentre a grande variedade de espécies bioativas estudadas destacam-se o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e o chinchilho (*Tagetes minuta* L.) devido aos seus potenciais bioativos e por serem plantas bastante conhecidas e usadas dos agricultores familiares da região sul do Brasil na transição agroecológica (LOVATTO, 2012),

2.2.1 Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

O alecrim é uma planta exótica amplamente utilizada desde a antiguidade por possuir diversas propriedades medicinais e por ser aplicado na culinária, farmácia e fabricação de cosméticos. Tem a sua origem no Mediterrâneo (GENENA et al., 2005), porém nos dias atuais é cultivada em grande parte dos países de clima temperado (LORENZI, 2008). É uma planta pertencente a família Limiaceae (COUTO et al., 2006), popularmente é conhecido como alecrim, alecrim-comum, alecrim-de-casa, alecrim-de-cheiro, alecrim-de-horta, alecrim-de-jardim, alecrim-

rosmarino, erva-cooada, erva-da-graça, flor-de-olimpio, rosa-marinha, rosmarinho e rosmarinho (LORENZI, 2008).

Para a extração de óleo essencial utilizam-se folhas e os ramos, devendo ser realizada após a floração, pois nesta época é maior o rendimento de óleo (VAZ, 2006), podendo chegar até 1,0% (ATTI-SANTOS et al.,2005). Em relação a composição química o alecrim possui um grande número de compostos fenólicos com ação antioxidante, incluindo diterpenos fenólicos, dentre eles o ácido carnosílico, carnosol, rosmanol, epirosmanol, 7-metilepirosmanol, e carnosato metílico. Diversos flavonóides também são importantes constituintes do óleo essencial do alecrim, como gencuanina, hispidulina, cirsimaritin, a luteolina e o isoscutelareína, ácidos rosmarínico e ácido caféico (ARASHIRO et al., 2012). Os constituintes majoritários do óleo essencial são monoterpenos oxigenados: 1,8 cineol (26,7%), cânfora (17,4%), bormilacetato (4,0%) e borneol (1,8%) e os hidrocarbonetos monoterpeneo α -pineno (18,6%), canfeno (11,8%), mirceno (9,0%) e β -pireno (2,8%) (LABORDA et al.,2013). Segundo Atti-Santos (2005), os constituintes do óleo essencial de alecrim não variaram significativamente em diferentes anos de produção indicando uma estabilidade nos componentes do óleo.

O uso do óleo essencial de alecrim no controle de pragas e doenças tem sendo investigado em diversos estudos e seu uso vem demonstrando grande eficiência em controle de fungos, bactérias e insetos. Pereira et al.(2006) avaliou o potencial antifúngico do óleo do essencial de alecrim e evidenciou que a partir de concentrações 1500 mgL⁻¹ este possui ação antifúngica contra *Fusarium* sp., *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *A. flavus*, inibindo o desenvolvimento micelial destes. O uso do óleo essencial obteve uma redução de 50% da ramulose no algodão, causado pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var.*cephalosporioide*, quando utilizado na concentração 1% (SANTOS, 2011). Contra ácaros, o óleo essencial de alecrim também é eficiente. Laborda et al. (2013) avaliou o seu efeito na mortalidade e fecundidade de ácaro rajado (*Tetrany chusurticae*) e verificou em bioensaios que 1 hora após a aplicação a concentração de 0,25% produziu 100% de mortalidade do ácaro, além de diminuir a viabilidade de ovos.

A utilização dos extratos de alecrim induz a produção de fitoalexinas, que constituem um grupo muito importante de metabolitos secundários com elevado potencial antimicrobiano (TAIZ; ZEIGLER, 2013). Brand et al. (2010) avaliou a

indução de faseolina, fitoalexina de maior abundância em feijoeiro, como o uso de extrato aquoso de alecrim e também a sua fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. Os resultados encontrados demonstram que o extrato aquoso de alecrim foi eficiente na indução de faseolina, reduzindo o crescimento micelial do fungo. Camatti-Sartori et al. (2011), utilizando extrato de alecrim também chegou a resultados positivos no controle de *Botrytis* sp. De forma geral, o alecrim também funciona como repelente devido aos seus constituintes químicos como β -pineno, 1,8-cineol (LIMA, 2007).

2.2.2 Chinchilho (*Tagetes minuta* L.)

O gênero *Tagetes*, família Asteraceae, possui mais de 50 espécies, dentre as quais o *Tagetes minuta* L., ou chinchilho como é popularmente conhecido na região sul do Brasil. É uma planta anual, ereta, sublenhosa, pouco ramificada e mede entre 1 e 2 metros de altura. (LORENZI, 2008). É nativa de regiões de clima temperado e montanhosas da América Latina, incluindo países como Argentina e México. Devido ser originária de clima temperado, o chinchilho pode ser encontrado com facilidade no Estado do Rio Grande do Sul.

O chinchilho é uma planta utilizada por diversas indústrias, dentre as quais de cosméticos, perfumaria e medicamentos. O seu uso em medicamentos se dá por possuir variadas propriedades medicinais, embora possa ser considerada tóxica dependendo da forma como é utilizada (LIMA et al., 2010). Por ser encontrado de forma espontânea em lavouras é considerada por muitos uma espécie invasora, porém na agricultura familiar há registros de seu uso com o intuito de controlar insetos e doenças de plantas (FRANZENER et al., 2005).

O uso de extratos e óleos essenciais de chinchilho é difundido entre os agricultores que buscam uma produção de alimentos livre de agrotóxicos. Para a extração do óleo pode-se utilizar as folhas, flores ou a planta inteira. As folhas, assim como as flores, possuem glândulas que liberam um odor característico, além do óleo essencial, com fungicidas e inseticidas. Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de chinchilho são limoneno (6,96%), ocimeno (5,11%), di-hidrotagetona (54,10%) e tagetona (6,73%), que compreendem aproximadamente 70% dos componentes totais (ANDREOTTI et al. 2013). A constituição do óleo essencial é variada uma vez que óleos extraídos de plantas

sem floração apresentam maiores teores de di-hidrotagetona enquanto o óleo extraído de flores é rico em β -ocimeno e tagetona (CHAMORRO et al., 2008).

O óleo essencial de chinchilho vem sendo investigado em diversos estudos e tem demonstrado grande eficiência em controle de fungos, bactérias e insetos. O óleo essencial é eficiente no controle da requeima da batata (*Phytophthora infestans*), reduzindo a severidade da doença (PEREIRA et al., 2013).

Outro uso potencial do óleo é o controle do carrapato bovino (*Rhipicephalus microplus*) sendo atingida eficiência de até 98% de mortalidade conforma a concentração utilizada (ANDREOTTI et al., 2013). Da mesma forma, o óleo tem inseticida sobre o piolho humano (*Pediculus humanus capitis* De Geer) (CESTARI et al., 2004).

O extrato aquoso do chinchilho também possui ação no controle de *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiro (JUNGES et al., 2009), e afídeos em hortaliças (LOVATTO et al., 2013).

2.3 Húmus de minhoca

A procura cada vez maior por alimentos saudáveis, livres de agrotóxicos e sem o uso de adubos químicos de alta solubilidade, tornou inevitável o uso de adubos orgânicos.

O destaque do uso de húmus de minhoca para a produção alimentos orgânicos se dá pela sua praticidade de produção e eficiência. Para sua produção se utiliza principalmente minhocas da espécie *Eisenia andrei* (Vermelha da Califórnia), devido suas características diferenciadas, tais como a facilidade em adaptação às condições de cativeiro e elevada taxa de multiplicação (BROWN, 2006), desta forma havendo elevada eficiência na conversão de resíduos orgânicos em húmus (EDWARDS, 2004).

O húmus de minhoca pode ser facilmente produzido em propriedades familiares diversificadas, já que é possível utilizar praticamente qualquer material orgânico disponível (SCHIEDECK et al., 2006).

O húmus pronto é constituído por substâncias orgânicas complexas e estáveis, resultantes da ação das minhocas e microrganismos sobre o resíduo orgânico, como ácidos húmicos e hormônios reguladores do crescimento de plantas (STEFFEN et al., 2011). A aplicação de húmus no solo produz benefícios físicos,

químicos e biológicos. Os nutrientes essenciais às plantas estão numa forma mais disponível, especialmente o nitrogênio, já que a sua liberação é mais lenta e gradual, havendo menor perda por lixiviação (OLIVEIRA et al., 2001).

Além destes aspectos, estudos demonstram que o uso de húmus de minhoca pode atuar como supressor de patógenos, tais como *Pythium ultimum* (CHEN et al., 2008), *Rizhoctonia. solani* (RIVERA et al., 2004) e *Pythium irregulare* (SCHEUERELL et al., 2004). Além disso, há indícios de que substâncias encontradas no húmus acarretam modificações fisiológicas benéficas, promovendo a indução de resistência em plantas (HERNANDEZ et al., 2013).

3.4 A cultura da Couve (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*)

A família Brassicaceae abrange cerca de 350 gêneros e aproximadamente 3.200 espécies (MILEC et al., 2007; FILGUEIRA, 2008; BEVILACQUA, 2011; MARTINS, 2011). Dentre estas espécies pode-se destacar a couve manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*).

Devido ao clima temperado a couve manteiga é bastante produzida no sul do Brasil, pois além de possuir importante valor econômico também tem um alto valor nutricional já que é rica em nutrientes essenciais, tais como: cálcio, ferro, enxofre e sódio (BIERMANN, 2009).

Os agricultores familiares são os maiores produtores desta espécie, porém sua produção é limitada muitas vezes pela ocorrência de insetos e patógenos.

Dentre os insetos indesejáveis que atacam a cultura da couve estão o curuquerê-da-couve (*Ascia monuste orseis* Latr.), traçadas crucíferas (*Plutella xylostella*), pulgões (*Lipaphis erysimi* (Kalt.), *Brevicoryne brassicae* L. e *Myzus persicae* Sulzer), mosca branca (*Bemisia tabaci* Biótipo B Genn.), lagarta-roscas (*Agrotis ipsilon* Hufnagel), lagarta-medede-palmo (*Trichoplusia ni* Heub.) e a broca-da-couve (*Hellula phidylealis*) (FILGUEIRA, 2008).

3 Metodologia

O experimento foi realizado em casa de vegetação, na Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS (31°37' S; 52°31' O) durante o período de Julho a Outubro de 2013.

3.1 Tratamentos

Os tratamentos avaliados foram doses de húmus de minhoca bovino e fertilizante mineral NPK e aplicação de óleos essenciais de alecrim e chinchilho (Tabela 1).

Tabela 1 - Tratamentos utilizados em experimento com couve manteiga em casa de vegetação durante o período de Julho a Outubro de 2013, Embrapa Clima Temperado, Estação experimental Cascata.

| Tratamento | Parcela | Sub-parcela1 | Sub-parcela2 | Sub-parcela3 |
|------------|------------------------|--------------|---------------|--------------|
| T1 | Adubação mineral | | | |
| T2 | 0,5 x húmus de minhoca | | | |
| T3 | 1 x húmus de minhoca | Sem OE | OE chinchilho | OE alecrim |
| T4 | 2 x húmus de minhoca | | | |
| T5 | 4 x húmus de minhoca | | | |

A concentração dos óleos essenciais utilizados foi de 1%. Para que ocorresse a emulsão do óleo com a água foi utilizado o tensoativo Tween, na proporção 1:1, além de farinha de trigo a 2% (CLARO, 2000) como espalhante adesivo. O uso de farinha se fez necessário, pois as folhas da couve possuem a epiderme bastante cerosa, o que dificulta a adesão e a absorção de soluções aquosas. Após o preparo dos tratamentos as soluções foram filtradas com peneira de 250µm para retirada de grânulos de farinha.

3.2 Obtenção de óleos essenciais

As plantas utilizadas para a extração dos óleos essenciais foram coletadas na Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata. O alecrim foi proveniente de cultivo em canteiro e o chinchilho de ocorrência espontânea em áreas adjacentes à horta experimental. O material vegetal foi coletado no período da manhã e após uma sequência de dias sem precipitação pluviométrica. Para as extrações dos óleos essenciais foram utilizados praticamente a planta inteira, sendo retirados apenas os talos mais lenhosos. A coleta e extração do alecrim foi realizada

no dia 11 de setembro de 2013 em relação ao chinchilho a coleta e extração ocorreu em 17 de maio de 2013.

A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de destilação água-vapor em equipamento semi-industrial de inox da marca Linax, com capacidade para 20 kg de plantas. Nesse método, semelhante ao método de arraste a vapor, o material vegetal e a água para a geração de vapor compartilham o mesmo espaço, porém sem entrar em contato. A água, no fundo do tanque de inox, é aquecida por uma fonte de calor e vaporiza. O vapor ascende à camada de material vegetal arrastando os componentes voláteis até o condensador. Nesse ponto, o vapor é resfriado, retornando ao estado líquido, quando então ocorre a separação da água e do óleo essencial. Na Figura 2 é mostrado o equipamento de extração de óleo essencial utilizado no experimento.

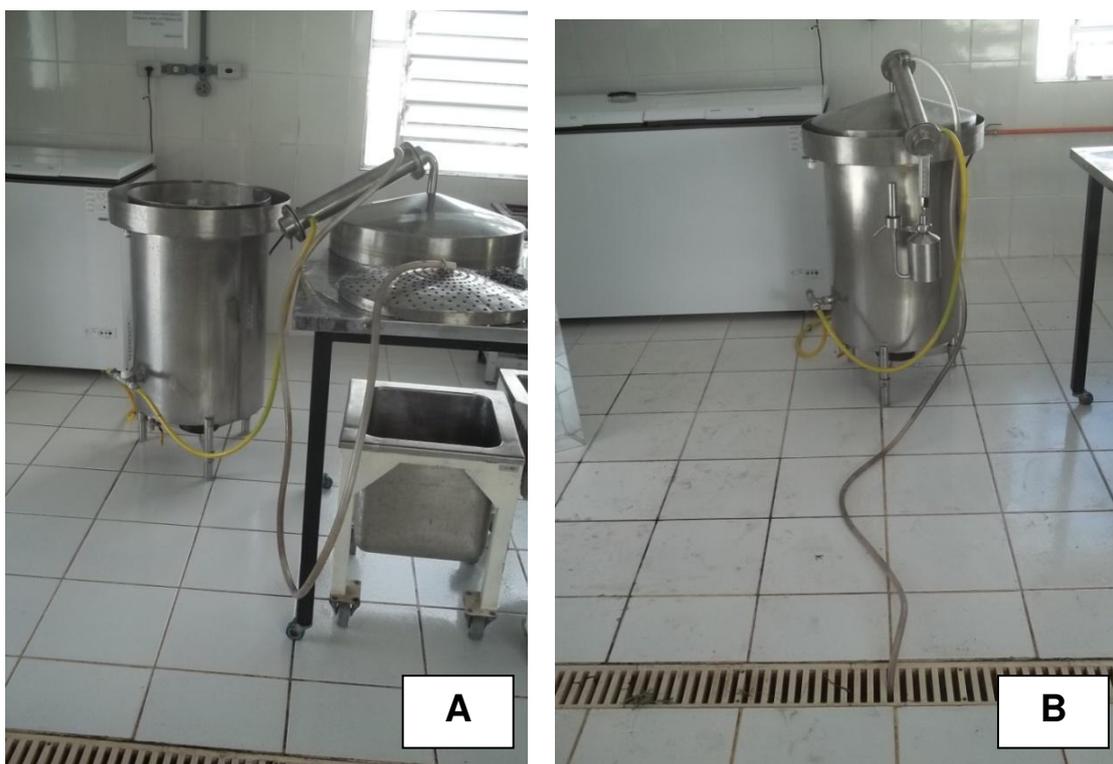


Figura 2 - Equipamento para extração de óleo essencial por arraste a vapor. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Julho de 2013.

3.2.1 Análise de composição dos óleos essenciais

Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados na Embrapa Agroindústria Tropicais. A determinação da composição foi realizada por cromatografia gasosa em que foi utilizado um cromatógrafo gasoso de espectro de massas (CG-EM), marca Varian, modelo CG-450/MS-240, com impacto de elétrons a 70 eV, modo de injeção com divisão de fluxo 1:30, gás carreador com fluxo 1,50 mLmin⁻¹, temperatura do injetor 250°C, temperatura da linha de transferência 250°C. A programação do forno cromatográfico seguiu em temperatura inicial de 70°C com rampa de aquecimento de 4°Cmin⁻¹ até 180°C por 27,5 min, continuada por rampa de aquecimento de 10°Cmin⁻¹ até 250°C, ao término da corrida (34,5min). A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massas com aqueles presentes na base de dados fornecidos pelo equipamento (NIST versão 2.0- 287.324 compostos), bem como através da comparação dos seus índices de retenção com os de compostos conhecidos, obtidos por injeção de uma mistura de padrões, e de dados da literatura (ADAMS, 2009).

3.2.1.1 Óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

O rendimento na extração do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), por arraste a vapor foi de aproximadamente 1,0% em relação ao seu peso fresco. A análise por cromatografia gasosa utilizando CG-EM, identificou 21 componentes dos 25 picos encontrados (Tabela 2). Os componentes majoritários foram cânfora, 1,8-cineol, α -pineno, β -pineno e mirceno, correspondendo aproximadamente 73% do total do óleo.

Tabela 2 - Composição de óleo essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), coletados na em horta na Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, coleta e extração em 11 de Setembro de 2013.

| Composto | % |
|----------------------|----------|
| α -tujeno | 0,6995 |
| α -pineno | 13,1611 |
| Canfeno | 6,1102 |
| β -pineno | 11,4044 |
| Mirceno | 11,3034 |
| α -terpineno | 0,7488 |
| p-cimeno | 0,8228 |
| Limoneno | 3,0172 |
| 1,8-cineol | 15,6768 |
| γ -terpineno | 2,4933 |
| Terpinoleno | 0,7892 |
| Linalool | 0,4399 |
| Cânfora | 20,6776 |
| Borneol | 0,8613 |
| terpinen-4-ol | 0,8662 |
| α -terpineol | 1,1085 |
| Verbenona | 2,0439 |
| acetato de bornila | 1,3974 |
| β -cariofileno | 3,9181 |
| α -humuleno | 0,6726 |
| d-cadineno | 0,3454 |

3.2.2.2 Óleo essencial de chinchilho (*Tagetes minuta* L.)

A extração de óleo essencial de chinchilho (*Tagetes minuta* L.) obteve um rendimento em torno de 0,9% em relação ao seu peso fresco. A análise fitoquímica identificou 14 componentes dos 26 picos encontrados (Tabela 3). A cis-tagetona, cis-b-ocimeno e dihidrotagetona foram responsáveis por aproximadamente 90% dos constituintes do óleo essencial.

Tabela 3 - Composição de óleo essencial de Chinchilho (*Tagetes minuta* L.), coletados na Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata. Coletada e extração no dia 17 de Maio de 2013.

| Composto | % |
|-------------------------|----------|
| β -pineno | 0,2464 |
| cis-b-ocimeno | 26,5821 |
| trans-b-ocimeno | 0,2977 |
| Dihidrotagetona | 12,5811 |
| allo-ocimeno | 0,5508 |
| trans-tagetona | 5,2944 |
| cis-tagetona | 49,0807 |
| trans-ocimenona | 0,3547 |
| silfiperfol-5-eno | 0,0558 |
| 7-epi-silfiperfol-5-eno | 0,1063 |
| β -cariofileno | 0,2427 |
| α -humuleno | 0,1839 |
| germacreno D | 0,1249 |
| Biciclogermacreno | 0,6961 |

3.3 Preparo de mudas

Para a realização do experimento utilizou-se sementes de couve manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), produzidas em sistema agroecológico, da empresa Bionatur. A semeadura foi realizada em 09 de julho de 2013, em bandejas de isopor de 72 células para a produção de mudas (Figura 3). Foi utilizado substrato comercial da marca Tecnomax, contendo em sua composição casca de pinus, vermiculita expandida, turfa e carvão mineral. Após a semeadura as bandejas foram colocadas em sistema floating para produção de mudas (Figura 3).

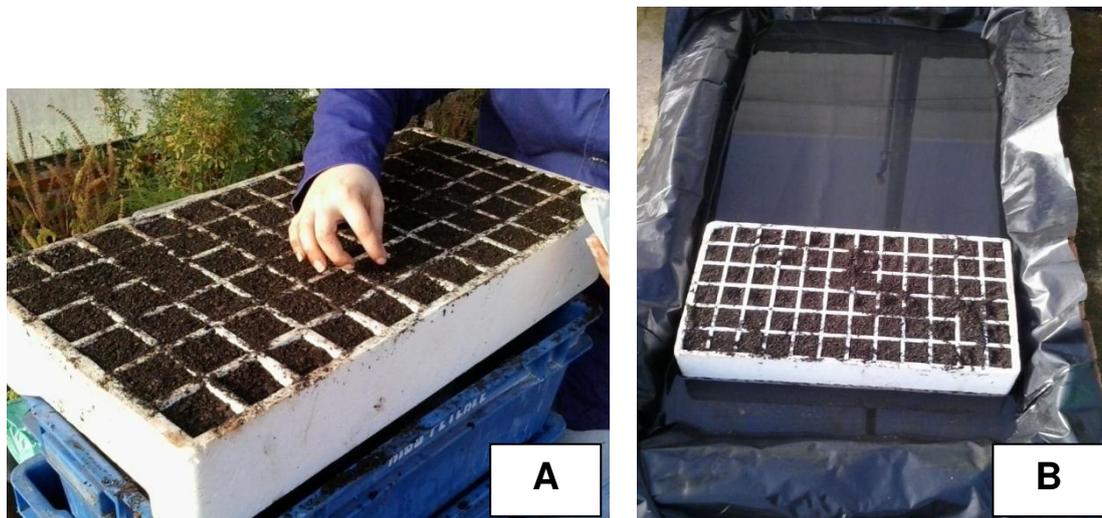


Figura 3 - Detalhe da semeadura de couve manteiga em bandejas de isopor de 72 células (A) e do sistema de produção de mudas em bandejas flutuantes. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Julho de 2013.

As mudas foram transplantadas para os vasos de cultivo aos 41 dias após a semeadura, quando apresentavam três a quatro folhas definitivas. Em cada vaso foram plantadas duas mudas.

3.4 Preparo dos vasos de cultivo

Os vasos em que foi realizado o experimento eram utilizados em trabalhos anteriores que possuíam a mesma lógica dos tratamentos de fertilização avaliados nesse experimento. Abaixo são mostradas as variáveis físicas e químicas do substrato nos vasos (Tabela 4) e do húmus de minhoca de origem bovina utilizados (Tabela 5).

Tabela 4 - Variáveis físicas e químicas do substrato contido nos vasos utilizados para experimento com couve manteiga. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, 2013.

| Substrato dos vasos | pH | Mo | Argila | Ca | Mg | Al | Ctc efetiva | P | K |
|---------------------|-----|------|--------|-----|-----------------------------------|----|-------------|--------------------|------|
| | | % | | | cmol _c dm ³ | | | mg dm ³ | |
| | 6,2 | 1,38 | 34 | 6,4 | 2,7 | 0 | 9,7 | 18,79 | 5,28 |

Tabela 5 - Variáveis físicas e químicas do Húmus de minhoca produzido a partir de esterco bovino. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, 2013.

| | pH | C:N | Corg | N total | P total | K total | Ca | Mg |
|-------------------------|--------------------|--------------------|-------|---------|---------------------|---------|-------|---------|
| | | g kg ⁻¹ | | | | | | |
| Húmus de minhoca | 6,89 | 6:1 | 160 | 22,18 | 6,78 | 11,74 | 18,79 | 5,28 |
| | S | Na | Cu | Zn | Fe | Mn | Bo | Umidade |
| | g kg ⁻¹ | | | | mg kg ⁻¹ | | | % |
| | 2,56 | 0,86 | 41,37 | 173,84 | 126,87 | 935,51 | 6,15 | 60% |

A fertilidade do substrato nos vasos para o cultivo da couve-manteiga foi adequada quanto ao nível de nitrogênio utilizando as necessidades para a cultura do brócolis, conforme a recomendação do manual de adubação e calagem da Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (2004).

Os vasos tinham volume útil de 100 L e área de 0,2724 m², além de serem dotados de sistema de irrigação com gotejadores individuais. Na Tabela 6 são mostradas as quantidades de húmus de minhoca e NPK adicionado em cada tratamento.

Tabela 6 - Quantidades utilizadas de húmus de minhoca e NPK adicionados em cada tratamento em experimento com couve manteiga em casa de vegetação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2013

| Tratamento | Quantidade (g) |
|----------------------------|----------------|
| T1: Adubação mineral | 50 |
| T2: 0,5 x húmus de minhoca | 278,33 |
| T3: 1 x húmus de minhoca | 556,675 |
| T4: 2 x húmus de minhoca | 1113,35 |
| T5: 4 x húmus de minhoca | 2226,7 |

As pulverizações dos óleos essenciais ocorreram semanalmente, diretamente sobre as folhas, as aplicações iniciaram no dia 19 de setembro de 2013, 20 dias após o transplante das mudas. As soluções eram preparadas minutos antes da aplicação e realizadas após as 16h para reduzir as perdas de volatilização dos óleos essenciais.

O volume de aplicação variou de acordo com o crescimento das plantas, ou seja, antes da realização da aplicação foi aferido o volume necessário para que

houvesse o completo molhamento da área foliar para isto era utilizada água, esta era adicionada em uma proveta, para aferir o volume exato, após a realização da pulverização o volume restante era novamente adicionado em proveta, com a relação entre volume total e gasto era possível calcular o volume necessário de aplicação. Na Tabela 7 são apresentados os volumes utilizados em cada aplicação.

Tabela 7 - Volume de aplicação dos tratamentos (L), óleo essencial (mL) e quantidade de farinha utilizada (g) utilizados em cada aplicação em experimento com couve manteiga em casa de vegetação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2013.

| Aplicações | Volume de aplicação por tratamento (L) | Volume de óleo essencial (mL) | Farinha de trigo (g) |
|-------------------|---|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1º | 0,3 | 3,0 | 6,0 |
| 2º | 0,45 | 4,5 | 9,0 |
| 3º | 0,6 | 6,0 | 12,0 |
| 4º | 0,9 | 9,0 | 18,0 |
| 5º | 1,0 | 10,0 | 20,0 |
| 6º | 1,2 | 12,0 | 24,0 |

Para evitar efeito de derivas na aplicação, as plantas de couve eram protegidas com um tapume plástico (Figura 4).



Figura 4 -Aplicação da solução contendo óleo essencial de plantas bioativas, em plantas de couve manteiga. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Outubro de 2013

3.6 Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Clima Temperado. Foi utilizado o pecíolo das plantas (Figura 5), que eram coletados e imediatamente acondicionados caixas térmicas contendo gelo, para evitar a degradação de enzimas. Posteriormente o material foi acondicionado em refrigerador a 4°C, até o momento do preparo dos extratos aquosos.



Figura 5 - Parte do pecíolo da folha utilizada para a determinação da atividade de enzimas. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Outubro 2013.

3.6.1 Obtenção de extratos protéicos

As amostras de pecíolo foram homogeneizadas à temperatura de 4°C em 10 mL de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0), contendo 1 mg de polivinilpirrolidona-10.

O homogeneizado foi filtrado e centrifugado a 4000g por 20 minutos em refrigeração e o precipitado sedimentado descartado. O extrato bruto foi acondicionado em gelo e usado posteriormente como fonte enzimática para determinação de peroxidase, polifenoloxidase e proteína total.

3.6.1.1 Peroxidase e Polifenoloxidase

As determinações de peroxidase (PO) e polifenoloxidase (PFO) seguiram de metodologia descrita por Campos (2003). Para isto a vidraria utilizada nas análises foi previamente resfriada a -18°C, por 4 horas e mantido sem banho de gelo durante o processo, para evitar alguma atividade da enzima.

Para a análise da atividade da PFO foi adicionado em um tubo 3,6 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0; 1mL do extrato enzimico; 0,1 mL de catecol 0,1 M, e em seguida misturados em vortex por quinze segundos. Esta mistura foi incubada

em banho de água a 30°C, por 30 minutos. Após, o tubo contendo a mistura foi transferido para um banho de gelo e adicionado de 0,2 mL de ácido perclórico a 1,4%. O tubo foi agitado em vortex e em seguida mantido em repouso durante 10 minutos. A leitura de absorvância realizou-se em 395 nm, em espectrofotômetro.

Para a análise da atividade da PO foi adicionado em um tubo 2,5 mL de tampão fosfato-citrato contendo solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M, pH 5,0; 1,5 mL de extrato enzimático; e 0,25 mL de guaiacol a 0,5%, sendo misturados em vortex. Posteriormente, foi adicionado a esta mistura 0,25 mL de HOa 3% e novamente misturados em vortex. Após a homogeneização a amostra foi incubada a 30°C por 15 minutos.

Após a incubação, o tubo foi colocado em banho de gelo e adicionado 0,25 mL da solução de meta bissulfito de sódio a 2% e deixado em repouso por 10 minutos. A leitura de absorvância foi em 450 nm, em espectrofotômetro.

Para ambos foi utilizado como controle água e a atividade da enzima foi expressa em unidade enzimática (UE). Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de extrato enzimático que acusou um aumento na absorvância de 0,001 unidades por minuto (CAMPOS, 2003).

3.6.2 Proteína total

O teste de Bradford foi utilizado para a quantificação do total de proteína (mg proteína g de massa fresca⁻¹) contido na amostra (BRADFORD, 1976). Para isto em um tubo de ensaio foi adicionado 0,1 mL de extrato bruto em duplicata, posteriormente a isto foi adicionado 5mL do reagente de Bradford. Os tubos foram agitados e após ficaram em repouso durante 15 minutos, sendo realizada a leitura em 595 nm no espectrofotômetro.

3.6.3 .Clorofila

Para a determinação do índice de clorofila foliar (ICF) do tipo A, tipo B e clorofila total foi utilizado um método não destrutivo de análise, por meio de clorofilômetro portátil ClorofiLOG (Falker Automação Agrícola Ltda.). Foram realizadas leituras nas plantas enquanto estas ainda estavam nos vasos, escolhendo aleatoriamente folhas. Foram realizadas leituras em quatro folhas de cada tratamento, sendo que foram efetuadas duas leituras em cada folha.

3.7 Delineamento experimental

O experimento foi montado em blocos ao acaso com três repetições e esquema fatorial 5 x 3 com subparcelas, sendo cinco tratamentos relativos a fontes/níveis de adubação na parcela e nas subparcelas a aplicação dos dois óleos essenciais e do controle (água).

Cada unidade experimental foi composta por três vasos e em cada vaso cultivadas duas plantas, totalizando 45 vasos e 90 plantas.

3.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias feitas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Foi utilizado o software estatístico Sisvar para as análises.

4 Resultados e discussão

4.1 Atividade de Peroxidase (PO) e Polifenoloxidase (PFO), com efeito de adição de óleo essencial (OE)

A atividade por miligrama de tecido e da enzima PO frente à aplicação de óleo essencial (concentração 1%) de chinchilho e alecrim pode ser observada na Figura 6. Entre os tratamentos houve diferença significativa, a aplicação dos óleos fez com que ocorresse um aumento na atividade da enzima.

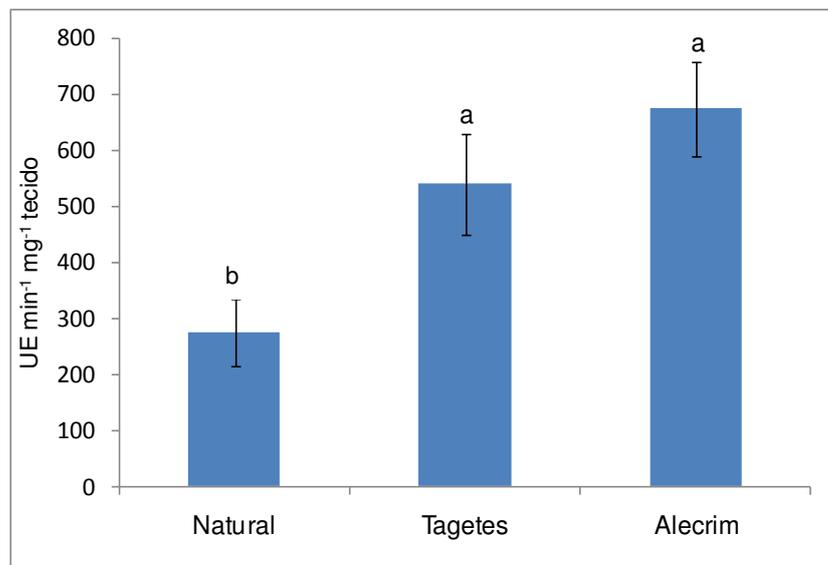


Figura 6 - Efeito da aplicação de OE de chinchilho (*Tagetes minuta* L.) e alecrim, (*Rosmarinus officinalis* L.) ambos em concentração 1%, na atividade de PO, em pecíolo de Couve Manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*). Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014.

Para a atividade por miligrama de tecido de PFO não houve diferença significativa entre os tratamentos, conforme demonstrado na Figura 7 em que três tratamentos obtiveram praticamente a mesma atividade enzimática,

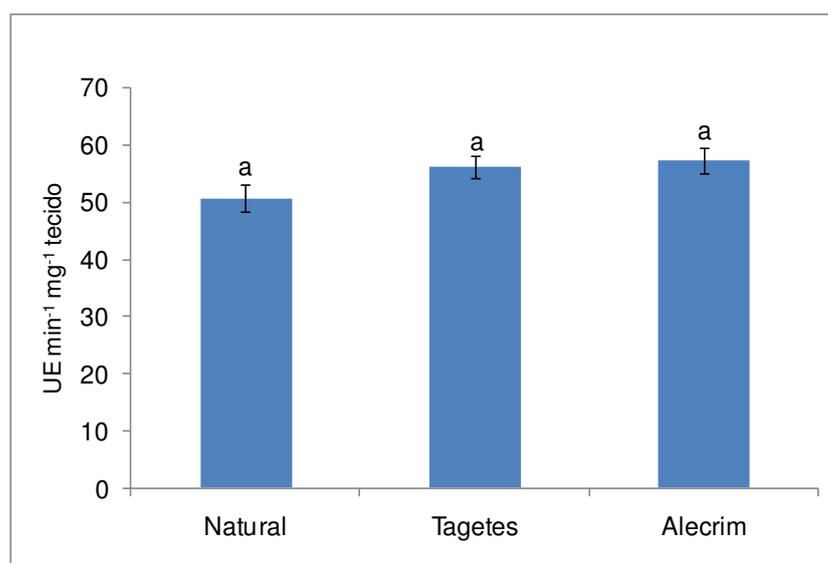


Figura 7 - Efeito da aplicação de OE de chinchilho (*Tagetes minuta* L.) e alecrim, (*Rosmarinus officinalis* L.) ambos em concentração 1%, na atividade de PFO, em pecíolo de Couve Manga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*). Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014.

Vigo-Schultz (2008), em estudo da indução de resistência no controle do crestamento bacteriano comum do feijão vagem, verificou que a aplicação do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. 0,5% não proporcionou um acréscimo na atividade de PO e PFO em relação a testemunha. No entanto, a aplicação das tinturas vegetais de *Lippia alba* (erva cidreira), *Lippia sidoides* (alecrim pimenta), *Mikania glomerata* (guaco), *Equisentum* sp. (cavalinha) e *Hedera helix* (hera), acarretaram aumento contrastantes quanto a produção das enzimas. Becker (2005) em ensaio a campo utilizando extrato bruto de alecrim e cúrcuma observou que houve proteção da soja contra as doenças de final de ciclo, porém esta proteção não envolveu a ativação de PO.

Formentini (2012) utilizando extratos de alecrim observou o seu uso folhas de tomateiros aumentou significativamente a atividade de PO e PFO, em raízes de plantas suscetíveis e resistente ao nematóide *Meloidogyne incognita*, demonstrando desta forma que os compostos presentes no alecrim possuem ação indutora das enzimas PO e PFO.

Em relação ao óleo de chinchilho Pereira (2013) constatou que o uso de óleo essencial da flor de chinchilho na concentração de 500 mg L⁻¹ proporcionou redução da severidade da requeima da batata, devido ao acréscimo da atividade de PO e PFO.

A maior expressão das enzimas PO e PFO, pode ocorrer após desafio por patógeno, porém o uso de elicitores pode proporcionar um pré-condicionamento da planta para o ataque destes patógenos (KUHN,2007).

Como a atividade da enzima PFO não demonstrou alteração com a aplicação dos indutores, isto pode significar que não ocorreu alteração na rota dos fenilpropanóides, ou seja, mecanismos relacionados com a produção compostos fenólicos e quinonas (KUHN, 2007). Pode-se atribuir esta não ativação a frequência e concentração dos óleos essenciais utilizados nos tratamentos testados.

O aumento da atividade de PO demonstra que ocorreu a indução de mecanismos secundários, pois esta enzima é ativada no início da resposta de resistência de muitos patógenos (ZACHEO, 1993). As mudanças na atividade de PO tem sido frequentemente correlacionadas a resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas (STANGARLIN, 2011).

4.2 Atividade de Peroxidase (PO) e Polifenoloxidase (PFO), com efeito de uso de Húmus de minhoca.

O uso de diferentes doses de húmus de minhoca na adubação de couve manteiga não proporcionou aumento da atividade por miligrama de tecido de PO e PFO em comparação a testemunha com adubação mineral (Figuras 8 e 9).

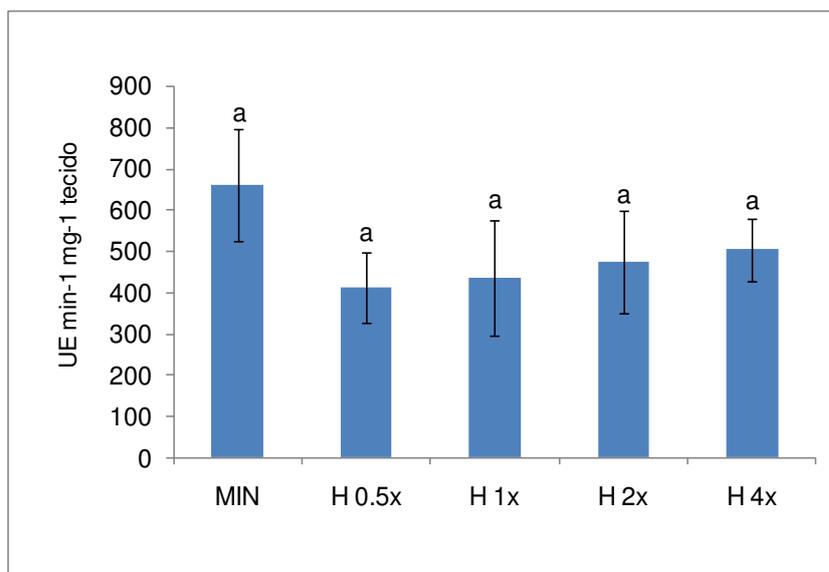


Figura 8 - Efeito do uso de húmus, na atividade de PO, em pecíolo de Couve Manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*). Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014.

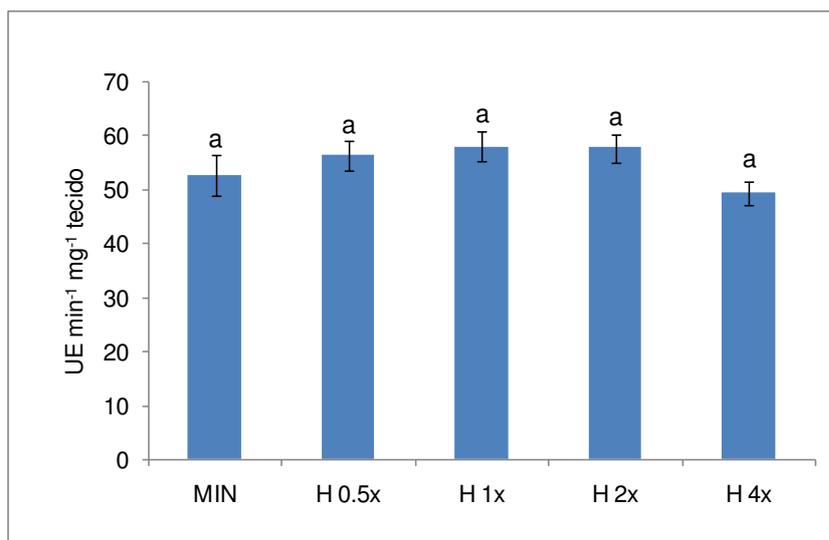


Figura 9 - Efeito do uso de húmus, na atividade de PFO, em pecíolo de Couve Manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*). Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014.

Borges (2012) encontrou resultados semelhantes, em que o uso de adubação orgânica em cultivo de Jambu, não proporcionou diferença na atividade enzimática de PO, porém, a adubação mineral acarretou uma maior atividade, mesmo não havendo diferença estatística. Malta (2003) observou que a dosagem de nitrogênio tem interação positiva com a atividade de PFO, em que a aplicação de maiores concentrações do nutriente em plantas de café acarreta na maior atividade da enzima.

Whattier (2014) observou que o aumento da dosagem do húmus na formulação de substratos para o preparo de mudas de beterraba e alface, proporcionou uma queda na atividade enzimática de PO e PFO, destoando dos dados encontrados neste trabalho.

A não ativação destas enzimas pode caracterizar que o meio em que as plantas se encontravam não causou estresse para as mesmas, já que a atividade de enzimas oxidativas como PO e PFO em plantas podem ser atreladas a parte dos mecanismos de defesas induzidas, ou a condições de estresse (NOJOSA, 2003).

4.3 Teor de Clorofila

A aplicação dos óleos essenciais de chinchilho e alecrim não alterou os teores de clorofila A, B e total. Em relação à clorofila A os índices ficaram em torno de 33,00; 12,00 para clorofila B e 45,00 para a Clorofila total, não havendo desta forma nenhum prejuízo na produção de clorofila devido a aplicação de óleos essenciais.

Resultados semelhantes foram encontrados por Bigaton et al. (2013), utilizando óleos essenciais de aroeira e quebra-macho em soja, em que este uso não resultou em incremento no teor de clorofila, entretanto, Pereira et al. (2013) observou que o uso de óleo essencial de chinchilho em batata proporcionou acréscimo no teor de clorofila.

A alta atividade de enzimas oxidativas como Peroxidases e Polifenoloxidase possui relação com a degradação das clorofilas, podendo desta forma ser prejudicada a formação das mesmas devido a ação enzimática (SOARES et al., 2001), entretanto o uso dos óleos essenciais de alecrim e chinchilho proporcionaram o aumento da atividade de Peroxidase mas este acréscimo não diminuiu o índice de clorofila.

O uso de Húmus de minhoca, por outro lado, proporcionou um acréscimo significativo no índice de clorofilas A, B e, conseqüentemente em clorofila total (Figura 10).

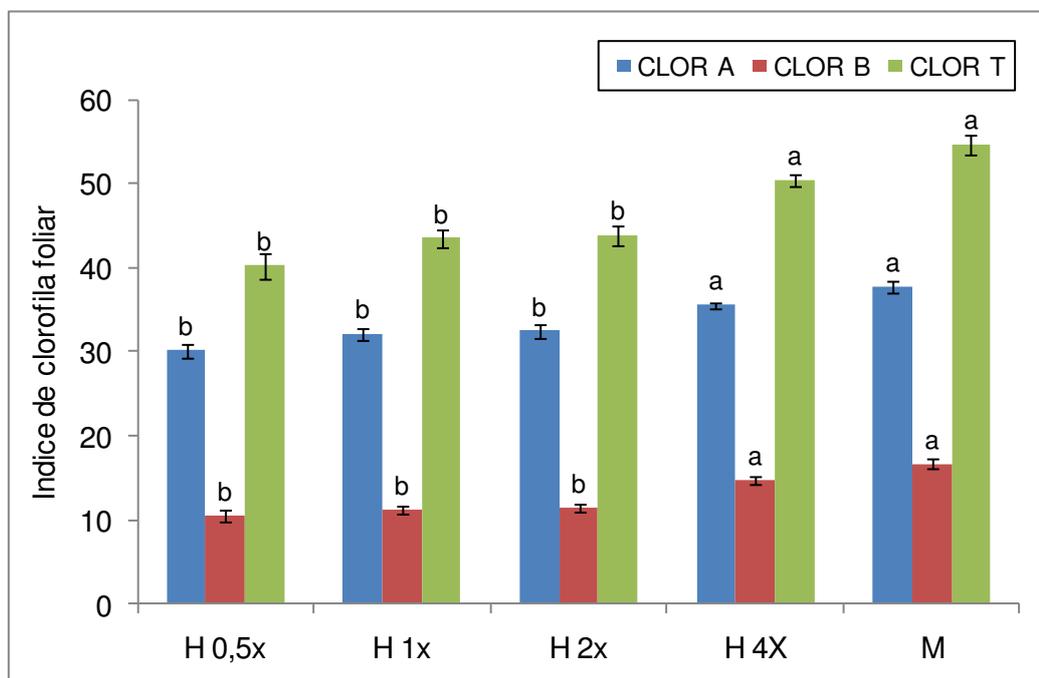


Figura 10 - Efeito do uso de diferentes dosagens de húmus no índice de clorofila a, b e total em plantas de couve manteiga (*Brássica oleraceae* L. var. *acephala*) Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014.

Os maiores valores encontrados foram observados nos tratamentos com uso de fertilizante mineral e húmus de minhoca com quatro vezes a recomendação de adubação, sendo superiores aos demais tratamentos, porém não diferindo estatisticamente entre si. O aumento da dose do húmus de minhoca proporcionou um acréscimo gradativo do índice de clorofila, os menores valores foram encontrados no tratamento e em que se utilizou metade da adubação recomendada, demonstrando desta forma que o aumento da adição de nutrientes aumenta o índice de clorofilas, o seja, o uso de doses maiores do que a recomenda para a adubação orgânica, acarreta um efeito benéfico para as plantas.

Este acréscimo progressivo é associado ao fato de que o nitrogênio e o magnésio são constituintes da molécula de clorofila, logo, o aumento da dosagem de húmus acarreta a uma maior disponibilidade destes nutrientes (TAIE, 2010). Resultados semelhantes foram encontrados por Corrêa (2010), em que o aumento

do teor de clorofila foi proporcional a elevação das doses de adubo orgânico, em plantas de orégano cultivadas em ambiente protegido. Porém, resultados diferentes foram encontrados por Ferreira (2012), em que o acréscimo de dose de adubo orgânico não proporcionou maiores teores de clorofila em plantas de hortelã e Silva (2009), em estudo utilizando húmus de minhoca na produção de mudas de mangabeira verificou que este tratamento acarretou em um menor índice de clorofila em comparação com os outros tratamentos.

4.4 Proteínas totais

O teor de proteína total em plantas de couve manteiga não sofreu influência da aplicação de óleos essenciais de plantas bioativas (Figura 11). O tratamento com o uso do alecrim obteve média superior aos demais apesar de não ocorrer diferença estatística, indicando que pode haver um potencial indutor de proteínas deste tratamento.

Os componentes dos óleos essenciais podem atuar sobre diversas proteínas, entre elas as ATPases, através de sua acumulação na dupla camada lipídica e conseqüente destruição da interação lipídeo proteína. (JUVEN, 1994; SIKKEMA, 1995). Entretanto, esta interação não foi observada, uma vez que o uso dos óleos não surtiu em um aumento, ou decréscimo significativo dos teores de proteínas. Vigo-schultz (2008) observou resultados semelhantes em que o uso de óleo de alecrim não aumentou a produção de proteína.

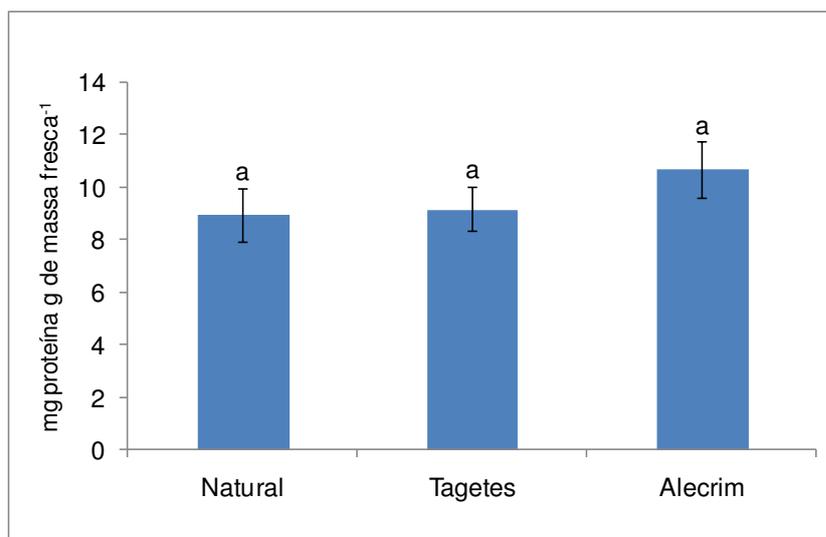


Figura 11 - Efeito da aplicação de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e chinchilho (*Tagetes minuta* L.) no teor de proteína total, em couve Manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*). Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014.

A adição de húmus de minhoca por sua vez influenciou no teor de proteína total (Figura 12). O tratamento com a menor dosagem de húmus apresentou valores mais baixos de proteína, diferindo dos outros tratamentos utilizados.

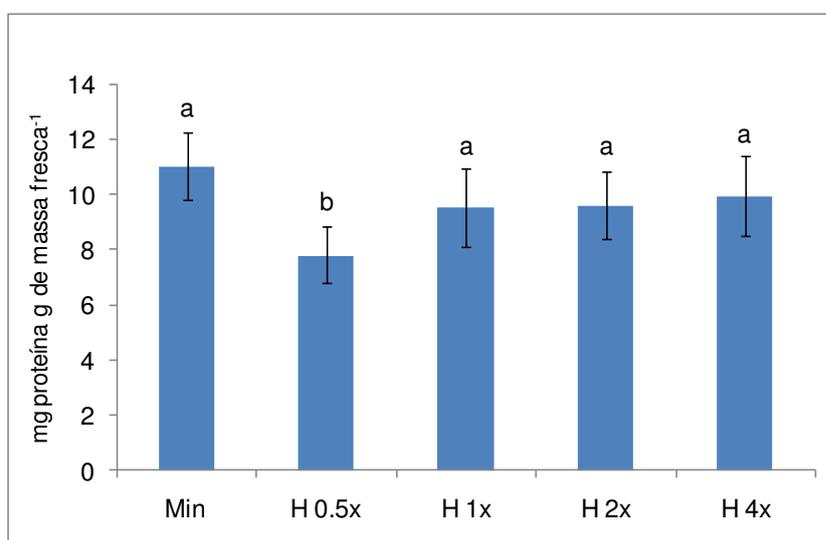


Figura 12 - Efeito de diferentes doses de húmus no teor de proteína total, em couve Manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro de 2014.

A avaliação do teor de proteína total é um dos parâmetros mais utilizado em estudos que relacionam a influência das condições de cultivo da planta com o seu estado fisiológico (PARENT, 2013), isto ocorre, pois este teor em plantas é alterado sob condições de estresse nutricional (ANDRADE, 2003), a menor dosagem de húmus apresentou o mais baixo teor de proteína, este resultado pode indicar a ocorrência de um estresse nutricional para a planta.

Imolesi (2001) apresentou resultados divergentes em relação ao uso de adubação orgânica, em que as diferentes dosagens em sementes de milho, não interferiram na produção de proteínas totais. resultados estes foram encontrados também por Aragão (2009) que observou que uso de adubação orgânica em diferentes doses não influenciou no teor de proteína total em Cunhã.

4.6 Produção de biomassa

O uso de óleos essenciais de chincilho e alecrim não influenciaram no crescimento de plantas de couve manteiga (Figura 13), não havendo diferença significativa entre os tratamentos avaliados.

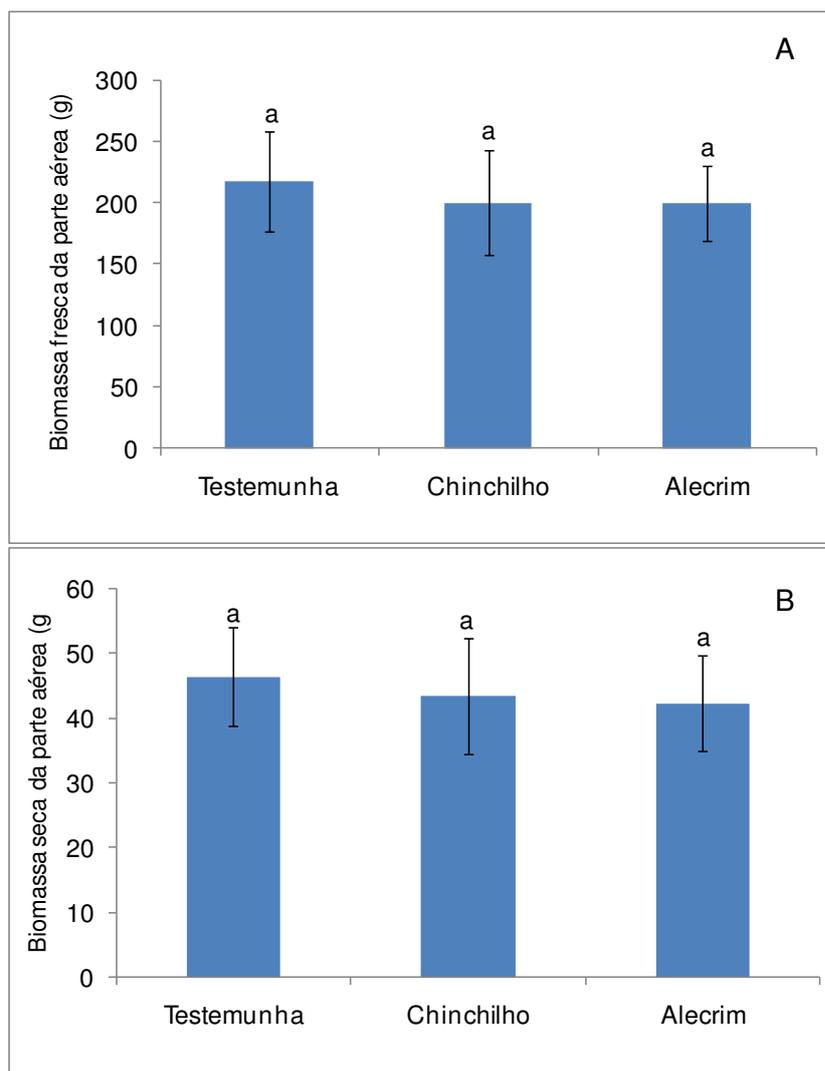


Figura 13 - Biomassa fresca média (g) (A) e Biomassa fresca média (g) (B) da parte aérea de couve-manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*) submetida à aplicações de óleo essencial de chinchilho (*Tagetes minuta* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) a 1%. Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas, Fevereiro 2014.

A adição de óleos essenciais pode acarretar em um estresse para a planta, desta forma ocorrendo um aumento da atividade da enzima PO, e como consequência haver danos no crescimento e desenvolvimento das plantas (PIZA, 2003, ULISSES, 2008). No entanto neste trabalho, a aplicação de óleos essenciais de alecrim e de chinchilho, proporcionou o aumento da atividade de PO porém não acarretou em um estresse para a planta, tendo em vista que a sua produção de biomassa fresca e seca foi estatisticamente igual em todos os tratamentos.

Em relação à aplicação de húmus o tratamento com maior dosagem de húmus e a adubação mineral não apresentaram diferença estatística (Figura 14).

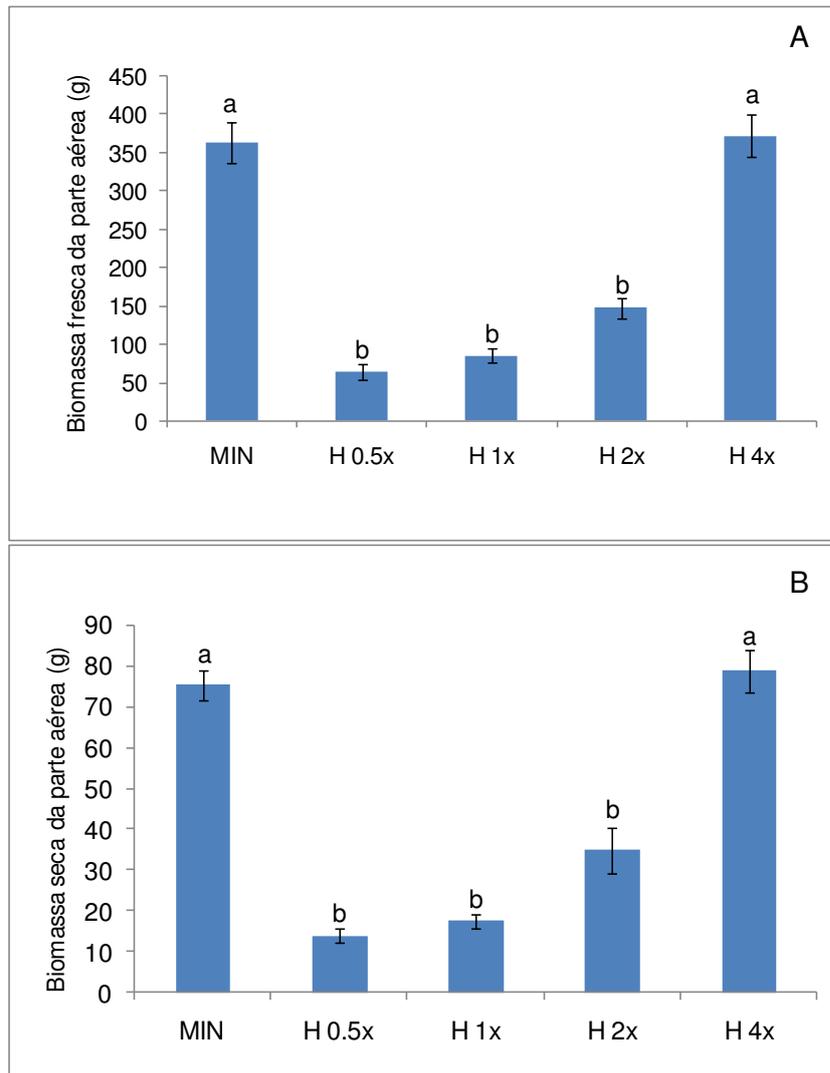


Figura 14 - Biomassa fresca média (g) (A) e biomassa seca (g) (B) da parte aérea de couve-manteiga (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*) submetida à diferentes dosagens de húmus de minhoca proveniente de esterco bovino. Letras minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Barras sobre as colunas indicam o erro experimental. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, Pelotas. Fevereiro 2014.

Em relação ao húmus, o aumento da dosagem proporcionou um aumento da produção de massa fresca e seca, e os tratamentos com 0,5x, 1x, 2x a dosagem de húmus recomendada não diferiram significativamente, porém, ocorreu um aumento do crescimento proporcional ao teor de húmus. Os tratamentos, fertilização mineral e húmus 4x a recomendação necessária não apresentaram diferenças significativas, indicando uma produção de massa seca e fresca similar.

A mineralização de nitrogênio em adubos orgânicos ocorre em maior período de tempo em comparado com fertilizantes minerais, sendo assim, necessário um

período maior para que haja sua disponibilização para a planta (LING-LING, 2014). Cabilovski et al. (2013), comparando diferentes adubos orgânicos verificaram que a mineralização mais lenta dos adubos orgânicos depende da composição dos mesmos, em relação ao húmus de minhoca a taxa de mineralização de nitrogênio por minuto é de 21,8% e a velocidade de mineralização de nitrogênio total de 0,045 por dia, indicando desta forma que não pode haver generalizações quanto ao uso de adubação orgânica e mineral. Os tratamentos com húmus possivelmente foram prejudicados na disponibilização de nutrientes para a planta, pois o manual de adubação de calagem não leva em consideração a taxa de mineralização dos adubos orgânicos para o cálculo das quantidades necessárias.

5 Conclusão

A aplicação de óleo essencial de alecrim e chinchilho em plantas de couve manteiga em concentração de 1 % induziu a atividade da enzima peroxidase, a enzima polifenoloxidase não sofreu alteração frente à adição dos óleos essenciais. O aumento da dosagem de húmus de minhoca não acarretou alterações na atividade das duas enzimas avaliadas, porém, o aumento da dosagem de húmus beneficiou as plantas de couve manteiga, pois as mesmas apresentaram um maior índice de clorofila, proteína total e maior biomassa no tratamento com a maior dosagem de húmus.

6 Referências Bibliográficas

ABIB, P. B. et. al, Extração e caracterização química do óleo essencial de *Tagetes Minuta* L., in: XXI **Congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Pelotas** , Pelotas, 2013. Disponível em: http://cti.ufpel.edu.br/siepe/arquivos/2013/CE_01759.pdf acesso em Julho de 2015.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry**, 4th ed., Allured Publ. Corp, Carol Stream, IL, USA, 2009.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 5th. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, p.922, 2005.

ANDRADE, A.C.; FONSECA, D.M.; QUEIROZ, D.S. et al. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. *Napier*). **Ciência e Agrotecnologia**, Edição Especial, p.1643-1651, 2003.

ANDREOTTIA, R.. et al. Protective action of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887)(Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.39, n.7, p.637-643, jul. 2004

ARAGÃO , A. L. et al.Valor nutritivo da cunhã submetida a adubação orgânica com esterco de ovinos In: 46^º **Reunião anual da sociedade brasileira de Zootecnia**, Maringá, PR, 2009 Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/162343/1/OPB2345.pdf> acesso em julho de 2015

ARASHIRO, M. P. et al. Efeito da adubação orgânica e da consorciação no rendimento de biomassa e óleo essencial se *Rosmarinus officinalis* **Iniciação Científica CESUMAR** -, v. 14, n. 1, p. 31-37, jun. 2012

ATTI-SANTOS, A. C. et al . Phytochemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, nov. 2005

BECKER, A. **Controle de doenças de final de ciclo e oídio da soja por extratos aquosos de *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis* e *Curcuma longa* e solução de curcumina**. 2005. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção

vegetal) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2005.

BIGATON, D. et al. Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 4, p. 757-763, out-dez, 2013

BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, Atividade Elicitora de Fitoalexinas e Proteção de Pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo Extrato Aquoso de *Eucalyptu scitriodora*. **Revista Fitopatologia Brasileira**, v.29, abril, 2004.

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

BOIX, Y. F.; VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S.; KUSTER, R. M. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 255-257, 2010.

BORGES, L. S. **Potencial antioxidante, óleo essencial e atividade antifúngica de plantas de jambu (*spilanthus oleracea*), cultivadas sob adubação orgânica e convencional e processamento mínimo de nectarina (*prunus persica* var. *nectarina*): conservação de suas qualidades e propriedades bioativas**. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp - Campus de Botucatu, 2012

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

BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254, 1976.

BROWN, G.G.; JAMES, S.W. Earthworm biodiversity in São Paulo state, Brasil. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v.42, supplements 1, p.145-149, 2006.

CABILOVSKI, R. et al. Estimation of potentially mineralizable N from fertilizers in organic agriculture., In: **I Congress on Soil Science, XIII National Congress in Soil Science, Soil - Water - Plant**, Belgrade, Serbia, 23-26th September, 2013.

CAMPOS, A. D. et al. Avaliação do efeito de produtos orgânicos na produção de compostos fenólicos envolvidos na indução de resistência às doenças do

morangueiro. In: **Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Clima Temperado**. Pelotas, 2006. Disponível em:
http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento_167.pdf

CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, E. M. L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas, p. 1-3. 2003.

CAMATTI-SARTORI, V. et al. Avaliação in vitro de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agrobiologia**, v.6, n.2, p.117-22, 2011.

CARVALHO JUNIOR, R. N. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica**: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CESTARI, I. M. et al. Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the headlice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). **Neotropical Entomology** vol.33 no.6 Londrina Nov./Dec. 2004

CHAMORRO, E. R. et al. Chemical composition of essential oil from *Tagetes Minuta* L. Leaves and flowers. **Journal of the Argentine Chemical Society** – Vol. 96 - N° (1-2), p. 80-86, 2008

CHEN, M.H. et. al. Seed-colonizing microbes from municipal biosolids compost suppress *Pythium ultimum* damping-off on different plant species. **Phytopathology**, v.98, n.9, p.1012-1018, 2008.

CLARO, S.A. Farinha de trigo: espalhante adesivo ecológico. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v. 1, n. 3, p. 31-33, jul./set. 2000.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10 ed. Porto Alegre, p.394, 2004.

COUTO, M. E. O. **Coleção de plantas medicinais aromáticas e condimentares**, 2006. Disponível em:
http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento_157.pdf
. Acesso em: Outubro 2014.

CRAVEIRO, A.A., MATOS, F.J.A., MACHADO, M.I.L., ALENCAR, J.W. Essential oils of *Tagetes minuta* from Brazil. **Perfum. & Flavor**, v.13, p.35-36, 1988.

DE WIT, P.J. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Science**, In Press. DOI. 10. 2007.

EDWARDS, C.A.; ARANCON, N.Q. The use of earthworms in the breakdown of organic wastes to produce vermicomposts and animal feed protein. In: EDWARDS, C.A. (Ed.). **Earthworm ecology**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. p.345-379.

FABRY, F. S. et. al. Efeito da aplicação de húmus e *Rhizobium etli* sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* Cléia. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** V. 2, N. 3, pág. 3, 2008

FILGUEIRA, F.A.R.Brassicáceas – couves e plantas relacionadas, p. 279-299. In **:Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3ed. Viçosa, Editora UFV, 421p 2008.

FERREIRA, T. et al. Accumulation of chlorophyll and biomass production in mint-green under different levels of organic manure, **Revista Verde** (Mossoró – RN), v. 7, n. 5, p. 41-45, dezembro de 2012

FORMENTINI, M. H. **Avaliação de indutores de resistência biótico, abiótico e extratos vegetais no controle de *Meloidogyne Incognita* em tomateiro**, 2015. Tese (Doutorado em Agronomia) universidade estadual do oeste do Paraná – UNIOESTE, Marechal Candido Rondon, 2015

GARGIA, M. V. et. Al. Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** vol.21 no.4 Jaboticabal Oct./Dec. 2012

GAYLER, S. et.al. Modelling the effect of environmental factors on “the trade” off between growth and defencive compounds in young apple trees. **Trees**, Berlin, V 18, p. 363-371, 2004

GENENA, A. K. **Extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Estudo de sua ação antioxidante**.2005, p. 159. Dissertação.

(Mestrado - Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos na Indústria de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis .

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia**: Processos ecológicos em agricultura sustentável. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 653p. 2000.

GONÇALVES, M. M. et al. **Produção e uso de biofertilizantes em sistemas de produção de base ecológica**. 2009. Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/circulares/Circular_78.pdf. Acesso em Outubro de 2014.

GUZZO, S. D. et al. . Mecanismos envolvidos na resistência induzida em plantas a doenças: sinalização e expressão de genes de defesa. In: **III Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. p. 281-01. Viçosa, 2007.

ITAKO, A. T. et al.; Polifenoloxidase induzida por óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em folhas de tomate inoculadas com *Alternaria solani*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34 (suplemento), p. 54, 2008.

JONES, J. D. & DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, vol 444, No 15: p323-329. 2006

JUVEN, B.J. et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Appl Bacteriol** 76: 626-631. 1994
JUNGES, E. et al .Efeito do extrato aquoso e do óleo essencial de *Tagetes Minuta* aplicado ao solo sobre a penetração de j2 de *Meloidogyne Incognita* em tomateiro **Revista Brasileira de Agroecologia** Vol. 4 No. 2 nov. 2009

KAO, C. H. Differential effect of sorbitol and polyethyl enegy colon antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 83-89, 2003.

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**. Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba SP. ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2007.

LAGOS, F.S. **Uso do leite de vaca no controle do oídio em feijão-de-vagem**, Dissertação de Mestrado, Pato Branco, Universidade Federal do Paraná, 2009

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000.

LIMA, R.K.; Cardoso, M.G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**. 2007;p:14-24.

LING-LING, L. et. al Nitrogen Mineralization from Animal Manures and Its Relation to Organic N Fractions. **Journal of Integrative Agriculture**, 13(9): 2040-2048, 2014

LOBARDA, R. et al. Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* essential oils on *Tetranychus chusurticae* Koch (Acari: Tetranychidae), **Industrial Crops and Products**, v. 48 p. 106– 110, 2013

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2 ed., p. 160-161, 2008.

LOVATTO, P. V. et. al. Extratos aquosos de *Tagetes minuta* (asteraceae) como alternativa ao manejo agro-ecológico de afídeos em hortaliças, **Interciência**, SEP 2013, VOL. 38 Nº 09

MALTA, M. R. et. al. Chemical composition, yield and quality of the fertilized coffee with different sources and doses of nitrogen. **Ciência agrotecnica** vol.27 no.6 Lavras Nov./Dec. 2003

MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plant. **Phytochemistry**, Oxford, v. 18, p. 193-215, 1979.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Amsterdam: v. 162, p. 491-498, 2002.

MYSORE, K.S. & RYU, C. Nonhost resistance: how much do we know?, **Trends in Plant Science**, 9(2): 97-104, 2004.

NOJOSA, G. B. A. et al. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, p. 148-154, 2003.

OLIVEIRA, A.P; FERREIRA. et. al. Uso de esterco bovino e húmus de minhoca na produção de repolho híbrido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 70-73, março, 2001.

ORLANDO L.H. et. al. Humatos isolados de vermicomposto como promotores de crescimento em cultivo orgânico de alface. **Revista Ciências Técnicas Agropecuarias**, Vol. 22, No. 1. 2013

PARENT, S.E.; PARENTE, L.E.; EGOZCUE, J.J. et al. The plant ionome revisited by the nutrient balance concept. **Frontiers in Plant Science**, v.4, p.1-10, 2013.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In.: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. V.1. 3. ed. São Paulo: Ceres, v.1, p. 417-53 1995

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R. e CIA, P. **Interação planta-patógeno. Fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba, FEALQ, p.179-197, 2008.

PERUCH L.. et al. Levantamento da intensidade da alternariose e podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 464-469, 2006.

PEREIRA. P. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e agrotecnologia**, vol.30, n.4, 2006

PEREIRA. I. S. et. al. Óleo essencial de chinchilho (*Tagetes Minuta* L.) Como alternativa para o controle da requeima na cultura da batata **Cadernos de Agroecologia** v. 8, n. 2, 2013

PIZA, I. M. et. al. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 4, p. 361-366, out-dez, 2003

RIVERA, M.C.; et. al.. Temperature and dosage dependent suppression of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* in vermicompost amended nurseries of white pumpkin. **Phyton**, v.73, p.131- 136, 2004.

RIBEIRO, D. S. et. al. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 687-696, abr. 2012

SANTOS, B. T. et al. Óleos essenciais de espécies florestais e medicinais no controle de ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) em algodão. **Cadernos de Agroecologia**, Vol6, No. 2, 2011.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBANEZ, E.; SENORANS, F. J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, Iowa-USA, v. 68, n. 4, p. 790-795, 2005.

SCHEURELL, S. et. al. Compost tea as a container medium drench for suppressing seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, v.9, n.11, p.1156-1163, 2004.

SCHIEDECK, G. et al. **Minhocultura e produção de húmus para a agricultura familiar** Dezembro, 2006. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30814/1/Circular-57.pdf>. Acesso em julho de 2015.

SCHIEDECK, G. et al. Saber popular como elemento primordial para trabalhos em Agroecologia. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n. 2, outubro, 2007.

SCHIEDECK, G. **Manejo de insetos por meio de plantas bioativas em sistemas de produção de base ecológica**. 2012. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2012_2/manejoInsetos/index.htm. Acesso em Outubro de 2014.

SIKKEMA, J. et.al. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol Rev** 59: 201-222. 1995

SILVA, A, E. et al. Efeito de diferentes substratos na produção de mudas de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 3, p. 925-929, Setembro 2009

SOARES, R. M. **Avaliação da eficácia de Fusarium sp. E da indução de resistência por acibenzolar-S-methyl à murcha-de-curtobacterium do feijoeiro**. 2001. 89 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal – Área de concentração Proteção de Plantas), Universidade Estadual Paulista/FCA, Botucatu, 2001.

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

STEFFEN, G. P. K. et. al. Utilização de vermicomposto como substrato na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Corymbia citroidora*. **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v 31, n 66, p. 75-82, 2011

STREIT, N. M.et. al. As Clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.748-755, mai-jun, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 5ª ed, 2013. p 393

TAIE, H. A., SALAMA, Z. A. R., RADWAN, S. Potential Activity of Basil Plants as a Source of Antioxidants and Anticancer Agents as Affected by Organic and Bio-organic Fertilization. **Not. Bot. Hort. Agrobot.** 38 (1) , 119-127. 2010.

THIPYAPONG, P.et. al. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, Berlin: v. 20, p. 105-117, 2004.

UPADHYAYA, K., CHANOTIYA, C.S., PADALIA, R., BHATT, Z.A., BAHUGUNA, Y.M. Comparative phytochemistry and pharmacological evaluation of *Tagetes minuta*. **J. Pharm. Res.** v.3, p.1434-1437, 2010.

VAZ, A. P. A. **Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas: Alecrim**, 2006. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/FOL68.pdf>. Acesso: Novembro 2014.

VAUGHN, K. C.; LAX, A. R.; DUKE, S. O. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn: v. 60, p. 106-112, 1988.

VOLP, A. C et al. Pigmentos naturais bioativos **Alim. Nutr**, Araraquara v.20, n.1, p. 157-166, jan./mar. 2009

VIECELLI, C. A. **Controle da mancha angular e análise bioquímica de resistência em feijoeiro tratado com extratos de *Pycnoporus sanguineus***. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Marechal Cândido Rondon PR, UNIOESTE, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008.

VIGO-SCHULTZ, S. C. **Avaliação da indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijão vagem**. Botucatu – SP. 2008. Tese (Doutorado em Agronomia). UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2008.

VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. **Óleo essencial de eucalipto** (Documentos florestais). Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, v. 17, 2003.

ZACHEO, G. **Nematode Interactions**. Khan, W.W. (ed.), Chapman and Hall, Londres, 1993. p. 1-25.

WATTHIER, M. **Substratos orgânicos: caracterização, produção de mudas e desenvolvimento à campo de alface e beterraba e influência na atividade enzimática**, Dissertação (Mestrado) Fitotecnia Ênfase Horticultura Porto Alegre (RS), Brasil Fevereiro de 2014