

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

Pedro Hernandez Padilha

**CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO, DIMENSIONAMENTO
AMOSTRAL E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CALÊNDULA**

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Pedro Hernandez Padilha

**CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO, DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL E
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CALÊNDULA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**

Orientador: Sidinei José Lopes

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Hernandez Padilha, Pedro
CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO, DIMENSIONAMENTO
AMOSTRAL E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CALÊNDULA /
Pedro Hernandez Padilha.-2016.
79 p. ; 30cm

Orientador: Sidinei José Lopes
Coorientadora: Solange Bosio Tedesco
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2016

1. Calendula officinalis L. 2. Estimação de caracteres
3. Reamostragem 4. Suficiência amostral 5. Infusões de
calêndula I. José Lopes, Sidinei II. Bosio Tedesco,
Solange III. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Pedro Hernandez Padilha. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua José Carlos Krueel, n. 325, Bairro Nossa Senhora de Lourdes, Santa Maria, RS.
CEP: 97060-380

Fonte: (0xx)55 9930 0906; E-mail: pedro.agroufsm@gmail.com

Pedro Hernandez Padilha

**CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO, DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL E
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CALÊNDULA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**

Aprovado em 23 de fevereiro de 2016:

Sidinei José Lopes, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Alessandro Dal'Col Lúcio, Dr. (UFSM)

Jana Koefender, Dra. (UNICRUZ)

Santa Maria, RS, Brasil
2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meu irmão e irmã, familiares, à minha namorada Giselle Machado, amigos, pessoas fundamentais para concretização dessa caminhada, por todo apoio que sempre deram para a realização de meus sonhos, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

O trabalho aqui descrito só pôde ser concluído pelo esforço conjunto de uma série de pessoas. Aqui deixo os meus sinceros agradecimentos para todos que contribuíram e me apoiaram para a conclusão do mesmo. Em especial, agradeço:

- a Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realizar, além do curso de graduação, um curso de Pós-Graduação, sendo por muito tempo minha segunda casa;

- ao meu orientador, Professor Dr. Sidinei José Lopes pela orientação e confiança, sempre presente e disposto a ajudar de forma humorada e tranquila, meu profundo respeito e admiração;

- ao Comitê de Orientação composto pelo professor Dr. Sidinei José Lopes, professora Dra. Solange Bosio Tedesco e a professora Dra. Jana Koefender, pelas orientações e apoio;

- aos professores Jorge Nadir Trevisan, Rogério Antônio Bellé, Rogério Luiz Backes, Alessandro Dal'Col Lúcio pelas conversas nos corredores, sanando dúvidas e incentivando a execução do trabalho;

- aos estagiários, colegas e amigos de pós-graduação que ajudaram na execução dos ensaios: Alessandra Manzoni Guedes, André Schoffel, Lucas Roani Ponte, Caren Alessandra Muller, Fabrício Fuzzer, Jéssica Machado e Ursulla Terra Bonumá, Iana Somavilla;

- aos acadêmicos e amigos do Setor de Experimentação Agrícola, Giovani Facco, Bruna Alves, Fernanda Simões, Jéssica Kleinpaul, André Lavezo, Rafael Pezzini, Cleiton Wartha, Cláudia Burin, Cláudia de Bem, Diego Follman, Daniela Lixinski, Daniela Uliana, e Gabriela Chaves, Bruno Sari;

- ao amigo e parceiro nos estudos, execução e conclusão do trabalho, presente em todas as etapas do mesmo, Fernando Machado Haesbaert;

- aos funcionários do Departamento de Fitotecnia, em especial ao João Colpo, dispostos na execução das atividades de campo.

Muito obrigado!

RESUMO

CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO, DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CALÊNDULA

AUTOR: Pedro Hernandez Padilha
ORIENTADOR: Sidinei José Lopes

A calêndula é uma espécie cultivada no sul do Brasil com importância medicinal, terapêutica e no incremento de renda dos agricultores. Os objetivos do trabalho foram: estimar os caracteres morfológicos altura do capítulo (cm), altura de planta (cm), número de folhas por planta e diâmetro do capítulo (cm) da haste principal, além dos caracteres produtivos massa seca (g planta^{-1}) e massa de sementes (g planta^{-1}); verificar a viabilidade da produção de sementes da espécie; averiguar a duração dos períodos de crescimento e desenvolvimento em épocas de cultivo; determinar tamanhos de amostra para estimação da média dos caracteres mencionados acima, com exceção da massa de sementes; investigar a variabilidade dos tamanhos de amostra entre os caracteres e épocas de avaliação e; avaliar o efeito genotóxico e antiproliferativo de infusões de calêndula sobre o sistema teste *in vivo* de *Allium cepa*. Conduziu-se um experimento em campo no delineamento blocos ao acaso com três fatores: épocas de cultivo (agosto/14, outubro/14 e abril/15), cultivares (Bonina Dobrada Sortida e Bon Bon Yellow) e sistemas de cultivo (semeadura direta e transplante de mudas), totalizando doze tratamentos. Os resultados indicaram maior ciclo, período de floração e crescimento na época abril/15. A cultivar Bonina Dobrada Sortida foi superior em qualquer combinação das épocas e sistemas de cultivo para o caractere altura de flor variando entre 26,84 cm e 39,76 cm. Plantas oriundas da semeadura direta mostraram superioridade para altura de flor na época abril/15, independente da cultivar. Esse sistema também foi superior para os caracteres altura de planta, número de folhas, massa seca e massa de sementes na época abril/15. Para altura de planta, número de folhas e massa seca nas épocas de cultivo agosto/14, outubro/14 e abril/15 a cultivar Bonina Dobrada Sortida apresentou as maiores médias. Em relação às épocas de cultivo, o caractere diâmetro do capítulo apresentou a maior média na época abril/15 com 6,82 cm. Dentre as cultivares a Bonina Dobrada Sortida diferiu da cultivar Bom Bon Yellow, apresentando 7,03 cm de média. As porcentagens de germinação das sementes colhidas das três épocas em estudo foram muito baixas para utilização pelo produtor. Os tamanhos de amostra foram bastante distintos entre os caracteres, sendo que para altura de plantas e número de folhas os valores foram semelhantes na avaliação realizada logo após o transplante e no florescimento das plantas. Verificaram-se tamanhos de amostra menores para caracteres morfológicos em relação ao produtivo massa seca. A avaliação de 190 plantas é suficiente para estimar a média dos caracteres avaliados para amplitude do intervalo de confiança de 95% com erro máximo de 20% da estimativa da média. As infusões oriundas de flores colhidas da época agosto/14 apresentaram efeito antiproliferativo, com redução do índice mitótico em relação aos controles para todas as infusões, não sendo possível determinar se existem efeitos genotóxicos.

Palavras-chave: *Calendula officinalis* L.. Estimação de caracteres. Reamostragem. Suficiência amostral. Infusões de calêndula.

ABSTRACT

GROWTH, DEVELOPMENT, SAMPLE DIMENSION AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF CALENDULA

AUTHOR: PEDRO HERNANDEZ PADILHA
ADVISOR: SIDINEI JOSÉ LOPES

Calendula is an important plant cultivated in southern Brazil with medicinal properties, therapeutic and for increasing farmers' income. The goals of the study were to estimate the morphological characters like flower height (cm), plant height (cm), number of leaves per plant and diameter of the flower head (cm) of the main stem, also the productive characters as dry mass (g plant⁻¹) and seed mass (g plant⁻¹); ascertain the viability of seed production for the species, the duration of growth periods and development in growing seasons; determine sample sizes for average estimation of the characters mentioned above, with the exception of the seed mass; check the variability of the sample sizes between the characters and evaluation periods and; evaluate the genotoxic and anti-proliferative effects of calendula infusions on the *in vivo* test system of *Allium cepa*. It was conducted a field experiment in a randomized block design with three factors which are: growing seasons (August/14, October/14 and April/15), cultivars (Bonina Dobra Sortida and Bon Bon Yellow) and cropping systems (direct seeding and transplanting seedlings), in a total of twelve treatments. The results indicate greater cycle, flowering period and growth to the period April/15. Cultivar Sortida was superior than Yellow for any combination of seasons and cropping systems for flower height character ranging between 26.84 cm to 39.76 cm. Plants originated by direct seeding demonstrated superiority for flower height for season April/15, regardless of the cultivar. This system was also higher for characters like plant height, leaf number, and dry mass and mass of seeds at the time April/15. For plant height, leaf number and dry weight of the plant growing seasons in August/14 October/14 and April/15 the variety Sortida had the highest averages. In relation to growing seasons, the flower head diameter character had the highest average in the period April/15 of 6.82 cm. Among the cultivars, Sortida differed from variety Yellow by showing 7.03 cm average. The germination percentages of the seeds harvested in three seasons under study were very low for use by the producer. Sample sizes were very different between the characters, and for plant height and number of leaves values were similar in the evaluation performed soon after transplanting and flowering plants. There were necessary smaller sample sizes for morphological characteristics in relation to dry mass production. Evaluation of 190 plants is enough to estimate the mean amplitude of the parameters evaluated for a 95% confidence interval with a maximum error of 20% of the mean estimate. Infusions derived from cut flowers of the season in August/14 showed antiproliferative effect, reducing the mitotic index compared to controls for all infusions, it is not possible to determine whether there are genotoxic effects.

Keywords: *Calendula officinalis* L.. Estimation of characters. Resampling. Sampling sufficiency. Infusion of calendula.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1 - Épocas de cultivo, datas de semeadura, do transplante, do início do florescimento e das colheitas das sementes para os doze tratamentos avaliados. Santa Maria, 2014/2015.....32
- Tabela 2 - Quadrados Médios (QM), média, coeficiente de variação da parcela principal (CV 1) e da subparcela (CV 2) da análise de variância (ANOVA) no delineamento blocos ao acaso no esquema trifatorial para épocas de cultivo (Fator A), cultivares (Fator D) e sistemas de cultivo (Fator E) (3x2x2) em parcelas subdivididas, para os caracteres analisados: altura do capítulo (AC) em cm, altura de planta (ALT) em cm, número de folhas (NF) por planta, massa seca (MS) em g planta⁻¹, massa de sementes (MSEM) em g planta⁻¹, diâmetro do capítulo (DC) em cm referente a haste principal e germinação (GERM) em porcentagem, para o teste em laboratório com ANOVA no delineamento inteiramente casualizado.....35
- Tabela 3 - Médias da altura do capítulo (AC), em cm, para cultivares de calêndula em épocas e sistemas de cultivo.....36
- Tabela 4 - Médias dos caracteres altura de planta (cm), número de folhas por planta, massa seca (g planta⁻¹) e massa de sementes (g planta⁻¹) para épocas de cultivo, sistemas de cultivo e cultivares de calêndula.....37

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 - Mínimo, média, máximo, desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) dos caracteres altura de planta (cm) e número de folhas por planta para a primeira avaliação realizada para as época 1, 2 e 3 respectivamente aos 51 dias após a semeadura (DAS) e 16 dias após o transplante, 55 DAS, 7 DAT e 46 DAS, 10 DAT em *Calendula officinalis* L.....55
- Tabela 2 - Mínimo, média, máximo, desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) dos caracteres altura do capítulo (cm), altura de planta (cm), número de folhas por planta, diâmetro do capítulo (cm) e massa seca (g planta⁻¹) para a segunda avaliação realizada para as épocas 1, 2 e 3 respectivamente aos 79 dias após a semeadura (DAS) e 44 dias após o transplante (DAT), 88 DAS, 40 DAT e 85 DAS, 48 DAT em *Calendula officinalis* L.....55
- Tabela 3 - Tamanhos de amostra, em número de plantas, para a primeira avaliação realizada para as época 1, 2 e 3 respectivamente aos 51 dias após a semeadura (DAS) e 16 dias após o transplante, 55 DAS, 7 DAT e 46 DAS, 10 DAT, com intervalo de confiança de 95% e erros de estimação máximos de 10%, 15% e 20% da estimativa da média, para estimação dos caracteres altura de planta (cm) e número de folhas de *Calendula officinalis* L.....56
- Tabela 4 - Tamanhos de amostra, em número de plantas, para a segunda avaliação realizada para as épocas 1, 2 e 3 respectivamente aos 79 dias após a semeadura (DAS) e 44 dias após o transplante (DAT), 88 DAS, 40 DAT e 85 DAS, 48 DAT, com intervalo de confiança de 95% e erros de estimação máximos de 10%, 15% e 20%

da estimativa da média, para estimação dos caracteres altura do capítulo (cm), altura de planta (cm), número de folhas, diâmetro do capítulo e massa seca de planta de <i>Calendula officinalis</i> L.....	57
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Número total de células analisadas (TC), de células em interfase (CI), de células na fase da divisão celular prófase (CP), em metáfase (CM), em anáfase (CA) e em telófase (CT) e o valor do índice mitótico (IM) das raízes emitidas a partir de bulbos de <i>Allium cepa</i> em contato com diferentes concentrações de infusões de <i>Calendula officinalis</i> L. e em contato com os controles.....	63
--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Decêndios das temperaturas médias e precipitação acumulada para as três épocas de cultivo, agosto/14 (Época 1), outubro/14 (Época 2) e abril/15 (Época 3) para as plantas de *Calendula officinalis* L.. UFSM, Santa Maria, RS. 2016.....33

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Decêndios das temperaturas médias e precipitação acumulada para as três épocas de cultivo, agosto/14 (Época 1), outubro/14 (Época 2) e abril/15 (Época 3) para as plantas de *Calendula officinalis* L.. UFSM, Santa Maria, RS. 2016.....58

Figura 2 - Valores de percentil 2,5%, média e percentil 97,5% das duas mil estimativas da média, obtidas por reamostragem com reposição, para massa seca de plantas para os tamanhos de amostra $n = 2, 7, 12, \dots, 800$ plantas, referente ao tratamento cinco (época outubro/14, cultivar Sortida, semeadura direta) com base nos dados da avaliação realizada aos 88 dias após a semeadura.....58

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Células de *Allium cepa* tratadas com diferentes concentrações de infusões de *Calendula officinalis* L. observadas com auxílio de microscópio óptico com objetiva 40x. A- Células em interfase observadas no tratamento 4. B - Células em interfase observadas no tratamento T5. C- Células em interfase observadas no tratamento 3.....64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>Calendula officinalis</i> L.	17
2.2 DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL	20
2.3 GENOTOXICIDADE E USO DO SISTEMA TESTE DE <i>Allium cepa</i>	22
3 CAPÍTULO I - CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO E VIABILIDADE DE PRODUÇÃO DE SEMENTES EM CULTIVARES DE CALÊNDULA L. SOB DIFERENTES ÉPOCAS E SISTEMAS DE CULTIVO	25
3.1 INTRODUÇÃO	26
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.4 CONCLUSÕES	40
3.5 REFERÊNCIAS.....	40
4 CAPÍTULO II - DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL PARA CARACTERES DE CULTIVARES DE CALÊNDULA EM DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO	44
4.1 INTRODUÇÃO	44
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.4 CONCLUSÕES	52
4.5 REFERÊNCIAS.....	52
5 CAPÍTULO III - AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA DE <i>Calendula officinalis</i> L. SOBRE O CICLO CELULAR DE <i>Allium cepa</i>	59
5.1 INTRODUÇÃO	59
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	61
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.4 CONCLUSÃO	66
5.5 REFERÊNCIAS.....	66
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÃO GERAL	72
8. REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO GERAL

A *Calendula officinalis* L. é uma planta medicinal, popularmente conhecida como calêndula, maravilha-do-jardim, margarida dourada, dentre outros nomes populares (SILVA JUNIOR, 2006). O cultivo é praticado em diversas partes do mundo sendo considerada potencialmente interessante para o sul do Brasil, devido suas condições climáticas favoráveis (SILVEIRA et al., 2002).

O cultivo de plantas medicinais é uma oportunidade de negócio para pequenos e grandes agricultores. O faturamento do mercado brasileiro de fitoterápicos no ano de 2014 foi de R\$ 1,1 bilhão de reais, o que representa 1,9% em unidades vendidas no mercado total de medicamentos (ANVISA, 2015). Dessa forma, esforços vêm sendo realizados com objetivo de expandir a produção dessas plantas no país. Uma das questões básicas na produção de plantas medicinais é a qualidade da matéria prima, que deve conter uma quantidade mínima aceitável de princípios ativos que dependem de fatores ambientais como: altitude, latitude, temperatura, duração do dia, disponibilidade de água e nutrientes (BRASIL, 2006).

No ano de 2010 o estado do Paraná era responsável por 90% da produção brasileira de plantas medicinais. O Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo correspondiam com o restante da produção, que é considerada uma alternativa de renda para o período do inverno, com baixo custo de produção e rendimentos elevados (BRASIL, 2010).

No caso da calêndula a espécie é utilizada na medicina popular como fitoterápico, no embelezamento de jardins como planta ornamental de forração ou de corte (CROMACK; SMITH, 1998), na indústria farmacêutica constituindo cosméticos para pele com efeito principalmente anti-inflamatório (BAUMANN, 2003). Já na indústria de tintas, o óleo é utilizado em formulações para acelerar o processo de secagem dos materiais e compor produtos industriais de fibra sintética (CROMACK; SMITH, 1998).

No ano de 2009, a calêndula foi listada como uma das 71 espécies vegetais de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS), publicado através do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde. A partir do reconhecimento oficial da espécie como medicamento fitoterápico fica clara a necessidade de pesquisas com a cultura em diferentes âmbitos. A orientação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) é que os aspectos agrônômicos básicos dessas plantas, como seleção do material genético, técnicas de cultivo e de colheita sejam estabelecidos.

Em alguns estudos já desenvolvidos é relatado que as épocas de cultivo de calêndula se estendem desde o outono até final do inverno (SILVA JUNIOR, 2006), porém há estudos que afirmam que a calêndula floresce quase todo ano, exceto se sofrer com períodos de estiagem prolongados (CORREA JÚNIOR et al., 1991). Os ciclos variam conforme a época de cultivo, sendo de aproximadamente quatro a cinco meses. Sabe-se que as plantas de calêndula apresentam grande variabilidade produzindo flores de cores, tamanhos, e composição fitoquímica variável (BERTONI et al., 2006). Os genótipos também exercem grande influência sobre a produção da calêndula (DUDA et al., 2010).

Muito cultivada no sul do Brasil para fins ornamentais (BARBOSA et al., 2010), a calêndula multiplica-se por sementes. Estas podem ser utilizadas sob dois sistemas de cultivo: semeadura direta no campo em canteiros, ou por semeadura em bandejas e posterior transplante de mudas (LUZ et al., 2001), que ocorre entre 35 e 45 dias quando essas possuem entre 4 e 6 folhas. Entretanto, questões relativas às diferenças no ciclo de crescimento e desenvolvimento entre épocas de cultivo, cultivares e sistemas de cultivo, não estão elucidadas.

Em relação ao dimensionamento amostral e planejamento de experimentos, o correto tamanho de amostra garante precisão na estimação dos parâmetros e confiabilidade nas conclusões (LÚCIO et al., 2003). Geralmente é comum que os experimentos utilizem avaliação de plantas dentro da unidade experimental. Os dados coletados em amostras da população e as estimativas calculadas passam a ser informações disponíveis para valores populacionais desconhecidos (FERREIRA, 2009), já que não é possível avaliar todo o experimento por questões de mão de obra, tempo e recursos financeiros (BUSSAB et al., 2003).

A técnica da reamostragem a partir do uso de intervalos de confiança é utilizada para dimensionar o tamanho de amostra para a média de uma população qualquer. Na ausência de conhecimentos sobre uma população, a distribuição de valores de uma amostra aleatória de tamanho “n” é a melhor orientação da distribuição da população. Ao reamostrar a própria amostra é possível aproximar o que acontece quando a população é reamostrada (FERREIRA, 2009).

Ao estabelecer o correto tamanho de amostra é esperado que este forneça informações confiáveis da população em estudo, do contrário, as conclusões podem ser distorcidas (PAGNANO; GAUVREAU, 2006).

O uso de plantas medicinais para a cura, prevenção ou mitigação de sintomas de doenças são comuns por grande parte da população, sendo em alguns casos a única fonte de tratamento de doenças (BRASIL, 2013). A principal forma de consumo é através de infusões ou decocções dessas plantas. Porém, ainda que o hábito de utilizar plantas medicinais seja crescente (GUERRA et al., 2010), a escassez de informação pode culminar no uso incorreto destas ervas, o que pode agravar a doença do paciente e até mesmo causar o surgimento de novas doenças devido a intoxicações (MACEDO et al., 2007).

Uma das principais razões para o uso das ervas é baseado na crença de que produtos de origem vegetal são isentos de reações adversas e efeitos tóxicos (GALLO; KOREN, 2001). Ainda assim, as pesquisas mostram que muitas plantas possuem substâncias potencialmente agressivas e, por isso, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (SAMPAIO et al., 2012).

Uma das possíveis formas de estudo para verificar os efeitos da ingestão de infusões, são testes realizados através do sistema vegetal de *Allium cepa* (cebola), introduzido por Levan (1938). O teste infere sobre o potencial citotóxico e genotóxico de extratos de plantas consumidas via infusões (CUCHIARA et al., 2012). Os resultados fornecem dois tipos de toxicidade: através de parâmetros macroscópicos via observação da formação de tumores ou via avaliação do tamanho de raízes, e através do índice mitótico (IM) para análise da taxa de divisão celular e aberrações cromossômicas (MONARCA et al., 2000). Para a calêndula, não foram encontrados estudos na literatura consultada que tratem a respeito dos efeitos das infusões sobre o ciclo celular de *Allium cepa*, ainda que o seu uso em diversas formas (infusões, emplastos) seja comum.

Considerando-se o acima exposto e visto a importância da calêndula o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e desenvolvimento da espécie em diferentes sistemas de cultivo e diferentes cultivares, bem como realizar o dimensionamento amostral para caracteres morfológicos e produtivos além de avaliar o efeito das infusões oriundas de inflorescências secas da espécie através do sistema teste de *Allium cepa*.

As hipóteses do estudo são: os sistemas de cultivo e as cultivares influenciam nos caracteres de crescimento e desenvolvimento da espécie; existe grande variabilidade nos tamanhos de amostra para os diferentes sistemas e cultivares e; as infusões de flores secas da espécie apresentam efeitos sob a divisão celular de células meristemáticas de *Allium cepa*.

Para isto, a presente dissertação está composta pelas seguintes partes: revisão bibliográfica e capítulos I, II e III descritos em forma de artigos científicos. A revisão

bibliográfica apresenta citações atualizadas que serviram de embasamento para a produção e discussão dos três capítulos.

O capítulo I refere-se ao estudo do efeito das diferentes épocas de cultivo, cultivares e sistema de cultivo sobre os principais caracteres morfológicos e produtivos, duração do ciclo e a viabilidade da produção de sementes. O capítulo II está formatado de acordo com a revista “Pesquisa Agropecuária Brasileira” e aborda a questão do dimensionamento amostral para os caracteres morfológicos e produtivos da cultura. Por fim o capítulo III está formatado de acordo com a revista “Caryologia” e avalia extratos na forma de infusões obtidos de inflorescências secas de calêndula sobre o ciclo celular de *Allium cepa*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Calendula officinalis* L.

Conhecida popularmente como calêndula, maravilha-do-jardim, malmequer, ou em inglês como *marigold*, a *Calendula officinalis* L. pertence à família *Asteraceae*, gênero *Calendula*. Várias origens são mencionadas para a espécie, Lorenzi e Matos (2008) consideram a Região Mediterrânea como a sua principal origem. Atualmente, a calêndula é considerada planta cosmopolita, sendo distribuída por quase todo o planeta e cultivada em várias partes do mundo, incluindo o Brasil (BERTONI et al., 2006).

A família *Asteraceae* possui o maior número de espécies entre as Angiospermas, contemplando aproximadamente 50.000 espécies divididas em 90 gêneros. O gênero *Calendula*, o qual está inserido a *Calendula officinalis* L., inclui 29 espécies (MOBOT, 2010).

Como características botânicas a calêndula apresenta raiz com forma cilíndrica e fasciculada (MARTINS et al., 2000), caule robusto e com abundante folhagem (CASTRO; CHEMALE, 1995), folhas simples, alternas, de coloração verde clara e flores reunidas em capítulos solitários e terminais (LORENZI; SOUZA, 2001). Pode haver no mesmo capítulo flores do mesmo sexo, unissexuais, bem como flores femininas e masculinas. No centro da inflorescência há flores hermafroditas, actinomorfas, unicamente destinadas à reprodução (SCHULTZ, 1990) as quais as abelhas são polinizadores efetivos (HOBOLD, 2009).

A calêndula é uma planta herbácea anual cuja altura varia de 25 a 65 cm, com inflorescências evidenciadas no ápice dos caules, diâmetro variando de 3 a 8,2 cm (DUDA et al., 2010) e flores de cores heterogêneas (SILVEIRA et al., 2002). A altura máxima média obtida foi de 34,02 cm aos 120 dias após o transplante, para calêndula proveniente de dois tipos de diásporos e duas colorações de capítulos florais (VIEIRA et al., 2006). Já Heitor et al. (2016) encontraram altura de 27,9 cm para plantas de calêndula inoculadas com fungos micorrízicos e adubadas com fósforo, as quais foram superiores em comparação com plantas sem fungos micorrízicos que alcançaram 19,8 cm.

As sementes de calêndula são frutos do tipo aquênios que se apresentam recurvadas e formam-se em flores liguladas, sendo que as tubuladas permanecem estéreis. Existem diferenças acentuadas na forma e tamanho dos aquênios em relação à posição da flor no capítulo (BERTONI, 1999) apesar disso verificou-se através de testes de germinação que não há diferença quanto ao ponto de maturidade fisiológica entre as sementes de maior e menor tamanho (SILVEIRA et al., 2002). Os diásporos de calêndula são classificados em alados (0,9

cm de comprimento), naviculares (1,0 cm), orbicular alado (0,5 cm) e orbicular (0,4 cm) (BERTONI, 1999).

Sementes de plantas medicinais de anis (*Pimpinella anisum* L.), funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.), losna (*Artemisia absinthium* L.), melissa (*Melissa officinalis* L.) e hortelã (*Mentha piperita* L.) apresentaram baixa porcentagem de germinação sendo abaixo do indicado nas embalagens, não representando o verdadeiro potencial de germinação (MENEGHELLO et al., 2002). A análise sanitária e da germinação de sementes de *Calendula officinalis* L. obtidas de empresa certificada demonstraram baixíssimo percentual de germinação (apenas 10%) e a presença de fungos de diferentes gêneros. A imersão em solução de hipoclorito de sódio à 2,5% por 30 minutos aliada à remoção do tegumento foi eficiente para desinfestação superficial das sementes, promovendo a germinação *in vitro* em porcentagem aceitável (BEVILACQUA, 2009).

A calêndula é cultivada na região Sul do país, devido às condições ambientais favoráveis e a composição química obtida nas plantas, que se assemelha a de plantas cultivadas na região francesa de Massif Central (GAZIM et al., 2007). Aliado a isto, o fator cultural também influenciou a expansão do cultivo de calêndula, que hoje vem sendo efetuado em escala comercial. A espécie é vista como potencial para incremento de renda e diversidade da produção, principalmente em pequenas propriedades onde a inserção do cultivo de plantas medicinais mostra-se em gradativa expansão (BORBA et al., 2012).

Cultivada desde a antiguidade, existem inúmeras variedades que se diferenciam principalmente pelo tamanho e cor da corola (LUZ et al., 2001), produzindo sementes de diferentes tamanhos e formas (SILVEIRA et al., 2002). Estas variações se refletem durante o crescimento da calêndula, comprometendo a qualidade da matéria prima de fitoterápicos e cosméticos (BERTONI et al., 2006). Raal e Kirsipuu (2011) avaliaram quatro variedades locais (Estônia) e dezesseis variedades importadas, e concluíram que o teor de flavonóides totais depende da variedade, do local e do tempo de cultivo, não havendo nenhuma relação clara entre a cor de inflorescências e o teor de flavonóides totais para a espécie.

No que diz respeito às questões de cultivo, a época preferencial é o inverno, porém, a espécie desenvolve-se durante todo o ano. A calêndula é resistente a geadas leves, mas sensível à deficiência de água. A suspensão da irrigação afetou as trocas gasosas das plantas após seis dias de interrupção, mas não provocou diminuição no teor de flavonóides totais das inflorescências (PACHECO et al., 2011).

As épocas de semeadura tardias com temperatura do ar elevadas causam efeito deletério no crescimento da calêndula, afetando a produção de flores e das sementes. Ainda que a espécie seja resistente a curtos períodos de deficiência hídrica no início do florescimento (KOEENDER, 2008), a utilização de irrigação suplementar no pré-florescimento induziu a maior quantidade de flores (MARQUES et al., 2011).

Alguns estudos relacionados à questão do crescimento e desenvolvimento da calêndula evidenciam variações relativamente grandes nos períodos de emergência ao início do florescimento, e da emergência a maturação das sementes. Angelini et al. (1997) semearam acessos de calêndula em campo durante quatro anos na Itália e observaram variações de até 42 dias (17 a 59 dias) entre a emergência e o início do florescimento e de 52 dias (98 a 150) entre emergência e maturação das sementes para o período estudado. Na Inglaterra, para calêndula cultivada em abril, a variação de dias para o início do florescimento foi menor variando de 63 a 75 dias entre os nove acessos utilizados.

Os períodos de colheita, estabelecidos com a finalidade de que ocorra a máxima produtividade de flores e teor de flavonóides, devem ocorrer a cada três dias já que coletas diárias são inviáveis de serem realizadas pelos produtores. Apesar de serem encontrados trabalhos que visam aumentar o teor de flavonóides, plantas que não receberam qualquer tipo de tratamento ou adubação extra apresentam quantidades satisfatórias deste metabólito (HONÓRIO, 2013). A utilização do produto Stimulate através de pulverizações foliares promoveu o melhor desenvolvimento da espécie em altura, massa seca, número de folhas e teor de flavonóides das flores, sendo mais eficiente nas doses de 6 e 9 ml l⁻¹ do produto (MACHADO, 2012)

Em relação às diversas utilizações, a espécie é considerada terapêutica, fazendo parte da composição de cosméticos por possuir substâncias farmacologicamente ativas como saponinas, flavonóides, triterpenos, óleos essenciais, hidrocarbonetos e ácidos graxos (BILIA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2004). Kishimoto et al. (2005) identificou dezenove tipos de carotenóides em seis cultivares de calêndula. Os carotenóides apresentam possivelmente atuação em tratamentos quimiopreventivos de câncer assim como ação antioxidante com mecanismos de ação ainda não totalmente conhecidos (CARDOSO, 1997).

O extrato aquoso de calêndula, irradiado com comprimento de onda de 650 nm, demonstrou capacidade de inibição *in vitro* e *in vivo* de células cancerosas derivadas de tumores humanos, alcançando 100% de inibição do crescimento em alguns casos (JIMÉNEZ-MEDINA et al., 2006). Ainda, o extrato alcoólico preparado via infusão a partir de 50 g de

capítulos desidratados adicionados em 500 ml de água fervente apresentou a capacidade de indução de fitoalexinas em cotilédones de soja, estímulo na produção de flavonóides sem prejuízo nos parâmetros de qualidade físico-químicos em pós-colheita de morangos, além de reduzir o crescimento do fungo *Botrytis cinera in vitro* (MAZARO et al., 2013).

A atividade cicatrizante da calêndula está associada ao seu efeito sobre a angiogênese, isto é, o mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de outros já existentes, comprovado pelo tratamento de feridas cutâneas e de membrana em ratos (PARENTE et al., 2011). A espécie também possui atividade antimicrobiana, sendo utilizada no tratamento de doenças infecciosas contra microrganismos. Os extratos da folha, raiz e flor causaram a inibição do crescimento dos organismos *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Agrobacterium tumefaciens* (BISSA; BOHRA, 2011).

Outras propriedades terapêuticas da calêndula são as ações antisséptica, antiviral, tonificante da pele e principalmente anti-inflamatória (GIL et al., 2000; DELLA-LOGGIA et al., 1994). Ainda, a tintura, emplastos ou pomadas a base de calêndula são utilizadas externamente para o tratamento de feridas e infecções de pele (LUZ et al., 2001). De forma geral o uso da calêndula para inflamações dermatológicas como varizes, úlceras, ferimentos superficiais e queimaduras é seguro (CARVALHO et al., 2005).

2.2 DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL

Em experimentos diversos fatores são limitantes na avaliação de uma grande quantidade de informações. Entre eles os principais são a disponibilidade de tempo, mão de obra e recursos financeiros (BUSSAB et al., 2003). O tamanho de amostra em experimentação agrícola é uma das principais questões a ser definida pelos pesquisadores, sendo que a sua determinação irá depender do grau de precisão desejado e da homogeneidade da população (CAMPOS, 1985).

O tamanho de amostra é diretamente proporcional à variabilidade dos dados e ao grau de confiança desejado na estimativa e inversamente proporcional ao erro de estimação permitido (BUSSAB; MORETTIN, 2012). A avaliação de plantas dentro da unidade experimental ou parcela, chamada de amostragem, é uma alternativa quando não é possível avaliar todos os indivíduos do experimento. A amostragem é uma técnica utilizada no estudo de populações devido ao menor custo e rapidez na obtenção e análise dos dados (BRAGA, 1986).

As variações decorrentes de unidades experimentais que receberam um mesmo tratamento geram o erro experimental e este deve ser o menor possível. Ao planejar um experimento o pesquisador deve dimensionar o correto tamanho de amostra dentro da parcela, assim como o número de repetições (STORCK et al., 2011). Diversos fatores causam interferência nessas definições, como a genética do material, o ambiente (MARTIN et al., 2005), o tipo de solo (RESENDE; SOUZA JÚNIOR, 1997), e a disponibilidade de recursos já supracitado.

Neste contexto, alguns estudos vêm sendo realizados para a definição de tamanhos de amostra em diferentes culturas. Em aveia preta buscou-se determinar o número de plantas necessário para estimação da média de caracteres morfológicos e produtivos, verificando que o tamanho de amostra dos caracteres produtivos foi maior que o dos morfológicos sendo 47 plantas suficientes para estimar a média desses caracteres, com um erro de estimação máximo de 20% da média com grau de confiança de 95% (CARGNELUTTI FILHO et al., 2015). Em nabo forrageiro Cargnelutti Filho et al. (2014) determinaram que 231 plantas são suficientes para estimativa da média de caracteres produtivos e morfológicos para um erro de estimação máximo de 10% da média. Para a cultura do pimentão, os tamanhos de amostra em experimentos realizados em diferentes épocas sob estufa plástica, para a estação sazonal verão-outono e inverno-primavera, são necessárias respectivamente, 28 e 35 plantas utilizando-se uma semi-amplitude do intervalo de confiança de 20% da média com grau de confiança de 95% (LÚCIO et al., 2003).

Estudos neste sentido são importantes para auxiliarem pesquisas futuras com plantas medicinais, já que a amostragem realizada fornecerá uma representação precisa da população como um todo, pois caso contrário, as conclusões podem ser viesadas (PAGANO; GAUVREAU, 2006). Uma das formas de definição de tamanhos de amostra é o uso de intervalos de confiança obtidos por reamostragem. Essa técnica apresenta como vantagem o fato de que não é preciso conhecer a distribuição de probabilidade dos dados (FERREIRA, 2009). Tal procedimento vem sendo empregada no dimensionamento amostral de diferentes culturas.

Dentre os estudos, destaca-se o de Leite et al. (2009) em que a determinação do número de plantas para a avaliação de famílias de irmãos completos em cana-de-açúcar concluiu que o método da reamostragem permite uma comparação eficiente dos efeitos do tamanho de amostra na estimação de parâmetros genéticos e fenotípicos.

A reamostragem foi empregada ainda para estimar o coeficiente de correlação linear de Pearson entre caracteres de milho (TOEBE et al., 2015), assim como a estimação da média do comprimento, do diâmetro maior e menor e da massa de sementes de feijão de porco e mucuna cinza (CARGNELUTTI FILHO et al., 2012). Para a cultura do tremoço branco (*Lupinus albus* L.) foram determinados os tamanhos de amostra necessários para estimação da média e da mediana de caracteres morfológicos (altura de planta e diâmetro do colmo) e produtivos (número de vagens, massa verde e seca de vagens, massa verde e seca da parte aérea com e sem vagens) indicando que 81 plantas são necessárias para estimação da média desses caracteres com amplitude do intervalo de confiança de 95% igual a 25% da estimativa da média (BURIN et al., 2014).

2.3 GENOTOXICIDADE E USO DO SISTEMA TESTE DE *Allium cepa*

A genotoxicidade visa o estudo dos processos que alteram a base genética do DNA, processo conceituado como mutagênese, ou que alteram a determinação genética a níveis celulares identificados como carcinogênese (SILVA et al., 2003). Algumas técnicas são utilizadas para detectar danos ou lesões gênicas no DNA causados por substâncias com atividade genotóxica (TICE et al., 2000). Entre elas estão o teste cometa descrito por Singh et al. (1998) em que células são analisadas e classificadas em diferentes graus de lesões (HARTMANN et al., 2003) e os testes a partir do cultivo direto de raízes de bulbos de *Allium cepa* (cebola) em contato com soluções preparadas com substâncias químicas, amostras de águas naturais, infusões de plantas, entre outras.

A introdução do sistema-teste *Allium cepa* ocorreu em 1938 por Levan (1938) e posteriormente foi proposto como um método padrão para testar químicos (NIELSEN; RANK, 1994). O *Allium cepa* vem sendo utilizado em pesquisas com ensaios toxicológicos através da avaliação de alteração de cor, tamanho, deformidade e formato das raízes (LONGHIN, 2008). É possível também avaliar anormalidades cromossômicas, índice mitótico, formação de micronúcleos e anormalidades nucleares sendo considerado um eficiente organismo teste de citotoxicidade e genotoxicidade (GRIPPA et al., 2010).

O teste que utiliza partes meristemáticas de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999) sendo eficiente devido à rápida proliferação e crescimento das raízes, ao grande número de células em divisão e por que a cebola possui cromossomos

em número reduzido e de grande tamanho (GROVER; KAUR, 1999). Além disso, o ensaio apresenta outras vantagens como o baixo custo, fácil manipulação, e a disponibilidade do material o ano todo (PAULA et al., 2015).

Estudos vêm sendo realizados com uso desse teste em diversas áreas como, por exemplo, na avaliação mutagênica de agentes químicos como os pesticidas, amplamente utilizados na agricultura moderna, para dessecação de lavouras como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) e a trifluralina (FERNANDES et al., 2007) e no controle de pragas através do inseticida fipronil (PEDRO, 2008). O teste também é utilizado em estudos de monitoramento ambiental para verificar possíveis contaminantes de origem industrial no leito de rios (BRAGA; LOPES, 2015), na água de bacias (AMARAL et al., 2007) e contaminantes de solo (WHITE; CLAXTON, 2004).

Em relação ao uso do teste para verificação de genotoxicidade de infusões oriundas de plantas medicinais, este apresenta-se como bioindicador ideal para rastreamento da genotoxicidade de infusões devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999), auxiliando estudos de prevenção de danos à saúde humana. O uso do sistema teste é apontado com grande relevância para avaliação de danos causados ao DNA através de diferentes agentes ou compostos químicos (BAGATINI et al., 2007).

O extrato de espécies medicinais como *Polygonum punctatum* (erva-de-bicho) (PASTORI et al., 2015), *Maytenus ilicifolia* Mart. (espinhadeira-santa), *Bauhinia candicans* Benth (pata-de-vaca) (CAMPAROTO et al., 2002) e *Prunus myrtifolia* (pessegueiro-do-mato) (TRAPP et al., 2015) utilizaram-se desse sistema teste para apontar efeitos como mutagenicidade e anti-mutagenicidade, bem como aumento ou diminuição da proliferação celular de raízes da cebola em contato com o extrato dessas plantas. Os resultados são úteis para alertar a população para o risco do consumo, no caso de extratos com a presença de substâncias genotóxicas, ou para indicar que essas infusões não contêm substâncias nocivas. Um estudo de Camparoto et al. (2002), por exemplo, indicou a continuidade do uso das infusões de *Maytenus ilicifolia* Mart. e *Bauhinia candicans* Benth desde que sejam respeitados o método de preparação e a concentração dos chás.

A grande diversidade genética vegetal mundial sugere que as espécies podem apresentar qualidades, porém devem ser vistas com cuidado por parte dos usuários. Isto por que muitas plantas podem apresentar efeitos citotóxicos, isto é, substâncias nocivas em sua composição que podem prejudicar células, ou efeitos genotóxicos, causados por substâncias

com a capacidade de interagir e causar danos ao DNA, sendo potenciais agentes mutagênicos ou cancerígenos. Estes efeitos podem ser testados *in vivo* utilizando as raízes de *Allium cepa* (EL-SHAHABY et al., 2003) e produzem resultados semelhantes aos de ensaios *in vivo* em animais (TEIXEIRA et al., 2003).

Ainda assim, apenas uma pequena parte das plantas medicinais (15 – 17%) foi investigada cientificamente (CALIXTO, 2005). De forma contrastante a esse dado, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), grande parte da população mundial (mais de cinco bilhões de pessoas) depende única e exclusivamente de medicamentos oriundos de plantas medicinais para o tratamento de doenças, principalmente em países de baixa renda. Na produção de medicamentos tradicionais, alta porcentagem destes envolve o uso de extratos vegetais em sua composição (FRANSWORTH, 1988).

Para *Calendula officinalis* L., testes *in vivo* a partir do extrato de flores frescas contendo componentes ativos fornecidos a ratos e testes *in vitro* a partir de diferentes técnicas, determinaram que a espécie possui alta capacidade de eliminação de radicais livres com resultados superiores ao do extrato de gengibre (PREETHI et al., 2006).

3 CAPÍTULO I - CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO E VIABILIDADE DA PRODUÇÃO DE SEMENTES DE CALÊNDULA SOB DIFERENTES ÉPOCAS E SISTEMAS DE CULTIVO

Resumo – Os objetivos deste trabalho foram estimar os caracteres morfológicos e produtivos da calêndula cultivada em campo, a duração do ciclo e avaliar a produção das sementes. Para isto foi conduzido um experimento trifatorial em blocos ao acaso com parcelas subdivididas, sendo composto por três épocas de cultivo (agosto/14, outubro/14 e abril/15), duas cultivares (Bonina Dobrada Sortida e Bon Bon Yellow) e dois sistemas de cultivo (semeadura direta e transplante de mudas). Os caracteres estimados foram: altura do capítulo (cm), altura de planta (cm), número de folhas por planta, diâmetro do capítulo da haste principal (cm) massa seca de planta (g) e massa de sementes por planta (g). A duração do ciclo desde a emergência até a colheita das plantas variou de 79 a 175 dias para as três épocas. A altura do capítulo foi superior para a cultivar Sortida para todas as épocas e sistemas de cultivo. Na época abril/15 a semeadura direta proporcionou maiores médias para altura de planta (20,30 cm), número de folhas (114,44 folhas) e massa de sementes (1,77 g planta⁻¹). A cultivar Sortida demonstrou superioridade para os caracteres altura de planta, número de folhas e massa de sementes nas três épocas de cultivo. A maior média para diâmetro do capítulo (7,03 cm) e massa de sementes (1,28 g planta⁻¹) ocorreu na cultivar Sortida. A época abril/15 apresentou média de 6,82 cm para o caractere diâmetro do capítulo. A porcentagem de germinação das sementes colhidas foi influenciada pelas épocas e cultivares.

Palavras-chave: *Calendula officinalis* L.. Altura do capítulo. Diâmetro do capítulo. Germinação.

Abstract - The purposes of this study were to estimate the morphological and productive characters of calendula cultivated field, cycle time and evaluate the production of seeds. For this, was conducted a three-factor experiment in a randomized block design with subdivided plot, consisting of three growing seasons (August / 14 October/14 and April/15), two cultivars (Bonina Dobrada Sortida and Bon Bon Yellow) and two cropping systems (direct sowing and transplanting of seedlings). Estimated characters were: Flower height (cm), plant height (cm), number of leaves per plant, diameter section of the main stem (cm) plant dry mass (g) and weight of seeds per plant (g). The cycle time from emergence to harvest the plants ranged 79-175 days for the three seasons. The height flower was superior to variety Sortida for all seasons and cropping systems. At the time April/15 direct sowing resulted in higher average for plant height (20.30 cm), number of leaves (114.44 leaves) and seed mass (1.77 g plant⁻¹). Variety Sortida demonstrated superiority for the characters plant height, leaf number and weight of seeds in the three growing seasons. The highest average for head diameter (7.03 cm) and seed mass (1.28 g plant⁻¹) occurred in cultivating Sortida. The time April/15 had average of 6.82 cm for head diameter. The percentage of germination of seeds harvested was influenced by the seasons and cultivars.

Keywords: *Calendula officinalis* L.. Flower height. Flower head diameter. Germination.

3.1 INTRODUÇÃO

A *Calendula officinalis* L. é uma espécie empregada para muitos fins e amplamente utilizada como medicinal com efeitos anti-inflamatório e cicatrizante (PARENTE et al., 2009), sendo o seu uso regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em uma lista com o registro de diversos fitoterápicos (BRASIL, 2004).

Outra utilização se dá especialmente como ornamental, podendo ser também utilizada como flor de corte em campo ou em vasos com flores que vão desde o amarelo até o laranja (CORREA JÚNIOR et al., 1991). As inflorescências são reunidas em capítulos terminais solitários (LORENZI; SOUZA, 2001), sendo essa a parte mais utilizada para fins medicinais (GAZIM et al., 2007), além do caule e folhas secas (SILVA JUNIOR, 2006).

Pertencente à família *Asteraceae*, a calêndula é originária da região Mediterrânea (LORENZI; MATOS, 2008) e vem sendo cultivada no sul do Brasil devido às condições climáticas de temperatura e precipitação favoráveis (SILVEIRA et al., 2002). Tem alcançado diferentes mercados em decorrência da diversidade de seus usos e a possibilidade de incremento de renda para agricultura familiar (BORBA et al., 2012) desde que se conheçam as exigências para produção e comercialização de espécies medicinais (LOURENZANI et al., 2004).

A utilização de plantas medicinais cresceu no Brasil à medida que programas oficiais de saúde disponibilizaram informações quanto ao consumo dessas ervas além de incentivarem a produção e seleção de materiais aptos para obtenção de produtos de qualidade. Dentre essas plantas, a calêndula é listada como uma espécie vegetal de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS), evidenciando a importância de pesquisas para o aprimoramento de conhecimentos básicos quanto à espécie (SANTOS et al., 2011).

O estudo da interação de fatores é importante para elucidar diferenças de crescimento e desenvolvimento que auxiliam no entendimento e aprimoramento de práticas culturais. Alguns desses fatores estão relacionados ao comportamento de espécies em diferentes épocas de semeadura, a exemplo de alguns estudos realizados para culturas anuais como soja (BARBOSA et al., 2011) e milho (PINOTTI et al., 2014).

Ainda, outros fatores alteram características de crescimento das plantas como as cultivares (DUDA et al., 2010) e os diferentes sistemas de cultivo utilizados (semeadura direta, transplante de mudas) (TIVELLI et al., 2009). Para espécies com menor representatividade em área cultivada, sobretudo as plantas medicinais, existem poucas

informações quanto às diferenças e, assim, estudos sobre o cultivo e domesticação dessas devem ser conduzidos (CORRÊA JUNIOR et al., 1991)

Para *Calendula officinalis* L., alguns estudos quanto à fenologia foram desenvolvidos, porém os resultados são bastante distintos. Berti et al. (2003) realizaram um estudo no Chile onde foi avaliado o efeito da época de semeadura e diferentes cultivares sobre o rendimento de capítulos secos. No primeiro ano, a semeadura de julho apresentou maior rendimento (1300 kg de flores secas ha⁻¹) enquanto no segundo ano, os maiores rendimentos foram obtidos em outubro com rendimento de 4042 kg ha⁻¹. Já Barboza et al. (2009) obteve a produção máxima de capítulos florais secos de 2227,61 kg ha⁻¹ ao utilizar 39,62 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 8109,75 kg ha⁻¹ de cama-de-frango semidecomposta.

Em relação à duração do ciclo da cultura e a necessidade de dias para os períodos emergência ao florescimento e emergência a maturação, Angelini et al. (1997) realizaram um estudo na Itália com acessos de calêndula semeados em casa de vegetação e posteriormente transplantados para o campo em março dos anos de 1992 a 1995. A variação do período emergência até abertura da primeira flor foi de 17 a 59 dias, e do período emergência a colheita foi de 98 a 150 dias, em média para todos os anos. Já Cromack e Smith (1998) verificaram que o cultivo de calêndula na Inglaterra, semeada em meados de abril apresentou uma variação entre diferentes acessos quanto ao início da floração de 63 a 75 dias, variação menor que aquele encontrado por Angelini et al. (1997).

Koefender et al. (2008) ao estimarem o filocrono (intervalo de tempo entre o aparecimento de duas folhas sucessivas na haste principal em °C dia folha⁻¹) em plantas de calêndula cultivadas em diferentes épocas de semeadura, constataram que esse é influenciado pelas épocas, as quais interferiram no número de folhas na haste principal e na primeira haste lateral.

Dessa maneira, percebe-se que a época de semeadura é um fator capaz de influenciar fortemente o crescimento e o desenvolvimento da calêndula. Uma vez que as condições climáticas de cada local apresentam diferenças de radiação solar, temperatura do ar e precipitação, fatores estes que resultam em comportamentos distintos para as cultivares quanto à adaptação, potencial de rendimento e possíveis problemas fitossanitários.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi determinar a relação entre diferentes épocas de cultivo, cultivares e sistemas de cultivo com a duração do ciclo de desenvolvimento da cultura, bem como estimar os principais caracteres morfológicos e produtivos e verificar a viabilidade da produção de sementes de *Calendula officinalis* L.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em campo no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM no município de Santa Maria, sob as coordenadas 29° 43' 23'' S, 53° 43' 15'' W e altitude de 95 m. A área pertence à região da Depressão Central do Rio Grande do Sul e o clima é do tipo fundamental Cfa subtropical úmido, conforme classificação de Köppen (ALVARES et al., 2014). A análise química indicou os seguintes valores: pH em água (1:1) = 5,8; matéria orgânica = 3,2%; P = 12,6 mg dm⁻³; K = 112 mg dm⁻³; Ca = 99 mmol_c dm⁻³; Mg = 36 mmol_c dm⁻³; H + Al = 55 mmol_c dm⁻³; Soma de Bases = 137,86 mmol_c dm⁻³; CTC efetiva = 138 mmol_c dm⁻³; Saturação Bases = 71,5%.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com três fatores (épocas de cultivo “fator A”, cultivares “fator D” e sistemas de cultivo “fator E”) e cinco repetições, em parcelas subdivididas. As épocas de cultivo foram: agosto/14 (época 1), outubro/14 (época 2) e abril/15 (época 3). As cultivares utilizadas foram: Bonina Dobrada Sortida (cultivar 1) importada pela empresa ISLA Sementes® Ltda e a cultivar Bon Bon Yellow (cultivar 2) importada pela empresa DM Sementes e Mudas® Ltda. Os sistemas de cultivo foram: Semeadura direta (sistema 1) e transplante de mudas (sistema 2). As épocas de cultivo constituirão a parcela principal (PP) e a combinação das cultivares e sistemas de cultivo as subparcelas (SP), casualizadas dentro de cada uma das épocas, resultando em doze tratamentos.

Os blocos foram constituídos por quatro canteiros de 2,25 m de comprimento por 1 m de largura, onde cada canteiro recebeu um tratamento. Para o sistema 1 as cultivares Sortida e Yellow foram semeadas, respectivamente, nos espaçamentos de 0,3 m x 0,3 m e 0,2 m x 0,2 m (entre plantas x entre linhas) conforme as recomendações dos fabricantes. Nos canteiros foram semeadas três linhas, sendo a parcela útil composta de dez plantas por parcela marcadas aleatoriamente após a emergência e estabelecimento das plantas.

A área para o cultivo foi preparada de maneira mecanizada, através de aração e gradagem, com posterior confecção de canteiros por meio de encanteiradora mecânica, resultando em canteiros de 10 cm de altura. O cultivo em canteiros teve como objetivo evitar acúmulo de água e melhorar o escoamento na ocorrência de elevadas precipitações. O controle de plantas daninhas foi realizado com auxílio de enxadas e a umidade do solo mantida através de irrigações por aspersão sempre que necessário. Não houve necessidade de controle fitossanitário por não ter ocorrido incidência significativa de doenças e pragas.

Para a semeadura direta, sistema 1, foram utilizadas duas a três sementes por cova, semeadas manualmente em profundidade de 2 a 3 cm (MONTANARI JÚNIOR, 2000). Para o sistema 2, na produção das mudas também foram utilizadas duas a três sementes por alvéolo em bandejas de isopor com 128 células utilizando o substrato comercial Mec Plant®.

Depois de semeadas, as bandejas foram acondicionadas em estufa plástica, com irrigações controladas através de aspersores com “timer” programado para três irrigações diárias, às 9, 13 e 16 horas, com duração de um minuto cada. Em períodos em que houve precipitações contínuas durante 24 horas, ajustou-se para duas irrigações diárias. Foi realizado desbaste no campo e nas bandejas uma semana após o início da emergência, deixando-se uma plântula. As mudas foram transplantadas para o campo quando apresentavam entre quatro e seis folhas totalmente desenvolvidas, sendo essas folhas maiores que 2,5 cm sem contato com o caule.

As adubações foram realizadas de acordo com o resultado da análise do solo e seguiram as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Comissão de Química e Fertilidade do Solo do Núcleo Regional Sul (SBCS/CQFS/NRSUL, 2004) para a cultura da *Calendula officinalis* L.. A adubação de base foi realizada aos 10 dias após a semeadura, para as plantas do sistema 1, utilizando 200 kg ha⁻¹ da fórmula comercial 5-20-20 (N-P₂O₅-K₂O). As adubações realizadas para plantas do sistema 2 iniciaram nas bandejas que receberam duas fertirrigações, aos 7 e 28 dias após a semeadura. Foi aplicado um litro de água com 1,5 g do adubo Krista K 12-00-45 por bandeja em cada um dos períodos. Após dez dias do transplante, a adubação foi a mesma do sistema 1.

Os caracteres avaliados foram: altura de plantas (AP) em centímetros, medidos com régua milimétrica, tendo como base o solo e ápice a última folha totalmente expandida da haste principal; altura do capítulo floral (AC) em centímetros, referente à flor da haste principal, tendo como base o solo e o ápice a parte mais alta da flor totalmente aberta; número de folhas (NF) totalmente expandidas maiores que 2,5 cm por planta; diâmetro do capítulo (DC) em centímetros referente a haste principal medido com auxílio de paquímetro; massa das sementes (MSEM) em gramas por planta após a limpeza manual dos capítulos colhidos e a massa seca de plantas (MS) em gramas, obtida após secagem em estufa de circulação forçada à 60°C até atingir massa constante.

As avaliações foram realizadas em diferentes períodos conforme o desenvolvimento da cultura. Para AP e AC, as medições ocorreram no momento em que 100% das plantas da parcela útil apresentavam capítulos abertos. O NF foi contabilizado quando aproximadamente 50% das plantas apresentavam pelo menos um capítulo aberto. Para DC, as medições foram

realizadas quando o capítulo da haste principal se abriu completamente, ocorrido entre a sexta e sétima semana para época agosto/14, quarta e sexta semana para a época outubro/14 e oitava e décima semana para a época abril/15.

As colheitas das sementes foram realizadas em dois momentos para cada uma das épocas de cultivo. A primeira colheita foi realizada em torno de 30 dias após 50% dos botões florais apresentarem-se em antese, considerando aquelas inflorescências que apresentavam sementes nas colorações creme, marrom claro e marrom escuro. A segunda colheita ocorreu após ser verificada a modificação de cor da maioria das sementes dos capítulos restantes que não foram colhidos na primeira por apresentar sementes verdes. Conforme Silveira et al. (2002) a maturidade fisiológica ocorre entre 28 e 32 dias após a antese, e a colheita das sementes pode ser feita com base em características visuais como modificação da coloração de verde para creme. A colheita da parte aérea das plantas foi efetuada logo após a colheita das sementes.

Os dados meteorológicos foram obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), através do download dos dados da estação automática pertencente ao 8º Distrito de Meteorologia localizada na UFSM em Santa Maria, código A803, o qual informa hora a hora os valores de temperatura instantânea (°C) e precipitação (mm). Calculou-se a temperatura média diária do ar através da média aritmética dos 24 valores da temperatura instantânea para posteriormente calcular a temperatura média de cada época de cultivo, além da precipitação acumulada através do somatório dos dados de precipitação horária. A estação fica à aproximadamente 50 m do local onde foi conduzido o experimento.

Para avaliar o percentual germinativo das sementes colhidas foi conduzido um experimento em laboratório. Para este, as sementes colhidas em campo foram armazenadas em papel Kraft em local fechado, arejado e no escuro e posteriormente levadas ao Laboratório Didático de Pesquisa em Sementes, do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria – RS.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado considerando os doze tratamentos resultantes do trifatorial em parcela subdividida descrito anteriormente. O teste de germinação foi realizado segundo a Regra de Análise de Sementes (BRASIL, 2009), em que se utilizou quatro amostras de 50 sementes, para cada tratamento, sobre duas folhas umedecidas com 2,5 vezes a massa do papel, em caixas “gerbox”. As sementes foram levadas ao germinador e mantidas em temperatura de 20°C ausente de fotoperíodo, sendo as avaliações realizados aos 7 e 14 dias.

A análise de variância para os dados de campo foi realizada conforme o modelo matemático do delineamento blocos ao acaso com arranjo trifatorial em parcelas subdivididas $Y_{ijk} = m + B_l + A_i + \text{Erro1}(B_l * A_i) + D_j + E_k + (AD)_{ij} + (AE)_{ik} + (DE)_{jk} + (ADE)_{ijk} + \text{Erro2}_{ijkl}$ em que: Y_{ijk} é o valor observado em cada unidade experimental que recebeu o nível i do fator A, j do fator D, k do fator E; m é a média geral do experimento; B_l é o efeito aleatório do bloco; A_i é o efeito do nível i do fator A; $\text{Erro1}(B_l * A_i)$ é o efeito aleatório do erro da parcela principal; D_j é o efeito do nível j do fator D; E_k é o efeito do nível k do fator E; $(AD)_{ij}$ é o efeito da interação do nível i do fator A com o nível j do fator D; $(AE)_{ik}$ é o efeito da interação do nível i do fator A com o nível k do fator E; $(DE)_{jk}$ é o efeito da interação do nível j do fator D com o nível k do fator E; $(ADE)_{ijk}$ é o efeito da interação do nível i do fator A com o nível j do fator D com o nível k do fator E; Erro2_{ijk} é o efeito aleatório do erro da subparcela.

Os erros experimentais foram testados quanto à normalidade de sua distribuição através do teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias através do teste de Bartlett, com auxílio do programa Action (ESTATCAMP, 2011). Posteriormente, procedeu-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Scott-Knott para comparação das médias, em 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa estatístico Sisvar® (FERREIRA, 1998).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os erros das experimentais referentes aos caracteres AC, ALT e MS aderiram à distribuição normal e foram homogêneos. Já os caracteres NF, MSEM e DC não atenderam a estes pressupostos sendo então transformados os dados pelo procedimento Box-Cox (BOX; COX, 1964)

Os erros experimentais dos caracteres NF e DC passaram a atender ao pressuposto da normalidade com a transformação, porém não atenderam à homogeneidade, embora os p -valores para o teste de Bartlett se aproximaram do atendimento. Antes da transformação, os p -valores eram de, 0,0002 e 0,0030, respectivamente para NF e DC. Com a transformação os p -valores passaram a ser de 0,0047 e 0,038. Como o pressuposto da normalidade foi atendido com a transformação procedeu-se a ANOVA, já que a heterogeneidade dos erros não deve ser encarada com excessivo rigor, pois é suficiente que as diferenças entre elas não sejam muito grandes (CONAGIN et al., 1993; PIMENTEL-GOMES, 2009).

Para o teste de germinação em laboratório, os erros experimentais das porcentagens de germinação aderiram à distribuição normal, porém não foram homogêneos. Assim, foram transformados em raiz quadrada de $Y+1$ e os pressupostos passaram a ser atendidos.

Não foram observadas diferenças visuais acentuadas na maturação de sementes entre os diferentes sistemas de cultivo e cultivares e assim as colheitas puderam ser realizadas para ambos os tratamentos das épocas 1 e 3 nas mesmas datas (Tabela 1). Observou-se senescência mais rápida das folhas da cultivar Bon Bon Yellow em relação a cultivar Bonina Dobrada Sortida para as três épocas de cultivo do estudo.

Tabela 1 – Épocas de cultivo, datas de semeadura, do transplante, do início do florescimento e das colheitas das sementes para os doze tratamentos avaliados. Santa Maria, 2014/2015.

Épocas de cultivo	Datas	Sistemas de Cultivo	Início do florescimento	1ª Colheita das sementes	2ª Colheita das sementes
Ago./14	18/08/14 (T1 e T3)	Semeadura	87 DAS (13/11/2014)	08/12/2014	19/12/14 (123 DAS)
	22/09/14 (T2 e T4)	Transplante	52 DAT (13/11/2014)	08/12/2014	19/12/14 (88 DAT)
Out./14	09/10/14 (T5 e T7)	Semeadura	74 DAS (22/12/2014)	23/01/2015	13/02/15 (127 DAS)
	26/11/14 (T6 e T8)	Transplante	49 DAT (14/01/2015)	-----	13/02/15 (79 DAT)
Abr./15	08/04/15 (T9 e T11)	Semeadura	93 DAS (10/07/15)	03/09/2015	30/09/15 (175 DAS)
	15/05/15 (T10 e T12)	Transplante	113 DAT (30/07/15)	03/09/2015	30/09/15 (138 DAT)

¹T1, ago./14, cv. Sortida, semeadura direta; T2, ago./14, cv. Sortida, transplante; T3, ago./14, cv. Yellow, semeadura direta; T4, ago./14, cv. Yellow, transplante; T5, out./14, cv. Sortida, semeadura direta; T6, out./14, cv. Sortida, transplante; T7, out./14, cv. Yellow, semeadura direta; T8, out./14, cv. Yellow, transplante; T9, abr./15, cv. Sortida, semeadura direta; T10, abr./15, cv. Sortida, transplante; T11, abr./15, cv. Yellow, semeadura direta; T12, abr./15, cv. Yellow, transplante. ²DAS – Dias após a semeadura; DAT – Dias após o transplante.

Silveira et al. (2002), ao realizarem a semeadura de calêndula em bandejas em casa de vegetação no mês de julho do ano de 2000, também na região Sul do Brasil, observaram que o início do florescimento ocorreu aos três meses após a semeadura, corroborando com o ocorrido na época agosto/14 (Tabela 1).

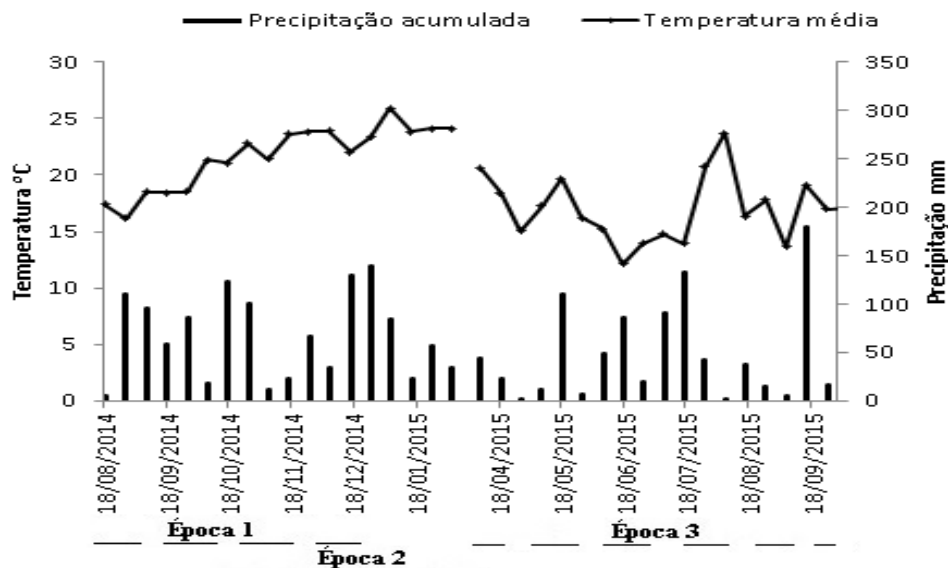
A diferença em dias para o início do florescimento para as plantas da época outubro/14, tratamentos 5 e 7 em relação aos tratamentos 6 e 8 pode estar relacionado ao crescimento mais acelerado de T5 e T7 (Tabela 1), devido a maior temperatura média do ar (Figura 1) após a germinação, comparados aos tratamentos da época agosto/14 (T1 e T3). Além disso, houve maior tempo para produção das mudas de T6 e T8 (47 dias), em comparação a T2 e T4 (34 dias). Esses dois fatores resultaram na diferença acentuada de desenvolvimento das plantas de T5 e T7 comparadas a T6 e T8.

Dessa maneira, realizou-se apenas uma colheita para T6 e T8 já que a maturação das sementes ocorreu de forma rápida devido as elevadas temperaturas do ar nesse período.

Optou-se, também, pela não realização de outra colheita por haver grande quantidade de capítulos sem a formação de sementes.

Na época abril/15, observou-se maior duração para os períodos emergência ao florescimento e florescimento a maturação de sementes, comparado as épocas 1 e 2. Gazim et al. (2007) ao realizarem semeadura direta no campo também no mês de abril (30/04/04) observaram que três meses após o plantio, as flores estavam no seu desenvolvimento máximo, corroborando com o que aconteceu nas plantas da época abril/15.

Figura 1 - Decêndios das temperaturas médias e precipitação acumulada para as três épocas de cultivo, agosto/14 (Época 1), outubro/14 (Época 2) e abril/15 (Época 3) para as plantas de *Calendula officinalis* L.. UFSM, Santa Maria, RS. 2016.



Fonte: Adaptado por PADILHA, P. H. 2015.

Angelini et al. (1997) observaram grande variação nos períodos emergência ao início de floração (17 a 59 dias) e emergência a maturação das sementes (98 a 150 dias). No presente estudo, foram necessários 159 dias da emergência a maturação das sementes (T9 e T11) e 138 dias do transplante a maturação das sementes (T10 e T12) na época abril/15, corroborando com o encontrado por Angelini et al. (1997).

Alguns fatores podem ser responsáveis pelo maior ciclo dos tratamentos referentes à época abril/15, sendo eles: temperaturas médias do ar em declínio nos dois primeiros meses de cultivo e grandes variações de temperatura médias diárias ocorridas no início do ciclo e especialmente a partir do mês de julho até o final do ciclo (Figura 1).

Cromack e Smith (1998), ao semear calêndula na Inglaterra, mencionaram que devido às condições de excesso de chuvas o período vegetativo e de floração se estenderam, ocorrendo variação quanto ao início da floração de 63 a 75 dias para nove acessos de calêndula. As condições climáticas do presente estudo foram atípicas por se tratar de um ano de *El Niño* com intensidade muito forte (CPTEC/INPE, 2015), ocorrendo excesso de chuvas, assim como ocorrido no estudo de Cromack e Smith (1998).

As temperaturas médias para as épocas agosto/14, outubro/14 e abril/2015 foram de, respectivamente, 20,92°C, 23,21°C e 17,01°C, com precipitações acumuladas de 1001,2 mm, 840,9 mm e 1208,6 mm (decêndios na Figura 1). Estudos relatam que as temperaturas ótimas para germinação de sementes de calêndula variam entre 18 e 25°C (LUZ et al., 2001; KOEFENDER et al., 2009), sendo que no momento da semeadura do sistema 1 para as três épocas de cultivo as temperaturas encontravam-se nesse intervalo. Durante os estágios restantes de desenvolvimento, a calêndula suporta temperaturas mais elevadas (LUZ et al., 2001), o que sugere um desenvolvimento normal para as condições climáticas das plantas do experimento.

A ANOVA mostrou que houve interação tripla significativa entre as épocas de cultivo, cultivares e os sistemas de cultivo para o caractere AC (Tabela 2). Assim foi realizado o desdobramento das cultivares dentro da combinação épocas*sistemas, além dos sistemas dentro de épocas*cultivares (Tabela 3).

Para os caracteres ALT, NF e MS, houve interação dupla significativa entre épocas e sistemas e entre épocas e cultivares (Tabela 2), assim foram realizados os desdobramentos dos sistemas e cultivares dentro das épocas (Tabela 4). Para MSEM houve interação dupla significativa entre épocas e sistemas (Tabela 2), e assim foi realizado o desdobramento dos sistemas dentro das épocas (Tabela 4), além do fator cultivar significativo (Tabela 2). Para o caractere DC, houve diferença entre as cultivares e entre as épocas (Tabela 2).

Para o caractere altura do capítulo (AC), verificou-se que a Bonina Dobrada Sortida foi superior a cultivar Bon Bon Yellow em todas as combinações de épocas*sistemas. As informações dos fabricantes das sementes informam “altura comercial” de 25 a 40 cm para a cultivar Sortida, e de 30 cm para a cultivar Yellow, todavia não especifica-se a referência utilizada. A análise confirmou a superioridade da cultivar Bonina Dobrada Sortida em relação a cultivar Bon Bon Yellow, considerando como referência o caractere AC. Portanto, se o produtor deseja obter flores mais altas com a finalidade de corte, deve optar pela cultivar Sortida, independente da época ou do sistema de cultivo adotado. Ainda, o sistema não influenciou a altura do capítulo para as épocas agosto/14 outubro/14, independente da

cultivar. Já para a época abril/15 as duas cultivares foram superiores em altura no sistema de cultivo semeadura direta (Tabela 3).

Tabela 2 – Quadrados Médios (QM), média, coeficiente de variação da parcela principal (CV 1) e da subparcela (CV 2) da análise de variância (ANOVA) no delineamento blocos ao acaso no esquema trifatorial para épocas de cultivo (Fator A), cultivares (Fator D) e sistemas de cultivo (Fator E) (3x2x2) em parcelas subdivididas, para os caracteres analisados: altura do capítulo (AC) em cm, altura de planta (ALT) em cm, número de folhas (NF) por planta, massa seca (MS) em g planta⁻¹, massa de sementes (MSEM) em g planta⁻¹, diâmetro do capítulo (DC) em cm referente a haste principal e germinação (GERM) em porcentagem, para o teste em laboratório com ANOVA no delineamento inteiramente casualizado.

FV	AC	ALT	NF	MS	MSEM	DC	GERM
BLOCO	4,891	3,652	0,113	36,402	0,297	0,023	----
Fator A	424,776*	335,468*	2,660*	1318,964*	14,202*	0,336*	18,258*
Erro 1	3,061	1,591	0,071	86,615	0,526	0,024	0,958
Fator D	2049,725	935,202*	4,379*	7715,963*	49,978*	1,751*	33,707*
Fator E	13,076*	2,638	1,347*	980,994*	2,975	0,021	5,210
A*E	11,082*	28,448*	0,511*	336,997*	1,081*	0,010	0,471
A*D	13,003*	25,297*	0,260*	314,698*	0,921	0,026	2,322
E*D	2,372	4,256	0,135	246,889	0,104	0,034	3,554
A*E*D	10,396*	3,934	0,150	187,795	0,595	0,015	5,239
Erro 2	3,001	2,929	0,060	80,378	0,324	0,012	1,606
Média	28,40	23,18	68,27	27,26	0,78	6,02	10,68
CV 1 (%)	6,16	5,44	33,33	34,14	62,32	16,84	26,31
CV 2 (%)	6,10	7,38	21,57	32,89	53,14	10,77	34,07

* Significativo pelo teste F em nível de 5% de probabilidade de erro.

Os resultados para a AC diferem daqueles encontrados por Barboza et al. (2009) onde a altura média final para as plantas aos 120 DAT foi de 60 cm, em um estudo com nove tratamentos resultantes das combinações de cinco doses de fósforo e cinco doses de cama-de-frango semidecomposta. Sabe-se que as inflorescências da calêndula são reunidas em capítulos terminais (LORENZI; SOUZA, 2001) que ficam geralmente mais altos que as folhas, porém os autores não mencionam como foram efetuadas as medições e nem as condições climáticas do experimento.

É comum que as épocas de cultivo influenciem diferentes caracteres de crescimento e desenvolvimento das culturas. Rezende et al. (2012) ao avaliarem a cultura da soja semeada

em diferentes épocas, verificaram que a interação época*cultivar alterou o rendimento forrageiro da soja além da proteína bruta total. Ainda para a soja Amorim et al. (2011) verificaram que a época de semeadura proporcionou diferenças na maioria das características agronômicas da cultura.

Tabela 3 - Médias da altura do capítulo (AC), em cm, para cultivares de calêndula em épocas e sistemas de cultivo. Santa Maria, 2014.

		Cultivares	
Épocas de cultivo	Sistemas de cultivo	Sortida*	Yellow
Agosto/14	Semeadura	37,60a	26,33b
	Transplante	39,76a	24,40b
Outubro/14	Semeadura	36,25a	23,93b
	Transplante	35,32a	24,31b
Abril/15	Semeadura	29,67a	19,39b
	Transplante	26,84a	16,94b

		Sistemas de cultivo	
Épocas de cultivo	Cultivares	Semeadura	Transplante
Agosto/14	Sortida	37,60a	39,76a
	Yellow	26,33a	24,40a
Outubro/14	Sortida	36,25a	35,32a
	Yellow	23,93a	24,31a
Abril/15	Sortida	29,67a	26,84b
	Yellow	19,39a	16,94b

* Médias não seguidas pela mesma letra na linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Houve interação dupla significativa entre as épocas e sistemas de cultivo para os caracteres ALT, NF, MS e MSEM. Para o desdobramento dos sistemas dentro das épocas, em relação ao caractere ALT na época agosto/14, o sistema de cultivo transplante de mudas apresentou a maior média. Para a época de cultivo outubro/14 não houve diferença significativa entre as médias. Já para a época abril/15 o comportamento foi inverso a época agosto/14, sendo o sistema de cultivo via semeadura direta o que proporcionou plantas mais altas (Tabela 4).

A menor precipitação acumulada (1001,2 mm) para a época agosto/14, associada a maior temperatura média (20,92°C) proporcionou plantas com maior altura, porém menor número de folhas. Já na época abril/15, as plantas completaram o ciclo com maior precipitação acumulada e menor temperatura média (17,01°C), o que proporcionou maior emissão de folhas e menor crescimento em altura, fato interessante devido a maior área

fotossinteticamente ativa que gera plantas com maior massa seca, como de fato ocorrido no experimento (Tabela 4). Os valores de ALT nos sistemas de cultivo variaram entre 26,08 cm e 27,67 cm na época agosto/14 e entre 20,30 cm e 17,25 cm na época abril/15.

Tabela 4 - Médias dos caracteres altura de planta (cm), número de folhas por planta, massa seca (g planta⁻¹) e massa de sementes (g planta⁻¹) para épocas de cultivo, sistemas de cultivo e cultivares de calêndula.

Altura de planta		Número folhas		Massa seca		Massa de sementes		
Sistemas de cultivo								
Épocas	Semeadura	Transplante	Semeadura	Transplante	Semeadura	Transplante	Semeadura	Transplante
Ago./14	26,08b	27,67a	76,33a	74,66a	30,35a	21,55b	0,75a	0,70a
Out./14	23,79a	24,00a	51,04a	37,73a	19,64a	20,10a	0,40a	0,24a
Abr./15	20,30a	17,25b	114,44a	55,42b	43,91a	27,99b	1,77a	0,78b
Cultivares								
	Sortida	Yellow	Sortida	Yellow	Sortida	Yellow		
Ago./14	31,82a	21,93b	88,00a	62,99b	36,45a	15,45b	-----	-----
Out./14	28,07a	19,72b	60,52a	28,25b	27,73a	12,01b	-----	-----
Abr./15	21,50a	16,05b	107,42a	62,44b	51,61a	20,29b	-----	-----

* Médias não seguidas pela mesma letra na linha, considerando os caracteres separadamente, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Para o caractere NF, não houve diferença significativa para o sistema de cultivo nas épocas agosto/14 e outubro/14. Já para a época abril/15, o sistema semeadura direta apresentou a maior média (114,44 folhas planta⁻¹).

A média geral do número de folhas das épocas abril/15 e agosto/14 foram de, respectivamente, 84,93 folhas planta⁻¹ e 75,49 folhas planta⁻¹, superiores a média de 44,38 folhas planta⁻¹ referente à época outubro/14. Koefender et al. (2008) ao estimar o filocrono em plantas de calêndula cultivadas em vasos sob estufa plástica, também verificaram que o número total de folhas na haste principal de plantas semeadas em outubro foi menor que nas semeadas em abril.

Entretanto, Koefender et al. (2008) obtiveram alto coeficiente de determinação para a relação entre o número de folhas acumuladas na haste principal e a soma térmica acumulada, indicando a temperatura do ar como o principal fator ambiental que determinou a emissão de folhas na calêndula. Nesse estudo não houve controle de outros fatores ambientais como, por exemplo, precipitação. Pelos resultados do presente estudo, para o número de folhas médio

nas épocas de cultivo, nota-se que outros fatores devem ter influenciado na emissão destas, já que não foi observada a relação direta de temperatura média do ar e emissão de folhas.

Para o caractere MS, não houve diferença significativa para o sistema de cultivo na época outubro/14. Nas épocas agosto/14 e abril/15, a semeadura direta apresentou as maiores médias para esse caractere (Tabela 4). Um parâmetro utilizado para indicar a intensidade de crescimento das plantas é a sua produção de massa seca (SERRA et al., 2012), o que indica que a semeadura direta proporciona maior crescimento em relação ao transplante de mudas.

De acordo com a finalidade a utilização do sistema 1, semeadura direta, pode ser benéfica por produzir plantas com maior massa, altura de plantas e maior número de folhas. Se a finalidade for o uso da planta inteira para extração de compostos e produção de fitoterápicos, plantas com maior massa deverão proporcionar maior rendimento na fabricação dos produtos.

A opção pelo transplante de mudas irá depender, principalmente, da disponibilidade de mão de obra, da estrutura disponível na propriedade (casa de vegetação, bancadas, sistema de irrigação) e do tempo de ocupação da área. No presente estudo houve redução de 35, 48 e 37 dias no tempo de cultivo dos tratamentos oriundos do transplante de mudas para as épocas 1, 2 e 3, respectivamente, em relação aos tratamentos oriundos da semeadura direta. Em um sistema de produção em que o produtor utiliza a área de forma intensiva e mais de um cultivo são planejados na mesma área, a diferença em dias torna-se importante ponto de decisão sobre qual sistema de cultivo utilizar.

Quanto à interação dupla significativa entre os fatores épocas e cultivares, o desdobramento das cultivares dentro das épocas indicou que a cultivar Sortida foi superior para os caracteres ALT, NF e MS independentemente da época de cultivo (Tabela 4). A superioridade no número de folhas é interessante à medida que é dessa parte da planta pode ser extraído o óleo essencial utilizado pela indústria farmacêutica e cosmética. Ao oferecer condições ideais de plantio, coleta, secagem e extração da fração volátil da calêndula é possível obter constituintes químicos semelhantes àqueles obtidos em seu habitat natural (GAZIM et al., 2007). Os resultados sugerem a superioridade da cultivar Sortida em relação a Yellow para os caracteres ALT, NF e MS, independente das épocas de cultivo do estudo. É provável que essa superioridade seja característica genética da cultivar, uma vez que se manteve nas diferentes épocas de cultivo.

Houve diferença estatística para as cultivares, em relação aos caracteres DC e MSEM, sendo que a cultivar Sortida apresentou a maior média para ambos os caracteres com 7,03 cm e 1,28 g planta⁻¹, respectivamente, superior a cultivar Yellow que apresentou 5,01 cm e 0,27 g

planta⁻¹. As épocas de cultivo também diferiram quanto ao caractere DC, sendo que a época abril/15 apresentou média de 6,82 cm, diferindo da época agosto de 2014 que apresentou tamanhos intermediários (5,96 cm) e da época outubro de 2014 cujas médias foram as menores (5,28 cm).

Marques et al. (2011) ao avaliar a produtividade em campo de inflorescências de calêndula com lâminas de irrigação suplementar na região do Oeste Paulista, verificou que a utilização de irrigação suplementar no pré-florescimento induziu ao máximo florescimento, o que sugere que a água está diretamente ligada a quantidade de flores. No presente estudo, a maior precipitação acumulada ocorreu na época abril/15 com grandes volumes de precipitação no período pré-florescimento em decorrência de ser um ano com presença do fenômeno *El Niño*. Dessa forma, se o objetivo do produtor for obter maior quantidade de flores e maior diâmetro, o cultivo em épocas com maiores precipitações acumuladas proporciona maior produtividade.

Em relação aos resultados do teste de germinação realizado com as sementes colhidas do experimento em campo, a época outubro/14 (tratamentos 5, 6, 7 e 8) não foi considerada na ANOVA por não apresentar germinação de sementes. A ANOVA mostrou não haver interação entre os fatores, porém as épocas de cultivo e cultivares foram significativas (Tabela 2).

A época abril/15 apresentou a maior porcentagem de germinação com 15,62% diferindo da época agosto/14 a qual apresentou 5,75% de sementes germinadas. Em relação às cultivares, a cultivar Yellow apresentou a maior porcentagem de germinação com 16,87%, apesar de ter produzido menor massa de sementes por planta, diferindo da cultivar Sortida que apresentou 4,5% de sementes germinadas. Devido à calêndula apresentar um longo período de florescimento, torna-se difícil obter elevado vigor das sementes com idade fisiológica uniforme, visto que inflorescências de idades e tamanhos diferentes são colhidas conjuntamente (SILVEIRA et al., 2002).

A porcentagem de germinação obtida nos testes é muito abaixo do esperado para utilização destas sementes, sugerindo a existência de fatores prejudicando o processo de germinação. As condições climáticas para as diferentes épocas na fase de maturação das sementes, principalmente as altas temperaturas ocorridas nesta fase na época outubro/14, tratamentos 5, 6, 7 e 8, os quais apresentavam visivelmente sementes vazias e que não apresentaram nenhuma semente germinada, pode ser o principal fator responsável pelas baixas porcentagens de germinação.

Outro fator que pode ter reduzido a germinação das sementes foi a presença de microrganismos, visualizados pela presença de fungos durante o teste de germinação. Bevilacqua (2009) também observou baixa porcentagem de germinação de sementes de calêndula adquiridas de empresa certificada em que o rótulo informava 92% de germinação, porém apenas 10% germinaram. A autora menciona fungos do gênero *Alternaria* e *Phomopsis* como os principais responsáveis pela redução da germinação.

Cabe salientar que a partir destes resultados dificilmente o produtor terá sucesso ao utilizar as sementes colhidas nas épocas e condições que foi realizado o experimento. Entretanto, um estudo de caso com um produtor de plantas medicinais da região de Santa Catarina, relatou que este utiliza o sistema de “replântio” natural em que as inflorescências que caem com as suas sementes, na próxima estação geram novos indivíduos (BORBA et al. 2012).

3.4 CONCLUSÕES

Os períodos da emergência à maturação das sementes variaram conforme as épocas de cultivo, sendo que o maior ciclo, período de floração e crescimento ocorreu na época abril/15.

A cultivar Bonina Dobrada Sortida foi superior em relação à altura do capítulo para as épocas agosto/14, outubro/14 e abril/15 e para os sistemas de cultivo semeadura direta e transplante de mudas, além de apresentar melhores médias para altura de planta, número de folhas e massa seca de plantas.

O sistema de cultivo semeadura direta é recomendado por proporcionar capítulos mais altos, plantas com maior número de folhas e maior massa de sementes na época abril/15, a qual proporcionou capítulos com maior diâmetro médio.

A porcentagem de germinação das sementes foi influenciada pelas épocas e cultivares.

3.5 REFERÊNCIAS

ALVARES, C. A. et al. Koppens climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v.22, n.6, p.711-728, 2014.

AMORIM, F. A. et al. Época de semeadura no potencial produtivo de soja em Uberlândia-MG. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.32, suplemento 1, p.1793-1802, 2011.

- ANGELINI, L. G. et al. Variation in agronomic characteristics and seed oil composition of new oilseed crops in central Italy. **Industrial Crops and Products**, v.6, p.313-323, 1997.
- BARBOSA, V. da S. et al. Comportamento de cultivares de soja, em diferentes épocas de semeaduras, visando a produção de biocombustível. **Revista Ciência Agronômica**. Fortaleza, v.42, n.3, p.742-749, jul./set. 2011.
- BARBOZA, V. C. et al. Produção de biomassa de *Calendula officinalis* L. adubada com fósforo e cama-de-frango. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.33, n.2, p.478-483, abr. 2009.
- BERTI, M. D. et al. Influencia de la fecha de siembra y de la procedência de la semilla em el rendimiento de capítulos de *Calendula officinalis* L. durante dos temporadas em Chillán. **Agricultura Técnica**, v.63, n.1, p.3-9, 2003.
- BEVILACQUA, C. B. **Germinação e cultivo *in vitro* de *Calendula officinalis* L.** 2009. 76 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009.
- BORBA, E. T.; MARQUES, B.H.; ZANETTE, V.C. Produção orgânica de calêndula: um estudo de caso. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.42, n.11, nov. 2012.
- BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformation. **Journal of the Royal Statistical Society**, v.26, p.211-243, 1964.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 398p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RE nº 89, de 16/03/2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004.
- CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba, EMATER-PR, 1991. 151 p.
- CONAGIN, A. et al. Efeito da falta de normalidade em testes de homogeneidade das variâncias. **Bragantia**. Campinas, v.52, n.2, p.173-180, 1993.
- CPTEC/INPE. Nota técnica sobre a previsão climática por consenso. 17 dez. 2015. **Nota técnica**. Disponível em: <http://clima1.cptec.inpe.br/~rclima1/pdf_notatecnica/Nota_Tecnica.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2015.
- CROMACK, H. T. H.; SMITH, J. M. *Calendula officinalis* – production potential and crop agronomy in southern England. **Journal Industrial Crops and Products**, v.7, n.2, p.223-229, 1998.
- DUDA, M. M. et al. Research on the cultivation of 8 marigold varieties (*Calendula Officinalis* L.) in various conditions of fertilization in the Jucu, Cluj. **UASVM Agriculture**, v.67, n.1, p.101-106, 2010.

ESTATCAMP. **Portal do Action**. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

FERREIRA, D. F. **Sisvar** - sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 1998. 19 p.

GAZIM, Z. C. et al. Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis* produzida no Paraná. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.25, n.1, p.118-121, jan./mar. 2007.

KOEFENDER, J. et al. Estimativa do filocrono em calêndula. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.38, n.5, ago. 2008.

KOEFENDER, J. et al. Influência da temperatura e da luz na germinação da semente de calêndula. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.27, n.2, p.207–210, abr./jun. 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil:nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3.ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 1120p.

LOURENZANI, A. E. B.; LOURENZANI, W.L.; BATALHA, M.O. Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. **Informações Econômicas**. São Paulo, v.34, n.3, mar. 2004.

LUZ, L. A de La.; FERRADÁ, C. R.; GOVÍN, E. S. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.6, n.1, p.23–27, 2001.

MARQUES, P. A.; BORTOLO, D. P. G.; SANTOS, A. C. P. Produtividade de inflorescências de calêndula sob irrigação suplementar na região do oeste paulista. **Irriga**. Botucatu, v.16, n.2, p.153-162, abr./jun. 2011.

MONTANARI JÚNIOR, I. Aspéctos do cultivo comercial de calêndula. **Revista Agroecologica Hoje**, v.2, p.24-25, 2000.

PARENTE, L. M. L. et al. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.11, n.4, p.383-391, 2009.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 15. ed., Piracicaba: FEALQ, 2009. 451p.

PINOTTI, E. B. et al. Características agrônômicas de cultivares de milho em função de populações de plantas e épocas de semeadura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. São Paulo, v.25, n.1, p.17-33, jun. 2014.

REZENDE, P. M. et al. Épocas de semeadura e cultivares de soja na produção de forragem. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v.28, n.4, p.557-565, jul./ago. 2012.

SANTOS, R. L. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.13, n.4, p.486-491, 2011.

SBCS. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. SBCS/CQFS/NRSUL. Porto Alegre, 2004. 400p.

SERRA, A. P. et al. Eficiência da absorção, translocação e uso de N e P pela *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.14, n.2, p.255-260, 2012.

SILVA JUNIOR, A. A. **Essentia herba-plantas bioativas**. Florianópolis: Epagri, 2006. 663p.

SILVEIRA, M. A. M.; VILLELA, F. A.; TILLMANN, M. A. A. Maturação fisiológica de sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v.24, n.2, p.31-37, 2002.

TIVELLI, S.W. et al. Semeadura direta e transplante influem na produtividade e qualidade de beterraba cultivada em plantio direto. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.27, n.2, p.77-85, ago. 2009.

4 CAPÍTULO II - DIMENSIONAMENTO AMOSTRAL PARA CARACTERES DE CULTIVARES DE CALÊNDULA EM DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO

Resumo - Os objetivos do trabalho foram determinar o tamanho de amostra, em número de plantas, necessário para estimação da média de cinco caracteres de plantas de calêndula (*Calendula officinalis* L.) semeadas em três épocas de cultivo, com duas cultivares, sob dois sistemas de cultivo e verificar a variabilidade do tamanho de amostra entre caracteres e épocas de avaliação. Calcularam-se as estatísticas descritivas e determinou-se o tamanho de amostra, a partir do método de reamostragem com reposição, necessário para a estimação da média para amplitudes do intervalo de confiança de 95% (AIC_{95%}) de 10, 15 e 20% da estimativa da média. São necessários tamanhos de amostra semelhantes para os caracteres altura de planta e número de folhas à medida que o ciclo da cultura avança. Independentemente da combinação de épocas de cultivo, cultivares e sistemas de cultivo é necessário menor tamanho de amostra para os caracteres morfológicos em relação ao produtivo. Em calêndula, 190 plantas são suficientes para estimação da média dos caracteres altura do capítulo, altura de plantas, número de folhas, diâmetro do capítulo e massa seca de planta para amplitude do intervalo de confiança de 95% com erro de estimação máximo de 20% da estimativa da média.

Termos para indexação: *Calendula officinalis*, reamostragem, planejamento experimental, plantas medicinais.

Abstract - The aim of this work were to determine the sample size (number of plants) necessary to estimate the average of five characters of marigold plant (*Calendula officinalis* L.) seeded in three growing seasons, with two cultivars in two different cropping systems, also check the variability of the sample size between characters and evaluation periods. The descriptive statistics were calculated and the sample size was determined, by using the method of resampling with replacement, required to estimate the average for the confidence interval ranges from 95% (AIC_{95%}) of 10, 15 and 20% of the average estimate. Similar sample sizes are required for the characters plant height and number of leaves as the growing season progresses. Regardless of the combination of growing seasons, varieties and cultivation systems, the sample size necessary for morphological characteristics is smaller than to the productive ones. In calendula, 190 plants are sufficient for estimate the average of characters as flower height, plant height, leaf number, diameter of the chapter and dry weight of plant for amplitude of confidence interval of 95% with maximum error estimation of 20% from average estimated.

Index terms: *Calendula officinalis*, resampling, design of experiments, medicinal plants.

4.1 Introdução

A calêndula (*Calendula officinalis* L.) é uma planta medicinal utilizada com muitos benefícios à saúde, dentre eles: o equilíbrio do sistema nervoso central; em casos de queimaduras, dermatites, foliculites (Franco, 1996); com efeito anti-inflamatória, antisséptica

e antiespasmódica (Kurkin; Sharova, 2007). Possui também, grande importância na indústria farmacêutica com a produção de cosméticos e na indústria de tintas (Pommier et al., 2004).

Em experimentos, existem diversos fatores limitantes na avaliação de uma grande quantidade de informações, dentre os quais os principais são a disponibilidade de tempo, mão de obra e recursos financeiros (Bussab et al., 2003). O correto dimensionamento amostral é fundamental para que as pesquisas com a cultura apresentem confiabilidade e a inferência estatística produza afirmações sobre uma característica da população na qual estamos interessados, a partir de informações colhidas de parte dessa (Bussab; Moretin, 2012).

A avaliação de plantas dentro da unidade experimental é uma alternativa quando não é possível avaliar todo experimento, gerando estimativas de uma variável estendidas para toda a unidade experimental. Assim, estudos de tamanho de amostra são importantes para que a amostragem realizada forneça uma representação precisa da população selecionada. Caso contrário, as conclusões podem ser viesadas (Pagano; Gauvreau, 2006).

As variações entre as unidades experimentais de um mesmo tratamento, geralmente denominadas no campo como parcelas, geram o erro experimental e este deve ser o menor possível. Ao planejar um experimento é necessário dimensionar o correto tamanho de amostra dentro da parcela, assim como o número de repetições (Storck et al., 2011). Alguns fatores causam interferência nessas definições como, por exemplo, a genética do material e o ambiente (Martin et al., 2005).

O tamanho de amostra depende da variabilidade dos dados, da confiabilidade desejada e do erro de estimação permitido. É possível dimensionar o tamanho de amostra mesmo partindo-se de uma situação de grande variabilidade dos dados. Se o pesquisador desejar maior confiabilidade da estimativa e menor erro de estimação, será necessário maior tamanho de amostra (Spiegel et al., 2004).

A técnica da reamostragem vem sendo empregada para o estudo do dimensionamento do tamanho de amostra, a partir do uso de intervalos de confiança. Uma vantagem da técnica é que a independência da distribuição de probabilidade dos dados (Ferreira, 2009), apresentando resultados com grande credibilidade para o cálculo de número de amostras (Melo Filho et al., 2002)

Atualmente diversos tamanhos amostrais são utilizados para caracterizações morfológicas e produtivas de calêndula. Barbosa et al. (2010) utilizaram 40 mudas oriundas de bandeja de isopor para avaliar a qualidade das mudas de calêndula e duas plantas para determinar o número e matéria seca de capítulos florais. Já Scalón Filho et al. (2011), utilizaram 18 plantas para avaliar altura, número de capítulos, massa seca e fresca e diâmetro

dos capítulos florais de calêndula. Em experimentos agrícolas com espécies medicinais e nativas, informações quanto ao tamanho de amostra são escassos e amplos quando existentes. Assim a definição da intensidade amostral é importante para conferir eficácia às pesquisas. Neste contexto, estudos que determinem o tamanho de amostra são necessários para avaliar a cultura.

Assim, os objetivos do trabalho foram verificar a variabilidade do tamanho de amostra entre caracteres e épocas de avaliação bem como determinar o tamanho de amostra necessário para a estimação de caracteres em plantas de calêndula.

4.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido em campo no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, no município de Santa Maria, sob as coordenadas 29° 43' 23'' S, 53° 43' 15'' W e altitude de 95 m. A área pertence à região da Depressão Central do Rio Grande do Sul e o clima é do tipo Cfa subtropical úmido, conforme classificação de Köppen (Alvares, 2014). A análise química do solo indicou os seguintes valores: pH em água (1:1) = 5,8; matéria orgânica = 3,2%; P = 12,6 mg dm⁻³; K = 112 mg dm⁻³; Ca = 99 mmol_c dm⁻³; Mg = 36 mmol_c dm⁻³; H + Al = 55 mmol_c dm⁻³; Soma de Bases = 137,86 mmol_c dm⁻³; CTC efetiva = 138 mmol_c dm⁻³; Saturação Bases = 71,5%.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com três fatores (épocas de cultivo “fator A”, cultivares “fator D” e sistemas de cultivo “fator E”) e cinco repetições, em parcelas subdivididas. As épocas de semeadura foram: agosto de 2014 (E1), outubro de 2014 (E2) e abril de 2015 (E3). As cultivares utilizadas foram: Bonina Dobrada Sortida (cultivar 1) importada pela empresa ISLA Sementes Ltda® e a cultivar Bon Bon Yellow (cultivar 2) importada pela empresa DM Sementes e Mudas Ltda®. Os sistemas de cultivo foram: Semeadura direta (S1) e transplante de mudas (S2). As épocas de cultivo constituíram a parcela principal (PP) e a combinação das cultivares e sistemas de cultivo a subparcela (SP), casualizadas dentro de cada época de cultivo, resultando em doze tratamentos.

Um dos blocos foi constituído de dois canteiros de 5 m de comprimento x 1 m de largura por tratamento, e os demais foram constituídos por um canteiro de 2,25 m x 1 m por tratamento. As cultivares foram semeadas de acordo com as recomendações dos fabricantes, sendo a cultivar 1 e 2 semeadas, respectivamente, nos espaçamentos de 0,3 m x 0,3 m e 0,2 m x 0,2 m (entre plantas x entre linhas). Foram avaliadas todas as plantas que constituíram os blocos. A variabilidade proporcionada pelos diferentes fatores do estudo é importante e

confere adequabilidade ao estudo do dimensionamento amostral (Cargnelutti Filho et al., 2014).

A área para o cultivo foi preparada de maneira mecanizada através de aração e gradagem, com posterior confecção de canteiros por meio de encanteiradora mecânica, resultando em canteiros de 1 m de largura e 10 cm de altura. O cultivo em canteiros teve como objetivo evitar acúmulo de água e melhorar o escoamento na ocorrência de elevadas precipitações. O controle de plantas daninhas foi realizado com auxílio de enxadas e a umidade do solo mantida através de irrigações por aspersão sempre que necessário. Não houve necessidade de controle fitossanitário por não ter ocorrido incidência significativa de doenças e pragas.

Para a semeadura direta, foram utilizadas duas a três sementes por cova, semeadas manualmente a profundidade de 2 a 3 cm (Montanari Júnior, 2000). Para a produção das mudas, utilizou-se duas a três sementes por alvéolo em bandejas de isopor com 128 células utilizando o substrato comercial Mec Plant®. Depois de semeadas, as bandejas foram acondicionadas em estufa plástica, com irrigações controladas através de aspersores com “timer” programado para três irrigações diárias, às 9, 13 e 16 horas, com duração de um minuto cada. Em períodos em que houve precipitações contínuas durante 24 horas, ajustou-se para duas irrigações diárias. Foi realizado desbaste no campo e nas bandejas uma semana após o início da emergência, deixando-se uma plântula. As mudas foram transplantadas para o campo quando apresentavam entre quatro e seis folhas totalmente desenvolvidas, sendo essas folhas maiores que 2,5 cm sem contato com o caule.

As adubações foram realizadas de acordo com o resultado da análise do solo e seguiram as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Comissão de Química e Fertilidade do Solo do Núcleo Regional Sul (SBCS/CQFS/NRSUL, 2004) para a cultura da *Calendula officinalis* L.. A adubação de base foi realizada aos 10 dias após a semeadura, para as plantas da semeadura direta, utilizando 200 kg ha⁻¹ da fórmula comercial 5-20-20 (N-P₂O₅-K₂O). As adubações realizadas para plantas do sistema de cultivo transplante de mudas iniciaram nas bandejas que receberão duas fertiirrigações, aos 7 e 28 dias após a semeadura. Foi aplicado um litro de água com 1,5 g do adubo Krista K 12-00-45 por bandeja em cada um dos períodos. Após dez dias do transplante, foi realizada adubação utilizando 200 kg.ha⁻¹ da fórmula comercial 5-20-20 (N-P₂O₅-K₂O).

Duas avaliações foram realizadas durante o ciclo da cultura, avaliando-se todas as plantas do experimento. As avaliações ocorreram logo após o transplante (período vegetativo) e no início do período de florescimento (período reprodutivo). Na primeira avaliação, os

períodos em dias, para as diferentes épocas foram: E1, 51 dias após a semeadura (DAS), 16 dias após o transplante (DAT); E2, 55 DAS, 7 DAT; E3, 46 DAS, 10 DAT, contemplando o período vegetativo. Na segunda avaliação, os períodos foram: E1, 79 DAS, 44 DAT; E2, 88 DAS, 40 DAT; E3, 85 DAS, 48 DAT, contemplando o início do período reprodutivo.

Na primeira avaliação, foram medidos, com régua milimétrica, os caracteres: altura de plantas (AP) em cm, tendo como base o solo e ápice a última folha totalmente expandida e; o número de folhas (NF) por planta totalmente expandidas maiores que 2,5 cm por planta. Na segunda avaliação, além dos caracteres avaliados na primeira, foram avaliados: altura do capítulo (AC) em cm, referente ao capítulo da haste principal, tendo como base o solo e o ápice a parte mais alta da flor totalmente aberta; o diâmetro do capítulo (DC) em cm, referente à haste principal com auxílio de paquímetro e; massa seca de planta (MS) em gramas, obtida após secagem em estufa de circulação forçada à 60°C até atingir peso constante. Na segunda avaliação, não pôde ser determinado o tamanho de amostra para DC nos tratamentos 5 (E2, sistema 1, cultivar Bonina Dobrada Sortida), 6 (E2, sistema 2, cultivar Bonina Dobrada Sortida), 10 (E3, sistema 2, cultivar Bonina Dobrada Sortida) e 12 (E3, sistema 2, cultivar Bon Bon Yellow) e para AF nos tratamentos 10 e 12.

Para todos os caracteres, em cada época de avaliação, com os dados de todas as plantas (n) dos cinco blocos, foram estimadas as estatísticas: mínimo, máximo, média, desvio-padrão (σ) e coeficientes de variação (CV%) para os doze tratamentos.

Para o cálculo do dimensionamento amostral, foram planejados 999 tamanhos de amostra para cada caractere, tratamento e época de avaliação, sendo o tamanho inicial de duas plantas, e os demais obtidos com incrementos de uma, até atingir 1000 plantas. Para cada tamanho de amostra planejado foram realizadas 2.000 simulações, por meio de reamostragem, com reposição (Ferreira, 2009). Com base nos valores obtidos para os parâmetros em cada uma das 2.000 simulações foi estimada a média, assim, foram obtidas 2.000 estimativas da média, para cada tamanho de amostra, e determinados os valores mínimo, percentil 2,5%, média, percentil 97,5% e máximo. Posteriormente, calculou-se a amplitude do intervalo de confiança de 95% ($AIC_{95\%}$) pela diferença entre o percentil 97,5% e o percentil 2,5%. A seguir, determinou-se o tamanho de amostra, em número de plantas, para a estimação da média dos caracteres. Para essa determinação considerou-se como tamanho de amostra, o número de plantas a partir do qual a amplitude do intervalo de confiança de 95% foi menor ou igual a 10%, 15% e 20% da estimativa da média. Os valores percentil 2,5%, média e percentil 97,5% dos tamanhos de amostra, foram plotados em gráficos com intervalo de cinco plantas, para melhor representação visual.

Para as análises estatísticas usou-se o aplicativo estatístico Action (Estacamp, 2014) e o procedimento de amostragem foi realizado com o auxílio do programa R (R Development Core Team, 2014) e do aplicativo Microsoft Office Excel.

4.3 Resultados e Discussão

O crescimento e desenvolvimento das plantas do experimento foi adequado e semelhante ao estudo de Scalon Filho et al. (2011), o qual avaliaram a produção da calêndula em função do fornecimento de cama-de-frango. A altura média no estudo de Scalon Filho et al. (2011), aos 44 DAT, foi de 15,11 cm valor próximo ao encontrado para a média dos doze tratamentos deste estudo que foi de 19,49 cm. Outro aspecto que revela o desenvolvimento normal das plantas é o NF médio obtidos na segunda avaliação realizada nas épocas de cultivo agosto/14, outubro/14 e abril/15 que foram de, respectivamente, 64,14 folhas planta⁻¹, 41,32 folhas planta⁻¹ e 47,80 folhas planta⁻¹. Os resultados corroboram com o encontrado no estudo de Koefender et al. (2008), no qual os autores afirmam que o número total de folhas na haste principal de plantas de calêndula semeadas em outubro foi menor que nas semeadas em abril, para o mesmo local de cultivo do presente estudo.

As estatísticas descritivas revelaram a existência de grande variabilidade entre as plantas de calêndula. Para todos os tratamentos e épocas de avaliação, os coeficientes de variação máximos foram de 17,21%, 22,42%, 30,33%, 55,20% e 67,60% respectivamente, para os caracteres DC, AC, AP, NF e MS (Tabelas 1 e 2). O menor coeficiente de variação (CV) foi de 12,92%, para a média do caractere DC no tratamento oito, e o maior foi 67,60% para a média da MS no tratamento cinco. Esses valores ocorreram na segunda avaliação das plantas ocorrida aos 40 DAT para T8 e 88 DAS para T5. Essa grande variabilidade sugere que os tamanhos de amostra entre os caracteres também serão bastante distintos. Para as épocas de avaliação, de maneira geral os coeficientes de variação foram menores na primeira avaliação em relação à segunda, quando observados os caracteres AP e NF (Tabelas 1 e 2).

O dimensionamento amostral de aveia preta em dez épocas de avaliação revelou coeficientes de variação para massa seca de planta de até 64,26%, o que demonstra que esse caractere apresenta valores de CV altos também em outras espécies (Cargnelutti Filho et al. 2015). Além disso, os resultados sugerem que, para a estimação da média com mesma precisão, o tamanho de amostra para o caractere produtivo MS é maior que para os caracteres morfológicos de calêndula. O mesmo comportamento também ocorreu em relação a

caracteres produtivos e morfológicos na cultura da aveia preta (Cargnelutti Filho et al., 2015) e em crambe (Cargnelutti Filho et al., 2010).

Os tamanhos de amostra variaram de forma distinta entre os caracteres à medida que o ciclo da cultura avança. Comparando AP e NF respectivamente, na primeira avaliação 36 e 104 plantas são necessárias para estimação da média com $AIC_{95\%}$ de 20% da estimativa da média (Tabela 3), enquanto na segunda avaliação 31 e 109 plantas são necessárias, para a mesma precisão (Tabela 4). Pode-se observar que houve pequeno decréscimo para o caractere AP e pequeno acréscimo para o caractere NF.

Para o dimensionamento amostral de caracteres de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb, cultivar comum) em épocas de avaliação, houve diminuição de nove plantas para uma planta, para o caractere altura de plantas avaliadas aos 22 e 105 dias após a semeadura, e aumento de dez para quinze plantas para o caractere número de folhas por planta para os mesmos períodos de avaliação (Cargnelutti Filho et al., 2015)

A cultura da calêndula apresenta crescimento mesmo após a emissão dos capítulos florais, indicando que as fases de crescimento e desenvolvimento são simultâneas (Vieira et al., 2006). Com isto, podem ocorrer diferenças acentuadas entre as plantas, o que explica a maior heterogeneidade à medida que o ciclo avança para o caractere NF.

Em relação às épocas de cultivo, a época agosto/14 foi a que apresentou os menores tamanhos de amostra para os caracteres analisados. A época outubro/14 foi a que apresentou os maiores tamanhos de amostra. Isto é explicado pelo melhor crescimento e desenvolvimento das plantas em agosto/14, semeada no inverno, com condições climáticas de temperatura média (20,92°C) e precipitação do período (1001,2 mm) mais favoráveis a espécie, em relação às demais épocas. A época outubro/14, semeada no início da primavera, apresentou condições climáticas de temperatura média do período mais elevadas (23,21°C) e menor precipitação acumulada (840,9 mm) (Figura 1), o que prejudicou o correto desenvolvimento da espécie e proporcionou maior heterogeneidade na população e conseqüentemente maiores tamanhos de amostra. A época abril/15, semeada no outono, apresentou tamanhos de amostra intermediários, porém o valor foi muito próximo à época agosto/14 (Tabela 4). Cabe ressaltar que não houve a formação de geada na época abril/15.

Haesbaert et al. (2011) ao estimarem o tamanho de amostra para fitomassa fresca de vagens de feijão-de-vagem, observaram que a variabilidade produtiva da vagem aumenta quando as condições de brilho solar e temperatura do ar são adversas, levando a necessidade de maiores tamanhos de amostra. Isto comprova que as condições climáticas afetam as plantas e quando são adversas geram maior variabilidade ao cultivo e conseqüentemente, maiores

tamanhos de amostra são necessários para estimação de caracteres na população, como ocorrido na época outubro/14.

Para os caracteres estudados, o DC apresentou os menores tamanhos de amostra para todos os tratamentos, justificado pelos menores coeficientes de variação, que oscilaram entre 12,92% a 17,21% (Tabela 2). Apesar do número de plantas amostradas ter sido menor em relação aos outros caracteres do estudo (Tabela 4), optou-se por dimensionar o tamanho de amostra já que esse foi o caractere com menor CV dentre todos estudados. Os maiores tamanhos de amostra foram verificados para o caractere MS, variável que apresenta os maiores valores de CV oscilando de 42,49% a 67,60% (Tabela 2).

Os tamanhos de amostra (em número de plantas), para estimativa da média dos caracteres AC, AP, NF, DC e MS com $(AIC_{95\%})$ igual a 10, 15 e 20% da estimativa da média, nas duas épocas de avaliação, oscilaram entre 6 plantas para o caractere DC na segunda avaliação, tratamento oito, até 764 plantas para o caractere MS na segunda avaliação, tratamento cinco (Tabela 4). Esses resultados confirmam grande variabilidade nos tamanhos de amostra entre os caracteres. Os resultados corroboram com o estudo de Cargnelutti Filho et al. (2010) com a cultura do crambe, em que os resultados apresentaram grande variabilidade entre os caracteres, assim como observado em aveia preta (Cargnelutti Filho et al., 2015).

Para caracteres com menor variabilidade, é possível estimar a média com erros de estimação de 10%, ou seja, maior precisão. Por outro lado, caracteres com maior variabilidade, são difíceis de serem estimados devido ao elevado número de plantas a serem mensuradas. Considerando um tamanho de amostra para as duas épocas de avaliação, independentemente do tratamento, com erro de estimação de 10%, ou seja, com a maior precisão, para os cinco caracteres avaliados, 764 plantas são necessárias (Tabela 4, Figura 2).

Esse elevado número de plantas pode tornar impraticável a coleta de dados. O tamanho de amostra a ser mensurado pode ser menor, porém haverá maiores erros de estimação, ou seja, menor precisão. Os menores tamanhos de amostra foram estimados com base em erros de estimação iguais a 15% e 20% da estimativa da média. Portanto, para avaliar os caracteres em estudo para a calêndula, o pesquisador deve julgar qual o erro de estimação máximo aceitável em seu planejamento experimental.

Se a opção for pelo maior tamanho de amostra, calculado com o maior CV (67,60% para T5, segunda avaliação) entre todas as épocas, cultivares e sistemas de cultivo, 190 plantas são necessárias para estimação da média dos caracteres morfológicos e produtivos de calêndula, para um erro de estimação máximo de 20% da média (Tabela 4).

Para as épocas de cultivo agosto/14, outubro/14 e abril/15, independentemente das cultivares e sistemas de cultivo, respectivamente, 130, 190 e 142 plantas são suficientes para estimação da média dos caracteres em calêndula, para amplitudes do intervalo de confiança de 95% com erro máximo de 20% da média.

4.4 Conclusões

1. Para todas as épocas de cultivo, cultivares e sistemas de cultivo, são necessários menores tamanhos de amostra para os caracteres morfológicos em relação ao produtivo.

2. Existe grande variabilidade no tamanho de amostra para os caracteres altura do capítulo, altura de planta, número de folhas, diâmetro do capítulo e massa seca de planta.

3. Para os caracteres altura de planta e número de folhas, os tamanhos e amostra são semelhantes à medida que o ciclo da cultura avança.

3. Avaliação de 190 plantas de *Calendula officinalis* L. são suficientes para estimação da média dos caracteres altura do capítulo, altura de planta, número de folhas, diâmetro do capítulo e massa seca de planta para amplitude do intervalo de confiança de 95% igual a 20% da estimativa da média.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsas; aos bolsistas e voluntários, pelo auxílio na condução experimental e na coleta de dados.

4.5 Referências

ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; GONÇALVES, J.L.M.; SPARAVOK, G. Koppens climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v.22, n.6, p.711-728, 2014.

BARBOSA, C.K.R.; VALADARES, S.V.; BONFIM, F.P.G.; HONORIO, I.C.G.; MARTINS, E.R. Influência do substrato e do tamanho da célula de bandejas de poliestireno expandido no desenvolvimento de mudas e produção de calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p.18–22, 2010.

BUSSAB, W.O.; MORETIN, P. A. **Estatística Básica**. 2012. 540p.

BUSSAB, W.O.; DINI, N.P.; MANCINI, S.R. Plano amostral: pesquisa de emprego e desemprego. **São Paulo Em Perspectiva**. São Paulo, v.17, 2003.

CARGNELUTTI FILHO, A. TOEBE, M.; SILVEIRA, T.R.; CASAROTTO, G.; HAESBAERT, F.M.; LOPES, S.J. Tamanho de amostra e relações lineares de caracteres morfológicos e produtivos de crambe. **Ciência Rural**, v.40, p.2262–2267, nov. 2010.

CARGNELUTTI FILHO, A.; FACCO, G. LÚCIO, A.D; TOEBE, M.; BURIN, C.; FICK, A.L.; NEU, I.M.M. Tamanho de amostra para a estimação da média de caracteres morfológicos e produtivos de nabo forrageiro. **Ciência Rural**, v.44, n.2, p.223-227, fev. 2014.

CARGNELUTTI FILHO, A.; TOEBE, M.; ALVES, B.M.; BURIN, C.; SANTOS, G.O.; FACCO, G.; NEU, I.M.M. Dimensionamento amostral para avaliar caracteres morfológicos e produtivos de aveia preta em épocas de avaliação. **Ciência Rural**, v.45, n.1, p.9–13, 2015.

ESTATCAMP. **Software Action. Estatcamp** - Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos, SP, 2014. Disponível em: <http://www.portalaction.com.br> Acesso em: 06 dez. 2015.

FERREIRA, D.F. **Estatística básica**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2009. 664p.

FRANCO, L.L. As sensacionais 50 plantas medicinais campeãs de poder curativo. Editora Santa Mônica, Curitiba. 1996. 241p.

HAESBAERT, F.M.; SANTOS, D.; LÚCIO, A.D.; BENZ, V.; ANTONELLO, B.I.; RIBEIRO, A.L.P. Tamanho de amostra para experimentos com feijão-de-vagem em diferentes ambientes. **Ciência Rural**, v.41, n.1, p.38-44, 2011.

KOEFENDER, J.; STRECK, N.A.; BURIOL, G.A.; TRENTIN, R. Estimativa do filocrono em calêndula. **Ciência Rural**, v.58, p.1246–1250, 2008.

KURKIN, V.A.; SHAROVA, O.V. Flavonoids from *Calendula officinalis* flowers. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, p.179-180, 2007.

MARTIN, T.N.; STORCK, L.; LÚCIO, A.D.C; LORENTZ, L.H. Plano amostral em parcelas de milho para avaliação de atributos de espigas. **Ciência Rural**, v.35, p.1257-1262, 2005.

MELO FILHO, J. F. et al. Método convencional e “bootstrap” para estimar o número de observações na determinação dos parâmetros da função $K(O)^{(1)}$. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. Campinas, v.26, p.895-903, 2002.

MONTANARI JÚNIOR, I. Aspectos do cultivo comercial de calêndula. **Revista Agroecologica**, v.1, p.24-25, 2000.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de bioestatística**. São Paulo: Thomson Learning, 2006. 506p.

POMMIER, P.; GOMEZ, F.; SUNYACH, M.P.; D'HOMBRES, A.; CARRIE, C.; MONTBARBON, X. Phase III Randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v.22, p.1447–1453, 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. SBCS/CQFS/NRSUL. Porto Alegre, 2004. 400 p.

SCALON FILHO, H.; VIEIRA, M.C.; SCALON, S.P.Q.; HEREDIA, N.A.Z. Formas de aplicação de cama-de-frango no crescimento e produção de capítulos florais de *Calendula officinalis* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.13, p.382–388, 2011.

SPIEGEL, R.A.; SCHILLER, J.; SRINIVASAN, R.A. **Probabilidade e estatística**. 2.ed. Porto Alegre: Bookman, 2004. 398p.

STORCK, L. GARCIA, D.C.; LOPES, S.J; ESTEFANEL, V. *Experimentação vegetal*. 3.ed. Santa Maria: UFSM, 2011. 200p.

VIEIRA, M. C.; GOMES, H.E.; SANGALLI, A.; HEREDIA, Z.; TEIXEIRA, I.R.; RAMOS, M.B.M. Crescimento e produção de biomassa de calêndula (*Calendula officinalis* L .) proveniente de dois tipos de diásporos e duas colorações de capítulos florais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.193–197, 2006.

Tabela 1 - Mínimo, média, máximo, desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) dos caracteres altura de planta (cm) e número de folhas por planta para a primeira avaliação realizada para as épocas 1, 2 e 3 respectivamente aos 51 dias após a semeadura (DAS) e 16 dias após o transplante, 55 DAS, 7 DAT e 46 DAS, 10 DAT em *Calendula officinalis* L.

	----- Época 1, agosto/14 -----				----- Época 2, outubro/14 -----				----- Época 3, abril/15 -----			
	Cultivar Sortida		Cultivar Yellow		Cultivar Sortida		Cultivar Yellow		Cultivar Sortida		Cultivar Yellow	
	S1 ¹	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
Altura de planta (cm)												
Mínimo	3,80	3,00	3,40	3,10	9,00	4,60	6,70	3,50	2,00	2,50	1,50	3,30
Média	6,41	6,45	5,12	5,14	24,53	7,68	18,19	5,66	5,16	5,37	3,69	6,74
Máximo	9,00	10,50	7,90	8,90	41,50	12,70	29,20	9,30	8,10	8,50	6,50	12,80
σ	1,06	1,18	0,89	0,89	7,44	1,43	4,91	0,92	1,09	1,14	0,88	1,56
CV (%)	16,53	18,23	17,45	17,41	30,33	18,65	26,99	16,34	21,05	21,29	23,90	23,14
Número de folhas por planta												
Mínimo	4,00	3,00	3,00	3,00	8,00	3,00	9,00	4,00	4,00	3,00	5,00	2,00
Média	7,75	7,73	7,19	7,95	61,82	8,15	46,63	7,40	10,69	7,19	9,47	6,01
Máximo	12,00	12,00	11,00	11,00	132,00	12,00	105,00	11,00	19,00	10,00	15,00	9,00
σ	1,71	1,37	1,79	1,28	31,00	1,60	22,41	1,45	3,15	1,25	2,09	1,08
CV (%)	22,08	17,71	24,94	16,17	50,14	19,68	48,05	19,56	29,45	17,32	22,05	17,95

¹S1 - Semeadura direta e S2 - Transplante de mudas, referente aos sistemas de cultivo.

Tabela 2 - Mínimo, média, máximo, desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) dos caracteres altura do capítulo (cm), altura de planta (cm), número de folhas por planta, diâmetro do capítulo (cm) e massa seca (g planta⁻¹) para a segunda avaliação realizada para as épocas 1, 2 e 3 respectivamente aos 79 dias após a semeadura (DAS) e 44 dias após o transplante (DAT), 88 DAS, 40 DAT e 85 DAS, 48 DAT em *Calendula officinalis* L.

	----- Época 1, agosto/14 -----				----- Época 2, outubro/14 -----				----- Época 3, abril/15 -----			
	Cultivar Sortida		Cultivar Yellow		Cultivar Sortida		Cultivar Yellow		Cultivar Sortida		Cultivar Yellow	
	S1 ¹	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
Altura do capítulo (cm)												
Mínimo	14,40	10,60	10,20	11,50	20,50	16,70	12,00	13,00	17,00	---	6,50	---
Média	30,22	26,46	20,91	21,48	35,89	29,87	23,88	22,34	27,45	---	17,10	---
Máximo	39,00	41,80	33,20	29,30	47,00	42,50	35,50	33,60	41,00	---	26,80	---
σ	6,34	5,50	4,49	3,61	5,39	6,70	4,75	4,42	5,14	---	3,83	---
CV (%)	20,96	20,80	21,45	16,81	15,02	22,42	19,90	19,79	18,72	---	22,39	---
Altura de planta (cm)												
Mínimo	13,50	10,00	7,20	8,50	16,50	10,00	10,00	7,30	8,60	7,60	5,60	5,20
Média	24,77	24,06	16,98	18,91	29,51	22,93	20,39	17,24	20,96	12,20	15,30	10,65
Máximo	36,20	35,00	26,10	27,90	42,50	40,00	30,00	28,00	35,50	18,80	21,60	16,40
σ	6,01	5,29	4,05	3,66	5,52	6,24	4,14	3,96	5,84	2,26	2,81	2,26
CV (%)	24,26	21,97	23,86	19,37	18,72	27,20	20,32	22,96	27,84	18,52	18,35	21,24

(continua)

Número de folhas por planta												
Mínimo	17,00	13,00	10,00	16,00	14,00	8,00	5,00	3,00	15,00	11,00	10,00	8,00
Média	73,33	70,14	56,96	56,14	69,81	33,98	30,61	30,89	77,90	33,99	58,96	20,33
Máximo	150,00	124,00	119,00	102,00	154,00	84,00	77,00	64,00	139,00	80,00	103,00	42,00
σ	31,07	22,07	22,61	17,27	32,81	14,39	16,90	12,09	24,53	12,63	16,94	6,34
CV (%)	42,37	31,47	39,69	30,77	47,01	42,35	55,20	39,13	31,49	37,16	28,72	31,19
Diâmetro do capítulo (cm)												
Mínimo	33,00	45,00	32,00	36,00	---	---	31,00	35,00	50,00	---	35,00	---
Média	60,88	56,29	46,20	47,73	---	---	44,73	42,88	85,69	---	63,81	---
Máximo	79,00	68,00	64,00	58,00	---	---	54,00	50,00	105,00	---	81,00	---
σ	10,42	7,57	6,99	6,31	---	---	7,27	5,54	14,75	---	10,09	---
CV (%)	17,11	13,44	15,12	13,21	---	---	16,25	12,92	17,21	---	15,81	---
Massa seca (g)												
Mínimo	6,39	7,37	2,29	1,56	3,57	2,49	1,03	1,73	4,45	3,84	1,50	2,07
Média	40,04	31,94	25,29	20,34	30,45	19,48	8,03	9,15	58,11	36,90	19,57	17,12
Máximo	82,00	69,38	80,32	46,34	107,00	55,36	35,84	22,37	132,87	85,48	50,46	45,72
σ	16,93	14,35	14,19	9,54	20,59	12,32	4,86	4,51	29,33	16,93	11,31	10,06
CV (%)	42,29	44,92	56,12	46,89	67,60	63,22	60,52	49,27	50,46	45,89	57,79	58,78

¹S1 - Semeadura direta e S2 - Transplante de mudas, referente aos sistemas de cultivo.

Tabela 3 - Tamanhos de amostra, em número de plantas, para a primeira avaliação realizada para as épocas 1, 2 e 3 respectivamente aos 51 dias após a sementeira (DAS) e 16 dias após o transplante, 55 DAS, 7 DAT e 46 DAS, 10 DAT, com intervalo de confiança de 95% e erros de estimação máximos de 10%, 15% e 20% da estimativa da média, para estimação dos caracteres altura de planta (cm) e número de folhas de *Calendula officinalis* L.

	----- Época 1, agosto/14 -----				----- Época 2, outubro/14 -----				----- Época 3, abril/15 -----			
	Cultivar Sortida		Cultivar Yellow		Cultivar Sortida		Cultivar Yellow		Cultivar Sortida		Cultivar Yellow	
	S1 ¹	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
Altura de planta (cm)												
10%	44	55	51	46	141	55	118	37	85	73	74	85
15%	19	24	22	23	64	25	49	18	39	34	32	40
20%	11	14	13	14	36	14	31	10	22	19	19	22
Número de folhas por planta												
10%	76	50	100	41	399	57	371	65	137	47	80	51
15%	37	22	41	19	174	28	162	29	63	21	35	23
20%	22	14	24	11	104	16	97	16	34	13	20	13
Número de amostras utilizadas "n"												
AP	105	193	187	255	128	197	179	287	111	193	208	282
NF	102	193	186	255	128	195	178	290	116	193	203	284

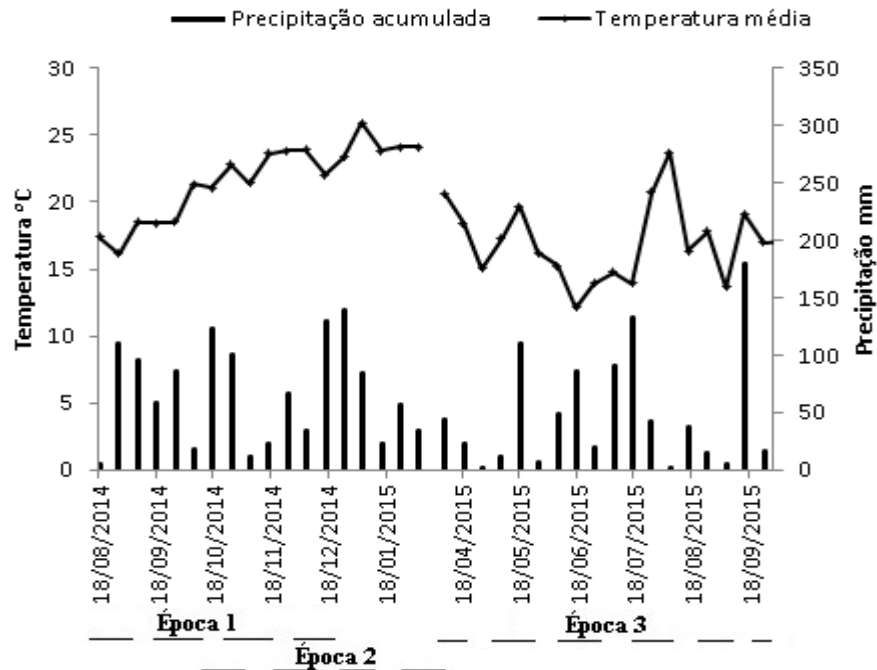
¹S1 - Semeadura direta e S2 - Transplante de mudas, referente aos sistemas de cultivo.

Tabela 4 - Tamanhos de amostra, em número de plantas, para a segunda avaliação realizada para as épocas 1, 2 e 3 respectivamente aos 79 dias após a semeadura (DAS) e 44 dias após o transplante (DAT), 88 DAS, 40 DAT e 85 DAS, 48 DAT, com intervalo de confiança de 95% e erros de estimação máximos de 10%, 15% e 20% da estimativa da média, para estimação dos caracteres altura do capítulo (cm), altura de planta (cm), número de folhas, diâmetro do capítulo e massa seca de planta de *Calendula officinalis* L.

	----- Época 1, agosto/14 -----				----- Época 2, outubro/14 -----				----- Época 3, abril/15 -----			
	Cultivar Sortida		Cultivar Yellow		Cultivar Sortida		Cultivar Yellow		Cultivar Sortida		Cultivar Yellow	
	S1 ¹	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
	Altura do capítulo (cm)											
10%	69	40	72	45	34	76	61	60	52	-	79	-
15%	31	19	31	19	16	35	27	26	25	-	36	-
20%	17	11	18	11	9	20	16	15	14	-	29	-
	Altura de planta (cm)											
10%	90	81	90	58	56	121	65	84	122	55	54	70
15%	43	35	42	27	25	53	30	37	55	24	25	31
20%	24	20	22	16	15	30	17	23	31	14	14	19
	Número de folhas por planta											
10%	278	157	255	149	348	285	438	241	160	220	133	158
15%	122	67	116	65	156	128	192	106	70	95	61	68
20%	74	40	61	38	92	73	109	63	39	55	34	39
	Diâmetro do capítulo (cm)											
10%	44	24	37	27	-	-	39	24	46	-	38	-
15%	20	12	15	13	-	-	16	11	19	-	18	-
20%	12	7	9	7	-	-	9	6	12	-	10	-
	Massa seca (g)											
10%	302	319	497	366	764	669	594	399	400	328	538	529
15%	130	142	217	155	330	286	269	173	180	152	239	249
20%	71	81	130	88	190	159	152	97	101	83	135	142

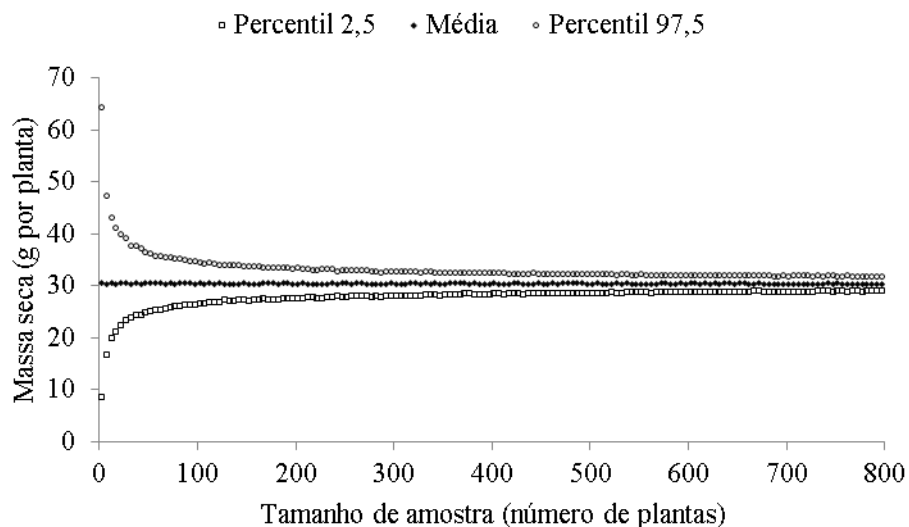
¹S1 - Semeadura direta e S2 - Transplante de mudas, referente aos sistemas de cultivo.

Figura 1 - Decêndios das temperaturas médias e precipitação acumulada para as três épocas de cultivo, agosto/14 (Época 1), outubro/14 (Época 2) e abril/15 (Época 3) para as plantas de *Calendula officinalis* L.. UFSM, Santa Maria, RS. 2016.



Fonte: Adaptado por PADILHA, P. H. 2015.

Figura 2 – Valores de percentil 2,5%, média e percentil 97,5% das duas mil estimativas da média, obtidas por reamostragem com reposição, para massa seca de plantas para os tamanhos de amostra $n = 2, 7, 12, \dots, 800$ plantas, referente ao tratamento cinco (época outubro/14, cultivar Sortida, semeadura direta) com base nos dados da avaliação realizada aos 88 dias após a semeadura.



5 CAPÍTULO III - AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA DE *Calendula officinalis* L. SOBRE O CICLO CELULAR DE *Allium cepa*

Resumo - *Calendula officinalis* L. (Asteraceae), popularmente conhecida como calêndula, maravilha-do-jardim, é uma planta medicinal utilizada para tratamento de infecções e feridas de pele por possuir efeito antiinflamatório. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antiproliferativo e genotóxico de infusões desta espécie sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. As células da ponta da raiz de *Allium cepa* foram utilizadas como sistema teste *in vivo* para monitorar esses efeitos. Capítulos de calêndula foram secos, triturados e preparados por imersão em água fervente. Os tratamentos foram compostos de água destilada (controle negativo), glifosato 2% (controle positivo), da infusão de capítulos da cultivar Bonina Dobrada Sortida nas concentrações de 10 g.L⁻¹ e 40 g.L⁻¹ e da infusão de capítulos da cultivar Bon Bon Yellow também a 10 g.L⁻¹ e 40 g.L⁻¹. Foram utilizados seis grupos de bulbos e quatro repetições por tratamento para análise. As lâminas foram confeccionadas pela técnica de esmagamento a partir de duas pontas de raízes por bulbo, as quais foram escolhidas aleatoriamente. Foram observadas as fases do ciclo celular em 500 células por lâmina para o cálculo do índice mitótico e observação de alterações cromossômicas. A análise estatística foi realizada pelo teste do Qui-Quadrado χ^2 a 5% de probabilidade do erro. Infusões de *Calendula officinalis*, independente da concentração ou cultivar, causaram inibição da divisão celular e redução do índice mitótico em relação aos controles. Não foi possível verificar efeito genotóxico por não ter ocorrido divisão celular. A espécie apresenta atividade antiproliferativa em todas as concentrações testadas dos chás.

Palavras-chave: Calêndula; proliferação celular; sistema-teste *in vivo*

Abstract - *Calendula officinalis* L. (Asteraceae), popularly known as marigold and maravilha-do-jardim, is a medicinal plant used to treat infections and skin wounds due to its anti-inflammatory effect. The goal in this study was to evaluate the antiproliferative and genotoxic effects of infusions of this species on the cell cycle of *Allium cepa*. The cells from the tips of *Allium cepa* roots were used as *in vivo* test system to monitor such effects. Flower heads of marigold were dried, crushed and prepared by immersion in boiling water. The treatments consisted of distilled water (negative control), glyphosate 2% (positive control), infusion of flower heads of cultivating Bonina Dobrada Sortida in concentrations of 10 g.L⁻¹ and 40 g.L⁻¹ and the infusion of flower heads from cultivar Bon Bon Yellow also 10 g.L⁻¹ and 40 g.L⁻¹. Six groups of bulbs were utilized with four replicates per treatment for analysis. The slides were prepared by crushing technique from both ends of roots bulb, which were randomly chosen. Phases of the cell cycle were observed at 500 cells per slide for calculating the mitotic index and observation chromosomal abnormalities. Statistical analysis was performed by Chi-Square χ^2 in 5% error probability. Infusions of *Calendula officinalis*, independent of concentration or cultivars, caused inhibition of cell division and reduced mitotic index compared to controls. It was unable to verify genotoxic effects due to not have occurred cell division. The specie has antiproliferative activity in all tested concentrations of teas.

Keywords: Marigold; cell proliferation; *in vivo* test system

5.1 Introdução

As plantas medicinais geralmente são utilizadas para a cura, prevenção ou mitigação de sintomas de doenças, sendo a principal forma de consumo através de infusões ou

decoções de partes destas. Entretanto, algumas espécies podem apresentar efeitos citotóxicos ou genotóxicos devido a substâncias presentes em sua composição (Bagatini et al. 2007).

De forma geral não há conhecimento pelos usuários em relação a possíveis efeitos colaterais, isto por que apenas uma pequena gama das plantas utilizadas foi estudada e por falta de conhecimento de alguns usuários em relação a estudos já realizados (Veiga et al. 2005). As plantas são consumidas na forma de infusão, portanto, de forma empírica devido a diversas influências. No Brasil o uso foi influenciado principalmente por povos indígenas e imigrantes africanos e europeus (Martins et al. 2000).

De origem Mediterrânea, de acordo com Lorenzi e Matos (2008) a espécie *Calendula officinalis* L. (calêndula) é utilizada para diversos fins, como planta ornamental em vasos e jardins (Bortolo et al. 2009), na indústria de tinta e cosméticos (Pommier 2004) e amplamente empregada como planta medicinal a partir de suas partes, como caule, folhas secas (Silva Jr 2006) sendo a flor a parte mais utilizada (Gazim et al. 2007).

O sistema teste vegetal de *Allium cepa* apresenta-se como bioindicador da genotoxicidade de infusões de plantas, auxiliando em estudos de prevenção de danos à saúde humana (Bagatini et al. 2007). Através do teste é possível avaliar a proliferação celular através do índice mitótico, formação de micronúcleos, anormalidades nucleares além da avaliação de parâmetros macroscópicos como tamanho de raízes e formação de tumores (Monarca et al. 2000). Este método além de fornecer informações valiosas sobre efeitos causados na divisão celular e nos cromossomos (Fiskejo 1994) é sensível para avaliação dos efeitos genotóxicos causados por produtos químicos e na avaliação de níveis de poluição ambiental (El-Shahaby et al. 2003; Olorunfemi et al. 2011).

As vantagens de sua utilização residem no fato de que esse método é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas, o qual apresenta alta sensibilidade e boa correlação com outros bioensaios como, por exemplo, sistema teste de mamíferos (Cabrera e Rodriguez, 1999), aliado a um baixo custo (Bagatini et al. 2007) e por possuir cromossomos em número reduzido e de grande tamanho que facilitam as análises (Grover e Kaur, 1999).

Neste sentido, estudos têm sido desenvolvidos com plantas medicinais a fim de elucidar sobre a segurança no uso de infusões e decoções de diferentes espécies como *Polygonum punctatum* (erva-de-bicho) (Pastori et al. 2015), *Allophylus edulis* (chal-chal) (Pasqualli et al. 2015) e *Prunus myrtifolia* (pessegueiro-do-mato) (Trapp et al. 2015). Para *Calendula officinalis* L. testes *in vivo* realizados com ratos e *in vitro* pelo método de redução do NBT (Mc Cord e Fridovich, 1969) utilizando extrato alcoólico de flores frescas

determinaram que a espécie possui alta capacidade de eliminação de radicais livres devido ao aumento da enzima catalase (Preethi et al. 2006).

Neste contexto, devido ao uso medicinal e a sua importância, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito antiproliferativo e genotóxico de infusões de *Calendula officinalis* L. utilizando o sistema teste de *Allium cepa*.

5.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido em duas etapas: condução do experimento a campo em agosto de 2014 para produção dos capítulos, e condução do experimento em laboratório, para análise celular dos efeitos das infusões sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. O experimento a campo foi conduzido no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, no município de Santa Maria, sob as coordenadas 29° 43' 23'' S, 53° 43' 15'' W e altitude de 95 m. A área pertence à região da Depressão Central do Rio Grande do Sul e o clima é do tipo Cfa subtropical úmido, conforme classificação de Köppen. A análise química do solo indicou os seguintes valores: pH em água (1:1) = 5,8; matéria orgânica = 3,2%; P = 12,6 mg.dm⁻³; K = 112 mg.dm⁻³; Ca = 99 mmol_c.dm⁻³; Mg = 36 mmol_c.dm⁻³; H + Al = 55 mmol_c.dm⁻³; Soma de Bases = 137.86 mmol_c.dm⁻³; CTC Efetiva = 138 mmol_c.dm⁻³; Saturação Bases = 71,5%.

A espécie calêndula foi cultivada a campo sob o delineamento blocos ao acaso em um experimento com dois tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram duas cultivares de calêndula: Bonina Dobrada Sortida, importada pela empresa ISLA Sementes® Ltda e a cultivar Bon Bon Yellow, importada pela empresa DM Sementes e Mudas® Ltda. As mudas foram produzidas em estufa com telado de plástico, irrigadas três vezes ao dia durante um minuto (as 9, 13 e 16 horas) realizadas através de aspersores com timer, em bandejas de isopor com 128 células, utilizando-se o substrato comercial Mec Plant®. A semeadura foi realizada dia 18/08/2014 e as mudas foram transplantadas para o campo em 22/09/2014, quando apresentavam entre quatro e seis folhas desenvolvidas, isto é, 34 dias após. As cultivares Sortida e Yellow foram transplantadas, nos espaçamentos 0,30 x 0,30 cm e 0,20 x 0,20 (entre linhas x entre plantas), respectivamente, conforme as recomendações dos fabricantes. As bandejas foram confeccionadas no dia 18/08/2014 e transplantadas para o campo no dia 22/09/2014, 34 dias após.

A área para o cultivo foi preparada com trator através de aração e gradagem, com posterior confecção de canteiros por meio de encateiradora mecânica, resultando em canteiros de 1 m de largura e 10 cm de altura. A opção por canteiros visou evitar acúmulo de água e

melhorar seu escoamento na ocorrência de precipitações elevadas. O controle de plantas daninhas foi realizado com auxílio de enxadas e a umidade do solo mantida através de irrigações por aspersão sempre que necessário. Não houve incidência significativa de doenças e pragas.

As adubações realizadas iniciaram nas bandejas que receberam, duas fertirrigações, aos 7 e 28 dias após a semeadura. Foi aplicado um litro de água com 1,5 g do adubo Krista K 12-00-45 por bandeja em cada um dos períodos. Após dez dias do transplante, foi realizado adubação com 200 kg.ha⁻¹ da fórmula comercial 5-20-20 (N-P₂O₅-K₂O).

As coletas dos capítulos inteiros cortados com o pedúnculo mais próximo possível ao capítulo iniciaram no final de outubro, sendo realizadas colheitas aos três dias após a abertura do mesmo, onde cem capítulos por tratamento foram escolhidos aleatoriamente. O material foi armazenado em papel Kraft, e realizou-se secagem em estufa de circulação forçada a 45°C por 30 horas (Silva et al. 2007).

Após secos, os capítulos foram triturados em moinho de facas da marca Marconi, modelo MA580, até atingirem granulometria constante, utilizando peneira de malha 20. As infusões foram preparadas por imersão em água fervente, permanecendo durante dez minutos em recipiente tampado. O material foi coado e resfriado, sendo posteriormente transferido para recipientes que receberam os bulbos de *Allium cepa* que haviam sido enraizados em água destilada durante sete dias. Os tratamentos foram compostos por: controle negativo em água destilada (T1); controle positivo em glifosato 2% (T2); infusão de capítulos secos na concentração de 10 g.L⁻¹ da cultivar Bonina Dobrada Sortida (T3); infusão de capítulos secos na concentração de 40 g.L⁻¹ da cultivar Bonina Dobrada Sortida (T4); infusão de capítulos secos na concentração de 10 g.L⁻¹ da cultivar Bon Bon Yellow (T5); infusão de capítulos secos na concentração de 40 g.L⁻¹ da cultivar Bon Bon Yellow (T6).

Para cada tratamento foram utilizados seis grupos de bulbos com quatro repetições, totalizando 24 bulbos analisados. As radículas permaneceram em contato com as infusões por 24 horas, e o controle negativo permaneceu em contato com água destilada. Após esse período, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol – ácido acético), onde permaneceram por 24 horas, sendo removidas e transferidas para frascos contendo álcool 70% e conservadas no refrigerador em temperatura de 7°C até o preparo das lâminas.

Para o preparo das lâminas foram utilizadas duas pontas de raízes escolhidas aleatoriamente para cada tratamento, sendo então confeccionadas duas lâminas. As pontas de raízes foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N por cinco minutos, lavadas em água destilada e coradas com carmim acético 2%.

As lâminas foram confeccionadas pela técnica de esmagamento (Guerra e Souza 2002) e examinadas observando-se as fases do ciclo celular com auxílio de microscópio óptico com a objetiva de 40x. O número total de células analisadas foi de 500 células por lâmina, somando 1000 células em cada repetição e 4000 células por tratamento.

Foram observadas células em cada uma das fases do ciclo celular, interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase para determinação do índice mitótico (IM), calculado a partir do número de células em divisão dividido pelo número total de células observadas multiplicado por cem (Pires et al. 2001), bem como a observação de ocorrência de alterações cromossômicas. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste Qui-Quadrado χ^2 , em 5% de probabilidade erro, utilizando o programa BioEstat 3.0 (Ayes 2003).

5.3 Resultados e discussão

Tabela 1. Número total de células analisadas (TC), de células em interfase (CI), de células na fase da divisão celular prófase (CP), em metáfase (CM), em anáfase (CA) e em telófase (CT) e o valor do índice mitótico (IM) das raízes emitidas a partir de bulbos de *Allium cepa* em contato com diferentes concentrações de infusões de *Calendula officinalis* L. e em contato com os controles.

Análises	T1	T2	T3	T4	T5	T6
TC	4000	4000	4000	4000	4000	4000
CI	3774	3892	3996	4000	4000	4000
CP	106	34	2	0	0	0
CM	46	43	2	0	0	0
CA	31	4	0	0	0	0
CT	43	27	0	0	0	0
IM	5.56 ^a	2.77 ^b	0.1 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c

As porcentagens das médias de IM não seguidas pela mesma letra diferem significativamente, em nível de 5% de probabilidade do erro, pelo teste χ^2 . Tratamentos: controle negativo em água destilada (T1); controle positivo em glifosato 2% (T2); infusão de capítulos secos na concentração de 10 g.L⁻¹ da cultivar Bonina Dobrada Sortida (T3); infusão de capítulos secos na concentração de 40 g.L⁻¹ da cultivar Bonina Dobrada Sortida (T4); infusão de capítulos secos na concentração de 10 g.L⁻¹ da cultivar Bon Bon Yellow (T5); infusão de capítulos secos na concentração de 40 g.L⁻¹ da cultivar Bon Bon Yellow (T6).

Ocorreu diminuição no índice mitótico, a partir da água destilada, sendo zero em todas as concentrações das infusões, com exceção do T3 que apresentou 0,1% para o valor do IM (Tabela 1). Porém, houve diminuição do IM em todas as concentrações das infusões e cultivares de calêndula em relação aos controles, com a predominância de células em interfase (Figura 1).

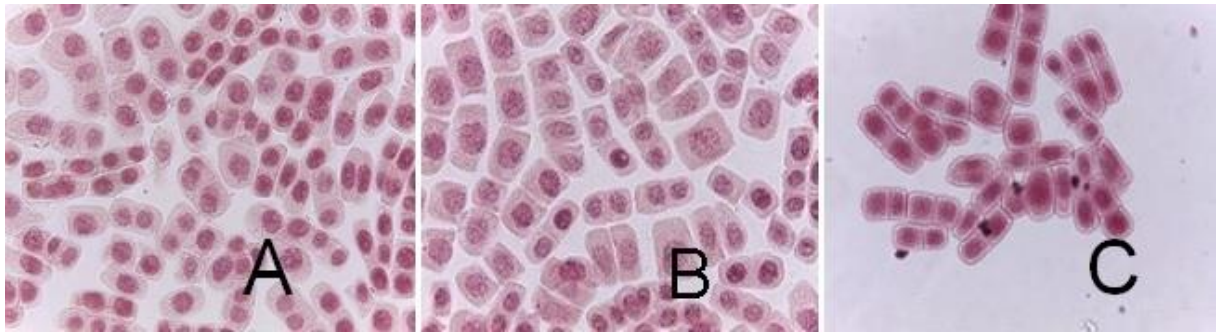


Figura 1. Células de *Allium cepa* tratadas com diferentes concentrações de infusões de *Calendula officinalis* L. observadas com auxílio de microscópio óptico com objetiva 40x. A- Células em interfase observadas no tratamento 4. B - Células em interfase observadas no tratamento T5. C- Células em interfase observadas no tratamento 3.

Em relação aos índices mitóticos, os resultados obtidos mostraram diferença significativa do controle em água destilada (T1) em relação a todos os tratamentos utilizados. O controle em glifosato (T2) também apresentou diferença significativa quando comparado com os demais tratamentos (infusão 10 g.L⁻¹ da cultivar Sortida χ^2 97,493 (T2xT3), infusão 40 g.L⁻¹ da cultivar Sortida χ^2 109,478 (T2xT4), infusão 10 g.L⁻¹ da cultivar Yellow χ^2 109,478 (T2xT5) e infusão 40 g.L⁻¹ da cultivar Yellow χ^2 109,478 (T2xT6).

A calêndula apresentou atividade antiproliferativa em testes *in vivo* realizados com *Allium cepa*. Houve inibição da divisão celular, ocasionando o decréscimo nos valores do IM das infusões em todas as concentrações analisadas, indicando atividade antiproliferativa de extratos oriundos de capítulos inteiros secos de calêndula. A capacidade de antiproliferação é benéfica por retardar o envelhecimento celular. Diversos chás são utilizados com esse fim, como o chá verde de *Camellia sinensis* L., que possui atividade antioxidante e inibidor de danos ao DNA (Cavalcanti et al. 2007). Ação antiproliferativa também foi constatada em infusões de *Achyrocline satureioides* (marcela), planta medicinal pertencente a mesma família da calêndula, sendo que a ação inibitória da divisão celular aumentou com o aumento da concentração do chá, bem como após dois anos de armazenamento (Fachinetti et al. 2007). O extrato de flores de marcela já havia sido identificado por inibir *in vitro* 67% o desenvolvimento de células cancerosas, além de ser não mutagênico (Arisawa 1994).

Já infusões obtidas de folhas secas de *Polygonum punctatum* foram observadas a ação antiproliferativa, mutagênica e genotóxica, sendo a ação antiproliferativa maior sob a menor concentração testada (0,4 g.mL⁻¹) em relação a concentração mais elevada (2,44 g.mL⁻¹), com valores de índice mitótico de 1,90% e 8,30% respectivamente (Pastori et al. 2015).

A ação antiproliferativa de infusões feitas de folhas secas e de extratos crus (folhas *in natura*) de *Allophylus edulis* apresentou maior inibição no extrato aquoso *in natura* sob a

maior concentração testada (16 g.L^{-1}) e a segunda maior inibição observada no extrato aquoso de folhas secas sob a mesma concentração. Também foram verificados efeitos genotóxicos nos tratamentos que utilizaram infusão de folhas secas e o extrato cru das folhas *in natura* sob a menor concentração (4 g.L^{-1}) (Pasquali et al. 2015). No presente estudo, não foram encontradas diferenças de inibição da divisão celular em relação às concentrações testadas.

Os efeitos genotóxicos e antiproliferativos de seis diferentes concentrações de infusões de folhas secas da espécie *Prunus myrtifolia* (pessegueiro-do-mato), obtiveram decréscimo dos valores dos índices mitóticos em todas as concentrações quando comparadas ao controle negativo, assim como houve no presente estudo (Trapp et al. 2015). Coelho et al. (2013) encontraram redução significativa do índice mitótico para extratos de folhas secas da espécie *Echinodorus longiscapus* na maior concentração estudada (24 g.L^{-1}), o que indica evidente potencial antiproliferativo.

Quanto ao número de células em divisão, o controle negativo (T1), apresentou o maior número de células em divisão (226) sendo predominantemente células em prófase. Já nas infusões, o T3 foi o único que apresentou células em divisão, com índice mitótico de 0,1%, sendo este valor muito baixo, não havendo diferença estatística em relação ao T4, T5 e T6 (Tabela 1). A predominância de células em prófase também foi encontrado por Pastori et al. (2015) ao estudar a ação antiproliferativa de infusões feitas de folhas secas de *Polygonum punctatum*.

Em relação às alterações na divisão celular, foram observadas ocorrências nas raízes de *Allium cepa* apenas no controle positivo em glifosato 2% (T2) na interfase e em diferentes fases da divisão celular. Pôde-se observar a ocorrência de células com ponte telofásica, divisão desorganizada e quebras cromossômicas. Nos tratamentos com infusões de calêndula, não foi possível observar alterações cromossômicas, já que não foram observadas células em divisão celular, com exceção de quatro células no T3.

As capacidades antiproliferativas das infusões testadas de calêndula podem estar correlacionadas com algumas substâncias em sua composição que proporcionam a inibição da divisão celular. Algumas substâncias com essas características foram citadas por Yoshikawa et al. (2001), como flavonóides, saponinas, glicosídeos e sesquiterpenos, e também por Dias et al. (2014) ao estudar infusões de *Mikania cordifolia* (L.F.) Wild. que apresentam também substâncias com as mesmas características, sendo elas triterpenos, esteroides, heterosídeos e flavonóides na sua composição (Bolina et al. 2009). A presença de taninos em flores de calêndula também pode ter relação com o efeito de inibição da divisão celular (Chakraborty

2010), assim como verificado por Teixeira et al. (2003). A atividade antiproliferativa também foi encontrada para a espécie *Mentha pulegium* L. (Tedesco et al. 2012).

O extrato aquoso de calêndula irradiado com luz no comprimento de onda de 650 nm possui dois efeitos complementares: efeito citotóxico em células de tumores e capacidade de ativação de linfócitos. A ele também está ligado a capacidade de induzir apoptose *in vitro* em alguns tipos de células cancerosas, a exemplo de células leucêmicas. Em testes *in vivo* realizados em ratos, o extrato demonstrou potencial de inibição do crescimento de células cancerosas “Ando-2 melanoma” (Jiménez-Medina et al. 2006)

Os resultados encontrados também são esperados em mamíferos e humanos, já que os testes com *Allium cepa* têm mostrado alta correlação com sistema teste de mamíferos e de carcinogenicidade em roedores (Rank e Nielsen, 1994). Teixeira et al. (2003) ao avaliar os efeitos da espécie *Psidium guajava* L. (goiabeira) e de *Achillea millefolium* L. (milefólio), espécie da mesma família da calêndula, encontrou resultados coincidentes em três sistemas testes: planta, roedores e humanos.

Sugere-se que novos estudos sejam realizados para verificar a possível ocorrência de efeitos tóxicos em doses ou formas de preparo diferentes das testadas, a fim de complementar o presente estudo e garantir que as infusões não causam danos ao material genético. Não foi possível verificar efeito genotóxico por ter ocorrido poucas células em divisão celular. O uso de infusões da espécie é relevante em pesquisas relacionadas à saúde humana.

5.4 Conclusão

Infusões de flores secas de *Calendula officinalis* L. na concentração de 10 g.L⁻¹ e 40 g.L⁻¹ das cultivares Bonina Dobrada Sortida e Bon Bon Yellow apresentam atividade antiproliferativa, causando alta inibição da divisão celular em raízes de *Allium cepa*.

5.5 Referências

- Arisawa M. 1994. Cell growth inhibition of KB cells by plant extracts. *Nature Medicine*. 48:338-347.
- Ayres M. 2003. *Bioestat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Brasília. CNPq.
- Bagatini, MD, Silva ACF da, Tedesco SB. 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17(3):444-447.

- Bolina RC, Garcia EE, Duarte MGR. 2009. Comparative study of the chemical composition of the species *Mikania glomerata* Sprengel and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19:294-298.
- Bortolo DPG, Marques PAA, Pacheco AC. 2009. Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 11(4):435-441.
- Chakraborty GS. 2010. Phytochemical screening of *Calendula officinalis* Linn leaf extract by TLC. *IJRAP*. 1(1):131-134.
- Cabrera GL, Rodriguez DMG. 1999. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant biossays. *Mutation Research*. 426(2):211-214.
- Cavalcanti ASS, Rosa JAB, Lima MSCS, Silva AG. 2007. O uso do chá verde, *Camellia sinensis* L. (Theaceae) em produtos tópicos. *Natureza Online*. 5(2):76-84.
- Coelho APD, Frescura VD, Mambri AP, Boligon, AB, Tedesco, SB. 2013. Avaliação dos compostos fenólicos e potencial genotóxico e antiproliferativo do extrato de *Echinodorus longiscapus* Arech. *Enciclopédia Biosfera*. 9(16):2698.
- Dias MG, Canto-Dorow TS, Coelho APD, Tedesco SB. 2014. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*. 16(2):202-208.
- El-Shahaby, OA, Abdel Migid, HM, Soliman, MI, Mashaly, IA. 2003. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 6(1):23-28.
- Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF da, Tedesco SB. 2007. Efeito anti-proliferativo das influções de *Achyrocline satuireioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17(1):49-54.
- Fiskejö G. 1994. Allium test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in roots tips of *Allium cepa* L. *Environmental Toxicological and Waters Quality. International Journal*. 9:235-241.
- Gazim ZC, Ferreira GA, Rezende CM, Nakamura CV, Filho BPD, Cortez DAG. 2007. Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis* L. produzida no Paraná. *Horticultura Brasileira*. 25:118-121.
- Grover IS, Kaur S. 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutation Research*. 426(2):183-188.
- Guerra M, Souza MJ. 2002. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto. UFRN.

- Jiménez-Medina E, Garcia-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. 2006. A new extract of the plant *calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*. 6:119.
- Lorenzi H, Matos FJA. 2008. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova odessa: Plantarum.
- Martins ER, Castro DM, Castellani, DC, Dias, JE. 2000. Plantas Medicinais. Viçosa. UFV.
- Mc Cord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase enzyme function for erythrocyte. *Journal of Biochemistry*. 244:6049–6056.
- Monarca S, Feretti D, Collivignarelli C, Guzella L, Zerbini I, Bertanza G, Pedrazzani R. 2000. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *34(17):4261-4269*.
- Olorunfemi DI, Ogieseri UM, Akinboro A. 2011. Genotoxicity screening of industrial effluents using onion bulbs (*Allium cepa* L.). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 15(1):211-216.
- Pasqualli M, Tedesco M, Tedesco SB. 2015. Potencial antiproliferativo e genotóxico de extratos de *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. pelo teste de *Allium cepa* L. *Enciclopédia Biosfera*. 11(21):2365.
- Pastori T, Kuhn, AW Tedesco M, Hoffmann CE, Neves LAS, Canto-Dorow TS, Tedesco SB. 2015. Ação genotóxica e antiproliferativa de *Polygonum punctatum* Elliott (Polygonaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. *Revista Brasileira Plantas Medicinais*. 17(2):186-194.
- Preethi KC, Kuttan G, Kuttan R. 2006. Antioxidant Potential of an extract of *Calendula officinalis* flowers *in vitro* and *in vivo*. *Pharmaceutical Biology*. 44(9)691–697.
- Pires NM, Souza IRP, Prates HT, Faria TCL, Filho IAP, Magalhães PC. 2001. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 13(1)55:65.
- Pommier P. 2004. Phase III Randomized trial of *Calendula officinalis* L. compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 22(8):1447–1453.
- Rank J, Nielsen MH. 1994. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutation Research*. 312(1):17-24.
- Silva F, Park KJ, Magalhães PM. 2007 Isotermas de dessorção de *Calendula officinalis* L.: determinação experimental e modelagem matemática. *Revista Brasileira Plantas Medicinais*. 9(1):21-28.
- Silva Junior AA. 2006. *Essentia herba: plantas bioativas*. Florianópolis: EPAGRI.

- Tedesco M, Kuhn AW, Aguiar, AR, Silva, ACF, Tedesco SB. 2012. Potencial antiproliferativo de extratos aquosos de *Mentha pulegium* L. pelo teste de *Allium cepa* L. Enciclopédia Biosfera. 8(15):1913.
- Teixeira RO, Camparoto ML, Mantovani MS, Vicentini, VEP. 2003. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. Genetics and Molecular Biology. 26(4):551–555.
- Trapp KC, Frescura VDS, Freitas JMB, Canto-Dorow TS, Tedesco SB. 2015. Efeitos genotóxicos e antiproliferativos de *Prunus myrtifolia* (pessegueiro-do-mato) pelo teste de *Allium cepa*. Enciclopédia Biosfera. 11(21):2222.
- Veiga, VF, Pinto, AC, Maciel, MAM. 2005. Plantas medicinais: Cura segura?. Química Nova. 28(3):519–528.
- Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A, Kageura T, Metsuda H. 2001. Medicinal flowers III. Marigold. (1): Hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane - type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 49:863–870.

6 DISCUSSÃO

A partir dos resultados dos capítulos 1 e 2, é possível verificar que as épocas de cultivo, cultivares e sistemas de cultivo interagem para os principais caracteres de crescimento e desenvolvimento da *Calendula officinalis* L. bem como influenciam a estimativa dos tamanhos de amostra.

As diferenças de condições ambientais, principalmente de temperatura do ar e precipitação, geram uma grande variabilidade nas plantas de calêndula, comprovado pela grande amplitude dos coeficientes de variação verificados nos tratamentos. A exemplo disto, o capítulo 2 verificou que de maneira geral os maiores CV foram observados na época outubro/14, a qual apresentou as condições climáticas menos propícias ao correto desenvolvimento da espécie, com maior temperatura média do ar e menor precipitação acumulada.

Os tamanhos de amostra definidos contemplando os doze tratamentos foram de 36, 29 e 12 plantas para estimação da média de altura de planta, altura do capítulo e diâmetro do capítulo, respectivamente, com amplitude do intervalo de confiança de 95% ($AIC_{95\%}$) variando 20% da estimativa da média. Verifica-se que a quantidade de plantas amostrados no capítulo 1 foi superior a necessidade estimada no capítulo 2. Já para o caractere número de folha, o valor amostrado foi inferior ao tamanho de amostra definido para os tratamentos 5 e 7 da primeira avaliação, e dos tratamentos 1, 3, 5, 7 e 10 da segunda avaliação.

Entretanto, apesar da amostragem realizada no capítulo 1 ter sido menor do que o tamanho de amostra calculado no capítulo 2, as 50 plantas foram suficientes para verificar interação entre os fatores e diferenças estatísticas entre as médias. O mesmo comportamento ocorreu para o caractere massa seca de planta, variável com grande heterogeneidade e que apresenta coeficientes de variação entre 30 e 60% como já comprovado em alguns trabalhos com diferentes culturas (BURIN et al., 2014; CARGNELUTTI FILHO, 2015).

Pode-se perceber que houve influência das épocas de cultivo para todos os caracteres avaliados no capítulo 1, o que é esperado já que as variações climáticas afetam fortemente o crescimento e desenvolvimento das plantas. O mesmo resultado ocorreu para os tamanhos de amostra estimados no capítulo 2, em que houve variação nos tamanhos definidos para as diferentes épocas de cultivo. A definição dos tamanhos de amostra para os diferentes tratamentos podem ajudar pesquisas futuras com a cultura, já que estas informações não estavam disponíveis até então.

A espécie foi capaz de desenvolver-se nas estações primavera/verão (épocas agosto e outubro de 2014) assim como no outono/inverno (época abril de 2015). Os capítulos florais na haste principal apresentaram tamanhos semelhantes ao encontrado na literatura (DUDA et al., 2010), com média geral de 6,02 cm.

Dada a larga utilização da inflorescência na medicina popular, o capítulo 3 avaliou infusões de capítulos secos de calêndula para verificar eventuais efeitos nocivos ao consumo humano. Os resultados demonstraram efeitos antiproliferativos com significativa redução do índice mitótico para todas as infusões testadas, o que é interessante na redução do envelhecimento celular, porém não foi possível determinar os efeitos genotóxicos uma vez que não houve divisão celular.

7 CONCLUSÃO GERAL

A época de cultivo do outono-inverno (abril de 2015) em Santa Maria – RS proporcionou maior duração de cultivo, com período de florescimento mais longo, taxa de crescimento mais elevada com maior acúmulo de matéria seca e maior número de folhas, independente do sistema de cultivo utilizado ou da cultivar. A maior média para diâmetro dos capítulos da haste principal também ocorre nesta época, obtendo-se 6,82 cm. Verifica-se que a época outubro de 2014 teve menor acúmulo de massa em decorrência das altas temperaturas do verão, prejudicando os caracteres de interesse da espécie.

A cultivar Bonina Dobrada Sortida é aquela com melhores características de crescimento, com emissão de flores e plantas mais altas, maior número de folhas e maior acúmulo de matéria seca, independente da época ou sistema de cultivo além de maiores diâmetros de capítulo e maior duração de floração. O sistema de semeadura direta é uma alternativa viável de cultivo, já que dispensa a necessidade de produção de mudas e posterior transplante, bem como apresenta melhores resultados para a maioria dos caracteres em questão. As sementes colhidas nas épocas de semeadura do estudo apresentam baixa porcentagem de germinação a partir do teste de germinação em laboratório, sendo inviável sua utilização pelos produtores.

São necessários maiores tamanhos de amostra para avaliação da média do caractere produtivo massa seca de planta em relação aos caracteres morfológicos altura de flor, altura de planta, número de folhas e diâmetro do capítulo de calêndula, havendo grande variabilidade nos tamanhos de amostra entre caracteres para as diferentes épocas de cultivo. Há menor necessidade de plantas para as épocas que apresentaram melhores condições climáticas e conseqüentemente desenvolvimento mais homogêneo das plantas. A amostragem de 190 plantas é suficiente para estimar a média dos caracteres em estudo, contemplando todos os tratamentos, para amplitude do intervalo de confiança de 95% com erro de estimação máximo de 20% da média.

As infusões produzidas dos capítulos secos oriundos da época de cultivo agosto de 2014, colhidos em final de outubro até meados de novembro, apresentam atividade antiproliferativa sobre as células de *Allium cepa*, com redução significativa do índice mitótico em relação aos controles independente da cultivar ou da concentração do chá.

8 REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. de M. et al. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**. São Paulo, v.20, n.1:2, p.65-72. 2007.
- ANGELINI, L. G. et al. Variation in agronomic characteristics and seed oil composition of new oilseed crops in central Italy. **Industrial Crops and Products**, v. 6, n. 3-4, p. 313–323, 1997.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Primeira edição de Memento Fitoterápico Brasileiro terá consulta pública**. Brasília, 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2015/primeira+edicao+de+memento+fitoterapico+brasileiro+tera+consulta+p+ublica>. Acesso em: 20 jan. 2016.
- BAGATINI, M. D.; CARLOS, A.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, v.17, n. 3, p.444–447, 2007.
- BARBOSA, C.K.R. et al. Influência do substrato e do tamanho da célula de bandejas de poliestireno expandido no desenvolvimento de mudas e produção de calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p.18–22, 2010.
- BAUMANN, L. S. Cosmeceutical critique: calendula. (Dermatologic Therapy). **Skin & Allergy News**, v.34, n.10, p.17, 2003.
- BERTONI, B. W. et al. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.8, n.2, p.48-54, 2006.
- BERTONI, B.W. **Propagação clonal e gâmica de *Calendula officinalis* L.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 1999. 77p.
- BEVILACQUA, C. B. **Germinação e cultivo *in vitro* de *Calendula officinalis* L.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009. 76p.
- BILIA, A.R. et al. Stability of the constituents of calendula, milk-thistle and passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.30, n.3, p.613-24, 2002.
- BISSA, S.; BOHRA, A. Antibacterial potential of pot marigold. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v.3, n.3, p.51-54, mar. 2011.
- BORBA, E. T.; MARQUES, B.H.; ZANETTE, V.C. Produção orgânica de calêndula: um estudo de caso. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.42, n.11, nov. 2012.
- BRAGA J. R. **Estudo sobre a distribuição do N no dimensionamento de amostras**. Piracicaba: ESALQ, 1986. 100p.

BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Revista Ambiente e Água**. Taubaté, v.10, n.1 jan./mar. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plantas de Interesse ao SUS**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277>. Acesso em: Jan de 2015.

BRASIL. Plantas Medicinais. **Orientações Gerais para o cultivo I: Boas Práticas Agrícolas de Plantas Medicinais e Condimentares**. MAPA. Brasília, 2006. 47p.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. Plantas medicinais geram renda para agricultores familiares. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.mda.gov.br/sitemda/noticias/plantas-medicinais-geram-renda-para-agricultores-familiares#sthash.Lw1ERPNq.dpuf>>. Acesso em: Fev de 2015.

BURIN, C. et al. Dimensionamento amostral para a estimação da média e da mediana de caracteres de tremoço branco (*Lupinus albus* L.). **Comunicata Scientiae**, v.5, n.2, p.205–212, abri./jun. 2014.

BUSSAB, W.O.; DINI, N.P.; MANCINI, S.R. Plano amostral: pesquisa de emprego e desemprego. **São Paulo Em Perspectiva**. São Paulo, v.17, 2003.

BUSSAB, W.O.; MORETIN, P. A. **Estatística Básica**. 7. ed. São Paulo: Saraiva, 2012. 540p.

CABRERA, G.L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, v.426, n.2, p.211-214, 1999.

CALIXTO, J.B. Twenty-five of research on medicinal plants in Latin America. **Journal of Ethnopharmacol**, v.100, n.1:2, p.131-134, 2005.

CAMPAROTO, M. L. et al. Effects of Maytenus ilicifolia Mart. and Bauhinia candicans Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.1, p.85-89, 2002.

CAMPOS, H. **Estatística e Experimentação Agrônômica** – amostragem I. Piracicaba: ESALQ/USP, 1985. 17p.

CARDOSO, S. L. Fotofísica de carotenóides e o papel antioxidante de β -caroteno. **Química Nova**. Rio de Janeiro, v.20, n.5, 1997.

CARGNELUTTI FILHO, A. et al. Dimensionamento amostral para avaliar caracteres morfológicos e produtivos de aveia preta em épocas de avaliação. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.45, n.1, p.9–13, 2015.

CARGNELUTTI FILHO, A. et al. Tamanho de amostra e relações lineares de caracteres morfológicos e produtivos de crambe. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.40, p.2262–2267, 2010.

CARGNELUTTI FILHO, A. et al. Tamanho de amostra para a estimação da média do comprimento, diâmetro e massa de sementes de feijão de porco e mucuna cinza. **Ciência**

Rural. Santa Maria, v.42, p.1541–1544, set. 2012.

CARGNELUTTI FILHO, A. Tamanho de amostra para a estimação da média de caracteres morfológicos e produtivos de nabo forrageiro. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.44, n.2, p.223-227, fev. 2014.

CASTRO, L.O.; CHEMALE, V.M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo**. Guaíba: Agropecuária, 1995. 196p.

CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba, EMATER-PR, 1991. 151p.

CROMACK, H. T. H.; SMITH, J. M. *Calendula officinalis* – production potential and crop agronomy in southern England. **Journal Industrial Crops and Products**, v.7, n.2, p.223-229, 1998.

CUCHIARA, C. C. et al. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**. João Pessoa, v.6, n.1, p.33-38, 2012.

DELLA-LOGGIA et al. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis*. **Planta Medicine Dec.**, v.60, n.6, p.516-520, 1994.

DUDA, M. M. et al. Research on the Cultivation of 8 Marigold Varieties (*Calendula Officinalis* L.) in Various Conditions of Fertilization in the Jucu, Cluj. **Bulletin UASVM Agriculture**, v.67, n.1, p.101-106, 2010.

EL-SHAHABY, O. A. et al. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.6, n.1, p.23-28, 2003.

FARNSWORTH, N. R. **Screening plants for new medicines**. Washington DC: National Academies Press, 1988. 521p.

FERNADES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, p.225-259, 2007.

FERREIRA, D.F. **Estatística básica**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2009. 664p.

GALLO, M.; KOREN, G. Can herbal products be used safely during pregnancy? Focus on Echinacea. **Canadian Family Physician**, v.47, p.1727-8, 2001.

GAZIM, Z. C. et al. Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis* produzida no Paraná. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.25, n.1, p.118-121, jan./mar. 2007.

GIL, B. Á.; CASTILLO, R. M.; ROQUE, C. G.; FERNÁNDEZ, D. Extracto acuoso de *Calendula officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.5, n.1, p.30-31, 2000.

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, n. 2, p.183-188, 1999.

GUERRA, A. M. N. de M. et al. Utilização de plantas medicinais pela comunidade rural Moacir Lucena, Apodi-RN. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 26, n.3, p.442-450, maio/jun. 2010.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v.18, p.45-51, 2003.

HEITOR, L. C. et al. Crescimento e produção de capítulos florais de calêndula em resposta à inoculação micorrízica e fósforo. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.34, p.26-30, 2016.

HOBOLD, C. **Visitantes florais das plantas medicinais *Calendula officinalis* L. (*Asteraceae*), *Chamomilla recutita* L. (*Asteraceae*) e *Foeniculum vulgare* Mill. (*Apiaceae*), cultivadas no município de Grão-Pará, Santa Catarina**. 2009. 58 p. Trabalho de Conclusão de curso (Bacharel em Ciência Biológicas) - Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, 2009.

HONÓRIO, I. C. G. **Crescimento, desenvolvimento e teor de flavonoides em calêndula (*Calendula officinalis* L.)**. 2013. 44p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

JIMÉNEZ-MEDINA, E. et al. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. **BMC Cancer**, v. 6, p.119, 2006.

KISHIMOTO, S. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.69, n.11, p.2122–2128, 2005.

KOEFENDER, J. **Crescimento de calêndula e produção de flavonóides em diferentes épocas de semeadura e suprimento hídrico**. 2008. 112p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.

LEITE, M. S. de O. et al. Sample size for full-sib Family evaluation in sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.44, n.12, dez. 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v.24, p.471-486, 1938.

LONGHIN, S. R. **Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos**. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química da Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3.ed., Nova Odessa: Plantarum, 2001. 1130p.

LÚCIO, A. D. et al. Tamanho da amostra e método de amostragem para avaliação de características do pimentão em estufa plástica. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.21, n.2, abr./jun. 2003.

LUZ, L. A de La.; FERRADÁ, C. R.; GOVÍN, E. S. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. Havana, v.6, n.1, p.23–27, 2001.

MACEDO, A.F.; OSHIIWA, M.; GUARIDO, C.F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**. Araquara, v.28, n.1, p.123-128, 2007.

MACHADO, V. P. de. **Ação de bioestimulante no crescimento, desenvolvimento e teor de flavonóides de calêndula (*Calendula officinalis* L.)**. 2012. 45p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP. 2012.

MARQUES, P. A.; BORTOLO, D. P. G.; SANTOS, A. C. P. Produtividade de inflorescências de calêndula sob irrigação suplementar na região do oeste paulista. **Irriga. Botucatu**, v.16, n.2, p.153-162, abr./jun. 2011.

MARTIN, T. N. et al. Plano amostral em parcelas de milho para avaliação de atributos de espigas. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.35, p.1257-1262, 2005.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 220p.

MAZARO, S. M. et al. Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução da síntese de fitoalexinas e no efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea*, in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.15, n.2, p.208–216, 2013.

MENEGHELLO, G. E.; SCHNEIDER, S. M. H.; LUCA-FILHO, O. A. Veracidade da germinação indicada nas embalagens de sementes de espécies medicinais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 5–10, 2002.

MOBOT. Missouri Botanical Garden. **W3 Tropics**. Missouri, 2015 Disponível em: <http://mobot.mobot.org/W3T/search/vast.html>. Acesso em: 05 dez. 2015.

MONARCA, S. et al. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, v.34, n.17, p.4261-4269, 2000.

NIELSEN, M. H.; RANK, J. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the Allium test. **Hereditas**, v.121, n.3, p.249-254, 1994.

PACHECO, A. C.; CASTRO, P. R. C. E.; SOUZA, G. M. Deficiência hídrica e aplicação de ABA nas trocas gasosas e no acúmulo de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n. 2, p. 275–281, 2011.

- PARENTE, L. M. L. et al. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. São Paulo, v.26, n.1, p.19-24, 2011.
- PASTORI, T. et al. Ação genotóxica e antiproliferativa de *Polygonum punctatum* Elliott (Polygonaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.17, n.2, p.186–194, 2015.
- PAULA, R. P. de. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de citotoxicidade e genotoxicidade em *Aristolochia elegans* Mast. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, v.11, n.21, p.1749, 2015.
- PEDRO, J. **Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2008.
- PREETHI, K. C.; KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Antioxidant Potential of an extract of *Calendula officinalis* flowers *in vitro* and *in vivo*. **Pharmaceutical Biology**, v.44, n.9, p.691–697, 2006.
- RAAL, A.; KIRSIPUU, K. Total flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from different countries and cultivated in Estonia. **Natural Product Research**, v.25, n.6, p.658-662, 2011.
- RESENDE, M. D. V. de.; SOUZA JÚNIOR, C. L. de. Número de repetições e tamanho da parcela para seleção de progênies de milho em solos sob cerrado e fértil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.32, n.8, p.781-788, ago. 1997.
- RODRIGUES, P. O. et al. Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (*Asteraceae*). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.23, n.1, p.27-31, 2004.
- SAMPAIO, J. et al. Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. Obtidos por infusão. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v.10, n.4, p.462-467, out./dez. 2012.
- SCHULTZ, A. **Introdução à botânica sistemática**. 5.ed. Porto Alegre: Sagra UFRGS, 1990. 144p.
- SILVA JUNIOR, A. A. **Essentia herba-plantas bioativas**. Florianópolis: Epagri, 2006. 663p.
- SILVA, J., ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003. 344p.
- SILVEIRA, M. A. M.; VILLELA, F. A.; TILLMANN, M. A. A. Maturação fisiológica de sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v.24, n.2, p.31-37, 2002.
- SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-9, 1988.

STORCK, L. et al. **Experimentação vegetal**. 3.ed. Santa Maria: UFSM, 2011. 200p.

TEIXEIRA, R. de O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p.551–555, 2003.

TICE, R. R. et al. The single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

TOEBE, M. et al. Dimensionamento amostral para estimação de coeficientes de correlação em híbridos de milho, safras e níveis de precisão. **Bragantia**. Campinas, v.74, n.1, p.16-24, 2015.

TOEBE, M. et al. Tamanho de amostra para estimação da média e do coeficiente de variação em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.49, n.11, p.860–871, 2014.

TRAPP, K. C. et al. Efeitos genotóxicos e antiproliferativos de *Prunus myrtifolia* (pessegueiro-do-mato) pelo teste de *Allium cepa*. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, v.11, n.21, p.2222, 2015.

VIEIRA, M. C. et al. Crescimento e produção de biomassa de calêndula (*Calendula officinalis* L.) proveniente de dois tipos de diásporos e duas colorações de capítulos florais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.8, p.193–197, 2006.