

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Débora Filippi

**Ação antifúngica do extrato de *Physalis peruviana* Linnaeus frente ao
fungo *Botrytis cinerea***

Passo Fundo

2018

Débora Filippi
Tecnóloga em Alimentos

**Ação antifúngica do extrato de *Physalis peruviana* Linnaeus frente ao
fungo *Botrytis cinerea***

Dissertação de Mestrado apresentada para
obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza
Friedrich.

Linha de pesquisa: Qualidade e propriedades
funcionais de alimentos.

Passo Fundo
2018

CIP – Catalogação na Publicação

F483a Filippi, Débora
Ação antifúngica do extrato de *Physalis peruviana*
Linnaeus frente ao fungo *Botrytis cinerea* / Débora Filippi.
– 2018.
86 p. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Tereza Friedrich.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2018.

1. Morango – Doenças e pragas. 2. Compostos fenólicos.
3. Fungos. 4. Antioxidantes. I. Friedrich, Maria Tereza,
orientadora. II. Título.

CDU: 632.4

Catalogação: Bibliotecária Marciéli de Oliveira - CRB 10/2113

Débora Filippi
Tecnóloga em Alimentos

**Ação antifúngica do extrato de *Physalis peruviana* Linnaeus frente ao
fungo *Botrytis cinerea***

Dissertação de Mestrado apresentada para
obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza
Friedrich.

Linha de pesquisa: Qualidade e propriedades
funcionais de alimentos.

Passo Fundo, 28 de fevereiro de 2018

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Tereza Friedrich - UPF - Orientadora

Profa. Dra. Laura Beatriz Rodrigues - UPF

Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo - IFRS Campus Erechim

Dedico,
À minha família, especialmente aos meus pais
Danilo Filippi e Dilce Maria Filippi.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida.

Aos meus pais, Danilo Filippi e Dilce Maria Filippi, por todo amor, incentivo e apoio durante esta caminhada.

Ao meu irmão, Dionata Filippi, pela confiança em mim depositada, palavras de incentivo e por tornar esta caminhada mais alegre.

Ao meu namorado, Artur Bordin, por estar ao meu lado em todos os momentos, tornando esta caminhada mais leve.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Tereza Friedrich, por ter aceitado me orientar no desenvolvimento deste projeto, pela orientação científica transmitida e por incentivar e apoiar a continuidade deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo, por incentivar a realização desta etapa acadêmica e pela orientação científica transmitida durante o período de graduação e do mestrado.

À Técnica de Laboratório Denise Bilibio, pela disponibilidade do espaço físico dos Laboratórios do IFRS -Campus Sertão, pela sua atenção e incentivo.

À Profa. Laura Beatriz Rodrigues e à doutoranda Bruna Webber, pelo conhecimento transmitido, sugestões e ajuda nas análises referentes à ação antifúngica do extrato.

À Laboratorista Cinara Cardoso, pela receptividade no Laboratório de Fitopatologia da UPF, pelos ensinamentos e pela atenção.

Às meninas do Laboratório de Cromatografia da UPF, pela companhia diária e amizade construída no decorrer destes dois anos.

Aos meus colegas de mestrado, pela companhia, amizade e apoio durante estes dois anos.

À Universidade de Passo Fundo - UPF, em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTA e todos os seus colaboradores, pelo suporte prestado para que a realização deste trabalho fosse possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

E a todos que, de uma forma ou outra, acreditaram junto comigo que esta conquista seria possível.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.” (Isaac Newton).

RESUMO

A composição química do morango (*Fragaria x ananassa* Duch) contribui para o desenvolvimento de fungos, em especial, o *Botrytis cinerea*, principal fitopatógeno relacionado à cultura. Este é responsável por causar o mofo cinzento, principal doença fúngica que acomete os frutos, principalmente no período pós-colheita. A severidade da doença se deve à capacidade do *Botrytis cinerea* de permanecer nos frutos durante todo o período de maturação, vindo a se manifestar somente no período pós-colheita, o que resulta em consideráveis perdas econômicas para o setor produtivo e comercial. O controle do fungo é realizado majoritariamente por fungicidas sintéticos, indicados para aplicação a partir do início da floração até o período de pré-colheita dos frutos. Métodos alternativos de controle têm sido utilizados a fim de reduzir a incidência da doença, contudo características próprias do *Botrytis cinerea* o tornam altamente resistente. Estes fatores, somados aos elevados teores de resíduos de fungicidas nos frutos, e a busca pelo desenvolvimento de alimentos saudáveis, tem intensificado as pesquisas a fim de identificarem novos métodos de controle do *Botrytis cinerea*. Extratos obtidos de plantas tem despertado o interesse científico por conterem substâncias responsáveis por conferirem proteção às mesmas. Esta ação se deve à presença de metabólitos secundários capazes de exercerem ação antimicrobiana frente a uma gama de microrganismos. A presença de ácidos fenólicos e flavonoides nas diferentes partes dos frutos de *Physalis peruviana* conferem à espécie capacidade de atuar como um agente antimicrobiano natural. Avaliar a ação preventiva do extrato de *Physalis peruviana* sobre o fungo *Botrytis cinerea*, aplicado através de suspensão de conídios na concentração de 10^5 conídios por mL de suspensão, em morangos da variedade Albion, foi o objetivo geral deste projeto de dissertação. A aplicação do extrato de forma preventiva frente ao fungo demonstrou melhor ação antifúngica quando aplicado em morangos verdes armazenados a 25 °C. A composição química dos morangos possivelmente interfere na intensidade da ação exercida pelo extrato. Os compostos fenólicos, ácido clorogênico ($148,8 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido cafeico ($14,42 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido ferúlico ($2,44 \mu\text{g mL}^{-1}$) e quercetina ($190 \mu\text{g mL}^{-1}$), identificados no extrato exercem ação antifúngica sobre o fungo *Botrytis cinerea* e esta, possivelmente se deve a ação sinérgica dos três compostos. *Physalis peruviana* representa uma alternativa para controle preventivo de mofo cinzento em morangos da variedade Albion.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, ação antifúngica, *Botrytis cinerea*.

ABSTRACT

The chemical composition of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) contributes to the development of fungi, in particular *Botrytis cinerea*, the main phytopathogen related to the crop. This is responsible for causing gray mold, the main fungal disease that affects fruits, especially in the post-harvest period. The severity of the disease is due to the ability of *Botrytis cinerea* to remain in the fruits throughout the maturation period, only to occur in the post-harvest period, which results in considerable economic losses for the productive and commercial sector. The control of the fungus is carried out mainly by synthetic fungicides, indicated for application from the beginning of flowering to the period of pre-harvesting of the fruits. Alternative methods of control have been used in order to reduce the incidence of the disease, but *Botrytis cinerea*'s own characteristics make it highly resistant. These factors, coupled with the high levels of fungicide residues in fruits and the search for the development of healthy foods, have intensified research to identify new methods of *Botrytis cinerea* control. Extracts obtained from plants have aroused the scientific interest to contain substances responsible for protecting them. This action is due to the presence of secondary metabolites capable of exerting antimicrobial action against a range of microorganisms. The presence of phenolic acids and flavonoids in different parts of the fruits of *Physalis peruviana* confer the ability of the species to act as a natural antimicrobial agent. To evaluate the preventive action of the extract of *Physalis peruviana* on the fungus *Botrytis cinerea*, applied by suspension of conidia in the concentration of 10^5 conidia per mL of suspension, in strawberries of the Albion variety was the general objective of this dissertation project. Application of the extract preventively against the fungus demonstrated a better antifungal action when applied to green strawberries stored at 25 °C. The chemical composition of strawberries possibly interferes with the intensity of the action exerted by the extract. Phenolic compounds, chlorogenic acid ($148.8 \mu\text{g mL}^{-1}$), caffeic acid ($14.42 \mu\text{g mL}^{-1}$), ferulic acid ($2.44 \mu\text{g mL}^{-1}$) and quercetin ($190 \mu\text{g mL}^{-1}$) identified in the extract exert an antifungal action on the fungus *Botrytis cinerea*, possibly due to the synergistic action of the three compounds. *Physalis peruviana* represents an alternative for preventive control of gray mold in strawberries of the Albion variety.

Key-words: Phenolic compounds, antifungal action, *Botrytis cinerea*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Descrição da localização do receptáculo floral.....	27
Figura 2 - Estrutura do <i>Botrytis cinerea</i> com conidióforos (A) e conídios (B).....	29
Figura 3 - Estrutura básica dos ácidos benzoicos e cinâmicos.....	31
Figura 4 - Estrutura básica de flavonoides.....	32
Figura 5 - Efeito antibacteriano de algumas especiarias.....	33
Figura 6 - Frutos da espécie <i>Physalis peruviana</i>	34
Figura 7 - Cálice de <i>Physalis peruviana</i>	35
Figura 8 - Grau de coloração do cálice dos frutos de <i>Physalis peruviana</i>	35
Figura 9 - Fluxograma das etapas realizadas no período de 2016/2018.....	39
Figura 10 - Morangos infectados com <i>Botrytis cinerea</i> (A) e fruto utilizado para isolamento do fungo (B).....	47
Figura 11 - Curva padrão de catequina.....	49
Figura 12 - Cromatograma dos ácidos fenólicos identificados no extrato de <i>Physalis peruviana</i>	50
Figura 13 - Cromatograma do flavonoide quercetina identificado no extrato de <i>Physalis peruviana</i>	50
Figura 14 - Ação fungicida apresentada pelo volume de 5 mL de extrato frente ao <i>Botrytis cinerea</i>	51
Figura 15 - Resultados obtidos no experimento I.....	53
Figura 16 - Resultados obtidos no experimento II.....	55
Figura 17 - Ausência de <i>Botrytis cinerea</i> em morangos verdes armazenados a 4°C.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química dos frutos de <i>Physalis peruviana</i>	48
Tabela 2 - Percentual de inibição do extrato de <i>Physalis peruviana</i> frente ao fungo <i>Botrytis cinerea</i>	52
Tabela 3 - Teor de compostos fenólicos nos diferentes volumes de extrato de <i>Physalis peruviana</i>	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Compostos fenólicos presentes na espécie <i>Physalis peruviana</i>	37
Quadro 2 - Preparo da curva, branco e amostra para determinação de flavonoides totais.....	42
Quadro 3 - Protocolo para incorporação do extrato ao meio de cultura.....	44
Quadro 4 - Protocolo para avaliar o percentual de inibição do extrato frente ao fungo <i>Botrytis cinerea</i>	44
Quadro 5 - Análise genômica do fungo isolado.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1	MORANGO	27
2.1.1	Principal fungo fitopatogênico do morango	28
2.1.1.1	Métodos de controle do <i>Botrytis cinerea</i>	29
2.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E AÇÃO ANTIFÚNGICA.....	31
2.3	<i>PHYSALIS PERUVIANA</i> LINNAEUS	34
2.3.1	Compostos fenólicos e ação antifúngica	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO <i>BOTRYTIS CINEREA</i>.....	40
3.1.1	Análise genômica do fungo isolado	40
3.2	MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DO EXTRATO.....	40
3.2.1	Caracterização química do <i>Physalis peruviana</i>	41
3.2.2	Preparo do extrato.....	42
3.2.2.1	Determinação dos flavonoides e ácidos fenólicos presentes no extrato	43
3.3	TESTE DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE <i>PHYSALIS PERUVIANA</i>.....	43
3.3.1	Repique do fungo	43
3.3.2	Avaliação das diferentes formas de incorporar o extrato ao meio de cultura.....	43
3.3.3	Determinação do percentual de inibição do extrato frente ao <i>Botrytis cinerea</i>	44
3.3.4	Teste com morangos.....	45
3.3.4.1	Experimento I	46
3.3.4.2	Experimento II.....	46
3.4	TRATAMENTO DE DADOS	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO	69

1 INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch) é caracterizado como um fruto perecível de vida útil relativamente curta e alta taxa respiratória, que aumenta em até 50 % no período de maturação dos frutos. A composição química dos frutos o torna um substrato ideal para o crescimento de microorganismos (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011).

A principal doença fúngica que acomete a cultura do morango é o mofo cinzento. Causada pelo fungo *Botrytis cinerea* pode danificar folhas, flores e frutos. O fungo é capaz de permanecer nos frutos verdes e se manifestar somente no período pós-colheita, resultando em consideráveis perdas econômicas para o setor produtivo (CANTILLANO; SILVA, 2010; HUSAINI; NERI, 2016).

No Brasil aproximadamente 3700 hectares são destinados à produção de morangos, sendo 70% destinados ao consumo *in natura* e 30% ao processamento (REVISTA CAMPO E NEGÓCIO, 2015). Em 2017 o país exportou 1.200,00 kg de morangos totalizando 8.282,00 dólares (VIEIRA, 2018). Somente nos Estados Unidos, as perdas causadas por *Botrytis cinerea* podem corresponder a 50% do total de morangos plantados (GIANESSI; REIGNER, 2005).

Os morangos comercializados no Brasil provem em sua maioria do sistema convencional, que utiliza como principal método de controle de doenças fúngicas os fungicidas sintéticos (SANHUEZA et al., 1996; LORENZETTI et al., 2011). Para controle do mofo cinzento em morangos o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem registrado 13 fungicidas sintéticos destinados à aplicação pré-colheita (BRASIL, 2018). Entretanto, o *Botrytis cinerea* tem se mostrado resistente frente a alguns fungicidas (GRABKE, 2014; FRAC, 2018).

É necessário oferecer métodos alternativos para controle do *Botrytis cinerea* em morangos produzidos pelos diferentes sistemas de cultivo (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; ANVISA, 2013; GYAWALI; IBRAHIM, 2014). O desafio da fruticultura atual é produzir alimentos de qualidade e saudáveis, que atendam aos requisitos de segurança alimentar, sustentabilidade ambiental e agrícola e que sejam viáveis economicamente para o setor produtivo e para os consumidores (BRASIL, 2012; CASTRO, 2012).

Extratos de plantas tem ganhado interesse científico devido a suas propriedades antimicrobianas. A ação se deve a diversidade de substâncias formadas pelo metabolismo secundário das plantas, que há muito tempo tem sido descritos na literatura por conferirem

proteção natural às mesmas frente ao ataque de microrganismos fitopatogênicos e pragas. A diversidade de metabólitos secundários tem estimulado o interesse na extração dos mesmos para posteriormente, avaliá-los quanto ao seu potencial antifúngico (AQUEVEQUE et al., 2016; LAGROUH, 2017).

Frutos da espécie *Physalis peruviana* também conhecida como *uchuva* e *goldenberry*, são fontes de ácidos fenólicos e flavonoides (VALENCIA, 1986; ROCKENBACH et al., 2009; SEVERO et al., 2010; RAMADAN 2011). Sua ação antifúngica tem sido demonstrada frente a diferentes espécies de fungos (CORRÊA, 2015). O percentual de inibição do crescimento micelial apresentado por extratos de *Physalis peruviana*, em alguns casos é superior ao percentual apresentado por alguns fungicidas comerciais, com exemplo, piraclostrobina e trifloxtrobina adicionada de protioconazol (CORRÊA, 2015).

Nesse sentido, avaliar a ação preventiva do extrato de *Physalis peruviana* sobre o fungo *Botrytis cinerea* aplicado em morangos (*Fragaria x ananassa* Duch) variedade Albion foi o objetivo geral desta dissertação de mestrado.

Os objetivos específicos são descritos abaixo:

- I. Identificar e isolar o fungo *Botrytis cinerea* a partir de morangos maduros da variedade Albion;
- II. Realizar a análise genômica do fungo isolado;
- III. Adquirir os frutos de *Physalis peruviana* Linnaeus, matéria-prima para produção do extrato;
- IV. Caracterizar os frutos de *Physalis peruviana* L., quanto aos parâmetros físico-químicos: pH; acidez titulável total em ácido cítrico; sólidos solúveis totais por refratometria; proteína pelo método de Kjeldahl clássico; umidade por secagem direta em estufa a 105°C; glicídios redutores em glicose; vitamina C por iodato de potássio e determinação de coloração do cálice.
- V. Preparar o extrato de *Physalis peruviana* L.;
- VI. Determinar os ácidos fenólicos e flavonoides presentes no extrato;
- VII. Avaliar *in vitro* e em morangos a ação antifúngica do extrato aplicado de forma preventiva.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MORANGO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch) foi identificado primeiramente pelo botânico Francês Antoine Nicolas Duchesne. A espécie se originou a partir do cruzamento das espécies *Fragaria virginiana* Mill (originária da América do Norte) e *Fragaria chiloensis* (Linnaeus) Duchesne (originária do Chile). O morangueiro pertence à família Rosaceae e é considerado um híbrido natural (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011).

Botanicamente *Fragaria x ananassa* Duch não é uma fruta ou *berry* verdadeira. As sementes, como são popularmente chamadas, é que são os verdadeiros frutos. O receptáculo floral cresce e se transforma em uma parte carnosa, a qual está embutida em muitos frutos verdadeiros (FILLINGER; ELAD, 2016). A Figura 1 apresenta a localização do receptáculo floral.

Figura 1 - Descrição da localização do receptáculo floral.



Fonte: <https://www.google.com.br/imagens>

A cor, textura e sabor característico do morango o tornam muito atrativo e o fazem um dos frutos mais consumido *in natura* do mundo (D.SC et al., 2012). Representando uma das culturas mais importantes economicamente (HORTIFRUTI, 2015; ANDRADE, 2017).

Os Estados Unidos é o maior produtor mundial de morango, seguido pela Turquia e pela Espanha, de acordo com o Serviço Nacional de Estatística Agrícola dos Estados Unidos (AGRICULTURE, 2017). O Brasil ocupa o primeiro lugar entre os principais produtores de morango da América do Sul, totalizando uma produção média de 30 t/ha (HORTIFRUTI, 2015; ANDRADE, 2017).

Devido ao alto teor de água ($\geq 90\%$) os frutos são considerados perecíveis e susceptíveis ao crescimento de diferentes microrganismos, sendo necessário o uso de diferentes técnicas que visem garantir a qualidade e o aumento de vida de prateleira dos frutos (D.S.C et al., 2012). Fungos, vírus, nematóides e bactérias são os principais responsáveis por originarem doenças no morangueiro. Insetos como percevejo, besouros e pulgões e ácaros, também causam danos à cultura se não controlados adequadamente (ESTECA, 2017).

Entre as principais cultivares de morangos plantadas no Brasil (Albion, Aromas, Camarosa, Camino Real, Diamante, Festival, Monterey, Oso Grande, Palomar, Portola, San Andreas e Ventana), a Albion corresponde a uma das mais cultivadas na região Sul do país. Entretanto não há cultivares de morango altamente resistentes ao mofo cinzento (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011).

Albion foi lançada comercialmente em 2004 pela Universidade da Califórnia. Foi criada a partir do cruzamento da cultivar “Diamante” com uma cultivar originária da Califórnia (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011). É caracterizada como uma planta de dias neutros, sendo menos sensível ao fotoperíodo (luz) em relação a plantas de dias curtos (HUSAINI; NERI, 2016). Os frutos variam quanto a sua composição química nos diferentes estádios de maturação. Frutos com coloração verde e vermelho escuro apresentam teores de sólidos solúveis totais, acidez total, pH e umidade de 6,8 %, 1,0 %, 3,42 e 92,4 % e 9,0 %, 0,7 %, 3,80 e 92,5 % respectivamente (ORNELAS-PAZ et al., 2013).

2.1.1 Principal fungo fitopatogênico do morango

O *Botrytis cinerea* é responsável por causar a doença conhecida por mofo-cinzento ou *gray mold*, principal doença que acomete a cultura do morango. Os sintomas da infecção podem aparecer em frutos verdes, em período de amadurecimento e na pós-colheita (MAAS, 1984). Se houver condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo, as perdas pós-colheita podem ser grandes, principalmente porque o mesmo pode se desenvolver dentro da embalagem durante o período de armazenamento. Em condições desfavoráveis o *Botrytis cinerea* pode permanecer na forma de micélio dormente, em restos de plantas ou em partes mortas das mesmas (GRABKE, 2014).

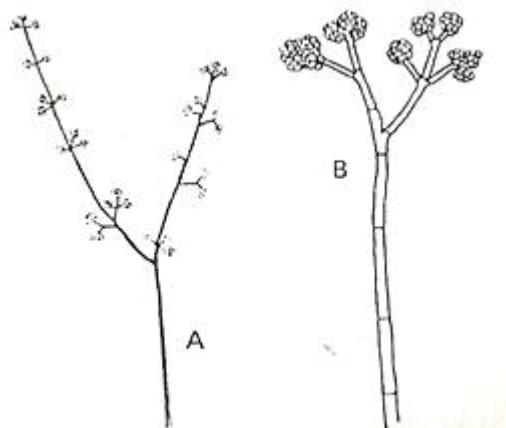
O *Botrytis cinerea* pertencente ao gênero *Botrytis* e a família Sclerotiniaceae. É caracterizado como um fungo necrotrófico, mas que pode viver saprotificamente. Apresenta ótima adaptabilidade, podendo ser encontrado em diferentes regiões geográficas de acordo com a natureza de seu hospedeiro (GRABKE, 2014; JIN et al., 2017). É um dos principais

fitopatógenos de frutas e vegetais, incluindo alface, batata, berinjela, caqui, cebola, citros, feijão-vagem e girassol (BRASIL, 2018).

Devido à capacidade do *Botrytis cinerea* de ocorrer em diferentes estágios da cadeia produtiva, tanto do morango como de outros frutos, hortaliças e plantas, estimar os reais custos dos danos causados pelo fungo se torna difícil (DEAN et al., 2012). Até o momento somente a cultivar de morango Oso Grande é tolerante ao *Botrytis cinerea* (BRASIL, 2018). Não foram encontrados dados que descrevam a cultivar Albion como resistente ao mofo cinzento.

Temperaturas moderadas (15 °C a 25 °C) são favoráveis ao desenvolvimento do fungo. Em temperaturas próximas de 0 °C também é possível haver crescimento fúngico, bem como, em morangos embalados e armazenados sob refrigeração (GINDRO; PEZET, 2001; AHLEM et al., 2012). A umidade é o principal fator regulatório para o desenvolvimento da doença e a germinação de esporos, também chamados de conídios, como apresentado na Figura 2 – B. Longos períodos chuvosos aumentam a incidência da doença (KOIKE; GLADDERS; PAULUS, 2007).

Figura 2 - Estrutura do *Botrytis cinerea* com conidióforos (A) e conídios (B).



Fonte: Maas (1984).

2.1.1.1 Métodos de controle do *Botrytis cinerea*

Fungicidas sintéticos correspondem ao método convencional de controle de doenças de plantas, da mesma forma, para o controle do mofo cinzento em morangos. Neste caso, as primeiras aplicações de fungicidas sintéticos são realizadas antes do período de floração

podendo ir até o período pré-colheita dos frutos. Em sua maioria, os fungicidas utilizados apresentam modo de ação sistêmicos seguido por não sistêmicos. A aplicação destes pode ser realizada de forma alternada (MAAS, 1984).

No Brasil atualmente, há 15 fungicidas (Cantus, Cercobin 700 WP, Certus, Collis, Meltitiofan, Mythos, Rovral SC, Sialex 500, Sonata, Sumilex 500 WP, Timorex Gold, Topsin 500 SC e Topsin 700) registrados no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), este vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Do total, apenas dois fungicidas não se enquadram na categoria sintéticos (classificados como biológico e bioquímico respectivamente). Todos são indicados para aplicação pré-colheita contra o fungo *Botrytis cinerea* em morangos (BRASIL, 2018).

O custo mundial com fungicidas sintéticos utilizados no controle do mofo cinzento ultrapassa 500 milhões de euros, o que representa mais de 10% do mercado mundial de fungicidas. Se somados ainda os gastos com outros métodos de controle, o valor provavelmente ultrapassa o 1 bilhão de euros (DEAN et al., 2012).

Fatores como presença de resíduos químicos em alimentos e o aumento de fungos resistentes, têm contribuído para o crescente interesse no desenvolvimento de novos métodos de controle de fitopatógenos ou também chamados de métodos alternativos (ANVISA, 2013; CUZZI, 2013; FRAC, 2014; AQUEVEQUE et al., 2016; LI et al., 2017). Extensa população, disseminação de conídios pelo ar, ampla gama de hospedeiros e variabilidade genética são fatores que tem contribuído para o desenvolvimento de resistência fúngica por este fitopatógeno (FRAC, 2018). Apesar de nem sempre a eficiência apresentada pelos métodos alternativos não superar a apresentada pelos fungicidas sintéticos, os danos causados ao meio ambiente e a saúde humana podem ser reduzidos pelos métodos alternativos (FILLINGER; ELAD, 2016).

Extratos naturais obtidos de plantas representam uma alternativa ao controle convencional de doenças, pois não representam danos ao meio ambiente e a saúde humana (CORRÊA, 2015). A ação se deve em sua maioria, a presença de metabólitos secundários, substâncias quimicamente diversificadas, que não possuem funções vitais para as plantas e não estão presentes uniformemente em todas as espécies (AQUEVEQUE et al., 2016; LAGROUH, 2017).

Estudos demonstram que *Botrytis cinerea* é sensível frente a extratos fenólicos obtidos de bagaço de uva, alho e urtiga (FELIZIANI et al., 2013; MENDOZA et al., 2013; DANIEL; LENNOX; VRIES, 2014). Em relação a extratos registrados oficialmente em órgãos nacionais, o Brasil conta com o Timorex Gold (nome comercial), primeiro e único fungicida a

base de plantas, incluso no Sistema AGROFIT. Atua como um fungicida de contato e mesossistêmico. O extrato é obtido de folhas de *Melaleuca altemifolia*, que apresenta ação antifúngica frente ao fungo *Botrytis cinerea*, indicado portanto, para as culturas de morango e uva. Pode ser utilizado também nas culturas de alface, arroz, banana, batata, brócolis, café, cebola, feijão, melancia, melão, milho, tomate e trigo, a fim de controlar outras doenças (BRASIL, 2018).

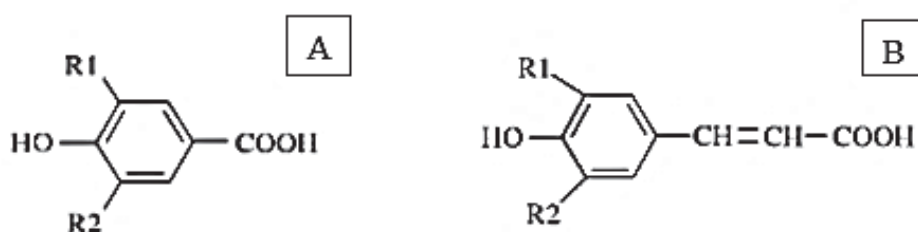
Os possíveis modos de ação antifúngico exercidos pelos metabólitos secundários em geral correspondem a I) inibição da formação da parede celular; II) rompimento da membrana plasmática; III) disfunção das mitocôndrias fúngicas; IV) inibição da divisão celular; V) inibição da síntese de RNA/DNA ou síntese protéica e VI) inibição das bombas de efluxo (RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013; BAUTISTA-BAÑOS et al., 2014; SIDDIQUI; BANSAL, 2017).

2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E AÇÃO ANTIFÚNGICA

Terpenos, compostos fenólicos e nitrogenados correspondem aos principais grupos de metabólitos secundários de plantas. Estes são classificados de acordo com as vias biosintéticas em que são formados. Neste caso, será dada atenção especialmente à ação antifúngica desempenhada pela classe dos compostos fenólicos (CORRÊA, 2015).

Os ácidos fenólicos se localizam nos vacúolos das células vegetais. Não apresentam aroma ou *flavor* característico. São descritos como compostos responsáveis pela proteção de plantas (RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013). A classe é formada por ácidos benzoicos (C6-C1), ácidos cinâmicos (C6-C3) e estilbenos (C6-C2-C6) (MORENO; PEINADO, 2012). A Figura 3 apresenta a estrutura química básica de ácidos benzoicos (A) e cinâmicos (B) respectivamente (MORENO; PEINADO, 2012).

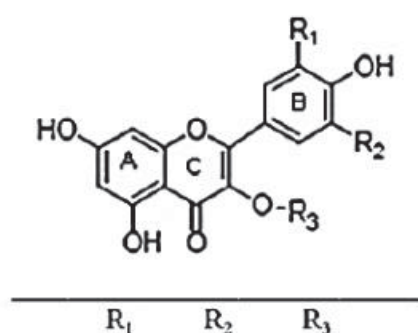
Figura 3 - Estrutura básica dos ácidos benzoicos e cinâmicos.



Fonte: Moreno; Peinado (2012).

Os flavonoides são caracterizados como compostos de baixa massa molecular (RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013). Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são responsáveis pela cor e gosto de muitas frutas e vegetais (RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013). A estrutura química básica dos flavonoides, apresentada na Figura 4, é formada de dois anéis aromáticos e um anel heterocíclico. São divididos em flavonas, flavonóis, flavanóis, flavononas, isoflavonas e antocianidinas (ARAÚJO, 2011; KY et al., 2016). Antocianinas correspondem a 80% dos flavonoides totais (RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013).

Figura 4 - Estrutura básica de flavonoides.



Fonte: Araújo (2011).

Além das atividades já mencionadas para os flavonoides, estes também são responsáveis pela proteção de plantas frente ao ataque de microrganismos e pragas (GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011).

Os compostos fenólicos apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus. A relação entre compostos fenólicos e ação antibacteriana (Figura 5) é estudada de forma mais aprofundada em relação à ação antifúngica apresentada por estes compostos, contudo, há crescente interesse em avaliar o potencial antifúngico de compostos fenólicos (RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013; ZABKA; PAVELA, 2013; DANIEL; LENNOX; VRIES, 2015; MARTÍNEZ et al., 2017). Este potencial é normalmente avaliado através de métodos denominados testes de diluição em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e testes *in vivo* (RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Figura 5 - Efeito antibacteriano de algumas especiarias.

Planta ou especiaria	Eficaz contra
Coentros, oréganos e salsa	Bactérias gram positivas e Gram negativas, incluindo a <i>Listeria monocytogenes</i>
Pimenta da Jamaica, manjeriço, alcarávia, citronela, manjerona, salvia, alecrim	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Alho, salvia, manjerona e pimenta da Jamaica	
Manjeriço, citronela, alho, menta	Largo espectro, bactérias Gram positivas e Gram negativas
Oréganos, salvia, tomilho	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>
Cominhos	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Endro	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>

Fonte: Fani (2010).

A intensidade da ação antifúngica exercida por um composto fenólico ou vários deles, pode variar em função de vários fatores, como o método de extração utilizado na obtenção destes compostos, solvente utilizado, parte da planta utilizada para obtenção do extrato, fungo testado, tempo e temperatura de incubação (ANTIMICROBIANOS, 2010; ZABKA; PAVELA, 2013; GYAWALI; IBRAHIM, 2014; LAGROUH, 2017; SIDDIQUI; BANSAL, 2017).

Entre os compostos fenólicos relatados por exercerem ação antifúngica sobre diferentes espécies de fungos estão timol, carvacrol, isoeugenol, eugenol, 2-etilfenol, 4-etilfenol, salicilaldeído, 2-metxi-4-metilfenol, 4-etilguaiacol, guaiacol, 2,6-dimetoxifenol, ácido salicílico, ácido ferulico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido vanílico, vanilina, ácido gálico, ácido sirínico; ácido sinápico; curcumeno e composto epóxido de iso aromadendreno (ZABKA; PAVELA, 2013; BAUTISTA-BAÑOS et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2017).

Se referindo especificamente ao *Botrytis cinerea*, este tem seu crescimento inibido por ácido clorogênico, ácido elágico, ácido protocatequínico, ácido gálico, epicatequina, ácido vanílico, catequina, ácido sirínico, quercetina, kaempferol e ácido p-cumárico (MENDONZA et al., 2013; MARTINEZ, et al., 2017).

Ácidos fenólicos e flavonoides podem exercer ação antifúngica através dos seguintes modos de ação: I) inibição da ação de enzimas (RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013); II) rompimento da membrana celular (RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013; BAUTISTA-BANÑOS et al., 2014; SIDDIQUI; BANSAL, 2017) e III) disfunção da mitocôndrias fúngicas (BAUTISTA-BANÑOS et al., 2014; LAGROUH, 2017).

2.3 *Physalis peruviana* Linnaeus

A espécie *Physalis peruviana* pertence ao gênero *Physalis* e à família Solanaceae. Este gênero compreende mais de 90 espécies identificadas no mundo todo. *Physalis peruviana* tem sua origem nas regiões Andinas da América do Sul, como Colômbia, Peru e Chile. Mas atualmente pode ser encontrado em diferentes regiões do mundo, como Nova Zelândia e Brasil. Dentre os nomes populares atribuídos à espécie estão *uchuva* e *goldenberry* (RONCANCIO; FISCHER; SORA, 2000).

A expansão da espécie para diferentes países, possivelmente contribuiu para a adaptabilidade da mesma em diferentes tipos de solo (RONCANCIO; FISCHER; SORA, 2000). A espécie também é caracterizada como de crescimento indeterminado. Os frutos apresentados na Figura 6, normalmente pesam de 4 a 10 g cada e são envoltos por um cálice, como apresentado na Figura 7 (LIGARRETO; LOBO; CORREA, 2005; ALMANZAMERCHÁN; FISCHER, 2012).

Figura 6 - Frutos da espécie *Physalis peruviana*.

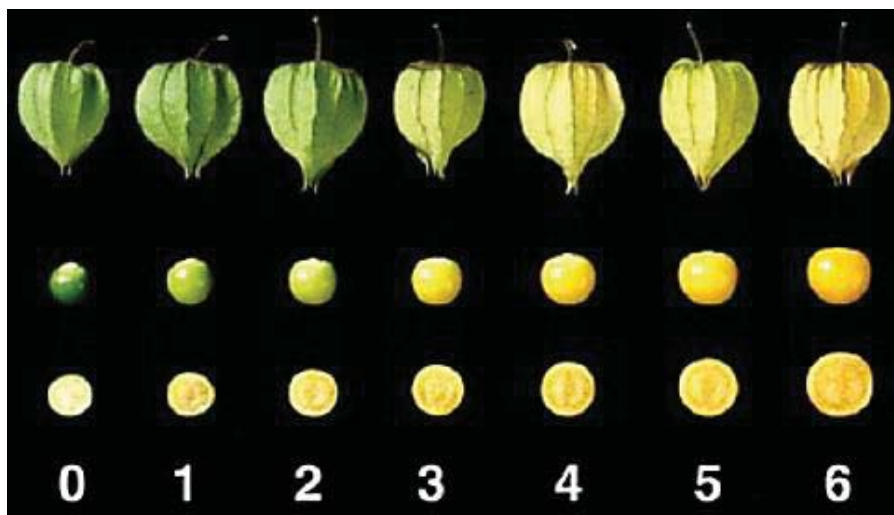


Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Figura 7 - Cálice de *Physalis peruviana*.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

De acordo com a Norma Técnica Colombiana (NTC) 4580 o estágio de maturação dos frutos é atribuído com base no grau de coloração do cálice dos mesmos. A escala varia de zero (0) a seis (6) sendo coloração 0 – fruto de coloração verde escuro; coloração 1 – fruto de coloração verdes mais clara; coloração 2 – início de tons alaranjados; coloração 3 – fruto alaranjado claro com alguns traços verdes; coloração 4 - fruto alaranjado claro; coloração 5 – fruto alaranjado e coloração 6 – fruto de coloração alaranjado intenso conforme apresentado na Figura 8 (ICONTEC, 1998).

Figura 8 - Grau de coloração do cálice dos frutos de *Physalis peruviana*.

Fonte: ICONTEC (1998).

Frutos de *Physalis peruviana* apresentam uma composição química variada formada por carboidratos, fitoesteróis, minerais, vitaminas, fisalinas e vitanolídeos (PUENTE et al., 2011). Minerais incluindo ferro, magnésio, zinco, potássio, manganês e cálcio são identificados nos frutos (RODRIGUES et al., 2009). Frutos *in natura* e óleos obtidos da

polpa, casca e sementes, podem fornecer vitamina A (β -caroteno), B na forma de tiamina (B1), riboflavina (B2) e niacina (B3), ácido ascórbico (vitamina C), vitamina K, Vitamina E, na forma de β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol (PUENTE et al., 2011).

Os principais países produtores de *Physalis peruviana* são Colômbia, Peru, Equador, Chile e Venezuela. Aproximadamente vinte países compõem a lista dos principais compradores de *Physalis peruviana* produzidos somente na Colômbia (VARGAS et al., 2015). No Brasil, a produção de *Physalis peruviana* se encontra em expansão embora, ainda de forma lenta. Esta espécie vem sendo cultivada na região do cerrado brasileiro e algumas cidades dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (LIMA, 2009; RUFATO et al., 2013; BRASIL, 2016). A pioneira no cultivo da espécie no país foi a Estação Experimental Santa Luzia (Guareí – SP). Projetos e seminários vêm sendo desenvolvidos por diferentes instituições, como Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) e Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), a fim de gerarem informações a respeito desta espécie e incentivar sua produção no país (RUFATO et al., 2013).

2.3.1 Compostos fenólicos e ação antifúngica

Dentre os metabólitos secundários identificados na espécie *Physalis peruviana* estão ácidos fenólicos e flavonoides. De modo geral, o teor de compostos fenólicos totais relatado para frutos de *Physalis peruviana* pode variar entre 49 e 145 mg de ácido gálico equivalente por 100 g de fruto (ROCKENBACH et al., 2008; LICODIEDOFF; KOSLOWSKI; RIBANI, 2013; YILDIZ et al., 2015). Para flavonoides totais os teores variam de 132 mg de catequina equivalente por 100 g de fruto e 77 mg catequina equivalente por mL de extrato (CORRALES-Bernal et al., 2015; RAMADAN; EL-GHORAB; GHANEM, 2015). Alguns desses compostos são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Compostos fenólicos presentes na espécie *Physalis peruviana*.

ROCKENBACH et al., (2008)	Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de <i>Physalis peruviana</i> L.	Ácido salicílico Ácido gentísico Ácido o-cumárico Ácido protocatequínico Ácido Quínico Ácido p-cumárico Ácido pirogálico Ácido ferúlico Ácido sináptico Ácido clorogênico
CORRALES - BERNAL et al., (2015)	Nutritional and antioxidant properties of Colombian cape gooseberry (<i>Physalis peruviana</i> L.) under three stages of maturation	Miricetina Ácido shikímico Ácido clorogênico Ácido gálico Miricetina Catequina Luteína
LICODIEDOFF; KOSLOWSKI; RIBANI (2013)	Flavanols and antioxidant activity of <i>Physalis peruviana</i> L. fruit at two maturity stages	Rutina Miricetina
ERTÜRK et al., (2017)	Antioxidant, Antimicrobial Activities and Phenolic and Chemical Contents of <i>Physalis peruviana</i> L. from Trabzon, Turkey	Ácido gálico Ácido Ferúlico Catequina Rutina

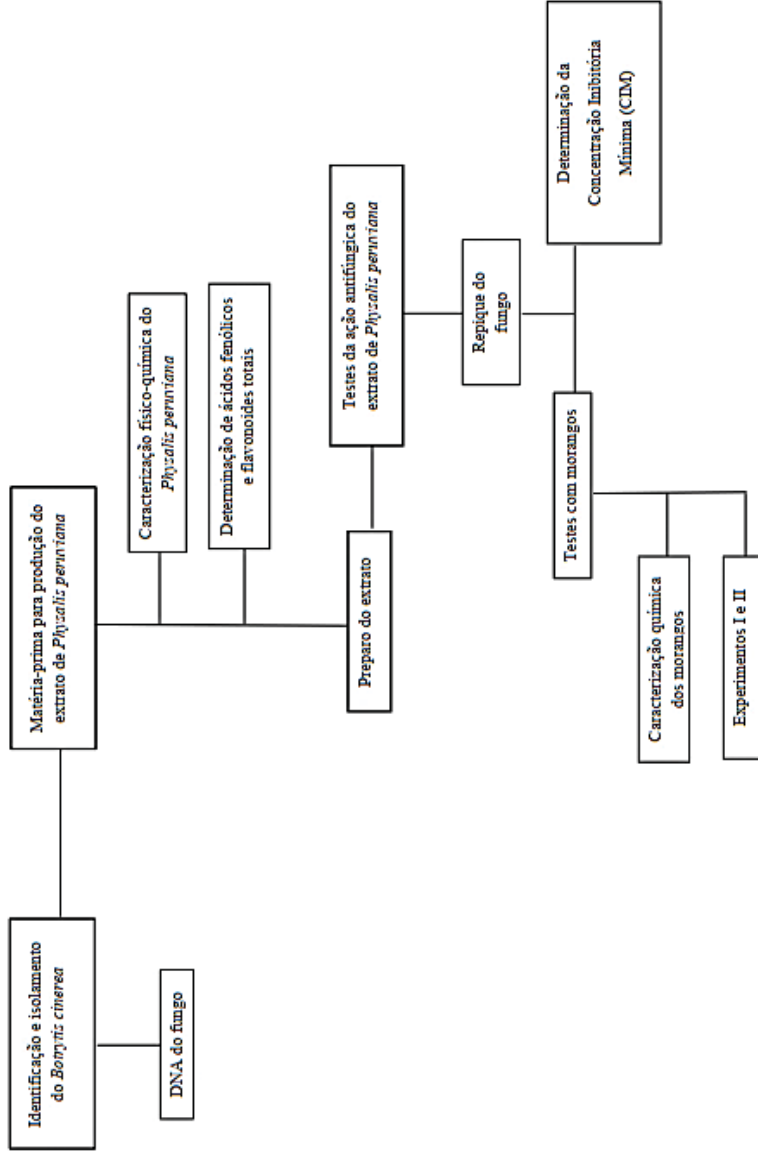
Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Estudos realizados a fim de avaliar a capacidade antifúngica da espécie demonstram que compostos fenólicos extraídos de diferentes partes da planta apresentam ação antifúngica (fungicida ou fungistática), frente a diferentes espécies de fungos. *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora cinnamomi*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* são exemplos de fungos que tem seu crescimento inibido em diferentes intensidades, por extratos fenólicos obtidos da espécie *Physalis peruviana* (GOZTOK; ZENGIN, 2013; CORRÊA, 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas que contemplam esta dissertação de mestrado são apresentadas na Figura 9 e descritas posteriormente.

Figura 9 - Fluxograma das etapas realizadas no período de 2016/2018.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

O desenvolvimento da parte prática ocorreu nos Laboratórios da Universidade de Passo Fundo (UPF) e nos Laboratórios do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) - Campus Sertão, o qual possui convênio com a UPF.

3.1 IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO *Botrytis cinerea*

As etapas de identificação e isolamento do *Botrytis cinerea* foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia da UPF com base na metodologia utilizada por Cuzzi (2013). O fungo foi identificado e isolado de morangos da variedade Albion adquiridos em comércio local do município de Getúlio Vargas - RS. A bandeja foi mantida em câmara com temperatura controlada ($25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) e fotoperíodo de 12 horas ao dia, até o aparecimento do fungo (Figura 10 - A). Posteriormente, foi realizada a identificação do *Botrytis cinerea* em microscópio óptico. Após confirmação da presença do mesmo nos frutos (Figura 10 - B), se procedeu seu isolamento em câmara de fluxo laminar.

3.1.1 Análise genômica do fungo isolado

A confirmação do DNA do *Botrytis cinerea* foi realizada pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies de Florianópolis - SC, através de metodologias de sequenciamento de DNA em larga escala de marcadores moleculares específicos, associados à análise de bioinformática. A coleta do isolado fúngico seguiu a metodologia encaminhada pela empresa.

3.2 MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DO EXTRATO

Frutos da espécie *Physalis peruviana* foram adquiridos da empresa ItalBraz®, localizada no município de Vacaria no estado do Rio Grande do Sul. Após a colheita manual, o acondicionamento e o transporte dos frutos foram realizados em caixas isotérmicas, sob refrigeração. No dia seguinte após a coleta, os frutos foram enviados para a Universidade de Passo Fundo (UPF), e classificados visualmente quanto ao seu grau de maturação, através da coloração do cálice de acordo com a NTC 4580 da ICONTEC (1998), em seguida foram acondicionados em embalagens plásticas, envoltas por plástico filme de policloreto de vinil (PVC) e identificadas. Os *Physalis peruviana* permaneceram congelados (-18 °C) e com o

cálice até o momento dos experimentos. A presença do cálice é relatada por prolongar a vida de prateleira dos frutos (LÓPEZ; C.; ARÉVALO, 2015; OLIVARES-TENORIO et al., 2017).

3.2.1 Caracterização química do *Physalis peruviana*

O suco de frutos *in natura* de *Physalis peruviana*, utilizado para as determinações em triplicata, foi obtido através da trituração em liquidificador e filtragem em funil de Büchner com filtro de nylon e papel de filtro quantitativo. O filtrado foi armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração até o momento dos testes.

A caracterização físico-química dos frutos de *Physalis peruviana* foi realizada em triplicata. Os parâmetros pH; acidez titulável em ácido cítrico; sólidos solúveis por refratometria; proteína pelo método de Kjeldahl clássico; umidade por secagem direta em estufa a 105 °C; glicídios redutores em glicose e vitamina C por titulometria com iodato de potássio foram determinados de acordo com as metodologias estabelecidas no Manual Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4 Edição, 1 Edição Digital, do Instituto Adolfo Lutz (2005). A determinação do grau de coloração do cálice do *Physalis peruviana* foi realizada visualmente de acordo com a NTC 4580 (ICONTEC, 1998).

Para determinação de flavonoides totais foi utilizada metodologia apresentada por Malta (2013). O teor flavonoides totais foi expresso em μg por mL^{-1} de catequina. Foram preparadas as soluções de padrão de catequina $0,2 \text{ mg por mL}^{-1}$, solução de nitrito de sódio $0,05 \text{ g por mL}^{-1}$, solução de cloreto de alumínio $0,1 \text{ g por mL}^{-1}$ e solução de hidróxido de sódio $0,04 \text{ g por mL}^{-1}$. A partir da solução de catequina $0,2 \text{ mg por mL}^{-1}$ foi preparada a curva analítica nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100, 125 e $1500 \text{ mg por mL}^{-1}$ conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 - Preparo da curva, branco e amostra para determinação de flavonoides totais.

Amostra/ padrão	Branco	Obs
2 mL de água Milli-Q	2 mL de água Milli-Q	
0,5 mL de padrão/amostra	0,5 mL de água Milli-Q	
0,15 mL de NaNO_2	0,15 mL de NaNO_2	Agitar e aguardar 5 min
0,15 mL de AlCl_3	0,15 mL de AlCl_3	Agitar e aguardar 6 min
1,0 mL de NaOH	1,0 mL de NaOH	Interrompe a reação
1,2 mL de água Milli-Q	1,2 mL de água Milli-Q	

Fonte: Adaptado de Malta (2013).

3.2.2 Preparo do extrato

O extrato foi preparado no Laboratório Núcleo de Experimentação e Estudos Analíticos do IFRS - Campus Sertão. Os frutos *in natura* previamente macerados em almofariz, foram adicionados à solução extratora água:etanol (50% v/v) e transferidos para banho de ultrassom, sem aquecimento, por 2 horas. Filtrado com peneira, papel de filtro quantitativo e filtro hidrofílico de $0,22 \mu\text{m}$ com base na metodologia descrita por Filippi et al (2015).

O filtrado foi transferido para um evaporador rotativo na temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$, por aproximadamente 2 horas, e o teor alcóolico do mesmo determinado através de densímetro (Rudolph Analytical Research), conforme metodologia descrita por Martin (2018) para etanol. O filtrado foi armazenado em frasco âmbar e mantido sobre refrigeração. Foi verificado o pH em pHgâmetro modelo Q 40A da Quimis, previamente calibrado com soluções tampão 4,0 e 7,0.

3.2.2.1 Determinação dos flavonoides e ácidos fenólicos presentes no extrato

A determinação dos flavonoides e ácidos fenólicos do extrato de *Physalis peruviana* (descrito no item 3.3.2), foi realizada por HPLC-UV em fase reversa, com vazão da fase móvel de 1 mL por min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. Para determinação de ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido cumárico e ácido clorogênico se utilizou fase móvel de acetonitrila:água, acidificada em pH 3,0 (10:90 v/v), com pH ajustado com ácido fosfórico e comprimento de onda: 280 nm. Para determinação dos flavonoides quercetina, kaempferol, crisina, miricetina, hesperidina e luteolina a fase móvel foi solução de água 0,3% ácido fórmico e solução de metanol 0,3% ácido fórmico em comprimento de onda de 360 nm, conforme metodologia interna “Procedimento para determinação de flavonoides” do Laboratório de Cromatografia – UPF.

3.3 TESTE DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE *Physalis peruviana*

A avaliação da ação antifúngica exercida pelo extrato de *Physalis peruviana* se realizou através de testes *in vitro* e com morangos.

3.3.1 Repique do fungo

O repique do *Botrytis cinerea* foi realizado através da adição de um disco de micélio de 7 mm no centro de cada placa. Após o período de incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, as placas foram armazenadas sobre refrigeração. O meio de cultura utilizado foi PDA (do inglês *Potato Dextrose Agar*). O repique do fungo foi realizado com 10 dias de antecedência a realização dos testes *in vitro* e com morangos.

3.3.2 Avaliação das diferentes formas de incorporar o extrato ao meio de cultura

A ação antifúngica do extrato de *Physalis peruviana*, fungicida Cercobin 700 WP e água Milli-Q estéril, sobre o crescimento micelial do *Botrytis cinerea*, foi avaliada inicialmente *in vitro*, a fim de identificar qual o método de incorporar o extrato ao meio de cultura mais eficaz para a ação antifúngica do mesmo.

Os testes foram realizados em quintuplicata no Laboratório de Fitopatologia da UPF. O experimento consistiu de 6 tratamentos sendo tratamento 1: controle negativo; tratamento

2: controle positivo; tratamento 3: extrato de *Physalis peruviana* adicionado posteriormente ao meio de cultura; tratamento 4: extrato de *Physalis peruviana* adicionado sobre o disco de micélio; tratamento 5: extrato de *Physalis peruviana* incorporado ao meio de cultura, de acordo com o método *Poisoned Food*; tratamento 6: extrato de *Physalis peruviana* incorporado ao meio de cultura de acordo com o método *Poisoned Food* relatado por Balouiri; Sadiki; Ibsouda (2016) conforme apresentado no Quadro 3.

Quadro 3 - Protocolo para incorporação do extrato ao meio de cultura.

Tratamento	Volumes adicionados		Disco de micélio (mm)
1	15 mL de PDA	5 mL de água Milli-Q estéril	7 mm
2	19 mL de PDA	1 mL de fungicida Cercobin 700 WP	7 mm
3	15 mL de PDA	5 mL de extrato	7 mm
4	20 mL de PDA	10 µL de extrato	7 mm
5	15 mL de PDA	5 mL de extrato	7 mm
6	10 mL de PDA	10 mL de extrato	7 mm

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

3.3.3 Determinação do percentual de inibição do extrato frente ao *Botrytis cinerea*

A menor concentração de extrato de *Physalis peruviana* capaz de inibir o crescimento (efeito preventivo) micelial do *Botrytis cinerea*, foi determinada pelo método de difusão em ágar denominado *Poisoned Food* (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). O extrato foi incorporado nas concentrações conforme Quadro 4 ao meio de cultura PDA previamente preparado.

Quadro 4 - Protocolo para avaliar o percentual de inibição do extrato frente ao fungo *Botrytis cinerea*.

Tratamento	Volumes adicionados	
1	20 mL de PDA	5 mL de extrato de <i>Physalis peruviana</i>
2		2,5 mL de extrato + 2,5 mL de água Milli-Q estéril
3		1,25 mL de extrato + 3,75 mL de água Milli-Q estéril
4		0,125 mL de extrato + 4,875 mL de água Milli-Q estéril
5		5 mL de água Milli-Q estéril
6		100 µL de fungicida Cercobin 700 WP

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Os diâmetros dos crescimentos fúngicos observados foram mensurados com auxílio de paquímetro. A Concentração Mínima Inibitória foi calculada através da Equação 1.

$$\text{Atividade antifúngica (\%)} = \left(\frac{D_c - D_a}{D_c} \right) * 100 \quad (1)$$

Onde:

D_c: corresponde ao diâmetro do crescimento micelial nas placas controle

D_a: corresponde ao diâmetro do crescimento micelial nas placas contendo o agente antifúngico testado.

3.3.4 Teste com morangos

Os morangos orgânicos variedade Albion utilizados nos experimentos, foram adquiridos de produtora certificada residente no município de Barão de Cotegipe-RS. Os testes foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da UPF.

Os morangos maduros e verdes, foram avaliados quanto ao valor de pH, sólidos solúveis totais (°Brix), atividade de água (A_w) e umidade (%) de acordo com Adolfo Lutz (2005). Foram realizados testes com os morangos para determinar o volume a ser utilizado de extrato de *Physalis peruviana*, fungicida Mythos e água estéril de acordo com Aqueveque et al (2016). Os pêndulos foram borrifados até o ponto de escorrimento e o número de borrifadas dadas de cada tratamento por fruto foi anotado. O volume restante no borrifador foi devolvido para a proveta e calculado o volume gasto em cada fruto.

Para todos os experimentos o extrato, fungicida e água estéril foram aplicados por aspersão, com base na metodologia utilizada por Aqueveque et al (2016). A aplicação da suspensão de conídios de *Botrytis cinerea*, preparada na concentração de 10⁵ conídios por mL de suspensão, foi realizada 24 horas após a aplicação dos tratamentos e consistia de 3 borrifadas por fruto. A água Milli-Q utilizada em todos os experimentos, era previamente esterilizada em autoclave (121 ± 1 °C). O fungicida Mythos foi adquirido em comércio local no município de Estação-RS. A diluição do mesmo foi realizada para volume final de 1 litro, de acordo com as recomendações disponibilizadas no Sistema AGROFIT (BRASIL, 2018).

Inicialmente se realizou um teste com morangos maduros. Após a aplicação preventiva dos tratamentos, os morangos foram acondicionados em placas de Petri seladas com plástico filme, e transferidos para câmara a 25 °C (± 1 °C) com fotoperíodo de 12 horas ao dia, onde

permaneceram até o aparecimento de desenvolvimento fúngico.

3.3.4.1 Experimento I

A ação antifúngica do extrato, fungicida e água estéril, aplicados de forma preventiva por aspersão, em morangos maduros e verdes, posteriormente aplicados de suspensão de conídios [10^5 conídios mL de suspensão] e armazenados a 25 °C, foi avaliada. Foram utilizados cinco morangos por tratamento.

3.3.4.2 Experimento II

O efeito das temperaturas de armazenamento (25 °C \pm 1°C e 4 °C \pm 1°C), sobre o crescimento do *Botrytis cinerea* aplicado nos morangos previamente tratados com extrato, fungicida e água estéril, foi avaliado nesse experimento. Foram utilizados dez morangos por tratamento.

3.4 TRATAMENTO DE DADOS

Os dados obtidos no experimento I e II, foram submetidos à análise de variância ANOVA e suas médias, comparadas pelo teste de Tukey a 95% de confiança, pelo software STATISTIC 7.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de estruturas características do *Botrytis cinerea* em morangos visualmente infectados com o fungo, conforme apresentado na Figura 10, foi confirmada com o auxílio de microscópio óptico. Resultado também relatado pela empresa Neopropecta, conforme descrito no Quadro 5.

Figura 10 - Morangos infectados com *Botrytis cinerea* (A) e fruto utilizado para isolamento do fungo (B).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Quadro 5 - Análise genômica do fungo isolado.

Taxonomia	<i>Botrytis cinerea</i>
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Classe	Letiomycetes
Ordem	Helotiales
Família	Sclerotiniaceae
Gênero	<i>Botrytis</i>
Espécie	<i>Botrytis cinerea</i>

Fonte: Neopropecta (2018).

Os resultados obtidos na caracterização química dos frutos de *Physalis peruviana* são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química dos frutos de *Physalis peruviana*.

Parâmetros analisados	Observado
pH	4,98 ± 0,09
ATT em ácido cítrico (%)	0,68 ± 0,01
SST (° Brix)	14,17 ± 0,06
Relação SST/ATT	20,84
Umidade (%)	81,14 ± 0,63
Açúcares redutores em glicose (%)	1,50 ± 0,30
Proteína (%)	1,33 ± 0,07
Ácido ascórbico (%)	34,67 mg 100 ⁻¹ ± 0,13

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

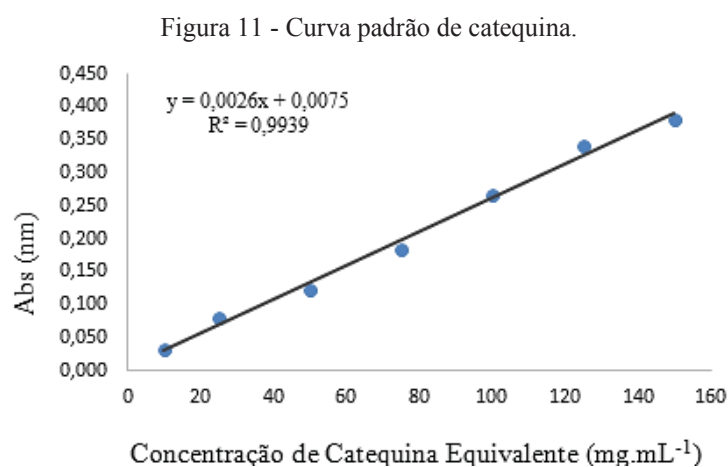
Os frutos da espécie *Physalis peruviana* normalmente não apresentam pH superior a 6 mesmo ao final do período de maturação (LICODIEDOFF; KOSLOWSKI; RIBANI, 2013; YILDIZ et al., 2015). O pH ácido característico desta espécie pode estar relacionado ao pH do vacúolo da célula vegetal, que normalmente se encontra entre 4,0 e 5,5 mas em alguns frutos cítricos pode chegar a 2,0 (CALBO; MORETTI; HENZ, 2007). O pH dos frutos se encontra próximo a faixa de pH ótima (5,0 a 7,0) para o desenvolvimento de fungos (HOFLING; GONÇALVES, 2016). Este fator pode interferir na ação antifúngica do extrato. O caráter ácido dos frutos é evidenciado também pelo percentual de acidez titulável total, expressa em ácido cítrico, sendo este o principal ácido orgânico presente em frutos da espécie *Physalis peruviana* (FISCHER; EBERT; LÜDDERS, 2000). Ácido málico e tartárico também podem ser identificados (OLIVARES-TENORIO et al., 2017).

O teor de sólidos solúveis totais identificado nos frutos fornece um indicativo da quantidade de açúcares presentes nos frutos, sendo este maior no final da maturação, quando o teor de sólidos solúveis totais pode chegar a 15,1 °Brix (LICODIEDOFF; KOSLOWSKI; RIBANI, 2013). O valor da relação sólidos solúveis totais/acidez titulável total (SST/ATT) observado para os frutos de *Physalis peruviana* demonstra o considerável teor de açúcar presente nos frutos (SCHIMIDT et al., 2015). Aproximadamente 5% do total de açúcares presentes nos frutos correspondem a açúcares redutores (YILDIZ et al., 2015), sendo que glicose e galactose também podem ser identificados (CORRALES-BERNAL et al., 2015). O teor de açúcares presente nos frutos pode influenciar a ação antifúngica do extrato, considerando a capacidade do fungo em absorver estes nutrientes através de enzimas

hidrolíticas e utilizá-los como fonte de energia para o seu crescimento (HOFLING; GONÇALVES, 2016).

As proteínas de origem vegetal apresentam menor efeito biológico em relação às proteínas de origem animal, devido, em sua maioria, a ausência de aminoácidos como lisina e metionina. As proteínas dos frutos podem participar de reações com diferentes fitopatógenos, incluindo o *Botrytis cinerea* (CAMPBELL-PLATT et al., 2015). Segundo estudos de Hofling e Gonçalves (2016) o teor de umidade no fruto também pode contribuir positivamente para a ação antifúngica do extrato, sendo também responsável pela fonte de vitaminas hidrossolúveis. No fruto estudado o teor de ácido ascórbico foi de 34,67 mg por 100 g. (PUENTE et al., 2011).

O teor de flavonoides totais observado para os frutos de *Physalis peruviana* foi de 9 µg de catequina equivalente por mg de amostra úmida. Estes valores estão de acordo com os já relatados na literatura (LICODIEDOFF; KOSLOWSKI; RIBANI, 2013; CORRALES-BERNAL et al., 2015). A curva-padrão utilizada na determinação de flavonoides totais é apresentada na Figura 11.

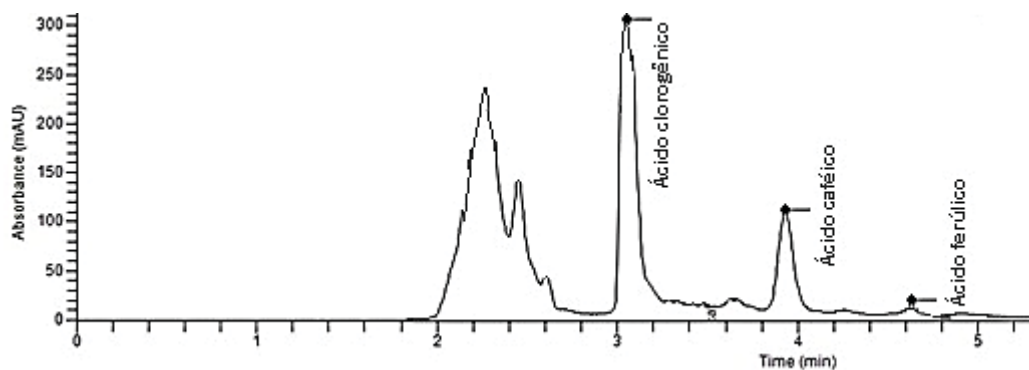


Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Na análise cromatográfica do extrato foram identificados os seguintes compostos: ácido clorogênico (148,8 µg mL⁻¹), ácido cafeico (14,42 µg mL⁻¹), ácido ferúlico (2,44 µg mL⁻¹) e quercetina (190 µg mL⁻¹). Os cromatogramas são apresentados nas Figuras 12 e 13. Os ácidos vanílico e cumárico e os flavonoides, kaempferol, crisina, miricetina, hesperidina e luteolina não foram identificados no extrato pelo método utilizado. A produção do extrato a partir dos frutos inteiros (casca, polpa e sementes) contribuiu para a presença dos compostos

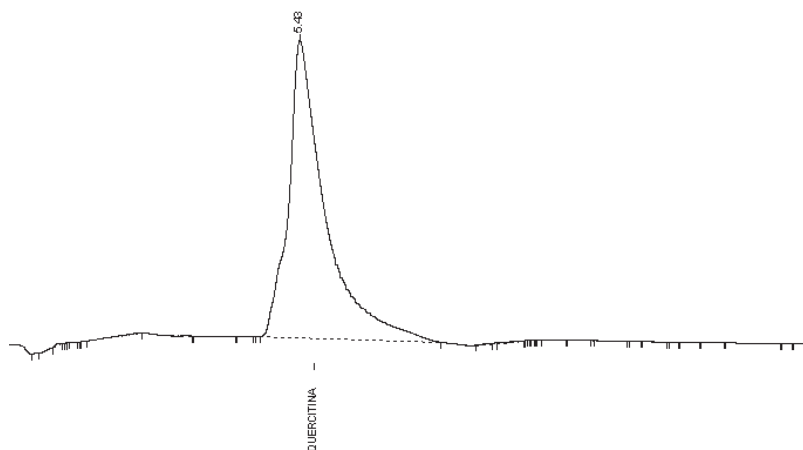
quantificados no trabalho. As diferentes partes da planta podem conter diversos compostos fenólicos e teores distintos de um mesmo composto (ERTURK et al., 2017).

Figura 12 - Cromatograma dos ácidos fenólicos identificados no extrato de *Physalis peruviana*.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Figura 13 - Cromatograma do flavonoide quercetina identificado no extrato de *Physalis peruviana*.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

O avanço da maturação pode influenciar na concentração dos diferentes compostos fenólicos (LA ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZALEZ-AGUILAR, 2010; LICODIEDOFF; KOSLOWSKI; RIBANI, 2013). Os frutos utilizados neste trabalho apresentavam grau de coloração 5 de acordo com a classificação pela Icontec (1998), o que pode ter influenciado na redução dos compostos fenólicos presentes no extrato (BOLZAN; CUQUEL; LAVORANTI, 2011).

As sementes de *Physalis peruviana* são descritas por armazenarem a maior concentração de flavonoides, sendo este teor na maioria das vezes, superior a concentração armazenada no fruto (ERTURK et al., 2017). A maior concentração de ácidos fenólicos

presentes no *Physalis peruviana* é relatada por estar armazenada também nas sementes dos frutos. Contudo, podem estar distribuídos em quantidades distintas em todas as partes do fruto desta espécie. Ácido ferúlico, por exemplo, pode ser identificado em todas as partes do *Physalis peruviana*, porém em quantidades distintas (ERTURK et al., 2017).

Os resultados obtidos no teste de avaliação *in vitro* do extrato, incorporado por diferentes métodos demonstrou desenvolvimento fúngico nos tratamentos 1, 2 e 4. As formas de adicionar o extrato ao meio de cultura nos tratamentos 3 e 5, aparentemente não demonstraram diferença, considerando que não houve desenvolvimento fúngico em ambos os tratamentos. Em relação aos tratamentos 5 e 6, ambos realizados pelo mesmo método, os diferentes volumes de extrato incorporados ao meio de cultura não demonstraram diferença entre si. Evidenciando também que o método de *Poisoned Food* relatado por Balouiri; Sadiki; Ibnsouda (2016) se mostrou mais eficiente frente aos demais.

O crescimento micelial foi inibido em 100% quando o volume de 5 mL do extrato foi incorporado ao meio de cultura PDA (Figura 14), resultando em uma concentração final de 20% (v/v). Volumes menores do extrato, como apresentado na Tabela 2, nas concentrações de 10%, 5% e 0,5% apresentaram capacidade de inibição inferior a 50%, sendo 48,63%, 28,45% e 21,26%, respectivamente. O percentual de inibição apresentado pelo volume de 5 mL de extrato foi superior ao percentual de inibição de 68,81% apresentado pelo fungicida Mythos.

Figura 14 - Ação fungicida apresentada pelo volume de 5 mL de extrato frente ao *Botrytis cinerea*.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Tabela 2 - Percentual de inibição do extrato de *Physalis peruviana* frente ao fungo *Botrytis cinerea*.

Tratamentos	Média ± (mm)	% de inibição do extrato
Extrato 20 %	0,0	100
Extrato 10 %	33,6 ± 5,0	48,63
Extrato 5 %	46,8 ± 4,0	28,45
Extrato 0,5 %	51,5 ± 3,6	21,26
Água Milli-Q estéril 20 %	68,96 ± 12,7	0
Fungicida Mythos 0,4 %	20,4 ± 0,4	68,81

A medida do crescimento micelial foi realizada com auxílio de paquímetro e expressa em mm. Foram utilizadas medidas de quatro placas por tratamento e o resultado apresentado como média e desvio padrão (\pm).

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

A evaporação do álcool presente no extrato em evaporador rotativo a 50 °C e a determinação do teor alcóolico garantiu que não houve interferência do etanol na ação antifúngica do extrato. A temperatura utilizada no evaporador rotativo não provoca a degradação dos compostos presentes no extrato (OLIVARES-TENORIO et al., 2017).

A fim de evitar a interferência de algum microrganismo eventualmente presente no extrato, como por exemplo, bactérias antagonistas frente ao *Botrytis cinerea*, o extrato passou por filtragem em filtro de 0,22 μ m (KUMAR, 2012).

A ação fungicida apresentada quando utilizado o volume de 5 mL de extrato se deve a presença dos compostos fenólicos, e a ação sinérgica dos compostos identificados no extrato apresentados na Tabela 3. Na maioria das vezes, a concentração dos diferentes compostos presentes em um extrato não é suficiente para que um composto isoladamente exerça ação antifúngica (PIRES; OLIVEIRA, 2011; RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013).

Tabela 3 - Teor de compostos fenólicos nos diferentes volumes de extrato de *Physalis peruviana*.

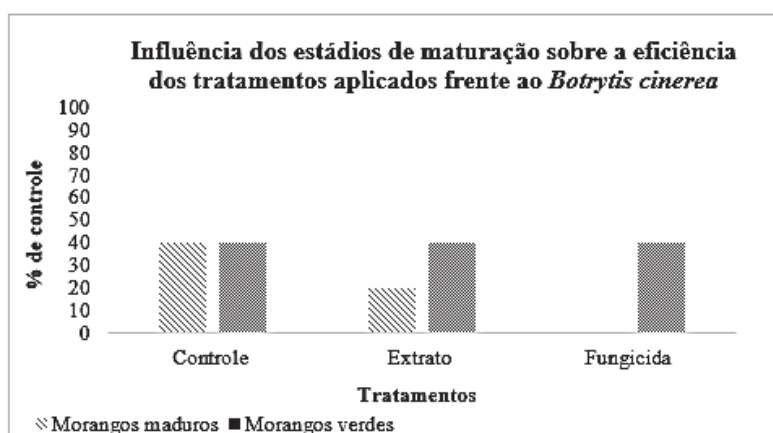
Compostos fenólicos identificados no extrato (μ g mL)	Volume de extrato (mL)			
	5 (20%)	2,5 (10%)	1,25 (5%)	0,125 (0,5%)
Ácido clorogênico	744	372	186	18,6
Ácido cafeico	72,1	36,05	18,03	1,80
Ácido ferúlico	12,2	6,1	3,05	0,31
Quercetina	950	475	237,5	23,75
Teor total de compostos fenólicos por volume de extrato (μ g)	1778,3	889,15	444,58	44,46

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Ácidos fenólicos e flavonoides presentes nas células das plantas apresentam capacidade de inibirem a ação de enzimas hidrolíticas utilizadas por fitopatógenos na obtenção de nutrientes (RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013). A ação antifúngica corresponde a uma das principais atividades biológicas mencionadas na literatura para o ácido clorogênico (KARACA, 2011; MARTÍNEZ et al., 2017). A concentração do mesmo influencia para que este composto desempenhe ação fungicida ou fungistática sobre a germinação de conídios do *Botrytis cinerea*. Abaixo de $10 \mu\text{g por } \mu\text{L}^{-1}$ o ácido clorogênico pode desempenhar ação fungistática frente ao *Botrytis cinerea* (MARTÍNEZ et al., 2017).

Segundo Sung e Lee (2010), Martínez et al (2017) os ácidos fenólicos e flavonoides podem promover o rompimento da membrana celular e a disfunção das mitocôndrias fúngicas, desta forma os compostos identificados no extrato podem ter atuado principalmente sobre a membrana citoplasmática do fungo. A camada externa da parede celular dos conídios do *Botrytis cinerea* representa a camada menos densa para os elétrons e a camada interna da parede celular a mais densa para os elétrons (GINDRO; PEZET, 2001). A estrutura e as posições dos grupos funcionais dos compostos presentes no extrato, como o ácido clorogênico, promovem o aumento da permeabilização da membrana, permitindo a dissolução e acúmulo do mesmo. Este acúmulo leva a desestabilização da membrana o que pode resultar em uma interrupção da transferência de prótons (ZABKA; PAVELA, 2013). A deslocalização de elétrons que atuam como trocadores de prótons pode levar a morte celular do fungo (GYAWALI; IBRAHIM, 2014). A Figura 15 apresentada a seguir, demonstra o resultado obtido no experimento I com morangos maduros e verdes à 25°C .

Figura 15 - Resultados obtidos no experimento I.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

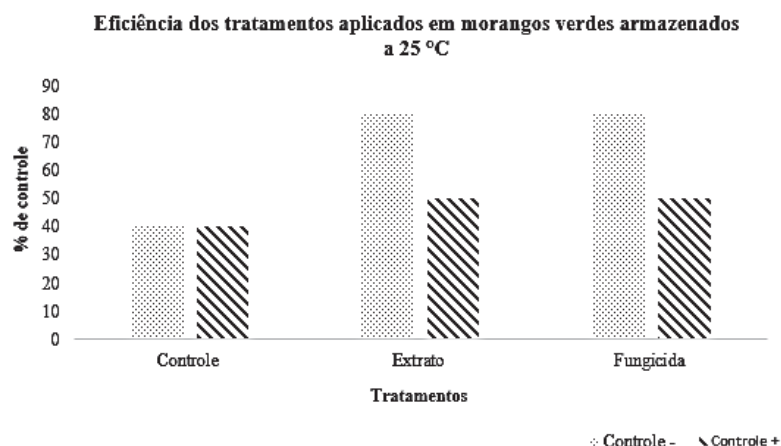
Os tratamentos extrato e fungicida, foram mais eficazes no controle do *Botrytis cinerea* quando aplicados por aspersão nos frutos verdes em relação aos maduros. A ação antifúngica observada foi com base no efeito resultante da ação dos compostos fenólicos do extrato juntamente com a composição química dos morangos.

Os valores de pH (3,33), °Brix (8), atividade de água (0,95) e umidade (90,47%), observados para os morangos verdes, foram inferiores aos valores de pH (3,37), °Brix (10), atividade de água (0,98) e umidade (91,67%), observados para os morangos maduros, demonstrando menor disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento do fungo. A aplicação do extrato nos morangos verdes atua como uma camada protetora, reduzindo a capacidade do fungo em metabolizar os nutrientes dos morangos mesmo com o avanço da maturação. Trabalhos anteriores relatam a relação da composição química do fruto com a disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento de fungos. Ornelas-Paz et al (2013) avaliaram a composição química de morangos da variedade Albion, em diferentes estádios de maturação, relatando o aumento do teor de sólidos solúveis totais, pH e umidade com o avanço da maturação dos frutos.

A aplicação do fungicida Mythos é indicada até o período pré-colheita dos morangos (BRASIL, 2018). Este fator pode ter influenciado a ação apresentada pelo mesmo sobre os morangos em diferentes estádios de maturação. Fungicidas pertencentes ao grupo anilinopirimidina, ao qual pertence o Mythos, atuam interferindo na síntese de aminoácidos e proteínas, possivelmente inibindo a biossíntese de metionina (FRAC, 2018). Por ser um fungicida de contato, sua ação pode ter sido minimizada, devido ao fato de ter sido incorporado ao meio de cultura, bem como, pelo fator resistência. Além do grupo químico anilinopirimidina, a qual pertence o ingrediente ativo N-(4,6-dimetil-pirimidina-2-y) anilina, que corresponde a 30% da composição do fungicida Mythos, os grupos benzimidazóis, hidroaxinilidas e dicarboximidas também estão relacionados à resistência fúngica desenvolvida pelo *Botrytis cinerea*, que está relacionada principalmente a variações de sequências de aminoácidos (BLANCARD, 2011; GRABKE, 2014; BAGGIO, 2016). O percentual de resistência fúngica apresentado por isolados do *Botrytis cinerea* (coletados de diferentes regiões dos estados da Carolina do Norte e do Sul), no período de 2011 a 2012, frente ao ingrediente ativo N-(4,6-dimetil-pirimidina-2-y) anilina (pirimetanil) foi de 47% (GRABKE, 2014).

Os resultados obtidos no experimento II para os morangos armazenados a 25 °C (\pm 1 °C), aplicados ou não da suspensão de conídios de *Botrytis cinerea*, são apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Resultados obtidos no experimento II.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

O extrato e o fungicida se mostraram visualmente mais eficazes no controle do mofo cinzento quando aplicados em morangos aplicados ou não com a suspensão de conídios de *Botrytis cinerea*. Em relação aos morangos armazenados sob temperatura de refrigeração ($4\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$), aplicados ou não com suspensão de conídios de *Botrytis cinerea*, se observaram ausência de desenvolvimento fúngico em todos os frutos durante os 15 dias de acompanhamento, como apresentado na Figura 17.

A partir dos resultados observados neste experimento, a temperatura influenciou no desenvolvimento do *Botrytis cinerea* em relação aos diferentes tratamentos avaliados. A capacidade do *Botrytis cinerea* em se desenvolver próximo de 0 °C é descrita na literatura (GINDRO; PEZET, 2001). Embora, estudos tem demonstrado que o mesmo pode não crescer em baixas temperaturas. Este fator isoladamente, influencia fortemente ($p < 0,0001$) o desenvolvimento do fungo segundo Lahlali et al., (2007).

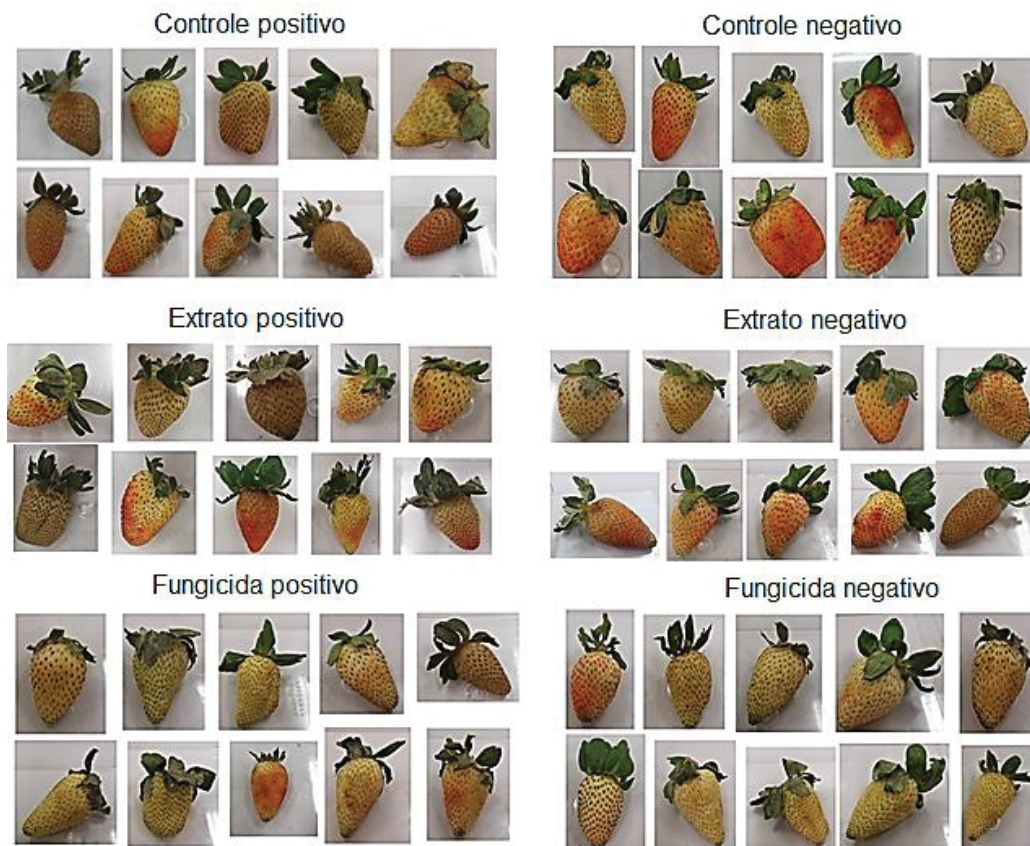
Ahlem et al (2012) avaliaram o crescimento do *Botrytis cinerea* em diferentes temperaturas ($5\text{ a }30\text{ °C}$) durante 7 dias. Os resultados demonstraram ausência de crescimento fúngico nos morangos armazenados a 4 °C , durante o período de incubação. Para as demais temperaturas se observou redução da taxa de crescimento micelial do *Botrytis cinerea* conforme a redução das mesmas. Resultado observado também por Lahlali et al (2007), que descrevem a redução do crescimento micelial do *Botrytis cinerea* em função da redução da temperatura, sendo fortemente influenciado quando armazenado a 5 °C .

O fator temperatura também esta relacionado ao fator atividade de água (a_w) dos morangos. Evidenciado pela redução no crescimento de *Botrytis cinerea* com a redução da

temperatura e da a_w ($\leq 0,93$) e o desenvolvimento em $5\text{ }^\circ\text{C}$ porém em taxas de a_w de 0,98 a 0,99 (LAHLALI et al., 2007).

Considerando a temperatura de armazenamento ($4,0\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$) e a taxa de a_w (0,95) dos morangos utilizados nesse experimento, se infere que o não desenvolvimento de *Botrytis cinerea* apresentado na Figura 17, em nenhum dos morangos avaliados, possivelmente foi em consequencia de ambos os fatores, independentemente dos tratamentos aplicados.

Figura 17 - Ausência de *Botrytis cinerea* em morangos verdes armazenados a 4°C .



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Somado a estes dois fatores, o teor de sólidos solúveis de $6\text{ }^\circ\text{Brix}$ também pode ter contribuído para este resultado. A influência exercida pelo teor de solutos no crescimento de *Botrytis cinerea* é mencionada por Lahlali et al (2007). Confirmando que o aumento do teor de sacarose, por exemplo, aumenta a taxa de desenvolvimento do fungo.

5 CONCLUSÃO

Quando avaliados *in vitro* ou *in vivo* a ação antifúngica exercida pelos metabólitos secundários de plantas, após extração da matriz vegetal, pode ser influenciada por diferentes fatores. A aplicação do extrato de forma preventiva frente ao *Botrytis cinerea* demonstrou melhor ação antifúngica quando aplicado em morangos verdes armazenados a 25 °C.

A concentração mínima inibitória foi determinada em 5 mL de extrato, quando avaliado *in vitro*. Os compostos fenólicos identificados no extrato, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico e quercetina, possivelmente atuaram de forma sinérgica demonstrando ação antifúngica. Normalmente, a concentração de cada composto extraído não é suficiente para exercer a ação antifúngica isoladamente.

A composição química dos morangos, como pH, teor de sólidos solúveis totais, atividade de água e umidade, demonstrou influenciar à intensidade da ação exercida pelo extrato. O grau de maturação do morango influencia na disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento do fungo sendo a aspersão do extrato de *Physalis peruviana* um protetor do morango na prevenção do desenvolvimento de *Botrytis cinerea*.

Os estudos mostraram que a temperatura de refrigeração em combinação com o grau de maturação do fruto e o uso do extrato inibiu o crescimento dos fungos em todos os tratamentos avaliados.

O extrato de *Physalis peruviana* representa uma alternativa para controle preventivo de mofo cinzento em morangos da variedade Albion. Uma sugestão de continuidade deste trabalho é o desenvolvimento de um nanoextrato de forma a potencializar o efeito antifúngico para que possa ser aplicado também em frutos maduros.

REFERÊNCIAS

ABRAFRUTAS, Associação Brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados - **Estatísticas das exportações de frutas no 1º Semestre de 2017**. 2017. Disponível em: <http://www.abrafrutas.org/index.php?option=com_content&view=article&id=258:estatistica-s-das-exportacoes-de-frutas-no-1-semester-de-2017&catid=95&Itemid=259&lang=pt-br>. Acesso em: 05 jan. 2018.

AGRICULTURE, United States Department of. **National Agricultural Statistics Service: Quick Stats**. 2017. Disponível em: <https://quickstats.nass.usda.gov/results/6AB689B0-CF71-38E4-A892-C453772DA167?pivot=short_desc>. Acesso em: 28 dez. 2017.

AGRIOS, G.N. 2005. **Plant Pathology** 5th ed. Academic Press, New York, NY.

AHLEM, H. et al. Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefaciens* isolates. **African Journal of Biotechnology**. Tétouan, Marocco, p. 2210-2217. jan. 2012.

ALMANZA-MERCHÁN, P.J.; FISCHER, G. Fisiologia del cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana*). Em: II REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DA PHYSALIS (Lages - Santa Catarina). **Anais da 2ª reunião técnica**. Lages - Santa Catarina: Universidade do Estado de Santa Catarina - Centro de Ciências Agroveterinária, 2012. p. 32-52.

AMHERST, University of Massachusetts; ENVIRONMENT, **Center of Agriculture Food and Biofungicides**. 2014. Disponível em: <<https://ag.umass.edu/greenhouse-floriculture/factsheets/biofungicides>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

ANTUNES, L.E.C.; CARVALHO, G.L.; SANTOS A.M. dos. **A cultura do morango**. Brasília - DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011.

ANVISA, Agência Nacional da Vigilância Sanitária - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): **Relatório de Atividades de 2011 e 2012**. Gerência Geral de Toxicologia. Brasília: 2013.

AQUEVEQUE, P. et al. Antifungal activities of extracts produced by liquid fermentations of Chilean *Stereum* species against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). **Crop Protection**. Chillan, Chile, p. 95-100. jul. 2016.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011, Cap. 6.,193-343 p.

ARIF, T.; MANDAL, T. K.; DABUR, R. **Natural products: Anti-fungal agents derived from plants**. In: TIWARI, Vinod K.; MISHRA, Bhuwan B. (Ed.). Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. Trivandrum, India: Research Signpost, 2011. p. 283-311.

BAGGIO, J.S. **Fungicide Sensitivity and spatial and temporal dynamics of *Botrytis cinerea* and *Colletotricum* spp. and conventional and organic strawberries fields**. 2016. 152 f. Tese (Doutorado em Ciências e Patologia das Plantas), Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 2016.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. Morocco, p. 71-79. abr. 2016.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al (Ed.). **Postharvest Decay: Control Strategies**. Yauatepec - México: Elsevier, 2014.

BLANCARD, D. (Ed.). **Enfermedades del tomate: identificar, conocer, controlar**. Mexico: Mundi-prensa, 2011. 671 p.

BOLZAN, R.P.; CUQUEL, F.L.; LAVORANTI, O.J. Armazenamento refrigerado de *Physalis*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 1, p.577-583, out. 2011.

BRASIL, **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)**. Consulta de Praga: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 11 janeiro 2018.

BRASIL. Decreto nº 7.794, de 20 de agosto de 2012. **Instituiu A Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica (PNAPO)**. Brasília, GO, Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/decreto/d7794.htm. Acesso em: 10 fev. 2018.

BRASIL. EMBRAPA CERRADOS. **Hortaliça pouco conhecida será alternativa de cultivo para o Cerrado**. 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cerrados/busca-de-noticias/-/noticia/10037366/hortaliça-pouco-conhecida-sera-alternativa-de-cultivo-para-o-cerrado>. Acesso em: 12 jan. 2018.

BRASIL. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Embrapa. **Árvore do conhecimento morango: Cultivares**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/morango/arvore/CONT000fmxotm4d02wyiv8065610do1fgl2q.html#>>. Acesso em: 7 maio 2018.

CALBO, A.G.; MORETTI, C.L.; HENZ, G.P. **Respiração de frutas e hortaliças**. 46. ed. Brasília - DF: Embrapa Hortaliças, 2007.

CANTILLANO, R.F.F; SILVA, M.M. da. **Manuseio Pós-colheita de Morangos**. Pelotas - RS: Embrapa Clima Temperado, 2010.

CASTRO, F. de. **Sustentabilidade agrícola requer abordagem sistêmica**. 2012. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/sustentabilidade_agricola_requer_abordagem_sistemica/15743/>. Acesso em: 18 jun. 2012.

COMITÊ DE AÇÃO À RESISTÊNCIA DE FUNGICIDAS (Brasil). **Modo de Ação de Fungicidas**. 2017. Disponível em: <<http://www.frac-br.org/modo-de-acao>>. Acesso em: 02 jan. 2018.

CORRALES-BERNAL, A.; VERGARA, A.I.; ROJANO, B.; YAHIA, E.; MALDONADO, M.E. Características nutricionales y antioxidantes de la uchuva colombiana (*Physalis peruviana*) en três estadios de su maduración. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición: Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición**, Colombia, v. 65, n. 4, p.254- 262, dez. 2015.

CORRÊA, J.A.M. **Estudo químico de extratos de plantas da família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos**. Tese (Curso de Doutorado em Ciências. Área de Concentração: Microbiologia Agrícola), Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 2015, 165 f.

CUEVA, C. et al. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research In Microbiology: Institut Pasteur**. Madrid - Spain, p. 372-382. maio 2010.

CUZZI, C. **Extratos de canola no controle do *Botrytis cinerea in vitro* e do mofo cinzento em pós-colheita de morangos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco - PR, 2013. 64 f.

D.SC, Francesca Giampieri et al. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**. Ancona - Italy, p. 9-19. jan. 2012.

DANIEL, C.K.; LENNOX, C.L.; VRIES, F.A. *N vivo* application of garlic extracts in combination with clove oil to prevent postharvest decay caused by *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba* on apples. **Postharvest Biology and Technology**. Matieland - South Africa, p. 88-92. ago. 2014.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**. Raleigh - USA, p. 414-430. abr. 2012.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soluções Tecnológicas: Produção Integrada de Morango (PIMo)**. 2008. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/3619/producao-integrada-de-morango-pimo>>. Acesso em: 3 jan. 2018.

ERPER, I. et al. First report of *Botrytis cinerea* on *golden berry*. **Australasian Plant Disease Notes**. p. 24-25. jul. 2015.

ERTÜRK, Ö. et al. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Phenolic and Chemical Contents of *Physalis peruviana* L. from Trabzon, Turkey. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**. Ordu, Turkey, p. 213-216. set. 2017.

ESTECA, F.C.N. **Manejo integrado de pragas na cultura do morangueiro no sul de Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Ciência, Área de Concentração: Entomologia), Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 2017. 128 f.

FANI, M. (Ed.). Agentes antimicrobianos químicos e naturais. **Food Ingredients Brasil**, São Paulo - SP, v. 15, n. 15, p.37-42, set. 2010.

FELIZIANI, E. et al. Pre- and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. **Postharvest Biology and Technology**. Ancona, Italy, p. 133-138. abr. 2013.

FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Ed.). **Botrytis - the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Switzerland: Springer, 2016.

FILIPPI, Débora et al. Kinetic extraction of total polyphenols from Pitanga (*Eugenia uniflora* L.): effect of ultrasonic treatment, modeling and antioxidant potential. **Journal of Food Process Engineering**. Sertão-RS, p. 320-328. jan. 2015.

FISCHER, G.; EBERT, G.; LÜDDERS, P. Provitamin A carotenoids, organic acids and ascorbic acid content of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) ecotypes grown at two tropical altitudes. **Acta Horticulturae**. Santafé de Bogotá - Colombia, p. 263-267. jan. 2000.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (Switzerland). **Pathogen risk list**. 2014. Disponível em: <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf?sfvrsn=669d419a_8>. Acesso em: 02 jan. 2018.

GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research**. Iran, p. 6697-6703. dez. 2011.

GIANESSI, L.P.; REIGNER, N. **The Value of Fungicides In U.S. Crop Production**. Washington, Dc: Crop life Foundation, 2005. 243 p.

GINDRO, K.; PEZET, R. Effects of long-term storage at different temperatures on conidia of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. **Fems Microbiology Letters**. Nyon, Switzerland, p. 101-104. set. 2001.

GÖZTOK, F.; ZENGIN, F. The antimicrobial activity of *Physalis peruviana*. Resultados da Pesquisa Bitlis Eren University. **Journal of Science and Technology**. Elazig, Turkey, p. 15-17. jun. 2013. Disponível em: Acesso em: 16 ago. 2016.

GRABKE, A. **Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry - Molecular Mechanisms and Management**. Tese (Ciências Agronômicas e de Cultivos comuns, Biologia comum e Patologias Farmacêuticas), Universidade de Clemson, Carolina do Sul, 2014. 106 f.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**. North Carolina, p. 412-429. jun. 2014.

HOFLING J. F; GONÇALVES B.R (Ed.). **Isolamento e Caracterização de fungos patogênicos de importância médica**. Jundiaí - SP: Paco Editorial, 2016.

HORTIFRUTI, Anuário. Morangos - do jeito que o consumidor gosta. **Revista Campo & Negócios**, Uberlândia - MG, v. 3, n. 0, p.64-72, dez. 2015.

HUSAINI, A,M; NERI, D. (Ed.). **Strawberry: Growth, Development and Diseases**. Boston - EUA: Cab International, 2016.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS E CERTIFICAÇÃO. NTC 4580: **Frutas frescas. Uchuva. Especificaciones**. ICONTEC. Colombia, 1998.

JIN, P. et al. UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. **Scientia Horticulturae**. China, p. 106-111. nov. 2017.

KARACA, A.(Ed.). **Biology of Earthworms**. New York: Springer, 2011.

KOIKE, Steven T.; GLADDERS, Peter; PAULUS, Albert O. **Vegetables Diseases: A color handbook**. San Diego: Academic Press, 2007. 437 p.

KUMAR, Surinder. Textbook of Microbiology. New Delhi - India: Jaupee Brothers Medical Publishers (p) LTDA, 2012. 759 p.

KY, I.; FLOCH, A.L.; ZENG, L.; PECHAMAT, L.; TEISSEDRE, P.L. **Tannins. The Encyclopedia of Food and Health**. France, p. 247-255. out. 2016.

LAGROUH, F. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. **Journal de Mycologie Médicale**. Rabat, Morocco, p. 303-311. maio 2017.

LAHLALI, R.et al. Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the *in vitro* radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. **International Journal of Food Microbiology**. Gembloux, Belgium, p. 1-9. fev. 2007.

LAROSA, L.A. de; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILAR, G.A. **Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability**. New Delhi, India: Wiley-blackwell, 2010.

LI, Y.et al. Tea tree oil exhibits antifungal activity against *Botrytis cinerea* by affecting mitochondria. **Food Chemistry**. Ningbo, China, p. 62-67. abr. 2017.

LICODIEDOFF, S. **Caracterização físico-química e compostos bioativos em *Physalis peruviana* e derivados**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2012. 124 f.

LICODIEDOFF, S; KOSLOWSKI, L.A.D.; RIBANI, R.H. Flavonols and antioxidant activity of *Physalis peruviana* fruit at two maturity stages. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 35, n. 2, p.393-399, jun. 2013.

LIGARRETO, G.A.; LOBO, M.; CORREA, A. Recursos genéticos del género *Physalis* en Colombia. En: FISCHER, G.; MIRANDA, D.; PIEDRAHITA, W.; ROMERO, J. (Ed.). **Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en Colombia**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2005. p.9-28.

LIMA, C.S.M. **Fenologia, sistemas de tutoramento e produção de *Physalis peruviana* na região de Pelotas, RS**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS, 2009. 116 f.

LÓPEZ, H.E.B.; C., C.A.M.; ARÉVALO, A.H. Papel del cáliz en el comportamiento poscosecha de frutos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) ecotipo Colombia. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.181-191, 15 abr. 2015. Sociedad Colombiana de Ciencias Horticolas. <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2014v8i2.3212>.

LORENZETTI, E.R et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (RBPM)**, Botucatu - SP, v. 13, p.619-627, dez. 2011.

LUTZ, Instituto Adolfo. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea IV. ed. 1º ed. digital. São Paulo - SP: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1000 p.

MAAS, J.L (Ed.). **Compendium of Strawberry Diseases**. Minnesota - EUA: Aps Press, 1984.

MALTA, L.G. **Conteúdo Teórico-Prático**. Campinas-SP: 10 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2013.

MARTIN, L. **Alcohol Density – Alcoholic beverage Sample Preparation**: Rudolph Research Analytical. 2018. Disponível em: <<https://rudolphresearch.com/alcohol-density-samples/>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

MARTÍNEZ, G.et al. Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. Mar del Plata, Argentina, p. 30-35. jun. 2017.

MELO, I.S. et al. Antifungal Activity of *Pseudomonas frederiksbergensis* CMAA 1323 Isolated from the Antarctic Hair Grass *Deschampsia antarctica*. **British Microbiology Research Journal**. São Paulo - SP, p. 1-11. abr. 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1054794/antifungal-activity-of-pseudomonas-frederiksbergensis-cmaa-1323-isolated-from-the-antarctic-hair-grass-deschampsia-antarctica>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

MENDOZA, L. et al. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Industrial Crops and Products**. Santiago, Chile, p. 360-364. maio 2013.

MORENO, J.; PEINADO, R. **Enological Chemistry**. Córdoba - Spain: Academic Press, 2012.

MUNIZ, J. et al. Principais pesquisas realizadas com o cultivo de *Physalis* no Sul do Brasil. Em: II REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DA PHYSALIS (Lages-SC). **Anais da 2ª Reunião Técnica**. Lages - SC: Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, 2012. p. 56-79.

OLIVARES-TENORIO, M. et al. Thermal stability of phytochemicals, HMF and antioxidant activity in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Functional Foods**. The Netherlands, p. 46-57. fev. 2017.

ORNELAS-PAZ, J.J. et al. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. **Food Chemistry**. Chihuahua, Mexico, p. 372-381. maio 2013.

PIRES, N.M.; OLIVEIRA, V.R. Alelopatia. In: OLIVEIRA JUNIOR, R.S.de; CONSTANTIN, Jamil; INOUE, Miriam Hiroko (Ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba - PR: Omnipax, 2011. Cap. 5. p. 95-124.

PUENTE, L.A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. **Food Research International**. Medellin - Colombia, p. 1733-1740. 2011.

RAMADAN, M.M.; EL-GHORAB, A.H.; GHANEM, K.Z. Volatile compounds, antioxidants, and anticancer activities of Cape gooseberry fruit (*Physalis peruviana*): an *in vitro* study. **Journal of the Arab Society for Medical Research**. Giza, Egypt, p. 56-64. dez. 2015.

RAMADAN, M.F. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. **Food Research International**. Zagazig, Egypt, p. 1830-1836. out. 2011.

RAZZAGHI-ABYANEH, M.; RAI, M. (Ed.). **Antifungal Metabolites from Plants**. Tehran - Iran: Springer, 2013.

REVISTA CAMPO E NEGÓCIO: Anuário HF 2015. Uberlândia - MG: Agrocomunicação, dez. 2015.

ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; CATANEO, C.; GONZAGA, L.V.; LIMA, L.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana*. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara - SP, v. 19, n. 3, p.271-276, jun. 2009.

RODRIGUES, E.; ROCKENBACH, I.I.; CATANEO, C.; GONZAGA, L.V.; CHAVES, E.S.; FE, R. Minerals and essential fatty acids of the exotic fruit *Physalis peruviana*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v. 29, n. 3, p.642-645, set. 2009.

RODRÍGUEZ, D. J. et al. Antifungal activity *in vitro* of ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Flourensia* spp. against postharvest fungi. **Industrial Crops & Products**. Coahuila - México, maio 2017.

RONCANCIO, V.J.F.; FISCHER, G.; SORA, Á. D. **Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana*.)**. Colombia: Unibiblos, 2000.

RUFATO, A.R. et al. A CULTURA DA PHYSALIS. In: Embrapa Uva e Vinho. **SÉRIE FRUTICULTURA – PEQUENAS FRUTAS**. Bento Gonçalves: CAV-UDESC, 2013. p. 172-238.

SALAS, M.P. et al. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, p. 1411-1415. fev. 2011.

SANHUEZA, R.M.V. et al. **Controle do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) com o fungo *Gliocadium roseum* em culturas protegidas de morangueiros**. Vacaria - RS: Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, 1996.

SCHIMIDT, F.L. et al. **PRÉ-PROCESSAMENTO DE FRUTAS, HORTALIÇAS, CAFÉ, CACAU E CANA DE AÇÚCAR**. Rio de Janeiro - RJ: Elsevier, 2015.

SEVERO, J. Principais propriedades nutracêuticas e compostos fitoquímicos de *Physalis*. Em: II REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DA PHYSALIS (Lages-SC). **Anais da 2ª Reunião Técnica**. Lages - SC: Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, 2012. p. 80-96.

SIDDIQUI, Mohammed Wasim; BANSAL, Vasudha (Ed.). **Plant Secondary Metabolites: Their Roles in Stress Eco-physiology**. Oakville - Canadá: Apple Academic Press, 2017.

SOUZA, M.M. de et al. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Rio Grande - RS, p. 680-685. set. 2010.

STAATS, M., van BAARLEN, P., and van KAN, J. A. L. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. **Mol. Biol. Evol.** 22:333-346.

SUBLIMAR PRODUTOS LIOFILIZADOS LTDA. (Tatuí - SP). **Lista de Produtos**. Disponível em: <<http://www.sublimar.com.br>>. Acesso em: 2 maio 2017.

SUNG, W.S; LEE, D.G. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. **Pure and Applied Chemistry**. Daegu, Korea, p. 219-226. jan. 2010.

TAJKARIMI, M.M.; IBRAHIM, S.A.; CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**. Carver Hall - Greensboro, p. 1199-1218. fev. 2010.

VALENCIA, M.L.Ch. Anatomia del fruto de la uchuva. **Acta Biologica Colombiana**, Bogotá, Colombia, v. 1, n. 2, p.63-89, jun. 1986.

VARGAS, F.J. A. et al. **INTELIGENCIA DE MERCADOS PARA LA CADENA DE UCHUVA COLOMBIANA (*Physalis peruviana*)**. Oidles: Observatorio Iberoamericano del Desarrollo Local y la Economía Social, Colombia, v. 9, n. 18, p.1-13, jun. 2015.

VIEIRA, J. **Estatísticas de Exportações de Frutas 2017**. 2018. Disponível em: <http://frutasdobrasil.org/index.php/pt-br/sala-de-imprensa/clipping-de-noticias/217-estatisticas-de-exportacoes-de-frutas-2017>. Acesso em: 02 fevereiro 2018.

YILDIZ, G. et al. Physical and chemical characteristics of goldenberry fruit (*Physalis peruviana*). **Journal of Food Science and Technology (JFST)**, Bursa - Turkey, p. 2320-2327. fev. 2014.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**. Czech Republic, p. 1051-1056. jun. 2013.

ZHAO, Y. (Ed.). **Berry Fruit Value - Added Products for health promotion**. New York: CRC Press, 2007.

APÊNDICE A – Artigo científico

Antifungal action of the *Physalis peruviana* Linnaeus extract against the fungus *Botrytis Cinerea*

Débora Filippi ^a, Rayanne Beulk Flores ^b, Maria Tereza Friedrich ^c.

^a FILIPPI, D. Endereço de e-mail: dfilippi17@hotmail.com. Fundação Universidade de Passo Fundo - UPF, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTA. UPF Campus I, BR 285, Km 292,7 - Bairro São José, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP: 99.052-900.

^b FLORES, RB. Endereço de e-mail: 151524@upf.br. Fundação Universidade de Passo Fundo – UPF, Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC. UPF Campus I, BR 285, Km 292,7 - Bairro São José, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP: 99.052-900.

^c FRIEDRICH, M.T. Endereço de e-mail: friedrich@upf.br. Fundação Universidade de Passo Fundo - UPF, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTA. UPF Campus I, BR 285, Km 292,7 - Bairro São José, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP: 99.052-900.

RESUMO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch) é caracterizado como um fruto perecível de vida útil relativamente curta. Sua composição química contribui para o desenvolvimento de fungos, em especial, o *Botrytis cinerea*, principal fitopatógeno relacionado ao morango, responsável por causar o mofo cinzento, doença fúngica que acomete os frutos, principalmente no período pós-colheita. A severidade da doença se deve a capacidade do *Botrytis cinerea* de permanecer nos frutos durante todo o período de maturação, vindo a se manifestar somente no período pós-colheita, o que resulta em consideráveis perdas econômicas. O controle do fungo é realizado majoritariamente por fungicidas sintéticos. Métodos alternativos de controle têm sido utilizados a fim de reduzir a incidência da doença, contudo características próprias do *Botrytis cinerea* o tornam altamente resistente. Estes fatores somados aos elevados teores de resíduos de fungicidas nos frutos e a busca pelo desenvolvimento de alimentos saudáveis tem intensificado as pesquisas a fim de identificarem novos métodos de controle do *Botrytis cinerea*. Extratos obtidos de plantas tem despertado o interesse científico por conterem substâncias responsáveis por conferirem proteção às mesmas. A presença de ácidos fenólicos e flavonoides nas diferentes partes dos frutos de *Physalis peruviana* conferem a espécie capacidade de atuar como um agente antifúngico natural. O objetivo geral desta dissertação foi avaliar a ação preventiva do extrato de *Physalis peruviana* sobre o fungo *Botrytis cinerea* inoculado em morangos da variedade Albion. Os resultados obtidos demonstraram a ação antifúngica do extrato. Quando avaliado *in vitro* o volume de 5 mL de extrato apresentou ação fungicida sobre o fungo. Nos testes realizados com morangos o extrato demonstrou ação fungistática. Fatores como a composição química do morango e a temperatura de armazenamento dos frutos influenciaram para a sensibilidade demonstrada pelo *Botrytis cinerea* frente ao extrato, fungicida Mythos e testemunha. A presença de ácido clorogênico ($148,8 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido cafeico ($14,42 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido ferúlico ($2,44 \mu\text{g mL}^{-1}$) e quercetina ($190 \mu\text{g mL}^{-1}$) no extrato, permite inferir que a ação antifúngica sobre o *Botrytis cinerea* tenha sido exercida pela ação sinérgica destes compostos.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, ação antifúngica, *Botrytis cinerea*.

ABSTRACT

Strawberry (*Fragaria x Ananassa Duch*) is characterized as a perishable fruit with a relatively short shelf life. Its chemical composition contributes to the development of fungi, especially *Botrytis cinerea*, the main phytopathogen related to strawberry, responsible for causing gray mold, a fungal disease that affects fruits, especially in the post-harvest period. The severity of the disease is due to the ability of *Botrytis cinerea* to remain in the fruits throughout the maturation period, only to occur in the post-harvest period, which results in considerable economic losses. The control of the fungus is carried out mainly by synthetic fungicides. Alternative methods of control have been used in order to reduce the incidence of the disease, but *Botrytis cinerea's* own characteristics make it highly resistant. These factors, together with the high levels of fungicide residues in fruits and the search for the development of healthy foods, have intensified the research in order to identify new methods of control of *Botrytis cinerea*. Extracts obtained from plants have aroused the scientific interest to contain substances responsible for protecting them. The presence of phenolic acids and flavonoids in different parts of the fruits of *Physalis peruviana* confer the ability of the species to act as a natural antifungal agent. The general objective of this dissertation was to evaluate the preventive action of the extract of *Physalis peruviana* on the fungus *Botrytis cinerea* inoculated in strawberries of the Albion variety. The results obtained demonstrated the antifungal action of the extract. When evaluated in vitro the volume of 5 mL of extract showed fungicidal action on the fungus. In the tests performed with strawberries the extract showed fungistatic action. Factors such as strawberry chemical composition and fruit storage temperature influenced the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the extract, fungicide Mythos and control. The presence of chlorogenic acid ($148.8 \mu\text{g mL}^{-1}$), caffeic acid ($14.42 \mu\text{g mL}^{-1}$), ferulic acid ($2.44 \mu\text{g mL}^{-1}$) and quercetin ($190 \mu\text{g mL}^{-1}$) allows to infer that the antifungal action on *Botrytis cinerea* has been exerted by the synergistic action of these compounds.

Key-words: Phenolic compounds, antifungal action, *Botrytis cinerea*.

1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa Duch*) é caracterizado como um fruto perecível de vida útil relativamente curta. Sua composição química o torna um substrato ideal para o crescimento de microorganismos (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011). A principal doença fúngica que acomete a cultura do morango é o mofo cinzento, causada pelo fungo *Botrytis cinerea* que pode infectar folhas, flores e frutos. O fungo é capaz de permanecer nos frutos verdes e se manifestar somente no período pós-colheita, ocasionando consideráveis perdas econômicas para o setor produtivo e comercial (CANTILLANO; SILVA, 2010).

O sistema convencional utiliza como principal método de controle de doenças fúngicas os fungicidas sintéticos (SANHUEZA et al., 1996; LORENZETTI et al., 2011). Estes registrados em sua maioria para aplicação no período pré-colheita, dificultando o controle da doença (AGROFIT, 2018).

Teores acima do permitido de resíduos de fungicidas e não autorizados para aplicação em morangos produzidos pelo sistema convencional, bem como, a necessidade de oferecer métodos de controle alternativos para ambos os sistemas de produção tem intensificado a busca por novos agentes antifúngicos (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; ANVISA, 2013; GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Extratos de plantas apresentam potencial antifúngico natural contra diferentes fitopatógenos. Os efeitos são atribuídos a diferentes metabólitos secundários como os compostos fenólicos (AQUEVEQUE et al., 2016; LAGROUH, 2017). Ácidos fenólicos e flavonoides podem atuar sobre a célula fúngica através de três principais mecanismos: I) rompimento da membrana celular; II) ação sobre enzimas hidrolíticas e III) disfunção das mitocôndrias fúngicas (RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013; BAUTISTA-BAUS et al., 2014; SIDDIQUI; BANSAL, 2017).

Frutos da espécie *Physalis peruviana* também são fontes de ácidos fenólicos e flavonoides (VALENCIA, 1986; ROCKENBACH et al., 2009; SEVERO et al., 2010; RAMADAN 2011). Avaliar a ação preventiva do extrato de *Physalis peruviana* frente ao fungo *Botrytis cinerea* aplicado em morangos da variedade Albion foi o objetivo geral deste trabalho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de identificação e isolamento do *Botrytis cinerea* foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia da UPF, com base na metodologia utilizada por Cuzzi (2013). O fungo foi identificado e isolado de morangos da variedade Albion adquiridos em comércio local do município de Getúlio Vargas - RS. Após confirmação da presença do mesmo nos frutos, se procedeu seu isolamento.

2.1 ANÁLISE GENÔMICA DO FUNGO ISOLADO

A confirmação do DNA do *Botrytis cinerea* foi realizada pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies de Florianópolis - SC, através de metodologias de sequenciamento de DNA em larga escala de marcadores moleculares específicos, associados à análise de bioinformática.

2.2 MATÉRIA PRIMA PARA PRODUÇÃO DO EXTRATO

Frutos da espécie *Physalis peruviana* foram adquiridos da empresa ItalBraz®, localizada no município de Vacaria no estado do Rio Grande do Sul. Os frutos foram classificados visualmente quanto ao seu estágio de maturação de acordo com o grau de coloração do cálice (ICONTEC, 1998). E permaneceram congelados e com o cálice até o momento dos experimentos.

2.2.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO *Physalis peruviana*

O suco *in natura* de *Physalis peruviana* utilizado para as determinações foi obtido através da trituração em liquidificador e filtragem em funil de Büchner com filtro de nylon. O

filtrado foi armazenado em frasco âmbar e mantido sobre refrigeração até o momento dos testes.

Foram determinados em triplicata os seguintes parâmetros pH; acidez titulável em ácido cítrico; sólidos solúveis por refratometria; lipídios por extração direta em Soxhlet, proteína pelo método de Kjeldahl clássico, umidade por secagem direta em estufa a 105 °C, glicídios redutores em glicose e vitamina C por titulometria com iodato de potássio (ADOLFO LUTZ, 2005).

2.2.2 PREPARO DO EXTRATO

A partir dos frutos *in natura*, previamente macerados em almofariz e adicionados à solução extratora água e etanol (50 % v/v), o extrato permaneceu em banho de ultrassom, sem aquecimento, por 2 horas. Foi filtrado e transferido para um evaporador rotativo a 40 °C por aproximadamente 2 h.

2.2.3 DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES NO EXTRATO

A determinação dos flavonoides e ácidos fenólicos foi realizada por HPLC-UV em fase reversa, com vazão da fase móvel de 1 mL por minuto e volume de injeção de 20 µL. Para determinação de ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido cumárico e ácido clorogênico foi utilizada fase móvel: acetonitrila:água acidificada em pH 3,0 (10:90 v/v), ajustado com ácido fosfórico e comprimento de onda: 280 nm. Para determinação dos flavonoides quercetina, kaempferol, crisina, miricetina, hesperidina e luteolina, a fase móvel solução de água 0,3%, ácido fórmico, solução de metanol 0,3%, ácido fórmico e comprimento

de onda de 360 nm. Conforme metodologia interna “Procedimento para determinação de flavonoides” do Laboratório de Cromatografia - UPF.

2.3 TESTE DA AÇÃO FÚNGICA DO EXTRATO DE *Physalis peruviana*

A avaliação da ação antifúngica exercida pelo extrato de *Physalis peruviana* se realizou através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e testes com morangos.

2.3.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A menor concentração de extrato de *Physalis peruviana*, capaz de inibir o crescimento (efeito preventivo) micelial do *Botrytis cinerea* foi determinada pelo método de difusão em ágar denominado *Poisoned Food* (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Um disco de micélio de 7 mm foi adicionado no centro de cada placa. Após o período de incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, os diâmetros dos crescimentos fúngicos foram mensurados com auxílio de paquímetro.

2.4 TESTE COM MORANGOS

Os morangos orgânicos utilizados nos experimentos I e II foram adquiridos de produtora certificada residente no município de Barão de Cotegipe-RS. Foram realizados testes para determinar o volume aproximado gasto de extrato, fungicida e água estéril, por

aspersão, de acordo com Aqueveque et al (2016). Os pêndulos foram borrifados até o ponto de escorrimento e o volume gasto de cada tratamento calculado para cada fruto.

A suspensão de conídios foi preparada na concentração de 10^5 conídios por mL de suspensão. Foram dadas 3 borrifadas em cada fruto. Transferidos para câmara a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) com fotoperíodo de 12 horas ao dia, onde permaneceram até o aparecimento de desenvolvimento fúngico.

2.4.1 EXPERIMENTO I

A ação antifúngica do controle negativo (água Milli-Q estéril), controle positivo (fungicida Mythos) e extrato de *Physalis peruviana* foi avaliada em morangos sobre diferentes estádios de maturação e armazenados a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram utilizados cinco morangos maduros e verdes para cada tratamento. O fungo foi aplicado através de aspersão da suspensão de conídios (10^5 conídios por mL de suspensão).

2.4.2 EXPERIMENTO II

O efeito das temperaturas de armazenamento ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) sobre o crescimento do *Botrytis cinerea* nos morangos previamente tratados com extrato, fungicida e água estéril foram avaliadas. Os morangos mantidos em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) foram armazenados nos Laboratórios de Fitopatologia e Cromatografia da UPF respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutos da espécie *Physalis peruviana* normalmente não apresentam pH superior a 6 mesmo ao final do período de maturação (LICODIEDOFF; KOSLOWSKI; RIBANI, 2013; YILDIZ et al., 2015). Este valor pode estar relacionado ao pH do vacúolo da célula vegetal, que normalmente se encontra entre 4,0 e 5,5 mas em alguns frutos cítricos pode chegar a 2,0 (CALBO; MORETTI; HENZ, 2007). O caráter ácido dos frutos é evidenciado também pelo percentual de acidez titulável total ($0,68 \pm 0,01$) expressa em ácido cítrico, sendo este o principal ácido orgânico presente em frutos da espécie *Physalis peruviana*.

O teor de sólidos solúveis totais identificado nos frutos ($14,17 \pm 0,06$) fornece um indicativo da quantidade de açúcares presentes nos frutos. O valor da relação sólidos solúveis totais/acidez titulável total (20,84) observado para os frutos de *Physalis peruviana* demonstra o considerável teor de açúcar presente nos frutos (SCHIMIDT et al., 2015).

As proteínas dos frutos podem participar de reações com diferentes fitopatógenos, incluindo o *Botrytis cinerea* (CAMPBELL-PLATT et al., 2015). Segundo estudos de Hofling e Gonçalves (2016) o teor de umidade no fruto também pode contribuir positivamente para a ação antifúngica do extrato, sendo também responsável pela fonte de vitaminas hidrossolúveis (PUENTE et al., 2011). No fruto estudado o teor de ácido ascórbico foi de 34,67 mg por 100 g. O ácido ascórbico desempenha como principal função a de antioxidante, embora possa atuar também como antimicrobiano (DAZ et al., 2015).

O teor de flavonoides totais observado para os frutos de *Physalis peruviana* foi de 9 μg de catequina equivalente por mg de amostra úmida. Na análise cromatográfica do extrato foram identificados os seguintes compostos: ácido clorogênico ($148,8 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido cafeico ($14,42 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido ferúlico ($2,44 \mu\text{g mL}^{-1}$) e quercetina ($190 \mu\text{g mL}^{-1}$). A produção do extrato a partir dos frutos inteiros (casca, polpa e sementes) contribuiu para a presença dos

compostos quantificados. As diferentes partes da planta podem conter diversos compostos fenólicos e teores distintos de um mesmo composto (ERTURK et al., 2017).

O avanço da maturação pode influenciar na concentração dos diferentes compostos fenólicos (LA ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZALEZ-AGUILAR, 2010; LICODIEDOFF; KOSLOWSKI; RIBANI, 2013). Os frutos utilizados neste trabalho tinham grau de maturação 5 de acordo com a classificação pela Icontec (1998), o que pode ter influenciado na redução dos compostos fenólicos presentes no extrato (BOLZAN; CUQUEL; LAVORANTI, 2011). As sementes de *Physalis peruviana* são descritas por armazenarem a maior concentração de flavonoides e ácidos fenólicos (ERTURK et al., 2017).

O crescimento micelial do fungo foi inibido em 100% quando o volume de 5 mL do extrato foi incorporado ao meio de cultura PDA resultando em uma concentração final de 20% (v/v). O percentual de inibição apresentado pelo volume de 5 mL de extrato foi superior ao percentual de inibição de 68,81% apresentado pelo fungicida Mythos.

A evaporação do extrato em evaporador rotativo a 40 °C e a determinação do teor alcoólico garantiu que não houve interferência do etanol na ação antifúngica do extrato (OLIVARES-TENORIO et al., 2017). A ação fungicida apresentada quando utilizado o volume de 5 mL de extrato se deve a presença dos compostos fenólicos e a ação sinérgica dos compostos identificados no extrato. Na maioria das vezes, a concentração dos diferentes compostos presentes em um extrato não é suficiente para que um composto isoladamente exerça ação antifúngica (PIRES; OLIVEIRA, 2011; RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013).

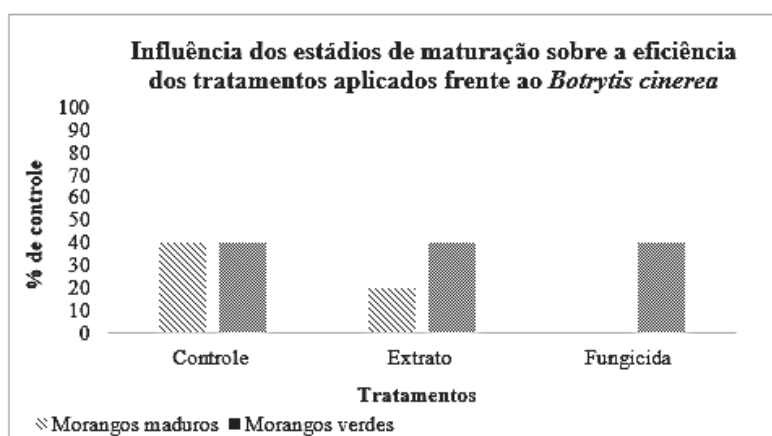
Ácidos fenólicos e flavonoides presentes nas células das plantas apresentam capacidade de inibirem a ação de enzimas hidrolíticas utilizadas por fitopatógenos na obtenção de nutrientes (RAZZAGHI-ABYANEH; RAI, 2013). Segundo Sung; Lee (2010) e Martínez et al (2017) os ácidos fenólicos e flavonoides podem promover o rompimento da membrana celular e a disfunção das mitocôndrias fúngicas, desta forma os compostos

identificados no extrato podem ter atuado principalmente sobre a membrana citoplasmática do fungo.

A estrutura e as posições dos grupos funcionais dos compostos presentes no extrato, como o ácido clorogênico, promovem o aumento da permeabilização da membrana, permitindo a dissolução e acúmulo do mesmo. Este acúmulo leva a desestabilização da membrana o que pode resultar em uma interrupção da transferência de prótons (ZABKA; PAVELA, 2013).

Os resultados obtidos no experimento I são apresentados na Figura 1. O grau de maturação dos morangos mostrou efeito sobre a ação do extrato, fungicida e controle. Os tratamentos extrato e fungicida, foram mais eficazes no controle do *Botrytis cinerea* quando aplicados por aspersão nos frutos verdes em relação aos maduros.

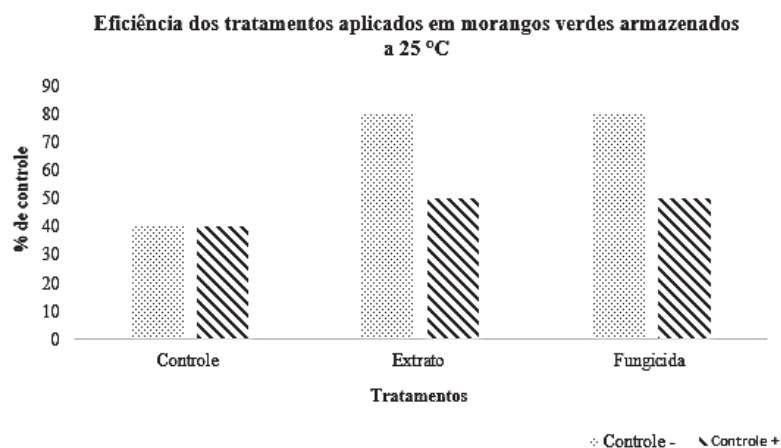
Figura 1: Resultados obtidos no experimento I.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Os resultados obtidos no experimento II para os morangos armazenados a 25 °C (± 1 °C) são apresentados na Figura 2.

Figura 1: Resultados obtidos no experimento I.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

A ação antifúngica observada foi com base no efeito resultante da ação dos compostos fenólicos do extrato juntamente com a composição química dos morangos. Os valores de pH, °Brix, atividade de água e umidade observados para os frutos verdes foram inferiores aos valores observados nos frutos maduros, demonstrando menor disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento do fungo. A aplicação do extrato nos frutos verdes atua como uma camada protetora, reduzindo a capacidade do fungo em metabolizar os nutrientes dos morangos mesmo com o avanço da maturação. Trabalhos anteriores relatam a relação da composição química do fruto com a disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento de fungos. Ornelas-Paz et al (2013) avaliaram a composição química de morangos da variedade Albion, em diferentes estádios de maturação, relatando o aumento do teor de sólidos solúveis totais, pH e umidade com o avanço da maturação dos frutos.

Em relação aos morangos armazenados sob temperatura de refrigeração ($4\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$), aplicados ou não com *Botrytis cinerea*, se observaram ausência de desenvolvimento fúngico em todos os frutos durante os 15 dias de acompanhamento. A temperatura influenciou no desenvolvimento do *Botrytis cinerea* em relação aos diferentes tratamentos avaliados. A capacidade do *Botrytis cinerea* em se desenvolver próximo de 0 °C é descrita na literatura

(GINDRO; PEZET, 2001). Embora, estudos tem demonstrado que o mesmo pode não crescer em baixas temperaturas. Este fator isoladamente, influencia fortemente ($p < 0,0001$) o desenvolvimento do fungo (LAHLALI et al., 2007).

Ahlem et al (2012) avaliaram o crescimento do *Botrytis cinerea* em diferentes temperaturas (5 a 30 °C) durante 7 dias. Os resultados demonstraram ausência de crescimento fúngico nos morangos armazenados a 5 °C, durante o período de incubação. Para as demais temperaturas se observou redução da taxa de crescimento micelial do *Botrytis cinerea* conforme a redução das mesmas. Resultado observado também por Lahlali et al (2007), que descrevem a redução do crescimento micelial do *Botrytis cinerea* em função da redução da temperatura, sendo fortemente influenciado quando armazenado a 5 °C.

O fator temperatura também esta relacionado ao fator atividade de água (a_w) dos morangos. Evidenciado pela redução no crescimento de *Botrytis cinerea* com a redução da temperatura e da a_w ($\leq 0,93$) e o desenvolvimento em 5 °C porém em taxas de a_w de 0,98 a 0,99 (LAHLALI et al., 2007).

Considerando a temperatura de armazenamento ($4,0 \text{ °C} \pm 0,1 \text{ °C}$) e a taxa de a_w (0,95) dos morangos utilizados nesse experimento, se infere que o não desenvolvimento de *Botrytis cinerea* em nenhum dos morangos avaliados, possivelmente foi em consequencia de ambos os fatores, independentemente dos tratamentos aplicados. Somado a estes dois fatores, o teor de sólidos solúveis de 6 °Brix também pode ter contribuído para este resultado. A influência exercida pelo teor de solutos no crescimento de *Botrytis cinerea* é mencionada por Lahlali et al., (2007). Confirmando que o aumento do teor de sacarose, por exemplo aumenta a taxa de desenvolvimento do fungo.

4. CONCLUSÃO

Quando avaliados *in vitro* ou *in vivo* a ação antifúngica exercida pelos metabólitos secundários de plantas, após extração da matriz vegetal, pode ser influenciada por diferentes fatores. A aplicação do extrato de forma preventiva frente ao *Botrytis cinerea* demonstrou melhor ação antifúngica quando aplicado em morangos verdes armazenados a 25 °C.

A composição química dos morangos, como pH, teor de sólidos solúveis totais, atividade de água e umidade, demonstrou estar relacionada à intensidade da ação exercida pelo extrato. Evidenciando que a ação exercida por um composto fenólico frente ao mesmo fitopatógeno, pode variar em função das diferentes composições químicas de diferentes espécies de frutos.

Os compostos fenólicos, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido cafeico e quercetina, identificados no extrato exercem ação antifúngica sobre o fungo *Botrytis cinerea*, sendo o volume de 5 mL de extrato capaz de atuar como um fungicida sobre o fungo, quando avaliado *in vitro*. Possivelmente a ação antifúngica se deve a ação sinérgica dos 4 compostos. Normalmente, a concentração de cada composto extraído não é suficiente para exercer a ação antifúngica isoladamente.

O extrato de *Physalis peruviana* representa uma alternativa para controle preventivo de mofo cinzento em morangos da variedade Albion. Uma sugestão de continuidade deste trabalho é a aplicação de um nanoextrato de forma preventiva frente ao fungo *Botrytis cinerea* em morangos verdes no período pré-colheita.

5. REFERÊNCIAS

AHLEM, Hamdache et al. Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefaciens* isolates. **African Journal of Biotechnology**. Tétouan, Maroco, p. 2210-2217. jan. 2012.

ANDRADE, P.F. de S. **ANÁLISE DA CONJUNTURA AGROPECUÁRIA SAFRA 2016/17**: Fruticultura. Paraná: Estado do Paraná - Secretaria da Agricultura e Abastecimento - Departamento de Economia Rural, 2017. 9 p. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/Fruticultura_2016_17.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2017.

ANTUNES, L.E.C.; CARVALHO, G.L.; SANTOS A.M. **A cultura do morango**. 2.ed. Brasília - DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011, 58 p.

ANVISA, Agência Nacional da Vigilância Sanitária - **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): Relatório de Atividades de 2011 e 2012**. Gerência Geral de Toxicologia. Brasília: 2013.

AQUEVEQUE, P. et al. Antifungal activities of extracts produced by liquid fermentations of Chilean *Stereum* species against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). **Crop Protection**. Chillan, Chile, p. 95-100. Jul. 2016.

ARIF, T.; MANDAL, T. K.; DABUR, R. **Natural products: Anti-fungal agents derived from plants**. In: TIWARI, Vinod K.; MISHRA, Bhuwan B. (Ed.). Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. Trivandrum, India: Research Signpost, 2011. p. 283-311.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. Morocco, p. 71-79. abr. 2016.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al (Ed.). **Postharvest Decay: Control Strategies**. Yauatepec - México: Elsevier, 2014.

BOLZAN, R.P.; CUQUEL, F.L.; LAVORANTI, O.J. Armazenamento refrigerado de *Physalis*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 1, p.577-583, out. 2011.

BRASIL, **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)**. Consulta de Praga: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 11 janeiro 2018.

CALBO, A.G.; MORETTI, C.L.; HENZ, G.P. **Respiração de frutas e hortaliças**. 46. ed. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007.

CANTILLANO, R.F.F.; SILVA, M.M. da. **Manuseio Pós-colheita de Morangos**. Pelotas - RS: Embrapa Clima Temperado, 2010.

CORRÊA, J.A.M. **Estudo químico de extratos de plantas da família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos**. Tese (Doutorado em Ciências. Área de Concentração: Microbiologia Agrícola), Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 2015. 165 f.

CUZZI, C. **Extratos de canola no controle do *Botrytis cinerea in vitro* e do mofo cinzento em pós-colheita de morangos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco - PR, 2013. 64 f. Disponível em: <<http://bdtd.ibict.br/vufind/Search/Results?lookfor=mofo+cinzento&type=AllFields&limit=20&sort=year>>. Acesso em: 3 jan. 2018.

FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Ed.). ***Botrytis - the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems***. Switzerland: Springer, 2016.

ERTÜRK, Ö. et al. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Phenolic and Chemical Contents of *Physalis peruviana* L. from Trabzon, Turkey. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**. Ordu, Turkey, p. 213-216. set. 2017.

GRABKE, A. **Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry - Molecular Mechanisms and Management**. Tese (Ciências Agronômicas e de Cultivos comuns, Biologia comum e Patologias Farmacêuticas), Universidade de Clemson, Carolina do Sul, 2014. 106 f.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**. North Carolina, p. 412-429. jun. 2014.

HOFLING J. F; GONÇALVES B.R (Ed.). **Isolamento e Caracterização de fungos patogênicos de importância médica**. Jundiaí - SP: Paco Editorial, 2016.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS E CERTIFICAÇÃO. NTC 4580: Frutas frescas. Uchuva. Especificaciones. Estabelece os requisitos que devem cumprir a uchuva (*Physalis peruviana* L.), destinada para o consumo fresco e como matéria-prima para o processamento. ICONTEC, Colombia, 1998.

LAGROUH, F.; DAKKA, N.; BAKRI, Y. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. **Journal of Mycologie Médicale**. Rabat, Morocco, p. 303-311. maio 2017.

LAHLALI, Rachid et al. Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the *in vitro* radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. **International Journal of Food Microbiology**. Gembloux, Belgium, p. 1-9. fev. 2007.

LAROSA, L.A. de; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILAR, G.A. **Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability**. New Delhi, India: Wiley-blackwell, 2010.

LICODIEDOFF, S.; KOSLOWSKI, L.A.D.; RIBANI, R.H. Flavonols and antioxidant activity of *Physalis peruviana* L. fruit and two maturity stages. **Acta Scientiarum**. Maringá - PR, p. 393-399. jun. 2013.

LORENZETTI, E.R et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (RBPM)**, Botucatu - SP, v. 13, n. , p.619-627, dez. 2011.

LUTZ, Instituto Adolfo. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea IV. ed. 1º ed. digital. São Paulo - SP: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1000 p.

MARTÍNEZ, G.et al. Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. Mar del Plata, Argentina, p. 30-35. jun. 2017.

MENDOZA, L.et al. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Industrial Crops and Products**.

OLIVARES-TENORIO, M.et al. Thermal stability of phytochemicals, HMF and antioxidant activity in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Functional Foods**. The Netherlands, p. 46-57. fev. 2017.

ORNELAS-PAZ, José de Jesús et al. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. **Food Chemistry**. Chihuahua, Mexico, p. 372-381. maio 2013.

PIRES, N.M.; OLIVEIRA, V.R. Alelopatia. In: OLIVEIRA JUNIOR, Rubem Silvério de; CONSTANTIN, Jamil; INOUE, Miriam Hiroko (Ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba - PR: Omnipax, 2011. Cap. 5. p. 95-124.

PUENTE, L.A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. **Food Research International**. Medellin - Colombia, p. 1733-1740. 2011.

RAMADAN, Mohamed Fawzy. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. **Food Research International**. Zagazig, Egypt, p. 1830-1836. out. 2011.

RAMADAN, M.M.; EL-GHORAB, A.H.; GHANEM, K.Z. Volatile compounds, antioxidants, and anticancer activities of Cape gooseberry fruit (*Physalis peruviana*): an *in vitro* study. **Journal of the Arab Society for Medical Research**. Giza, Egypt, p. 56-64. dez. 2015. Santiago, Chile, p. 360-364. maio 2013.

RAZZAGHI-ABYANEH, M.; RAI, M. (Ed.). **Antifungal Metabolites from Plants**. Tehran - Iran: Springer, 2013.

RODRIGUES, E.; ROCKENBACH, I.I.; CATANEO, C.; GONZAGA, L.V.; CHAVES, E.S.; FE, R. Minerals and essential fatty acids of the exotic fruit *Physalis peruviana*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v. 29, n. 3, p.642-645, set. 2009.

ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; CATANEO, C.; GONZAGA, L.V.; LIMA, L.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. ÁCIDOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM FRUTO DE *Physalis peruviana* L. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara - SP, v. 19, n. 3, p.271-276, jun. 2009.

SANHUEZA, R.M.V. et al. **Controle do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) com o fungo *Gliocadium roseum* em culturas protegidas de morangueiros**. Vacaria - RS: Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, 1996.

SEVERO, J. Principais propriedades nutracêuticas e compostos fitoquímicos de *Physalis*. In: II REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DA PHYSALIS (Lages-SC). **Anais da 2ª Reunião Técnica**. Lages - SC: Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, 2012. p. 80-96.

SIDDIQUI, M.W.; BANSAL, V. (Ed.). **Plant Secondary Metabolites: Their Roles in Stress Eco-physiology**. Oakville - Canadá: **Apple Academic Press**, 2017.

SCHIMIDT, F.L. et al. **PRÉ-PROCESSAMENTO DE FRUTAS, HORTALIÇAS, CAFÉ, CACAU E CANA DE AÇÚCAR**. Rio de Janeiro - RJ: Elsevier, 2015.

TAJKARIMI, M.M.; IBRAHIM, S.A.; CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**. Carver Hall - Greensboro, p. 1199-1218. fev. 2010.

VALENCIA, M.L.Ch. ANATOMIA DEL FRUTO DE LA UCHUVA. **Acta Biologica Colombiana**, Bogotá, Colombia, v. 1, n. 2, p.63-89, jun. 1986.

YILDIZ, G. et al. Physical and chemical characteristics of goldenberry fruit (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Food Science and Technology**. Bursa, Turkey, p. 2320-2327. abr. 2015.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**. Prague, p. 1051-1056. jun. 2013.