



Diocléa Almeida Seabra Silva
(Organizadora)

Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva 6



Diocléa Almeida Seabra Silva
(Organizadora)

Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva 6

Atena
Editora

Ano 2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Natália Sandrini
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobom – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
A281	<p>Agronomia [recurso eletrônico] : elo da cadeia produtiva 6 / Organizadora Diocléa Almeida Seabra Silva. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva; v. 6)</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-825-0 DOI 10.22533/at.ed.250190312</p> <p>1. Agricultura – Economia – Brasil. 2. Agronomia – Pesquisa – Brasil. I. Silva, Diocléa Almeida Seabra. II. Série.</p> <p style="text-align: right;">CDD 630.981</p>
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A cadeia produtiva é um termo amplo que define com clareza onde cada segmento tem seu grau de importância seja na produtividade de frutos, venda de semente de capineira, na pesca, na aquicultura, na formação de resíduos para a indústria, no controle determinado de vírus, bactérias, nematóides para a agricultura e até mesmo na comercialização de espécies florestais com potencial madeireiro. Na verdade, o termo cadeia produtiva é um conjunto de ações ou processos que fazem presente em estudos científicos que irá dar imagem para o avanço de um produto final.

A imagem de um produto final se torna possível quando trabalhamos todos os elos da cadeia, como por exemplo: para um produtor chegar a comercializar o feijão, ele precisará antes preparar seu solo, ter maquinários pra isso, além de correr o solo com corretivo, definindo a saturação de base ideal, plantar a semente de boa qualidade, adubar, acompanhar a produção fazendo os tratamentos culturais adequados, controlando pragas, doenças e ervas daninhas, além de encontrar mercados para que o mesmo possa vender sua produção. Esses elos são essenciais em todas as áreas, ao passo que na produção de madeira será necessário técnicas sofisticadas de manejo que começa na germinação de sementes, quebra de dormência para a formação de mudas, e além disso padronizar espaçamento, tratamentos silviculturais para a formação de madeira em tora para exportação.

Na pesca a cadeia produtiva segue a vertente do ganho de peso e da qualidade da carne do pescado, que está vinculada a temperatura, pH da água, oxigenação, alimentação e o ambiente para que haja produção. Também a cadeia se verticaliza na agregação de preço ao subproduto do pescado como o filetagem para as indústrias, mercado de peixe vivo e etc.

Na cadeia cujo foco são os resíduos da indústria açucareira, há mercados para a queima de combustível no maquinário da indústria, através da qualidade deste resíduo, além de mercados promissores para a fabricação de combustíveis, rações e até mesmo resíduo vegetal para incorporação nos solos, com a finalidade de manter ou melhorar as características químicas, físicas e biológicas, além de controlar erosão e elevar os níveis de produtividade nas áreas agrícolas, através da adição de nutrientes.

Contudo, sabemos que todos os elos que compõem a cadeia produtiva são responsáveis por agregar valor e gerar de maneira direta e indireta renda aos produtores e pescadores, possibilitando-os na melhoria da qualidade de vida, além da obtenção de produtos de alta qualidade. No entanto, aqui se faz presente a importância das pesquisas mostradas neste E-Book, v. 6 – Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva para que o leitor possa perceber novidades que são contextualizadas, através dos trabalhos aqui publicados.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM JILOEIRO (<i>Solanum gilo</i>) COM RESÍDUO DO FRUTO DE PEQUI (<i>Caryocar brasiliense</i>)	
Rodrigo Vieira da Silva João Pedro Elias Gondim Fabrício Rodrigues Peixoto Luam Santos Emmerson Rodrigues de Moraes José Humberto Ávila Júnior Luiz Leonardo Ferreira Silvio Luis de Carvalho	
DOI 10.22533/at.ed.2501903121	
CAPÍTULO 2	12
FUNGOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITONEMATOIDES	
Valéria Ortaça Portela Juliane Schmitt Leticia Moro	
DOI 10.22533/at.ed.2501903122	
CAPÍTULO 3	22
NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (NEPs)	
Raiana Rocha Pereira Josiane Pacheco de Alfaia Artur Vinícius Ferreira dos Santos Débora Oliveira Gomes Raphael Coelho Pinho Lyssa Martins de Souza Shirlene Cristina Brito da Silva Telma Fátima Vieira Batista	
DOI 10.22533/at.ed.2501903123	
CAPÍTULO 4	33
ICTIOFAUNA DA PRAIA DE BERLINQUE, ILHA DE ITAPARICA, MUNICÍPIO DE VERA CRUZ - BA	
Edilmar Ribeiro Sousa Hortência Ramos Gomes Santos Fabrício Menezes Ramos	
DOI 10.22533/at.ed.2501903124	
CAPÍTULO 5	44
PESCADORES E SUAS PERCEPÇÕES SOBRE A PESCA EM PEQUENA ESCALA: ESTUDO DE CASO NA VILA DOS PESCADORES, COMUNIDADE COSTEIRA NA AMAZÔNIA (BRAGANÇA-PARÁ)	
Maria Eduarda Garcia de Sousa Pereira Thaila Cristina Neves do Rosário Hanna Tereza Garcia de Sousa Moura Elizete Neres Monteiro Francisco José da Silva Santos	
DOI 10.22533/at.ed.2501903125	

CAPÍTULO 6	57
INFLUÊNCIA DE CULTIVAR E DO PERÍODO DE COLHEITA NA PRODUTIVIDADE E NO PADRÃO DE FRUTOS DE MAMOEIROS, INTRODUZIDOS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, EM CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DO AMAZONAS	
Lucio Pereira Santos Enilson de Barros Silva Scheilla Marina Bragança	
DOI 10.22533/at.ed.2501903126	
CAPÍTULO 7	71
MÉTODOS QUÍMICOS NA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA DE <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst ex A. Rich.) Stapf	
Tiago de Oliveira Sousa Mahany Graça Martins Marcela Carlota Nery Marcela Azevedo Magalhães Thaís Silva Sales Letícia Lopes de Oliveira Letícia Aparecida Luiz de Azevedo Bruno de Oliveira Fernandes	
DOI 10.22533/at.ed.2501903127	
CAPÍTULO 8	79
MICROBIOMA BACTERIANO: EXTRAÇÃO E PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS	
Juliano Oliveira Santana Karina Peres Gramacho Katiúcia Tícila de Souza de Nascimento Rachel Passos Rezende Carlos Priminho Pirovani	
DOI 10.22533/at.ed.2501903128	
CAPÍTULO 9	106
MODELO PARA A MELHORIA DO PROCESSO DE REGULARIZAÇÃO DA AQUICULTURA PRATICADA EM RESERVATÓRIOS DA UNIÃO BRASILEIRA	
Sara Monaliza Sousa Nogueira Marco Aurélio dos Santos Sandro Alberto Vianna Lordelo José Rodrigues de Farias Filho	
DOI 10.22533/at.ed.2501903129	
CAPÍTULO 10	123
NOVA VARIEDADE SEMINAL DE <i>STEVIA REBAUDIANA</i> : OBTENÇÃO DE FRAÇÕES COM ALTO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FOLHAS	
Paula Gimenez Milani Maysa Formigoni Antonio Sergio Dacome Livia Benossi Maria Rosa Trentin Zorzenon Simone Rocha Ciotta Cecília Edna Mareze da Costa Silvio Claudio da Costa	
DOI 10.22533/at.ed.25019031210	

CAPÍTULO 11 136

OS CENTROS DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS E O PRISIONAL: REFLEXIBILIDADE AMBIENTAL E NA SAÚDE

Paulo Barrozo Cassol
Edenilson Perufo frigo
Alberto Manuel Quintana

DOI 10.22533/at.ed.25019031211

CAPÍTULO 12 148

PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA PARA CARACTERIZAÇÃO DA FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA TRATADA COM COMBINAÇÕES QUÍMICAS DE FUNGICIDAS SISTÊMICOS E DE CONTATO

Milton Luiz da Paz Lima
Gleina Costa Silva Alves
Matheus do Carmo Leite
Andressa de Souza Almeida
Rafaela Souza Alves Fonseca
Cleberly Evangelista dos Santos
Marciel José Peixoto
Flavia de Oliveira Biazotto
Lettícia Alvarenga
Justino José Dias Neto
Wesler Luiz Marcelino

DOI 10.22533/at.ed.25019031212

CAPÍTULO 13 166

PRODUÇÃO DA SOJA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES ÉPOCAS DE APLICAÇÃO DE BIOESTIMULANTE

Cristiano de Freyn
Alexandre Luis Müller
Dyogo Bortot Brustolin
André Prechtlak Barbosa
Martios Ecco
Vitor Hugo Rosseto Belotto
Luiz Henrique da Costa Figueiredo
Vinícius Fernando Carrasco Gomes
Matheus Henrique de Lima Raposo
Anderson José Pick Benke
Arlon Felipe Pereira
Alan Benincá

DOI 10.22533/at.ed.25019031213

CAPÍTULO 14 174

BIOGAS PRODUCTION FROM SECOND GENERATION ETHANOL VINASSE

Manuella Souza Silverio
Rubens Perez Calegari
Gabriela Maria Ferreira Lima Leite
Bianca Chaves Martins
Eric Alberto da Silva
José Piotrovski Neto
Mario Wilson Cusatis
André Gomig
Antonio Sampaio Baptista

DOI 10.22533/at.ed.25019031214

CAPÍTULO 15 185

PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM SISTEMAS VEGETAIS: VÍRUS DE PLANTAS COMO REATORES DE FÁRMACOS

Nicolau Brito da Cunha
Michel Lopes Leite
Kamila Botelho Sampaio
Simoni Campos Dias

DOI 10.22533/at.ed.25019031215

CAPÍTULO 16 219

PROGNOSE DO VOLUME DE MADEIRA EM FLORESTAS EQUIÂNEAS POR MEIO DE MODELOS AGROMETEOROLÓGICOS DE REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

Mariana Rodrigues Magalhães Romeiro
Aristides Ribeiro
Leonardo Bonato Felix
Aylen Ramos Freitas
Mayra Luiza Marques da Silva
Aline Edwiges Mazon de Alcântara

DOI 10.22533/at.ed.25019031216

CAPÍTULO 17 232

QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE FEIJÃO AMENDOIM, TRATADAS COM FERTILIZANTE ORGANOMINERAL E SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO

Thiago Figueiredo Paulucio
Paula Aparecida Muniz de Lima
Rodrigo Sobreira Alexandre
José Carlos Lopes

DOI 10.22533/at.ed.25019031217

CAPÍTULO 18 245

QUALIDADE MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE FEIJÃO

Manoel Victor Borges Pedrosa
Arêssa de Oliveira Correia
Patrícia Alvarez Cabanez
Allan de Rocha Freitas
Rodrigo Sobreira Alexandre
José Carlos Lopes

DOI 10.22533/at.ed.25019031218

CAPÍTULO 19 256

RELAÇÕES ENTRE A UMIDADE E ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE *PINUS* SP., ANGELIM-PEDRA (*HYMENOLOBIMUM PETRAEUM*) E CAIXETA (*TABEBUIA CASSINOIDES*)

Vitor Augusto Cordeiro Milagres
Jessyka Cristina Reis Vieira
Luiz Carlos Couto
Magno Alves Mota

DOI 10.22533/at.ed.25019031219

CAPÍTULO 20 262

TEOR DE NITROGÊNIO ORGÂNICO NAS FOLHAS E DE PROTEÍNA BRUTA NOS GRÃOS DE SOJA FERTILIZADA COM NITROGÊNIO E MOLIBDÊNIO

Lucio Pereira Santos
Clibas Vieira

DOI 10.22533/at.ed.25019031220

CAPÍTULO 21	280
TEORES DE MANGANÊS EM <i>Pereskia Grandfolia</i> Haw.	
Nelma Ferreira de Paula Vicente	
Erica Alves Marques	
Michelle Carlota Gonçalves	
Abraão José Silva Viana	
Adjaci Uchôa Fernandes	
Roberta Hilsdorf Piccoli	
DOI 10.22533/at.ed.25019031221	
CAPÍTULO 22	285
THE HEIGHT OF CROP RESIDUES INFLUENCES INTAKE RATE OF SHEEP IN INTEGRATED CROP-LIVESTOCK SYSTEMS	
Delma Fabíola Ferreira da Silva	
Carolina Bremm	
Vanessa Sehaber	
Natália Marcondes dos Santos Gonzales	
Breno Menezes de Campos	
Anibal de Moraes	
Anderson M. S. Bolzan	
Alda Lucia Gomes Monteiro	
Paulo César de Faccio Carvalho	
DOI 10.22533/at.ed.25019031222	
CAPÍTULO 23	298
USO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE AÇÚCAR E ÁLCOOL: BENEFÍCIOS E PERDAS	
Camila Almeida dos Santos	
Leonardo Fernandes Sarkis	
Eduardo Carvalho da Silva Neto	
Luis Otávio Nunes da Silva	
Leonardo Duarte Batista da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.25019031223	
SOBRE A ORGANIZADORA	310
ÍNDICE REMISSIVO	311

CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM JILOEIRO (*Solanum gilo*) COM RESÍDUO DO FRUTO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*)

Rodrigo Vieira da Silva

Eng.º Agrônomo, Doutor em Fitopatologia,
Professor do Instituto Federal Goiano – Campus
Morrinhos, Morrinhos – GO

João Pedro Elias Gondim

Eng.º Agrônomo, Doutorando em Fitopatologia,
Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG

Fabrcio Rodrigues Peixoto

Eng.º Agrônomo, IF Goiano – Campus Morrinhos,
Morrinhos – GO

Luam Santos

Eng.º Agrônomo, Mestre em Olericultura pelo
Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos,
Morrinhos – GO

Emmerson Rodrigues de Moraes

Eng.º Agrônomo, Doutor em Ciências do Solo,
Professor do Instituto Federal Goiano – Campus
Morrinhos, Morrinhos – GO

José Humberto Ávila Júnior

Mestre em Olericultura Instituto Federal Goiano
-Campus Morrinhos

Luiz Leonardo Ferreira

Eng.º Agrônomo, doutor em Fitotecnia
pela UFRural do Semi-Árido. Prof. UEG -
Mineiros do Centro Universitário de Mineiros
(UNIFIMES). Mineiros/GO

Silvio Luis de Carvalho

Eng.º Agrônomo, Mestre em Olericultura, IF
Goiano – Campus Morrinhos, Morrinhos – GO.
Prof. Agronomia, Unicerrado, Goiatuba/GO.

RESUMO: Os nematoides de galhas causam perdas significativas na cultura do jiloeiro (*Solanum gilo*). O controle alternativo torna-se interessante frente ao manejo químico convencional, que pode apresentar riscos de contaminação ambiental. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do resíduo do fruto de pequi (*Caryocar brasiliense*) no controle de *Meloidogyne javanica* em jiloeiro. O experimento foi instalado em casa de vegetação utilizando o delineamento em blocos casualizados com seis tratamentos e oito repetições. Os tratamentos consistiram na aplicação das doses de 0; 2,5; 5; 10 e 20 g L⁻¹ de resíduo do fruto de pequi. O tratamento sem inoculação e sem resíduo foi utilizado como controle negativo. As variáveis analisadas aos 65 dias após a inoculação de 5000 ovos de *M. javanica* foram: altura de planta, matéria fresca da parte aérea, matéria fresca das raízes, matéria seca da parte aérea, índice de galhas, número de ovos e fator de reprodução (*M. javanica*). O teste de médias de Tukey foi utilizado no programa estatístico SISVAR com 5 % de probabilidade nas avaliações. O produto incorporado no solo, independentemente da dose, não influenciou as variáveis de desenvolvimento das plantas. Na dose mais alta houve uma redução significativa no número de galhas, número de ovos e fator de reprodução em relação à dose zero. Assim, o resíduo do

fruto de pequi apresentou ação nematicida contra *M. javanica*.

PALAVRAS-CHAVE: controle alternativo, cultura do jiloeiro, nematoides de galhas.

MANAGEMENT OF *Meloidogyne javanica* IN *Solanum gilo* CULTIVATED IN NURSERY POTS UNDER PROTECTED ENVIRONMENT WITH DIFFERENT DOSES OF PEQUI FRUIT RESIDUE (*Caryocar brasiliense*)

ABSTRACT: The root-knot nematodes causes many losses in the scarlet eggplant plant cultivation (*Solanum gilo*). The alternative control becomes interesting in view of conventional chemical management, which may presents risks of environmental contamination. Therefore, the objective of this work was to evaluate the efficiency of the pequi (*Caryocar brasiliense*) fruit residue in the control of *Meloidogyne javanica* in scarlet eggplant plant cultivation. The experimental was organized in a greenhouse using a randomized block design with six treatments and eight replications. The treatments consisted of applying the doses of 0, 2.5, 5, 10 and 20 g L⁻¹ of pequi fruit residue. Treatment without inoculation and without residue was used as negative control. The variables analyzed 65 days after the inoculation of 5000 *M. javanica* eggs were: plant height, fresh matter of aerial part, fresh root matter, dry matter of aerial part, gall index, number of eggs and reproduction factor (*M. javanica*). The Tukey test was used in the SISVAR statistical program with 5 % probability in the evaluations. The product incorporated in the soil, regardless of the dose, did not influence the variables of the development of the plants. At the highest dose there was a significant reduction in gall number, number of eggs and reproduction factor in relation to the zero dose. Thus, the residue of the pequi fruit presented nematicidal action against *M. javanica*.

KEYWORDS: alternative control, scarlet eggplant plant cultivation, root-knot nematodes.

1 | INTRODUÇÃO

A produção de hortaliças é fundamental para o desenvolvimento do agronegócio brasileiro. Dentre as mais importantes está o jiloeiro (*Solanum gilo*), uma solanácea de origem africana trazida ao Brasil pelos escravos no século XVII. As informações sobre área plantada e produção total da cultura no país são bem escassas pelo motivo de ser cultivada, principalmente, em pequenas áreas, como na agricultura familiar, e a comercialização ser feita, na maioria das vezes, em pequenas cooperativas como nos sacolões, ou pelo próprio agricultor em feiras de hortaliças (ALVES et al., 2012).

São basicamente duas classes principais de jiló mais aceitas pelo consumidor, uma de fruto comprido com coloração verde-claro mais comercializado nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Goiás, e a outra com fruto mais arredondado com coloração verde escuro, mais comercializado no estado de São Paulo. Ambos são consumidos de forma *in natura* e contém sabor amargo característico devido à concentração de fitoquímicos, dentre eles o ácido ascórbico que contém propriedades

nutritivas e terapêuticas. Quando maduros, os frutos atingem coloração vermelha (CHINEDU et al., 2011; FILGUEIRA, 2003).

O jiloeiro é uma hortaliça de porte herbáceo e possui em sua constituição química: carboidratos, flavonoides, alcaloides e esteroides. Além disso, vale ressaltar que as suas raízes possuem propriedades antioxidantes que podem diminuir o nível de colesterol. O principal meio de propagação é via sementes, e a colheita, geralmente, inicia-se a partir de 90 dias após a semeadura, podendo-se estender até aos 150 dias (ODETOLA et al., 2004).

Apesar de o jiloeiro ser uma das espécies mais rústicas da família Solanaceae, existem pragas e doenças capazes de comprometerem a produtividade da planta. Dentre as principais doenças da cultura, destaca-se a meloidoginose, causada pelos nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.), em que as espécies mais importantes no Brasil são *M. javanica* e *M. incognita*. A queda de produção nas lavouras pode chegar a 80 %, e em alguns casos, os nematoides inviabilizam o cultivo devido à alta infestação do solo (PEREIRA et al., 2012; PINHEIRO, 2017).

O nematoide de galhas constitui-se em um patógeno de solo, que após ser introduzido em uma área, a sua erradicação é quase impossível. Além de ser polífago, o nematoide ainda consegue permanecer no solo na fase de ovo por longos meses, inclusive, em condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento. Os sintomas visíveis na parte aérea da planta mais comuns são clorose nas folhas, baixo desenvolvimento e murcha nas horas mais quentes do dia, além de galhas e lesões nas raízes, e até morte prematura da planta, em alguns casos (FERRAZ & BROWN, 2016).

Nematoides do gênero *Meloidogyne* são parasitas obrigatórios de raízes e de caules subterrâneos e apresentam metabolismo ativo durante todo o ano em regiões de temperaturas mais quentes e solos úmidos, porém há espécies adaptadas a regiões de climas mais frios. A forma de vida móvel no solo capaz de infectar as raízes é o juvenil de segundo estágio (J2). Ao penetrarem nas raízes, os J2 movimentam-se para as regiões próximas aos vasos condutores, induzem a formação de células especializadas de alimentação e tornam-se sedentários. Ali, passam por sucessivas ecdises, que é a troca da cutícula externa (2^a, 3^a e 4^a), até chegarem à fase adulta. Também ocorre o alargamento progressivo do corpo dos juvenis durante as ecdises. Ao atingirem a fase adulta, as fêmeas permanecem em seu sítio de alimentação, assumindo um formato piriforme, e os machos reassumem o formato filiforme, saindo das raízes em direção ao solo (FERRAZ, 2018).

O engrossamento das raízes denominado “galha” é devido à hiperplasia celular, uma multiplicação desordenada de células adjacentes ao sítio de alimentação do nematoide. Posteriormente, a fêmea deposita seus ovos em uma matriz gelatinosa, que pode ser interna ou externa, que contém em média de 500 a 1000 ovos protegidos pela camada gelatinosa que evita a dessecação e protege contra o ataque de microrganismos. Ainda dentro do ovo ocorre a formação do juvenil de primeiro estágio (J1), que ali sofre a 1^a ecdise, originando o J2, que abandona o ovo e passa

a migrar no solo à procura da raiz de um hospedeiro favorável. O ciclo de vida varia de 21 a 45 dias, dependendo das condições do ambiente, da planta hospedeira e da espécie de *Meloidogyne* (FERRAZ, 2018; OLIVEIRA & ROSA, 2018).

O controle químico com uso de nematicidas é uma forma de controle de nematoides, porém, traz riscos de contaminação ao aplicador, são de alto custo, e ocasionam problemas ambientais como a contaminação de lençóis freáticos e a morte de microrganismos benéficos ao solo (PINHEIRO, 2017). A resistência genética de plantas a nematoides é considerada uma medida eficiente e econômica de se evitar perdas causadas por estes patógenos, mas até o presente momento, não há disponível no mercado variedades de jiloeiro com resistência. Portanto, a busca de novas estratégias de manejo é essencial para o controle de nematoides de galhas na cultura do jiloeiro, e dentre essas técnicas destaca-se o uso de produtos biológicos, esterco de animais, extratos e resíduos de plantas. Todavia, é necessário que haja estudos para determinar a dose correta, a época e a forma de aplicação destes materiais a fim de não causarem toxidez às plantas (SILVA et al., 2016).

O pequi (*Caryocar brasiliense*) é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro, cultivado, principalmente, nos estados de Minas Gerais e Goiás, que são destaques na produção e consumo do fruto no Brasil. É uma espécie que pode ser empregada em programas de recuperação de áreas degradadas e em programas de renda familiar. É considerada uma espécie de interesse econômico pelo uso de seus frutos na culinária e na extração de óleos para fabricação de cosméticos (ALMEIDA & SILVA, 1994).

Os frutos de pequi contêm: esteroides, flavonoides, heterosídeos antraquinônicos, heterosídeos saponínicos, taninos e triterpenos (CARVALHO et al., 2015). Das substâncias presentes, algumas apresentam ação nematicida, além de estarem envolvidas na defesa de plantas a patógenos (CHITWOOD, 2002). A presença de princípios ativos com efeito nematicida nos resíduos de fruto de pequi pode se tornar uma alternativa no manejo de nematoides de galhas em hortaliças (SILVA et al., 2016).

Por ser um material vegetal, durante a decomposição o resíduo do pequi pode também liberar nutrientes para as plantas e favorecer o crescimento de organismos antagonistas ao nematoide de galhas (PEREIRA et al., 2012). Além disso, este resíduo não possui custos de aquisição por ser totalmente descartados, contribuindo ainda com a redução do volume de lixo na natureza (RIBEIRO et al., 2012). Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o controle de *Meloidogyne javanica* em jiloeiro (*Solanum gilo*) com o uso de resíduo do fruto de pequi (*Caryocar brasiliense*).

2 | MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação do Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos, localizado nas coordenadas 17°49' S e 49°12' O, a uma altitude

de, aproximadamente, 885 metros em relação ao nível do mar.

A espécie da população do nematoide utilizada como inóculo foi identificada como *Meloidogyne javanica*. Para tal, utilizou a análise da região perineal das fêmeas de *Meloidogyne* spp. (TAYLOR & NETSCHER, 1974). As fêmeas utilizadas na identificação e os ovos utilizados como inóculo foram obtidos de raízes de jiló comprido cultivar verde-claro cultivado em casa de vegetação. A extração dos ovos de *M. javanica* foi realizada segundo o método de Bonetti & Ferraz (1981). A suspensão obtida foi levada ao microscópio de fotônico em uma lâmina de contagem de nematoides tipo Peters para calibrar a população inicial desejada.

O substrato das plantas usado nos vasos foi preparado com terra de barranco classificada como Latossolo Vermelho Distrófico, misturada com areia fina, ambas peneiradas e misturadas na proporção de 3:1, respectivamente. Para garantir que o substrato estivesse livre de organismos vivos que podussem interferir nos resultados do experimento, o material foi autoclavado dentro de sacos plásticos em temperatura de 120°C e pressão de 1 kgf/cm² (aproximadamente 0,967 atm) por 20 minutos (DHINGRA & SINCLAIR, 1995) em autoclave vertical. Logo após retirar o material de dentro da autoclave, o mesmo foi espalhado sobre uma lona plástica por um período de quatro dias para dissipar os compostos tóxicos para não ocorrer reação de fitotoxicidade devido a altas concentrações de alguns elementos, principalmente, manganês.

Foram utilizados vasos com capacidade de volume para 1 L. Os mesmos foram lavados com água e sabão para retirar impurezas e após mergulhados por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1,0 %.

O resíduo do fruto de pequi foi composto pela parte não comercial, ou seja, a casca e o mesocarpo externo, este mais conhecido como polpa branca do fruto. A coleta foi realizada no início da safra do fruto, durante outubro de 2018, em pontos de venda do fruto na cidade de Morrinhos - Goiás. Após a coleta, o resíduo foi lavado em água corrente para remoção de impurezas. Após seco, foram selecionados os melhores resíduos sem injúrias, que foram cortados em pequenos pedaços de, aproximadamente, 1 cm e levados à estufa para secagem a 65 °C por 72 horas. Em seguida, o material foi triturado em moinho elétrico e peneirado com peneira de 30 mesh (0,59 mm de abertura) para a obtenção do pó a ser utilizado no experimento, com fragmentos do tamanho de partículas de areia com textura média seguindo a metodologia utilizada por Silva (2017). Esse material foi pesado e incorporado em até cinco centímetros de profundidade no substrato dos vasos.

As mudas de jiló comprido (*Solanum gilo*) cultivar verde-claro foram adquiridas do viveiro Beira Mato em Morrinhos - Goiás, e transplantadas um dia após a incorporação do resíduo do fruto de pequi no solo. A cultivar escolhida é a mais plantada na região e não tem resistência aos nematoides de galhas. As mudas estavam com 35 dias de semeadura em substrato comercial e no estágio vegetativo de 3 a 4 folhas completamente expandidas. O transplante das mudas foi realizado

dentro da casa de vegetação que manteve uma temperatura média de 25 ± 2 °C e umidade média de 60 %, com irrigação automática por microaspersão funcionando três vezes ao dia por dois minutos.

Sete dias após a incorporação do resíduo de fruto de pequi ao substrato dos vasos, foi realizada a inoculação 5000 ovos de *M. javanica*, aplicados diretamente no solo de cada vaso. O inóculo foi distribuído em quatro orifícios a dois centímetros de distância do colo da planta e de profundidade no substrato. Para auxílio, utilizou-se de uma pipeta automática de 1000 μ L.

Após sete dias da inoculação, realizou-se a primeira adubação de cobertura. Ao todo, foram realizadas oito adubações distribuídas em intervalos de sete em sete dias em horários mais frescos do dia. A quantidade do adubo (NPK 04-30-16) e micronutrientes utilizados foi com base na necessidade da cultura do jiloeiro (FILGUEIRA, 2003). Para isso, foi realizada uma análise nutricional do substrato no Laboratório de Solos da Universidade Federal de Uberlândia.

Após 65 dias da inoculação de *M. javanica*, foram realizadas as avaliações das seguintes variáveis: altura de plantas, matéria fresca da raiz e da parte aérea, matéria seca da parte aérea, índice de galhas, número de ovos e fator de reprodução. A matéria seca da parte aérea foi obtida colocando-se a parte aérea fresca em envelopes de papel cartão e levados à estufa de circulação forçada a 65 °C por 72 horas.

Para determinar o índice de galhas, utilizou-se a escala de 0 a 5, sendo 0 = nenhuma galha ou massa de ovos por raiz de planta; 1 = uma a duas galhas; 2 = três a dez galhas; 3 = onze a trinta galhas; 4 = trinta e uma a cem galhas; 5 = acima de cem galhas (TAYLOR & SASSER, 1978). Para quantificar número de ovos de *M. javanica* foi realizada a extração segundo o método de Bonetti & Ferraz (1981). Os ovos foram colocados em câmara de Peters e levados ao microscópio de fotônico para contagem. O fator de reprodução do nematoide foi calculado pela razão: Pf/Pi (OOSTENBRINK, 1966).

O delineamento experimental foi organizado em blocos casualizados (DBC) composto por seis tratamentos e oito repetições. Os tratamentos consistiram na aplicação das doses de 0; 2,5; 5; 10 e 20 g L⁻¹ de resíduo do fruto de pequi. O tratamento sem inoculação e sem resíduo foi utilizado como controle negativo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey em 5 % de probabilidade utilizando o programa computacional estatístico para Análise de Variância – SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve alta taxa de reprodução de *M. javanica* nas plantas sem adição do resíduo de pequi, comprovando a viabilidade do inóculo dos nematoides. Verificou-

se que a aplicação de doses do resíduo de fruto de pequi até 20 g L⁻¹ não influenciou no desenvolvimento vegetativo do jiloeiro (Tabela 1). Todavia, observou-se que as parcelas que tiveram incorporação do resíduo, o crescimento inicial das plantas foi mais lento quando comparado ao dos tratamentos controle e com dose zero.

Tratamento	ALT (cm)	MFPA (g)	MSPA (g)	MFRA (g)
T1 - Controle	45,00 a	54,98 a	9,66 a	38,50 a
T2 - dose 0,0 (g)	42,75 a	51,13 a	8,14 a	42,07 a
T3 - dose 2,5 (g)	41,00 a	48,22 a	7,56 a	42,98 a
T4 - dose 5 (g)	41,75 a	50,02 a	8,06 a	47,08 a
T5 - dose 10 (g)	38,50 a	46,85 a	7,64 a	42,92 a
T6 - dose 20 (g)	42,62 a	50,70 a	8,88 a	50,74 a
DMS	10,83	11,62	2,50	14,04
CV (%)	17,14	15,33	19,98	21,16

Tabela 1. Valores médios altura de planta (ALT), matéria fresca de parte aérea (MFPA), matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria fresca de raiz (MFRA) das plantas de jiloeiro 65 dias após a inoculação de 5000 ovos de *Meloidogyne javanica*.

DMS = Diferença mínima significativa; CV = Coeficiente de variação; Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente em nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

O motivo das plantas terem se desenvolvido bastante e não obter diferenças significativas com relação às variáveis de desenvolvimento vegetativo, provavelmente deve-se pelo fato da adubação ter sido realizada semanalmente com fonte de nitrogênio, fósforo e potássio constituído no adubo que foi triturado no liquidificador com água para que o nutriente estivesse mais prontamente disponível às plantas. Além disso, as condições ambientais na casa de vegetação eram favoráveis ao desenvolvimento do jiloeiro. Silva (2017) realizou um trabalho com a casca do fruto de pequi como condicionador de solo e sua influência no desempenho agrônômico do feijoeiro e obteve bons resultados, observando o potencial de uso do material como corretivo do solo por ter elevado o pH, e fornecido K e C orgânico ao solo. Porém, para que o material tenha efeito no solo é necessário um período de mineralização, que varia com as condições ambientais, referente à relação C/N do carbono e nitrogênio que influencia a decomposição dos resíduos.

Trabalhando com a adubação fosfatada na cultura de jiló em Mato Grosso do Sul, Biscaro et al. (2008) mostraram a capacidade de aumento do desenvolvimento das plantas, do número total de frutos por planta, do peso comercial dos frutos por planta e da produtividade de frutos por hectare. O autor explica que o principal fator a considerar na adubação é a disponibilidade do nutriente para a planta, visto que o fósforo tem característica de fixação muito forte, se tornando às vezes, indisponível para a planta.

No presente estudo, somente as variáveis, índice de galhas (IG) e número de ovos (NO) tiveram diferenças significativas (Tabela 2).

Tratamento	IG	NO	FR	R (%)
T1 – Controle	0 a	0 a	0,00	-
T2 - dose 0,0 (g)	5 c	43300 b	8,66	-
T3 - dose 2,5 (g)	5 c	85150 c	17,03	+ 97%
T4 - dose 5 (g)	5 c	80775 c	16,15	+ 86%
T5 - dose 10 (g)	5 c	41450 b	8,29	- 4%
T6 - dose 20 (g)	4 b	19300 ab	3,86	- 56%
DMS	0,48	26370,36		
CV (%)	8,20	38,89		

Tabela 2. Valores médios do índice de galhas (IG), número de ovos (NO) e fator de reprodução (FR) no jiloeiro 65 dias após a inoculação de 5000 ovos de *Meloidogyne javanica*.

DMS = Diferença mínima significativa; CV = Coeficiente de Variação; R = Reprodução; Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O tratamento T6 recebeu a aplicação da maior dose usada no experimento, e obteve os melhores resultados em relação ao controle de *M. javanica* para as variáveis relacionadas à reprodução do nematoide. Foi calculada a influência do uso do resíduo de pequi na reprodução do nematoide (R %), comparando o número de ovos dos tratamentos T3, T4, T5 e T6 em relação o número de ovos do tratamento T2.

Estudando metabólitos secundários, Borges (2017) analisou classes importantes como esteroides, fenóis simples, flavonoides, flavanonas, saponinas e taninos, e explicou que estas substâncias presentes em plantas têm atividades antibactericida e nematicida, o que pode explicar a diminuição da população de *M. javanica* com o resíduo de pequi utilizado.

Em trabalho realizado por Lopes (2017) sobre extratos metabólicos de plantas nativas do Cerrado goiano para o controle de *M. javanica*, *in vitro*, o extrato de pequi (*Caryocar brasiliense*) apresentou significativa eficiência na mortalidade do nematoide na concentração de 100 mg.L⁻¹.

Os produtos naturais podem ser usados como controle alternativo de doenças em plantas na agricultura orgânica. Moreira et al. (2015) usando óleos essenciais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) e capim citronela (*Cymbopogon winterianus*) no controle de *M. incognita* raça 2 nas culturas de tomate e celósia observaram redução de até 83 % na taxa reprodutiva do nematoide. Sousa Junior (2018) usando extrato de Nim (*Azadirachta indica*) e Rubim (*Leonurus sibiricus*) obteve efeito significativo no controle de eclosão de ovos e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*, *in vitro*. Resultado semelhante ao de Azam et al. (2017) que trabalharam com extrato de *Azadirachta indica*, e obtiveram resultados satisfatórios em termos de crescimento e produtividade do tomateiro e menor população final de *M. incognita*.

Existem várias outras plantas com efeitos nematicidas, como no estudo de Mioranza et al. (2016), que utilizaram o extrato aquoso de *Curcuma longa* no controle de *M. incognita*, *in vitro*, e todas as concentrações testadas reduziram a eclosão de

ovos do nematoide em mais de 90 %. Nandakumar et al. (2017) relataram que as concentrações de 1,5 e 2 % dos extratos aquosos obtidos de folhas de *Brugmansia suaveolens*, *Datura metel* e *D. innoxia* foram mais eficazes no controle de *M. javanica*, *in vitro*, quando comparada às menores concentrações (0,5 e 1%). No experimento de Parihar et al. (2011) com extrato aquoso de *Thuja orientalis*, também foi observado que as concentrações mais altas do produto tiveram os melhores resultados no controle de *M. incognita*. Com estas comparações é possível identificar que produtos orgânicos no controle de nematoides precisam ser trabalhados com doses mais altas para aumento da eficiência, porém é preciso fazer estudos minuciosos, pois alguns extratos de plantas podem causar reações de fitotoxidez.

No trabalho de Ribeiro et al. (2012), ao usarem resíduos de frutos de pequi na forma de extrato aquoso e pó moído no controle de *M. javanica*, obtiveram reduções significativas na eclosão de ovos e aumento na mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) do nematoide. O aumento das doses também reduziu o número de galhas, massa de ovos e número de ovos do nematoide por sistema radicular, porém, reduziu também o peso da matéria seca da parte aérea e da altura do tomateiro, indicativo de fitotoxidez.

Assim, todos os trabalhos acima relatam o uso de material orgânico como no controle de nematoides de galhas, comprovando a eficiência nematicida. As diferenças ocorridas nos resultados deste trabalho em comparação com a literatura pode ser devido a fatores como planta hospedeira, espécie do nematoide, produto usado no manejo do nematoide ter composição química diferente, doses do produto e período de aplicação, além da diferença que pode ter entre a população inicial inoculada nos experimentos, fatores ambientais, tipo de solo, dentre outros.

No presente estudo, a utilização do resíduo de fruto do pequi na dose de 20 g L⁻¹ teve efeito significativo na redução da reprodução de *M. javanica* em jiloeiro. Sugerem-se novos estudos bioquímicos do composto para identificar a(s) substância(s) química(s) com efeito nematicida presente(s) no material utilizado, a fim de poder verificar se o aumento da dose desta(s) substância(s) específica(s) é capaz de causar toxidez às plantas, além da avaliação de diferentes períodos de aplicação antes do estabelecimento da cultura. As informações geradas neste trabalho poderão contribuir de forma direta à comunidade acadêmica, pela escassez de dados relacionados ao cultivo de jiloeiro com utilização de resíduos orgânicos no manejo de *M. javanica*.

4 | CONCLUSÃO

A adição de resíduos do fruto de pequi até 20 g L⁻¹ não influenciou o desenvolvimento vegetativo do jiloeiro, porém reduziu a reprodução de *M. javanica* em jiloeiro de maneira expressiva, apresentando alto potencial para ser utilizado no manejo do nematoide na cultura.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. **Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados**. Planaltina: Embrapa - CPAC, 1994. 38 p. (Documentos, 54).
- ALVES, C. Z.; GODOY, A. R.; CANDIDO, A. C. S.; OLIVEIRA, N. C. **Qualidade fisiológica de sementes de jiló pelo teste de envelhecimento acelerado**. Ciência Rural, v. 42, n. 1, p. 58-63, 2012.
- AZAM, T.; GHEBRETINSAE, D.; TESFASION, F.; OSMAN, H. **Nematicidal activity of botanicals against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tomato in Hamelmalo Agricultural College**. Trends in Bioscience Journal, v. 10, n. 47, p. 9478-9481, 2017.
- BISCARO, G. A.; LEAL FILHO, O. M.; ZONTA, T. T.; MENDONÇA, V.; MAIA, S. M. **Adubação fosfatada na cultura do jiló irrigado nas condições de Cassilândia-MS**. Revista Caatinga, v. 21, p. 69-74, 2008.
- BONETTI, J. I. S.; FERRAZ, S. **Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro**. Fitopatologia Brasileira, v. 6, n. 3, p. 553, 1981.
- BORGES, D. F. **Efeito nematicida de extratos de plantas do cerrado e óleos essenciais**. 2017. 37 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Rio Paranaíba, 2017.
- CARVALHO, L. S.; PEREIRA, K. F.; ARAUJO, E. G. **Características botânicas, efeitos terapêuticos e princípios ativos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*)**. Arquivos de Ciências e Saúde da Unipar, v. 19, n. 2, p. 147-157, 2015.
- CHINEDU, S. N.; OLASUMBO, A. C.; OKWUCHUKWU, K. E.; EMILOJU, O. E.; OLAJUMOKE, K. A.; DANIA, D. I. **Proximate and phytochemical analyses of *Solanum aethiopicum* L. and *Solanum macrocarpon* L. fruits**. Research Journal of Chemical Sciences, v. 1, p. 63-71, 2011.
- CHITWOOD, D. J. **Phytochemical based strategies for nematode control**. Annual Review of Phytopathology, v. 40, n. 1, p. 221-249, 2002.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.
- FERRAZ, L. C. C. B. **Nematoides**. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). Manual de Fitopatologia. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. v. 1, cap. 13, p. 195-211.
- FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de Plantas: fundamentos e importância**. Manaus: Norma Editora, 2016. 251 p.
- FERREIRA, D. F. **Sisvar: a computer statistical analysis system**. Ciência e Agrotecnologia, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló**. Viçosa: Editora UFV, 2003. 323 p.
- LOPES, L. N. S. **Controle de *Meloidogyne javanica*: Efeito in vitro de extratos de plantas nativas do Cerrado**. 2017, 50 f. Dissertação (Mestrado em Olericultura) - Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos, Morrinhos, 2017.
- MIORANZA, T. M.; MÜLLER, M. A.; INAGAKI, A. M.; FUCHS, F.; COLTRO-RONCATO, S.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J. **Potencial nematicida e nematostático do extrato de *Curcuma longa* sobre *Meloidogyne incognita***. Revista de Ciências Agroambientais, v. 14, n. 1, p. 104-109,

2016.

MOREIRA, F. J. C.; SANTOS, C. D. G.; INNECCO, R.; SILVA, G. S. **Controle alternativo de nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*) raça 2, com óleos essenciais em solo**. Summa Phytopathologica, v. 41, n. 3, p. 207-213, 2015.

NANDAKUMAR, A.; VAGANAN, M. M.; SUNDARARAJU, P.; UDAYAKUMAR, R. **Nematicidal activity of aqueous leaf extracts of *Datura metel*, *Datura innoxia* and *Brugmansia suaveolens***. American Journal of Entomology, v. 1, n. 2, p. 39-45, 2017.

ODETOLA, A. A.; IRANLOYE, Y. O.; AKINLOYE, O. **Hypolipidemic potentials of *Solanum melongena* and *Solanum gilo* on hypercholesterolemic rabbits**. Pakistan Journal of Nutrition, v. 3, p. 180-187, 2004.

OLIVEIRA, C. M. G.; ROSA, J. M. O. **Nematoides Parasitos do Cafeeiro**. São Paulo: Instituto Biológico, 2018. 28 p. (Boletim Técnico, 32).

OOSTENBRINK, M. **Major characteristics of the relation between nematodes and plants**. Mededelingen Landbouwhogeschool, v. 66, n. 4, p. 1-46, 1966.

PARIHAR, K.; REHMAN, B.; SIDDIQUI, M. A. **Nematicidal potential of aqueous extracts of botanicals on *Meloidogyne incognita* in vitro**. Current Nematology, v. 22, n. 1, p. 55-61, 2011.

PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B.; GUIMARÃES, J. A.; REIS, A. **Doenças e pragas do jiloeiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2012. 13 p. (Circular Técnica, 106).

PINHEIRO, J. B. **Nematoides em hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2017. 194 p.

RIBEIRO, H. B.; RIBEIRO, R. C. F.; XAVIER, A. A.; CAMPOS, V. P.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; MIZOBUTSI, E. H. **Resíduos de frutos de pequi no controle do nematoide das galhas em tomateiro**. Horticultura Brasileira, v. 30, n. 3, p. 453-458, 2012.

SILVA, F. J.; RIBEIRO, R. C. F.; XAVIER, A. A.; SANTOS NETO, J. A.; SOUZA, M. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. **Rizobactérias associadas a materiais orgânicos no controle de nematoides das galhas em tomateiro**. Horticultura Brasileira, v. 34, n. 1, p. 59-65, 2016.

SILVA, M. S. A. **Biochar de casca de pequi como condicionador de solo no desempenho agrônômico de feijoeiro**. 2017, 89 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2017.

SOUSA JUNIOR, J. R. **Bioatividade de extratos de Nim (*Azadirachta indica*) e Rubim (*Leonurus sibiricus*) sobre *Meloidogyne javanica* in vitro**. 2018. 23 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) - Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos, Morrinhos, 2018.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. International Meloidogyne Project, 1978. 111 p.

TAYLOR, D. P.; NETSCHER, C. **An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp**. Nematologica, v. 20, n. 2, p. 268-269, 1974.

FUNGOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITONEMATOIDES

Valéria Ortaça Portela

Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria – Rio Grande do Sul

Juliane Schmitt

Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria – Rio Grande do Sul

Leticia Moro

Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria – Rio Grande do Sul

relatam eficiência do uso de fungos como agentes de controle biológico, principalmente como antagonistas. Entre os fungos nematófagos mais estudados destacam-se o *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson e os do gênero *Trichoderma* Pers.

PALAVRAS-CHAVE: Agricultura; solo; microrganismos; nematoides.

FUNGI AS AGENTS OF BIOLOGICAL CONTROL OF PHYTHONEMATOIDES

RESUMO: Os fitonematoides são organismos microscópicos capazes de parasitar plantas causando danos severos. A principal forma de controle desses microrganismos é realizada por meio de produtos químicos, que têm elevado custo e são fonte de resíduos químicos no ambiente, além da possibilidade de desenvolvimento de resistência aos princípios ativos mais comumente empregados. Desta forma, há um crescente interesse por métodos de controle que não resultem em tantos prejuízos. O controle biológico apresenta-se como uma alternativa, pela bioprospecção de microrganismos do ambiente com potencial de serem agentes eficientes de controle. Este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica de estudos relacionados à aplicação de fungos como agentes de controle biológico de fitonematoides. Diversos estudos

ABSTRACT: Phytonematoids are microscopic organisms capable of parasitizing plants causing severe damage. The main form of control of these microorganisms is carried out by means of chemicals, which are costly and source of chemical residues in the environment, in addition to the possibility of developing resistance to the most commonly used active ingredients. Thus, there is a crescent interest in control methods that do not result in so much damage. Biological control is presented as an alternative, by bioprospecting microorganisms from the environment with potential to be efficient control agents. This study aimed to perform a bibliographic review of studies related to the application of fungi as biological control agents of phytonematoids. Several studies report the efficiency of the use of fungi as biological

control agents, mainly as antagonists. Among the most studied nematophagous fungi are *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and those of the genus *Trichoderma* Pers.

KEYWORDS: Agriculture; soil; microorganism; nematodes.

INTRODUÇÃO

Os nematoides englobam um grupo bastante diversificado de invertebrados abundantes como parasitas ou na forma de vida livre no solo, assim como em ambientes aquáticos. Segundo Barker (1998), existe mais de 15.000 espécies descritas, representando somente uma pequena porção dentro do filo Nematoda. Dentre os gêneros descritos, 26% habitam o solo sob diferentes grupos funcionais são bacterívoros, fungívoros, onívoros, predadores ou fitoparasitas (BLAKELY et al. 2002).

Os fitonematoides são organismos microscópicos capazes de parasitar plantas, geralmente as raízes, causando danos severos ao hospedeiro, ocasionando grandes perdas para a produtividade da cultura. Sua importância foi reconhecida entre as décadas de 1930 e 1940, devido à expansão das fronteiras agrícolas (MANZANILLA-LÓPEZ et al., 2004). Devido ao tamanho microscópico, que não permite que esses microrganismos sejam visíveis a olho nu, ocorreu um reconhecimento tardio da relevância destes, somado a isto, os sintomas apresentados pelas plantas infectadas são inespecíficos e podem ser confundidos com os provocados por outros organismos ou mesmo por fatores abióticos (FERRAZ et al., 2010; LOPES et al., 2016).

Diversas alternativas de controle de nematoides são propostas, porém, são encontradas dificuldades devido ao tipo de habitat, características morfológicas e o hábito polífago desses organismos (SOARES et al., 2016). Assim, o controle químico é o método mais utilizado atualmente, no entanto apresenta custo elevado, nem sempre possui eficiência comprovada, e é passível de geração de poluição ambiental (LEONETTI et al., 2017). Desta forma, despertou-se o interesse por métodos de controle que não resultassem em tantos prejuízos associado à crescente preocupação da sociedade com os impactos ocasionados pelo uso intensivo de agroquímicos na agricultura. Assim, vem ocorrendo um crescimento da produção de alimentos sem o uso de agroquímicos, bem como a busca de soluções dos problemas visando um menor impacto ao ambiente. Deste modo, o controle biológico tem sido disseminado como uma de técnica alternativa.

Uma grande diversidade de microrganismos pode ser utilizada como agentes de controle biológico, como vírus, bactérias e leveduras. No entanto, os fungos são comumente usados, pois ocorrem em abundância na natureza, podem ser cultivados em meios artificiais para produção massiva. Além disso, há diversos estudos na literatura de bioprospecção de microrganismos para controle biológico. Diante disto, este artigo tem como objetivo uma revisão bibliográfica dos estudos relacionados à utilização de fungos no controle biológico de fitonematoides.

MATERIAL E MÉTODOS

A construção desta revisão bibliográfica teve como ponto de partida o levantamento de pesquisa envolvendo fungos como agentes de controle biológico de fitonematoides. Foram levantadas informações em meios impressos e digitais, pela análise de livros, artigos científicos, teses e dissertações relacionadas ao assunto.

FITONEMATOIDES

Os fitonematoides são considerados parasitas obrigatórios, isso significa que eles necessitam da presença de plantas hospedeiras para conseguir se reproduzir e multiplicar até atingir níveis populacionais de danos às plantas (FERRAZ et al., 2001). A intensidade dos danos econômicos de determinadas espécies de fitonematoides está diretamente ligada aos efeitos ocasionados à planta, principalmente à redução da produtividade da cultura, à facilidade na disseminação e à adaptação da espécie em certas regiões, além da indução de alterações na composição mineral e orgânica dos tecidos da planta parasitada (SHARMA & SHARMA, 2017).

Os fitonematoides possuem variadas formas de adaptação às mudanças que ocorrem causadas por diversos fatores, entre os quais o manejo dos cultivos, estresse climático, época de plantio, fisiologia das plantas e melhoramento genético (BLAKELY et al. 2002). A faixa de temperatura ótima é de 15 a 30°C, influenciando a distribuição geográfica, embriogênese, desenvolvimento, eclosão, mobilidade, e o crescimento do hospedeiro, produzindo modificações morfológicas e fisiológicas no solo (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2001).

O sistema ecológico habitado pelos fitonematoides apresenta grande complexidade de inter-relação entre o parasito, planta hospedeira, condições ambientais, características físicas, químicas e biológicas dos solos (GONÇALVES & SILVAROLLA, 2001). O ciclo de vida do nematoide envolve o ovo, quatro estádios juvenis (J1, J2, J3 e J4) e o estágio adulto (WHARTON, 1993). O ciclo de vida de alguns nematoides possibilita resistência ao estresse ambiental, por exemplo, a formação de cisto, que consiste em abrigar a massa de ovos. Além disso, pode sobreviver a condições prolongadas de falta de alimento por diferentes mecanismos, como redução de seu metabolismo e/ou por meio de armazenamento de lipídios ou glicose (RITZINGER et al., 2010; MOURA & FRANZENER, 2015).

Segundo a Sociedade Brasileira de Nematologia (2012), o nematoide formador de galhas (*Meloidogyne* spp. Göldi, 1892) e lesões radiculares (*Pratylenchus* spp. Filipjev, 1936) são dois dos grupos mais importantes de patógenos para a agricultura brasileira, pois, são os causadores dos maiores danos às culturas atualmente. Eles reduzem a absorção de água e nutrientes da planta, comprometendo ou, em alguns casos, até inviabilizando o cultivo devido as lesões causadas nos sistemas radiculares das plantas parasitas.

De acordo com Araújo et al. (2002) o controle dos nematoides no solo pode ser feito por diferentes métodos, dando destaque aos métodos químico e biológico, que podem ser aplicados buscando sua ação como nematicidas, ou atuando na reprodução e orientação do parasita em direção às raízes da planta hospedeira no solo. Para o manejo deste parasita, recorre-se ao controle químico, no entanto, os nematicidas químicos têm seu uso limitado por sua alta toxicidade, risco de contaminação ambiental, alto custo e baixa eficácia de controle após repetidas aplicações (Nunes et al., 2010). Diante disto, tem crescido a aposta no controle biológico clássico, que possui como forma de controle a predação, o parasitismo e a patogênese.

Entre os microrganismos estudados os fungos possuem maior destaque, pois ocorrem em abundância na natureza, podem ser cultivados em meios artificiais para produção massal e há possibilidade de possuir ação específica sobre outros microrganismos. Associado a isso, ainda está a possibilidade de otimização da produção de esporos em laboratório, para posterior formulação e aplicação em larga escala. Neste contexto, essa forma de controle tem se mostrado como alternativa mais viável para o manejo de fitonematoides, por minimizar o dano ambiental e ser mais vantajoso economicamente, comparado aos métodos químicos.

FUNGOS COM POTENCIAL NEMATICIDA

Os microrganismos apresentam grande importância agrícola, pois estão envolvidos em diversos processos no solo. Os fungos em específico são os decompositores primários em todos os ecossistemas terrestres e possuem papel fundamental no ciclo do carbono e na ciclagem de nutrientes (BALDONI, 2016). Além disso, estes microrganismos possuem significativa utilização na agricultura, para degradação biológica, assim como aplicação industrial e para obtenção de novos produtos e processos biotecnológicos (CHAMBERGO & VALENCIA, 2016).

Os fungos são importantes agentes de controle biológico, utilizam-se de diferentes estratégias de infecção ou captura de nematoides empregando mecanismos como predação, endoparasitismo, parasitismo em ovos e fêmeas e pela produção de metabolitos tóxicos aos nematoides (JANSSON et al., 1997; FERRAZ et al., 2010). Diversas pesquisas têm apresentado resultados promissores de fungos como forma de controle de nematoides, *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams 2001 (Hypocreales, Clavicipitaceae) em alface (VIGGIANO; DE FREITAS; LOPES, 2014), *Paecilomyces lilacinus* Thom (1910) Samson para o controle de *Meloidogyne* spp. em pepino (HUANG et al., 2016), *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne incognita* Kofoid & White (1919) em soja (NUNES et al., 2010), e *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) em goiabeira para combate de *Meloidogyne Enterlobii* Yang & Eisenback, 1983 (sin. *M. mayaguensis*)

(JINDAPUNNAPAT; CHINNASRI; KWANKUAE, 2013).

Os fungos são um dos grupos mais estudados devido ao seu efeito antagônico. A eficiência deste grupo está relacionada à habilidade de colonizarem a rizosfera (MAIA et al., 2001). O fungo *Paecilomyces lilacinus* é conhecido por sua ação parasita sobre os ovos e fêmeas de *Meloidogyne* ssp, diversos estudos relatam seu efeito positivo no controle de nematoides formadores de galhas (STIRLING, 1991). O gênero *Trichoderma* Pers. tem sido estudado principalmente pelo parasitismo direto de ovos e juvenis (SAHEBANI & HADAVI, 2008). Devido à importância desses dois fungos como agentes de controle biológico de fitonematoides, a importância e ecologia destes serão enfatizadas no decorrer desse estudo.

Atualmente, a grande parte de estudos voltados ao controle biológico de doenças de plantas foi baseada no uso de um único antagonista contra o patógeno alvo. No entanto, no ambiente onde ocorre o controle biológico natural, esse controle é resultado da mistura de antagonistas, muito mais do que uma alta população de apenas um (FERRAZ et al., 2010). Desta maneira, a mistura de antagonistas pode ou não ser vantajosa para o controle de fitopatógenos, devendo-se evitar a mistura de isolados que sejam incompatíveis, e ocasionem a inibição de ambos. Esta situação foi analisada por Lucon et al. (2009), foi verificado que na aplicação conjunta de cinco isolados de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* Kühn apenas duas combinações entre os isolados do antagonista resultaram em maior controle da doença.

Neste contexto, o controle biológico apresenta vantagens em comparação ao químico. O uso do carbofuran ($C_{12}H_{15}NO_3$) em soja, já foi considerado um bom método no controle de nematoides (JADA et al., 2011). Porém, o uso repetitivo desse produto em uma mesma área, ocasionou ao longo do tempo cada vez menos eficiência para o controle, levando em conta sua restrição, por ter uma alta toxicidade (DONG; ZHANG, 2006). O controle biológico também pode ser aderido para método de controle, proporcionado por fungos no solo que pode ser empregado no manejo destes fitoparasitas. No entanto, são necessários mais estudos de seleção de bioprospecção de microrganismo, além de bioensaios de seleção de isolados promissores, assim como estudos de compatibilidade com aplicação em conjunto com outros organismos.

***Paecilomyces lilacinus* Thom (1910) Samson**

Esse fungo possui uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrado frequentemente em solos agrícolas, tem sido frequentemente isolado a partir de diferentes hospedeiros (SOSA-GOMEZ, 2002). Diversos estudos avaliaram esse microrganismo como agente de controle biológico, Costa et al. (1997), estudando a associação de fungos a cistos de *Heterodera glycines* Ichinohe (1952) isolaram *P. lilacinus* em alguns municípios nos estados de Minas Gerais e Goiás.

Este fungo tem se mostrado efetivo no biocontrole de espécies do gênero *Meloidogyne* (KERRY, 1990), apresenta como principais características penetrar os ovos de nematoides, inviabilizando o embrião (DUNN et al., 1982). Santiago et al. (2006) obtiveram 37 isolados de *P. lilacinus* em amostras de solo oriundas de 19 municípios, distribuídos nos Estados do Sul do Brasil e São Paulo, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Pará. Freitas et al. (1995), compararam a eficiência do parasitismo de 19 isolados de *P. lilacinus*, originados de diferentes países, em ovos de *M. Javanica* Treub (1885) Chitwood, e observaram que 100% dos ovos de *M. javanica* estavam parasitados com os isolados originários da Itália e do Peru, e cerca de 70% com o isolado da França, já o isolado obtido no Brasil variou entre 2 e 69%.

A eficiência desse fungo é evidenciada a campo pelo uso de nematicidas microbiológicos a base desse microrganismo. A empresa Ballagro Agro Tecnologia Ltda. tem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do produto Nemat[®] (número de registro 5713), usado para o controle de *M. javanica*, *M. incógnita* e *P. brachyurus*, e Unique[®] (número de registro 26018) no controle de *M. incognita*, ambos tendo como base *P. lilacinus*.

Trichoderma Persoon (1794)

Os fungos hematófagos pertencentes ao gênero *Trichoderma* spp. possuem capacidade de crescimento saprofítico na rizosfera, esse é um dos fatores associados à sua eficiência como agente de controle de fitonematoides. O gênero *Trichoderma* spp. pode suprimir os patógenos de forma direta e indireta, por meio de mecanismos de parasitismo, competição, produção de enzimas hidrolíticas, produção de compostos orgânicos (SANTIN, 2008) voláteis e não voláteis (HARMAN, 2006), estimulação de hormônios de defesa das plantas e promoção de crescimento (MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2017).

Além disso, diversos trabalhos na literatura associam o uso desse gênero a resultados promissores no controle como o fungo *Trichoderma longibrachiatum*. Rifai (1969) apresentou efeito letal em juvenis de segundo estágio de *M. incognita* in vitro (ZHANG; GAN; XU, 2015); *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) e *Trichoderma viride* Schumach. 1803 diminuíram a reprodução de *M. javanica* em tomate (AL-HAZMI; TARIQJAVEED, 2016); e o tratamento do solo com isolados de *T. harzianum* reduziu a suscetibilidade do tomate para o parasitismo de *M. incognita* (LEONETTI et al., 2017).

A importância desse microrganismo pode ser evidenciada, por esse ser a base do produto TRICHODERMIL SC 1306[®], composto biológico com uma linhagem selecionada de *Trichoderma harzianum* (Rifai, 1969), cepa ESALQ-1306, sendo registrado pela empresa Koppert Biological Systems, para o controle de diversos microrganismos possuindo ação fungicida e nematicida no controle do fitonematoide

CONSIDERAÇÕES FINAS

A grande variabilidade genética dos fitonematoides adaptadas aos diferentes climas, culturas e solos dificulta o seu controle, associada às elevadas perdas de produtividade, e às formas de controle químico ineficientes e de grande impacto no meio ambiente, contribuem para a importância desse microrganismo como praga agrícola no cenário brasileiro e mundial.

O controle biológico com espécies antagonistas é um método eficiente e com poucos riscos ao ambiente para o manejo de pragas agrícolas. Além disso, existem diversos microrganismos antagonistas que podem ser utilizados no controle de fitonematoides, dentre os quais, os mais estudados são os fungos nematófagos, devido à habilidade que possuem de colonizar a rizosfera. Entre esses, destacam-se os fungos *Paecilomyces lilacinus* e os do gênero *Trichoderma*.

REFERÊNCIAS

AL-HAZMI, A. S.; TARIQJAVEED, M. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 288–292, 2016.

ARAÚJO, F.F. et al. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.197-203, 2002.

BALDONI, D. B. **Prospecção de fungos para produção de quitinases por fermentação em estado sólido**. 2016.84p. Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, RS.

BALLAGRO (Bom Jesus dos Perdões). Nemat: Nematicida Microbiológico. 2019. Disponível em: <<http://www.ballagro.com.br/control-biologico/nemat-2>>. Acesso em: 06/08/ 2019.

BARKER, K. R. Introduction and synopsis of advancements in nematology. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAM, G. L. Plant and nematode interactions. Madison: American Society of Agronomy, 1998. p. 1-20.

BLAKELY, J.K.; NEHER, D. A.; SPONGBERG, A. L. Soil invertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. **Applied Soil Ecology**, v.21, p. 71–88, 2002.

CARNEIRO, R. M. D. G. (1980). **Flutuação populacional e distribuição vertical de quatro espécies de nematóides nocivos à cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) em relação a certas propriedades do solo**. Tese (Mestrado em Entomologia) - Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, 104p.

CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567–2577, 2016.

COSTA, S.B.; CAMPOS, V.P. Obtenção de Fêmeas de *Heterodera glycines* em hidroponia e testes de patogenicidade de fungos isolados de cistos a fêmeas de *H. glycines* e de *Meloidogyne* spp. **Summa**

Phytopathologica, Piracicaba, v.23, p.239-243, 1997.

DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant parasitic nematodes: a five party interaction. **Plant Soil**, v. 288, p. 31- 45, 2006.

DUNN, M.T.; SAYRE, R.M.; CANELL, A.; WERGIN, W.P. Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. **Scanning Electron Microscopy**, p.1351-1357, 1982.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. in Silva, J.F.V. (Org.) Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. Londrina: **Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia**, p.15-38, 2001.

FERRAZ, S. et al. Manejo sustentável de fitonematoides. Viçosa: Ed.ufv, p.306, 2010.

FREITAS, L.G. et al. Effectiveness of different isolates of *Paecilomyces lilacinus* and an isolate of *Cylindrocarpon destructans* on the control of *Meloidogyne javanica*. **Nematropica**, v.25, n.2, p.109-115, 1995.

GONÇALVES, W., Silvarolla, M. B. (2001) Nematóides parasitos do cafeeiro. In: Zambolim, L. (ed). *Tecnologias de produção de café com qualidade*. Viçosa: UFV, p. 199-268.

GRAMINHA, E. B. N. et al. Avaliação in vitro da patogenicidade de fungos predadores de nematóides parasitos de animais domésticos. **Semina: Ci. Agrárias**, v.22, n.1, p.11-16, 2001.

HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190–194, 16 fev. 2006.

HUANG, W.-K. et al. Testing various biocontrol agents against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in cucumber plants identifies a combination of *Syncephalastrum racemosum* and *Paecilomyces lilacinus* as being most effective. **Biological Control**, v. 92, p. 31–37, 2016.

JADA, M. Y.; GUNGULA, D. T.; JACOB, I. Efficacy of Carbofuran in Controlling Root-Knot Nematode (*Meloidogyne javanica* Whitehead, 1949) on Cultivars of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) in Yola, Nigeria. **International Journal of Agronomy**, p. 1- 5, 2011.

JINDAPUNNAPAT, K.; CHINNASRI, B.; KWANKUAE, S. Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne enterolobii*) in guava by the fungus *Trichoderma harzianum*. **Journal of Developments in Sustainable Agriculture**, v. 8, n. 2, p. 110–118, 2013.

KERRY, B.R. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematode. **Journal of Nematology**, v.22, n.45, p.621-631, 1990.

LEONETTI, P. et al. Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant cell reports**, v. 36, n. 4, p. 621–631, 2017.

LOPES, E. A; FERRAZ, S. Importancia dos fitonematoides na agricultura. In: OLIVEIRA, C.M.; DOS SANTOS, M.A.; CASTRO, L.H.S.; Diagnose de Fitonematoides. Campinas, SP. Millenium Editora, p. 9-10, 2016.

LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M.; ISHIKAWA, A. I.; PATRÍCIO, F. R. A.; HAKAKAVA, R. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 225-232, 2009.

MAIA, L. C. et al. Diversity of Brazilian Fungi. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1033–1045, 2015.

- MANZANILLA-LÓPEZ, R.H. et al. Plant diseases caused by nematodes. In CHEN, Z. X.; CHEN, S.Y.; DICKSON, D. W. Nematology advances and perspectives. Nematode management and utilization. Wallingford, Beijing: CBI Publishing, p.637-716, 2004.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A. et al. Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **New Phytologist**, v. 213, n. 3, p. 1363–1377, 2017.
- MOURA, G. S. & FRANZENER, G. Biodiversidade de nematoides indicadores biológicos da qualidade do solo em agroecossistemas. **Arq. Inst. Biol.** 2017, v.84, p 1-8, 2015.
- Nematodes. In: ANKE, T. (Ed.). **Fungal Biotechnology**. Weinheim: Chapman and Hall, 1997. p.38-50.
- NUNES H.T.; MONTEIRO A.C.; POMELA A.W.V. Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Scientiarum Agronomy** Maringá, v. 32, n. 3, p. 403-409, 2010.
- NUNES, H. T.; MONTEIRO, A. C.; POMELA, A. W. V. Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 403-409, 2010.
- RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. Nematoides: bioindicadores de sustentabilidade e mudanças edafoclimáticas. **Rev. Bras. Frutic**, v. 32, n.4, p. p. 1289-1296, 2010.
- SAHEBANI, N.; HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2016–2020, 2008.
- SANTIAGO, D.C.; HOMECHIN, M.; SILVA, J.F.V.; RIBEIRO, E.R.; GOMES, B.C.; SANTORO, P.H. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaenses* em tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1055-1064, 2006.
- SANTIN, R. de C. M. **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. E *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. 2008, p. 92. Tese (doutorado) em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- SHARMA, I. P. & SHARMA, A. K. Physiological and biochemical changes in tomato cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot nematode. **Symbiosis**, v. 71, p.175–183, 2017.
- SOARES P. L. M. et al. Controle Biológico de Fitonematoides com Fungos Nematófagos In: BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA et al. Defensivos Agrícolas Naturais Uso e Perspectivas. Brasília, DF: Embrapa, 2016.
- SOSA-GOMEZ, D. R. **Fungos entomopatogênicos**: catálogo de isolados. Londrina: Embrapa Soja, 2002. v.1.
- STIRLING, G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes**. Progress, Problems and Prospects. UK: CAB International, Wallingford, 1991, p.282.
- VIGGIANO, J. R.; DE FREITAS, L. G.; LOPES, E. A. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. **Biological Control**, v. 69, p. 72–77, 1 fev. 2014.
- WHARTON, D. A.; BARCLAY, S. Anhydrobiosis in the free-living antarctic nematode *Panagrolaimus davidi* (Nematoda: Rhabditida). **Fundamental and Applied Nematology**, Paris, v. 16, p. 17-22, 1993.
- ZARE, R.; GAMS, W.; EVANS, H.C. A revision of *Verticillium* section Prostrata. V. the genus *Pochonia*,

with notes on *Rotiferophthora*. Nova Hedwigia, v.73, p.51-86, 2001.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, v. 94, p. 21–29, 2015.

NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (NEPS)

Raiana Rocha Pereira

Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Ciências Agrárias
Belém - Pará

Josiane Pacheco de Alfaia

Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Ciências Agrárias
Belém - Pará

Artur Vinícius Ferreira dos Santos

Universidade Federal Rural da Amazônia, Departamento de Topografia e Geoprocessamento
Tomé-Açu - Pará

Débora Oliveira Gomes

Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Ciências Agrárias
Belém - Pará

Raphael Coelho Pinho

Instituto Federal do Pará, Campus Industrial Marabá
Marabá - Pará

Lyssa Martins de Souza

Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus de Paragominas
Paragominas - Pará

Shirlene Cristina Brito da Silva

Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus de Paragominas
Paragominas - Pará

Telma Fátima Vieira Batista

Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Ciências Agrárias
Belém - Pará

RESUMO: Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) são encontrados no solo, pertencem à ordem Rabditoide. São considerados organismos importantes no controle de insetos. Os gêneros mais estudados são *Heterorhabditis* e *Steinernema*, sendo utilizado para o controle biológico de pragas. Os NEPs estão simbioticamente associados às bactérias dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, o ciclo de vida desses nematoides possuem quatro estádios de desenvolvimento (ovo, J1, J2, J3, J4 e adulto). Os estádios de vida desses nematoides são parasitas dentro do hospedeiro, exceto o estágio imaturo de vida livre conhecido como juvenil infectante (JI). Os nematoides possuem dois tipos de forrageamento, estratégia para encontrar novos hospedeiros, as categorias são *ambusher* (Baixa mobilidade) e *cruiser* (Alta mobilidade). Existe dois métodos de produção massal: in vitro (meio sólido e líquido) e in vivo. Poucas empresas produzem e comercializam nematoides entomopatogênicos. Após serem produzidos os NEPs são armazenados em água, esponja, gel, ou em outros materiais inertes, com temperatura variando de 4 °C a 16°C. O Brasil é um dos líderes no uso de agrotóxico, esse fato pode ser mudado com a utilização dos NEPs no controle biológico de pragas, o país tem grande potencial na produção do NEPs. Pesquisas são necessárias, além de incentivos para a produção e desenvolvimento de medidas

de controle de pragas usando NEPs.

PALAVRAS-CHAVE: *Heterorhabditis*, *Steinernema* parasita, simbiose e controle biológico.

ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE (EPNS)

ABSTRACT: The entomopathogenic nematodes (EPNs) are found in the soil belong to Rhabditida order. They are considered important organisms in insect control. The most studied genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* are being used for biological pest control. EPNs are symbiotically related to bacteria of the *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* genres, the life cycle of these nematodes have four stages of development (eggs, J1, J2, J3, J4 and adult). The life stages of these parasites are nematodes within the host, except the immature stage known as free-living infective juvenile (JI). Nematodes have two types of foraging strategy to find new hosts, the categories are *Ambusher* (low mobility) and *cruiser* (high mobility). There are two methods for mass production in vitro (solid, liquid medium), or in vivo. Few companies produce and commercialize entomopathogenic nematodes. Após serem produzidos os EPNs são armazenados em água, esponja, gel, ou em outros materiais inertes, com temperatura variando de 4 °C a 16°C. The Brazil is one of the leaders in the use of pesticides, a fact that can be changed with the use of EPNs in the biological control of pests, the country has great potential in the production of EPNs. Research is needed, as well as incentives for the production and development of pest control measures using EPNs.

KEYWORDS: *Heterorhabditis*, *Steinernema*, parasite, symbiosis and biological control

1 | INTRODUÇÃO

O estudo dos nematoides que causam a morte de insetos, conhecido como entomopatogênicos (NEPs), teve início na década de 1930, intensificando-se na década de 1980, os nematoides pertencem ao Filo Nematoda, à ordem Rhabditida, são reconhecidas aproximadamente trinta famílias de nematoides em diferentes associações com os insetos (KAYA & STOCK, 1997).

Os NEPs são organismos importantes no controle biológico de insetos, eles interferem na reprodução ou matam indivíduos considerados pragas na agricultura. Tais indivíduos pertencentes às ordens: Coleóptera, Díptera, Hymenoptera e Lepdoptera. Diferentes espécies de nematoides das famílias Mermithidae, Tetradonematidae, Neotylenchidae com potencial para o controle biológico já foram estudadas (FERRAZ, 1998). Contudo, as famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae, são consideradas excelentes agentes de controle biológico, demonstrando maior potencialidade em insetos-praga de solo e de ambientes crípticos (GEORGIS et al., 2006; SHAPIRO-ILAN et al., 2006).

Ambos as famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae podem ser cultivados em larga escala em meios sólidos ou líquidos artificiais. São organismos que

desenvolveram a capacidade de transportar e introduzir bactérias simbióticas na cavidade corporal dos insetos, promovendo a morte desses insetos em aproximadamente 48 horas (KAYA & GAUGLER, 1993).

As duas famílias possuem ciclos de vida semelhantes, estão simbioticamente associadas às bactérias dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, são considerados parasitas letais e hábeis para infectar ampla gama de espécies de insetos, respectivamente, são responsáveis pela morte por septicemia (GREWAL; NARDO; AGUILLERA, 2001; SIMI, 2014).

Os nematoides entomopatogênicos são organismos exclusivos de solos, podem ser encontradas em áreas agrícolas, florestas, gramados, desertos e praias (GREWAL, 2000). Esses organismos podem se adaptar a novos ambientes, disseminam-se em busca de hospedeiros, podem ser produzidos em larga escala, apresentam uma vasta gama de hospedeiros e podem ser aplicados com equipamentos convencionais (GREWAL; NARDO; AGUILLERA, 2001). Os nematoides entomopatogênicos podem substituir inseticidas devido a fácil aplicação e a capacidade de busca por hospedeiro (CAPINERA & EPSKY, 1992). A comercialização de produtos à base de NEPs já é realidade nos Estados Unidos e na Europa (GAUGLER et al., 2000).

No Brasil, a pesquisa com o NEPs é considerada recente, mas vem progredindo em vários aspectos, como a exploração da biodiversidade, a formulação e produção comercial desses agentes. A dificuldade em disseminar o uso de NEPs tem relação com a escassez de empresas que comercialmente produzem esses nematoides, o que compromete sua aplicação em larga escala no campo (BRIDA et al., 2018).

No Brasil a empresa Bio Controle - Métodos de Controle de Pragas Ltda, que junto com Instituto Biológico produziu e comercializou o produto Bio Nep, à base de *Steinernema*, teve o seu registro cancelado em 2018. O inseticida microbiológico *Nematec*, à base do nematoide entomofílico *Deladenus siridicola*, para controle da vespa da madeira (*Sirex noctilio*), é o único produto registrado no Brasil (BIO CONTROLE, 2019 & SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 2019).

2 | CARACTERÍSTICAS DO NEMATOIDE

Os nematoides caracterizam-se por serem vermes com forma cilíndrica e de dimensões microscópicas que podem estender-se de 558 a 1130 μm (NEVES et al., 1999). São constituídos de sistemas reprodutivo, muscular, digestivo, secretor/excretor e nervoso, porém não possuem órgãos de visão e audição nem sistema circulatório e respiratório. A maioria das espécies possui os sexos separados (anfimíticos). No entanto, a partenogênese (somente nas fêmeas) ou o hermafroditismo ocorre em algumas espécies (BIRD & BIRD, 2012).

3 | CICLO DE VIDA DOS NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

Segundo Lewis et al., (2006) os nematoides entomopatogênicos possuem quatro estádios de desenvolvimento (ovo, J1, J2, J3, J4 e adulto). Fazem associação simbiótica com bactérias entomopatogênicas, são considerados parasitas letais e hábeis para infectar ampla gama de espécies de insetos. Os estágios de vida desses nematoides são parasitas dentro do hospedeiro, exceto o estágio imaturo de vida livre conhecido como juvenil infectante (JI), a fase J3 corresponde à fase em que o nematoide se encontra no solo. Este não se alimenta, não se reproduz, emerge do hospedeiro depredado e sai em busca de um novo hospedeiro, passando pelo último estágio de juvenil (J4) e tornam-se adultos da primeira geração, machos e fêmeas (KAYA & GAUGLER, 1993; AKHURST, 1993; KAYA & CAMPBELL, 2000; ADAMS & NGUYEN, 2002).

3.1 Ciclo da família Steinernematidae

O ciclo de vida da família Steinernematidae inicia-se quando o juvenil infectante (JI) entra no inseto hospedeiro pelas aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos), ou também podem penetrar através da cutícula, sendo liberada na hemocélio as bactérias simbióticas do gênero *Xenorhabdus*, a qual se multiplica rapidamente, matando o hospedeiro (FERRAZ, 1998; POINAR; GREWAL, 2012; STILWELL et al., 2018).

Dentro do inseto, os juvenis infectantes se alimentam da bactéria e dos tecidos em decomposição, se desenvolvem e sofrem muda para estágio (J4), quando então formam os adultos machos e as fêmeas de primeira geração. Após o acasalamento, as fêmeas colocam os ovos que eclodem em juvenis de primeiro estágio (J1), mudam sucessivamente para os de segundo (J2), os de terceiro (J3) e os de quarto estágio (J4) e passam para adultos fêmeas e machos de segunda geração. Os nematoides se reproduzem continuamente, frequentemente, por duas ou três gerações até a depredação do cadáver do inseto. Se o recurso alimentar for limitado, os ovos colocados pelas fêmeas de primeira geração se desenvolvem diretamente em juvenil infectante (JI). Após se extinguirem os recursos alimentares do cadáver, o último segundo estágio juvenil cessa de se alimentar, incorpora uma quantidade de células bacterianas numa vesícula especial que se situa na região anterior do intestino, converte-se num estágio pré-infectante, muda para o juvenil infectante (JI) que retém cutícula do segundo estágio como um revestimento, deixa o cadáver e procura por um novo hospedeiro (POINAR, 1990; KAYA & GAUGLER, 1993; ADAMS & NGUYEN, 2002).

3.2 Ciclo da família Heterorhabditidae

Os Heterorhabditídeos apresentam um ciclo de vida semelhante ao da família Steinernematidae, passando pelos mesmos estádios de vida, porém a primeira

geração de adultos no inseto morto é hermafrodita, machos e fêmeas anfimíticos surgem na segunda geração e eventualmente nas seguintes (JOHNIGK & EHLERS, 1999; CICHE & ENSIGN, 2003).

O ciclo de vida para a maioria dos nematoides entomopatogênicos da infecção à emergência dos juvenis infectantes varia de 7 a 10 e 12 a 15 dias, respectivamente, em temperatura ambiente (EHLERS, 2001).

4 | RELAÇÃO DOS NEMATOIDES E BACTÉRIAS SIMBIONTES

As bactérias simbiontes dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* colonizam os nematoides entomopatogênicos exclusivamente dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, respectivamente (AKHURST, 1980; CHICHE; ENSIGN, 2003).

Existe diferença entre as bactérias simbiontes, na maneira de colonização do hospedeiro nematoide: *Heterorhabditis* retém as bactérias *Photorhabdus* na porção anterior do intestino enquanto *Steinernema* possui um divertículo intestinal especializado para abrigar as bactérias *Xenorhabdus* (ALMERANA et al., 2012).

As bactérias além de causar a morte do inseto, também fornecem base nutritiva para o crescimento e desenvolvimento do nematoide e reduzem a contaminação do cadáver do inseto por organismos oportunistas do solo (AKHURST, 1993; DUNPHY & THURSTON, 1990).

5 | ESTRATÉGIA DE FORRAGEAMENTO DOS NEMATOIDES

As estratégias para encontrar novos hospedeiros são divididas nas categorias *ambusher* e *cruiser*. Esta divisão refere-se à diferença de tempo gasto pelo nematoide para explorar o ambiente, as quais correlacionam-se com um conjunto de características morfológicas, fisiológicas, comportamental e ecológica do nematoide (HUEY & PIANKA, 1981).

Os forrageadores do tipo *ambusher* apresentam baixa mobilidade, exploram o ambiente por pausa de longa duração. Este tipo de forrageador permanece próximo à superfície do solo e tem maior probabilidade de encontrar hospedeiros móveis. Os forrageadores *cruiser* apresentam alta mobilidade, exploram sinais associados ao hospedeiro enquanto se movem pelo ambiente ou durante pausa de curta duração. Este tipo de forrageador tem maior possibilidade de encontrar insetos crípticos ou sedentários, aprofundados no perfil do solo (LEWIS et al., 1992; CAMPBELL & GAUGLER, 1997; KAYA & CAMPBELL, 2000).

Os forrageadores do tipo *cruiser* também possuem quimiorreceptores que captam compostos voláteis, principalmente dióxido de carbono, liberado pelas trocas gasosas do inseto, que os direcionam para os hospedeiros, assim como, voláteis que são emitidos por raízes de plantas em resposta ao ataque de insetos (ENNIS et

6 | VANTAGENS NA UTILIZAÇÃO DE NEMATOIDES NO CONTROLE DE INSETOS

Os NEPs possuem atributos que são característicos de um agente de controle biológico ideal, por exemplo, ampla gama de hospedeiros, possibilidade de criação massal in vitro a custos economicamente viáveis, capacidade de serem efetivos na presença de inseticidas químicos e de outros agentes, possibilidade de agirem em sinergia com estes. Tais nematoides são inseto-específicos e têm demonstrado eficácia no controle de certos insetos ou grupos de insetos, particularmente no de pragas que completam parte de seu ciclo de vida no solo, em muitos casos apresentam a capacidade de buscar a espécie hospedeira, persistem no ambiente por longos períodos, não são tóxicos para o homem, para plantas cultivadas, para animais domésticos e de interesse zootécnico (LEITE, 2006). Os nematoides entomopatogênicos podem ser empregados em programas de controle integrado, em certos casos causam índices de mortalidade das pragas maiores que os proporcionados pelo uso de outros patógenos (ALVES et al, 1998).

7 | LIMITAÇÕES NA UTILIZAÇÃO DE NEMATOIDES PARA O CONTROLE DE INSETOS

O uso de nematoides entomopatogênicos no controle de pragas ainda é muito restrito, principalmente em escala comercial. Essas implicações estão relacionadas com o custo de produção na criação massal, dificuldades no armazenamento por longos períodos, preparo/obtenção de embalagens adequadas para a remessa segura dos nematoides produzidos, despesas com testes para registro em órgãos competentes, poucas espécies estudadas em laboratório e campo. Condições ambientais como umidade baixa e temperatura fora da faixa ideal (21 a 27°C) desfavorece a biologia do nematoide. Além disso, alguns insetos-pragas apresentam mecanismos de defesa contra nematoide entomopatogênicos, tais mecanismos referem-se à encapsulação e melanização do nematoide causando-lhes a morte (ALVES et al, 1998).

8 | PRODUÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

Os NEPs para serem incluídas em programas de manejo integrado de pragas (MIP) é necessária uma produção em grande escala. Para isso, existe dois métodos de produção massal: in vitro (meio sólido e líquido) com o uso de meios de cultura específicos, ou in vivo mediante a reprodução do nematoide em larvas vivas de insetos (BARBOSA, 2005).

8.1 Produção in vitro: Meio sólido e líquido

A produção em meio sólido consiste no cultivo do nematoide em meio artificial onde é previamente inoculado com a bactéria simbiote, alimentando-se dos componentes do meio e da cultura do microrganismo (LEITE et al., 2011).

Nesse método, os nematoides são criados em esponjas de poliéster e poliuretano impregnadas com vísceras de porco e gordura bovina contendo a bactéria simbiote. Esse método é comercialmente utilizado na Austrália, China e Estados Unidos (BEDDING, 1984)

Os NEPs desinfestados em um meio monoxênico onde são colocados sobre as bactérias simbiotes. A esterilização superficial dos JIs é insuficiente para estabelecer uma cultura monoxênica porque a bactéria contaminante pode sobreviver abaixo da cutícula. Assim, foi desenvolvido um método em que ovos de nematoides são obtidos da ruptura de fêmeas grávidas em solução alcalina, colocadas em culturas com o simbiote (SHAPIRO; GAUGLER, 2002).

O outro método é em meio líquido, onde a bactéria simbiote é cultivada antes do nematoide. Vários ingredientes da cultura líquida são relatados incluindo farinha de soja, extrato de levedura, óleo de milho, gema de ovo, leite em pó e etc. O tempo de cultura pode variar dependendo do meio e da espécie, variando de três semanas a duas semanas ou menos. A cultura estando completa, os nematoides podem ser removidos do meio por centrifugação (SHAPIRO & GAUGLER, 2002).

Entretanto ao utilizar a esponja para a produção de NEPs, esta, não é biodegradável e, para a comercialização do nematoide, deve ser removida. Portanto, para fins comerciais, a produção de nematoides em meio líquido é mais prática e econômica. O nematoide pode ser colhido sem a necessidade de ser previamente extraído da esponja, e todos os componentes do meio de cultura são biodegradáveis (LEITE et al., 2011).

8.2 Produção in vivo

A produção in vivo é uma técnica simples, mas cujo custo de produção pode ser elevado e não permite uma economia de escala. O número de juvenis obtidos depende da suscetibilidade do hospedeiro e também da espécie de nematoide multiplicada (MOLINA; LÓPEZ, 2001).

O inseto mais comumente utilizado em laboratório são as larvas de *Galleria mellonella*, (Lepidoptera: Pyralidae) conhecida como traça-dos-favos. Esta possui alta suscetibilidade à maioria dos nematoides, é de fácil criação pode ser produzida em grande escala e apresenta disponibilidade comercial (BARBOSA, 2005).

9 | ARMAZENAMENTO E COMERCIALIZAÇÃO

Poucas empresas produzem e comercializam os nematoides entomopatogênicos, como resultado essas empresas lucram razoavelmente, fundamental para a continuação da produção comercial (LACEY & GEORGIS, 2012). Os NEPs são geralmente formulados em substratos não líquidos ou semi-líquidos logo após serem produzidos, armazenados em água, esponja, gel, ou em outros materiais inertes, com temperatura variando de 4 °C a 16°C, podem também ser estocados em tanques aerados por mais de três meses (GEORGIS; DUNLOP; GREWAL, 1995; GREWAL, 2002).

Apesar da demanda por produtos biopesticidas ter aumentado e ser significativo desde 2003, a receita global dos nemátodos foi plana, enquanto que para outros produtos biopesticidas houve aumento significativo das receitas e da cota de mercado. Fatores como custo, prazo de validade, manuseio, mistura, cobertura, novos pesticidas baseados em sinais de alerta, compatibilidade e margens de lucro para fabricantes e distribuidores têm contribuído para o fracasso de penetrar em muitos mercados ou ganhar participação significativa nos mercados atuais (LACEY & GEORGIS, 2012).

10 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil é também um dos países líderes no uso de agrotóxicos, motivo pelo qual existe preocupação crescente devido ao receio do uso excessivo desses produtos. Esse fato pode incentivar e impulsionar novas pesquisas para desenvolver e implementar medidas de controle de pragas usando NEPs.

O país possui uma variedade de biomas e ampla biodiversidade de espécies, com grande potencial para a descoberta de novas cepas e espécies de NEPs adequadas para a implementação de medidas de controle em diferentes ecossistemas.

Nesse sentido, existe a necessidade de estudos mais aprofundados para que haja o máximo de aproveitamento desse potencial. Estudos nas áreas de produção, formulação comportamental, comercialização e modo de aplicação ainda são escassos. Além disso, precisa-se divulgar mais as vantagens deste maravilhoso agente biocontrolador de pragas, o nematoide entomopatogênico.

REFERÊNCIAS

ADAMS, B. J., NGUYEN, K. B. Taxonomy and Systematics. In: Gaugler, R. (ed.) **Entomopathogenic Nematology**. New York: CABI, 2002. p. 311-332.

AKHURST, R. J. Bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes – the power behind the throne. In: BEDDING, R. A., AKHURST, R.; KAYA, H. (Eds.) **Nematode and the biological control of insects pests**. East Melbourne, Australia: CSIRO, 1993. p. 127-135.

AKHURST, R. J. Neoplectana species: Specificity of association with bacteria of the genus Xenorhabdus. **International journal of systematic bacteriology**, v. 33, p. 38-45, 1980.

ALMENARA, D. P., ROSSI, C., CAMARGO NEVES, M. R., E CARLOS EDUARDO WINTER, C. E. Nematoides Entomopatogênicos. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular- INCT. 2012.

BARBOSA, C. R. C. **Técnicas de produção in vivo de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) em galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae) e hospedeiros alternativos**. 2005. 91f. Dissertação (Mestrado) – UFLA. Lavras Minas Gerais-Brasil, 2005.

BEDDING, R. A. Storage of insecticidal nematodes. **International World Patent**, London, 1998. n. WO 88/08668.

BEDDING, R.A. (1984) Large scale production, storage and transport of insect parasitic nematodes (Neo- pectana sp. and Heterorhabditis sp.). **Annals of Applied Biology** 104, 117–120.

BIO CONTROLE, 2019. Disponível em: <<http://www.biocontrole.com.br/?area=produtos&id=32>> Acesso em: maio 2019.

BIRD, A. F.; BIRD, J. **The structure of nematodes**. Academic Press, 2012.

CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: dichotomy or variation along a continuum? **Fundamental and Applied Nematology**, v. 20, 1997. p. 393-398.

CAPINERA, J. L.; EPSKY, N.D. Potential for biological control of soil insects *in the Caribbean basin using entomopathogenic nematodes*. Florida Entomologist, v.75, p.525-532,1992.

CHICHE, T. A.; ENSIGN, J. C. For the insect pathogen Photorhabdus luminescens, wich end of a nematode is out? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1890-1897, 2003.

DUNPHY, G. B.; THURSTON, G. S. Insect immunity. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Eds.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, p. 301-326,1990.

EHLERS. R. U.; Biocontrol nematodes. In: Hokkanen HMT, Hajek AE (eds) **Environmental impacts of microbial insecticides**. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2001. 177–220.

ENNIS, D. E.; DILLON, A. B.; GRIFFIN, C. T. Simulated roots and host feeding enhance infection of subterranean insects by the entomopathogenic nematode Steinernema carpocapsae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, 2010. p. 140–143.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematoides entomopatogênicos. In: ALVES, S. B.; **Controle microbiano de insetos**. 2. Edição. Piracicaba: FEALQ, p.541-569, 1998.

FLANDERS, K. L.; MILLER, J. M.; SHIELDS, E. J. In vivo production of Heterorhabditis bacteriophora “Oswego” (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil inhabiting insects in temperate regions. **Journal Economic Entomology**, v.89,1996. p.373-380.

GAUGLER, R. Entomopathogenic Nematodes **In: Biological Control: 0**. CRC press, 2017.

GAUGLER, R.; BOUSH, G. M., Effects of ultraviolet radiation and sunlight on the entomogenous nematode, Neoaplectana carpocapsae, **J. Invertebr. Pathol**, 32, 1978. 291.

GAUGLER, R.; GREWAL, P.; KAYA, H.; SMITH-FIOLA, D. Quality assessment of commercially

produced entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, San Diego, v. 17, n.1, 2000. p. 100-109.

GEORGIS, R. et al. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. **Biological Control**, v. 38, n. 1, p. 103-123, 2006.

GEORGIS, R. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC, 1990, p.173-191.

GEORGIS, R.; DUNLOP, D. B.; GREWAL, P. S. Formulation of entomopathogenic nematodes. Pp. 197–205 In: HALL, F. R.; BARRY, J. W. (Ed.). **Biorational pest control agents: formulation and delivery**. Washington, DC: American Chemical Society. 1995. p. 197–205.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal for Parasitology**. 30, 2000. p. 995-1000.

GREWAL, P. S. Formulation and application technology. In: Gaygler, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. Rutgers University, New Jersey. 2002. p. 1-28.

GREWAL, P. S.; DE NARDO, E. A. B.; AGUILLERA, M. M. Entomopathogenic nematodes: Potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, 2001. p. 191-205.

HUEY, R. B.; PIANKA, E. R. Ecological consequences of foraging mode. **Ecology**, v. 62 , 1981. p. 991-999.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, v. 38, 1993. p. 181-206.

KAYA, H. K.; STOCK, S. P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. A. (Ed.) **Manual of techniques in insect pathology**. (Biological Techniques), San Diego: Academic Press, p. 281-324. 1997.

KAYA, H.K; CAMPBELL, J.F. **Influence of insect associated cues on the jumping behavior of entomopathogenic nematodes (Steinernema spp.)**. Behaviour, v. 137, n. 5, p. 591-609, 2000.

LACEY, L. A.; GEORGIS, R. Entomopathogenic Nematodes for Control of Insect Pests Above and Below Ground with Comments on Commercial Production. Journal of Nematology, Loudonville, OH, v. 44, n. 2, 2012. p .218-225.

LEITE, L. G. Nematoides entomopatogênicos. In: BATISTA FILHO, A. (ed.). **Controle biológico de insetos e ácaros**. (Boletim Técnico, 15). São Paulo: Instituto Biológico, 2006. p. 42-51.

LEITE, L. G.; SCHMIDT, F. S.; DELLACQUA, R.; PIETROBON, T. C.; MARRASCHI, R.. Avanços na produção “in vitro” de nematoides entomopatogênicos. **12º SICONBIOL, Simpósio de Controle Biológico “Mudanças climáticas e sustentabilidade: quebra de paradigmas”**, 2011. 51p.

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; HARRISON, R. Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. **Parasitology**, v. 105,1992. p. 309-315.

LINDEGREN, J.E.; VALERO, K.A.; MACKEY, B.E. Simple in vivo production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. **Journal Nematology**, v.25,1993. p.193-197.

MOLINA, A. J. P.; LOPEZ NUÑEZ, J. C. Produccion in vivo de tres entomonematodos con dos sistemas de infeccion en dos hospedantes. **Sociedad Colombiana de Entomologia**, Bogota (Colombia), 2001.

- NEVES, J., SIMÕES, N. & MOTA, M. Nemátodes Entomo patogénios: Uso e novas perspectivas. **Boletim de Biotecnologia**, 23-29, 1999.
- POINAR, G. O. Jr. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K.(Eds.) **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 23-62.
- POINAR, G. O.; GREWAL, P. S. History of entomopathogenic nematology. **Journal of Nematology** 44: 2012. p. 153-161.
- SCHMIEGE, D. C. The feasibility of using a neoaplectanid nematode for control of some forest insect pests, **J. Econ. Entomol.**, 1963. 56, 427.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; GOUGE, D. H.; PIGGOTT, S. J.; FIFE, J. P. Applications technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. **Biological Control**, San Diego, v. 38, n. 1, 2006. p. 124-133.
- SHAPIRO-ILAND, I. D. I., GAUGLER, R. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**.28: 2002. p. 137–146.
- SILVER, S. C.; DUNLOP, D. B.; GROVE, D. I. Granular formulation of biological entities with improved storage stability. **Int. patent**. No. WO 95/0507, 1995.
- SIMI, L. D.; **Controle de *sphenophorus levis* e *conotrachelus humeropictus* pelo uso combinado de nematoides e fungos entomopatogénicos**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista “júlio de mesquita filho” Faculdade de Ciências Agronômicas Câmpus de Botucatu. Botucatu-SP, 2014.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA. Inseticida microbiológico à base de nematoides, 2019. Disponível em: <<http://nematologia.com.br/index.php?page=noticia&id=17>> Acesso em: julho 2019.
- STILWELL, M.D.; CAO, M.; GOODRICH-BLAIR, H.; WEIBEL, D. B. Studying the Symbiotic Bacterium *Xenorhabdus nematophila* in Individual, Living *Steinernema carpocapsae* Nematodes Using Microfluidic Systems. **American Society for Microbiology**. V. 3, 2018.
- TURLINGS, T. C. J.; HILTPOLD, I.; RASMANN, S. The importance of root-produced volatiles as foraging cues for entomopathogenic nematodes. **Plant Soil**, v. 358, 2012. p. 51–60.

ICTIOFAUNA DA PRAIA DE BERLINQUE, ILHA DE ITAPARICA, MUNICÍPIO DE VERA CRUZ - BA

Edilmar Ribeiro Sousa

Pós-Graduação da Universidade Salvador (UNIFACS), Laureate International Universities, Salvador-Bahia.

Hortência Ramos Gomes Santos

Pós-Graduação da Universidade Salvador (UNIFACS), Laureate International Universities, Salvador-Bahia.

Fabrizio Menezes Ramos

Instituto Federal do Pará (IFPA), Campus de Cametá. Cametá-Pará.

RESUMO: Esta pesquisa visa abordar a importância da preservação da Ictiofauna e apresenta a estrutura da comunidade de peixes encontrada na Praia de Berlinque, Ilha de Itaparica, município de Vera Cruz, Bahia, Brasil. Os peixes foram coletados no período de outubro/2012 a setembro/2013, durante a baixa-mar. Foram coletados 1994 indivíduos pertencendo a 31 famílias e 52 espécies. A maioria dos espécimes coletados foram consideradas de pequeno porte, variando de 19 mm a 352 mm de comprimento total (CT). O estudo apresentou também, espécies e um gênero que ainda não haviam sido coletadas na região. Concluindo que das 52 espécies capturadas 44,23% estiveram presentes em ambas as estações.

PALAVRAS-CHAVE: Dinâmica da ictiofauna,

estrutura de comunidade, diversidade.

THE ICTIOFAUNA OF BERLINQUE BEACH, ITAPARICA ISLAND, MUNICIPALITY OF VERA CRUZ - BA

ABSTRACT: This research aims to address the importance of Ichthyofauna preservation and presents the structure of the fish community found in Berlinque Beach, Itaparica Island, municipality of Vera Cruz, Bahia, Brazil. The fish were collected from October / 2012 to September / 2013, during low tide. We collected 1994 individuals belonging to 31 families and 52 species. Most of the specimens collected were considered small, ranging from 19 mm to 352 mm of total length (CT). The study also presented species of a genus that had not yet been collected in the region. In conclusion, of the 52 species captured, 44.23% were present in both seasons.

KEYWORDS: Ichthyofauna dynamics, community structure, diversity.

INTRODUÇÃO

A Ilha de Itaparica, maior ilha da Baía de Todos os Santos (BTS), estado da Bahia, possui uma grande diversidade em peixes marinhos e tem a pesca artesanal como elemento principal

para economia local, de extrema importância no aspecto econômico e social (Souto, 2008; Souto e Martins, 2009; Jesus e Prost, 2011). Sendo os peixes, crustáceos e moluscos os pescados mais capturados, alimentando o mercado consumidor de Salvador e de todo recôncavo baiano.

Devido à pressão humana que ocorre há décadas, falta de saneamento básico adequado e a pesca predatória, os recursos pesqueiros encontram-se comprometidos, ameaçando a produtividade e a diversidade dos ecossistemas marinhos da BTS. Os estudos voltados para a ictiofauna são fundamentais em ações de gestão e manejo dos ecossistemas e da pesca artesanal. São informações importantes nas tomadas de decisões de impactos ambientais e para o licenciamento de empreendimentos e/ou atividades humanas (Silveira et al., 2010).

São escassos os estudos na Ilha de Itaparica e região da BTS, principalmente sobre a ictiofauna local, o presente trabalho pretende assim, ampliar os conhecimentos da ictiofauna da praia de Berlinque.

CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA GERAL DE ESTUDO

A Baía de Todos os Santos (BTS) está localizada nas bordas da terceira maior cidade brasileira, Salvador, capital da Bahia. Centrada entre a latitude de 12°50' S e a longitude de 38°38' W. Possui 268 km de praias e 139 km de manguezais, com uma riqueza ambiental de grande importância tais como: manguezais, praias arenosas e formações insulares. Na entrada desta encontra-se a Ilha de Itaparica, a maior ilha marítima do Brasil com 293 km² com uma grande diversidade e belezas naturais possuindo um imenso potencial turístico e pesqueiro (BAHIA, 2000; Kirimurê, 2014).

A Ilha de Itaparica é a maior e mais importante ilha da BTS, com uma extensão de recifes de corais de 15km, uma das maiores do país e guardando uma diversidade tão significativa. Dividida entre Itaparica e Vera Cruz, a ilha guarda uma beleza natural grande e com imenso potencial turístico (Moura, 2011). Detém mais de 40km de praias, com farta vegetação tropical, onde predominam exuberantes coqueirais e inúmeros vilarejos de pescadores, com uma temperatura média anual de 25 °C.

A praia de Berlinque (13°06'S – 38°45'W) é uma praia exposta, constituída de substrato arenoso, localizada no lado oriental da Ilha de Itaparica (Município de Vera Cruz), com águas mornas e calmas em qualquer período das marés, sendo um importante local para a prática esportiva e a pesca artesanal (BAHIA, 2000).

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostragens foram realizadas mensalmente no período de outubro/2012 a setembro/2013, durante a baixa-mar com auxílio de rede de arrasto manual medindo 13 m de comprimento, 1,70 m de altura e malha de 12 mm entre nós. Cada coleta

contou de 5 arrastos de 100 m de extensão cada, totalizando 500 m, paralelos à linha da costa, em profundidade geralmente inferior a 1,60 m.

Ainda em campo, os peixes capturados foram acondicionados em gelo e, em laboratório, identificados ao menor nível taxonômico possível de acordo com Figueiredo e Menezes (1978; 1980; 2000) e Menezes e Figueiredo (1980; 1985) e medidos com auxílio de ictiômetro e régua com precisão de 1,0 mm para obtenção do comprimento total (mm).

O material representativo de cada táxon fixado em formol 10% e conservado em álcool 70%, foi tombado e depositado na coleção científica do Laboratório de Biologia Pesqueira (LABIPESCA), localizado no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura (NEPA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

A abundância relativa das espécies foi obtida através da razão entre o número de indivíduos capturados de cada espécie e o total de exemplares em cada amostra multiplicado por 100. Além disso, como medida de abundância relativa mensal foi utilizada a Captura por Unidade de Esforço (CPUE) calculada pelo número total de peixes capturados dividido pelo número de arrastos realizados em cada coleta.

A frequência de ocorrência foi calculada em função do número de vezes que cada espécie ocorreu em relação ao total de coletas realizadas, sendo as espécies classificadas de acordo com Dajoz (1973), a partir dos valores obtidos, em constantes ($\geq 50\%$), acessórias ($25\% < C < 50\%$) e acidentais ($C \leq 25\%$).

A análise de agrupamento Cluster foi utilizada para avaliar a similaridade entre dez pesquisas realizadas em praias arenosas do Brasil, incluindo os dados desse trabalho. Antes das análises, os valores de ocorrência numérica das espécies foram transformados em matrizes de similaridade (presença x ausência). Foram excluídos da análise os táxons que não estavam identificados em nível específico para evitar distorções. Utilizou-se o coeficiente de Similaridade de Bray-Curtis.

Para avaliar a variação temporal na composição das espécies coletadas foram realizadas as análises multivariadas de nMDS (non Metric Multidimensional Scaling) e de Cluster utilizou-se para ambas as análises a matriz de similaridade de Bray-Curtis. O nMDS é um método de ordenação que indica o grau de distorção entres ranks de similaridade. Stress $< 0,1$ indica uma boa à excelente representação com pouca probabilidade de distorção, enquanto que $0,1 < stress < 0,2$ proporciona uma útil representação dos dados embora os pontos das extremidades apresentem um pouco de distorção (Clark e Warwick, 2001).

Todo procedimento estatístico foi realizado com o auxílio do pacote Paleontological Statistics Version 2.17.c.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados um total de 1994 indivíduos, distribuídos em 11 ordens, 31 famílias, 47 gêneros e 52 espécies (Tabela 1). Dentre os exemplares capturados, 47 peixes não obtiveram classificação em espécie permanecendo em família ou gênero devido ao seu tamanho muito reduzido ou ao péssimo estado de conservação por terem sido danificados durante a coleta, prejudicando assim sua identificação.

Ordem	Família	Espécie	Ordem	Família	Espécie
Elopiiformes	Albulidae	<i>Albula vulpes</i> (Linnaeus, 1758)	Perciformes	Haemulidae	<i>Pomadasys corvinaeformis</i> (Steindachner, 1868)
Anguilliformes	Muraenidae	<i>Gymnothorax</i> sp.			<i>Conodon nobilis</i> (Linnaeus, 1758)
Clupeiformes	Clupeidae	<i>Lile piquitinga</i> (Schreiner e Miranda Ribeiro, 1903)		Sciaenidae	<i>Anisotremus moricandi</i> (Ranzani, 1842)
		<i>Harengula Jaguana</i> (Cuvier, 1829)			Sciaenidae
	Engraulidae	<i>Anchoa tricolor</i> (Spix e Agassiz, 1829)			<i>Menticirrhus americanus</i> (Linnaeus, 1758)
		<i>Anchoviella brevirostris</i> (Günther, 1868)			<i>Menticirrhus littoralis</i> (Holbrook, 1860)
		<i>Anchoviella lepidentostole</i> (Fowler, 1911)			<i>Umbrina coroide</i> (Cuvier, 1830)
	Pristigasteridae	<i>Chirocentrodon bleekermanus</i> (Poey, 1867)			<i>Ophioscion punctatissimus</i> (Meek e Hildebrand, 1925)
Siluriformes	Ariidae	<i>Cathorops spixii</i> (Agassiz, 1829)			<i>Larimus breviceps</i> (Cuvier, 1830)
Myctophiformes	Synodontidae	<i>Synodus foetens</i> (Linnaeus, 1766)			<i>Odontoscion dentex</i> (Cuvier, 1830)
Gasterosteiformes	Fistulariidae	<i>Fistularia tabacaria</i> Linnaeus, 1758		Mullidae	<i>Upeneus parvus</i> (Poey, 1852)
	Syngnathidae	Syngnathidae		Mugilidae	<i>Mugil</i> sp
Dactylopteriformes	Dactylopteridae	<i>Dactylopterus volitans</i> (Linnaeus, 1758)		Ephippidae	<i>Chaetodipterus faber</i> (Broussonet, 1782)
Perciformes	Carangidae	Carangidae		Polynemidae	Polynemidae
		<i>Oligoplites saurus</i> (Bloch e Schneider, 1801)			<i>Polydactylus virginicus</i> (Linnaeus, 1758)
		<i>Caranx latus</i> (Agassiz, 1831)		Scaridae	<i>Sparisoma radians</i> (Valenciennes, 1840)
		<i>Chloroscombrus chrysurus</i> (Linnaeus, 1766)		Scombridae	<i>Scomberomorus cavala</i> (Cuvier, 1829)
		<i>Trachinotus goodei</i> (Jordan e Evermann, 1896)		Kyphosidae	<i>Kyphosus</i> sp.
		<i>Trachinotus falcatus</i> (Linnaeus, 1758)		Lobotidae	<i>Lobotes surinamensis</i> (Bloch, 1790)
		<i>Trachinotus carolinus</i> (Linnaeus, 1766)	Pleuronectiformes	Paralichthyidae	<i>Etropus crossotus</i> (Jordan e Gilbert, 1882)
		<i>Selene vomer</i> (Linnaeus, 1758)			<i>Citharichthys macrops</i> (Dresel, 1885)
		<i>Uraspi secunda</i> (Poey, 1860)		Achiridae	<i>Trinectes microphthalmus</i> (Chabanaud, 1928)
		<i>Trachinotus</i> sp.	Tetraodontiformes	Monacanthidae	<i>Stephanolepis hispidus</i> (Linnaeus, 1766)
	Lutjanidae	<i>Lutjanus synagris</i> (Linnaeus, 1758)			<i>Monacanthus ciliatus</i> (Mitchill, 1818)
		<i>Lutjanus jocu</i> (Bloch e Schneider, 1801)		Tetraodontidae	Tetraodontidae
	Gerreidae	<i>Eucinostomus</i> sp.			<i>Sphoeroides greeleyi</i> (Gilbert, 1900)

<i>Eucinostomus argenteus</i> (Baird e Girard, 1855)			<i>Sphoeroides</i> <i>testudineus</i> (Linnaeus, 1758)
<i>Ulaema lefroyi</i> (Goode, 1874)		Diodontidae	<i>Chilomycterus spinosus</i> (Linnaeus, 1758)
<i>Eucinostomus melanopterus</i> (Bleeker, 1863)		Sphyraenidae	<i>Sphyraena guachancho</i> Cuvier, 1829
<i>Diapterus rhombeus</i> (Valenciennes, 1830)	Atheriniformes	Belonidae	<i>Tylosurus acus acus</i> (Lacepede, 1803)
<i>Eucinostomus gula</i> (Quoy & Gaimard, 1824)		Hemiramphidae	<i>Hyporhamphus roberti roberti</i> (Valenciennes, 1847)

Tabela 1. Espécies de peixes registradas na Praia de Berlinque, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, Bahia, entre outubro/2012 a setembro/2013.

Segundo os inventários faunísticos presente nos trabalhos de Costa (2009), Oliveira-Silva et al. (2008), Barbalho (2007; 2004) e Moraes (2003), relativos à Baía de todos os Santos, este trabalho apresentou espécies e um gênero que ainda não haviam sido coletadas na região: *Gymnothorax* sp., *Anchoviella brevirostris*, *Uraspis secunda*, *Lutjanus jocu*, *Anisotremus moricandi*, *Upeneus parvus* e *Tylosurus acus acus* (Figura 2).

A espécie *A. moricandi* é uma espécie pouca estudada, encontra-se na categoria “pouco preocupante” (LC), de acordo com a IUCN (2015), habita recifes rochosos, relativamente comum no litoral brasileiro e não é uma espécie abundantemente explorada. Esteve representada por um indivíduo no mês de abril, medindo 96 mm de comprimento total.

Os indivíduos coletados apresentaram tamanhos que variaram de 19 mm a 352 mm de CT, sendo considerados de pequeno porte. A maioria dos exemplares atingiram menos de 100 mm, equivalente 92,63 % (1847 indivíduos totais) e 7,37% (147) alcançaram 100 mm ou mais de CT.

A presença de várias espécies, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, indicam a importância deste ambiente como berçário (Robertson e Lenanton, 1984; Blaber et al., 1995, Godefroid et al., 2001).

Foram observadas maior riqueza de espécies para as famílias Carangidae, Sciaenidae e Gerreidae, totalizando 33,45% dos indivíduos coletados (Figura 1), como também registradas por Moraes (2003), para a praia de Berlinque, Barbalho (2004; 2007), na praia de Aratuba e Ponta da Ilha, todas situadas na Ilha de Itaparica, BA.

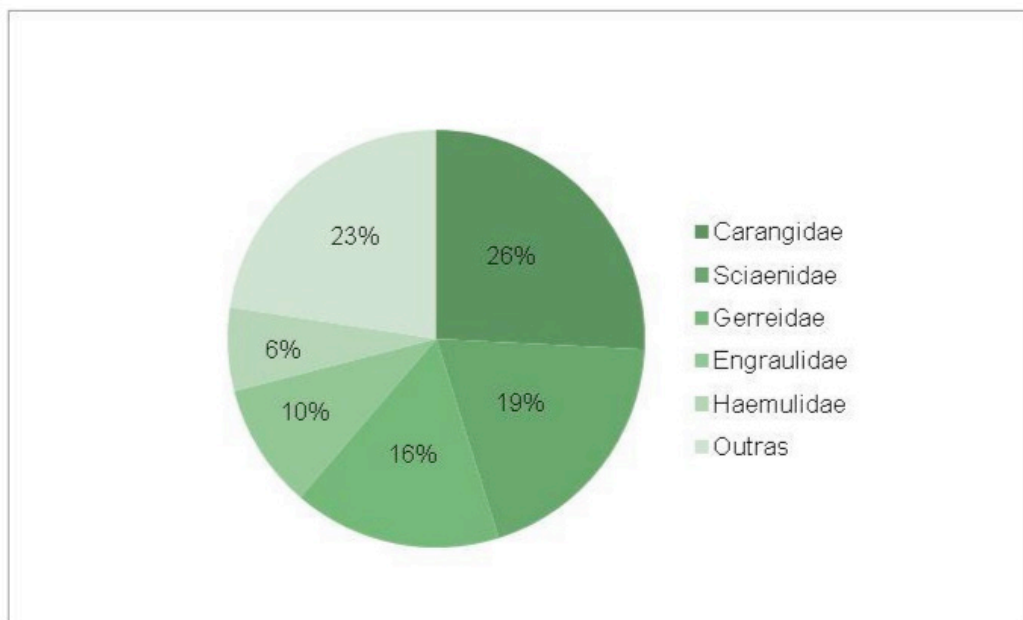


Figura 1. Contribuição percentual, em número de espécies para as principais famílias coletadas na Praia de Berlinque, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, Bahia, entre outubro/2012 a setembro/2013.

Avaliando a riqueza mensal das espécies, observa-se que o mês de abril/2013 abrangeu uma maior diversidade seguida pelo mês de maio/2013, na estação chuvosa. Os meses de outubro/12, dezembro/12 e janeiro/13 apresentaram baixa abundância e um alto valor de riqueza (Figura 2).

A alta diversidade de espécies em abril possivelmente foi influenciado por grande quantidade de macroalgas presentes na coleta, Crawley et al. (2006) e Andrades et al. (2010), justificam que a presença de macroalgas na praia fornece abrigo e recurso alimentar para diversas espécies de peixes juvenis.

Moraes (2003), Barbalho (2004) e Godefroid et al. (2004) também descrevem maiores riquezas de espécies no período chuvoso, o que foi igualmente encontrado no presente estudo.

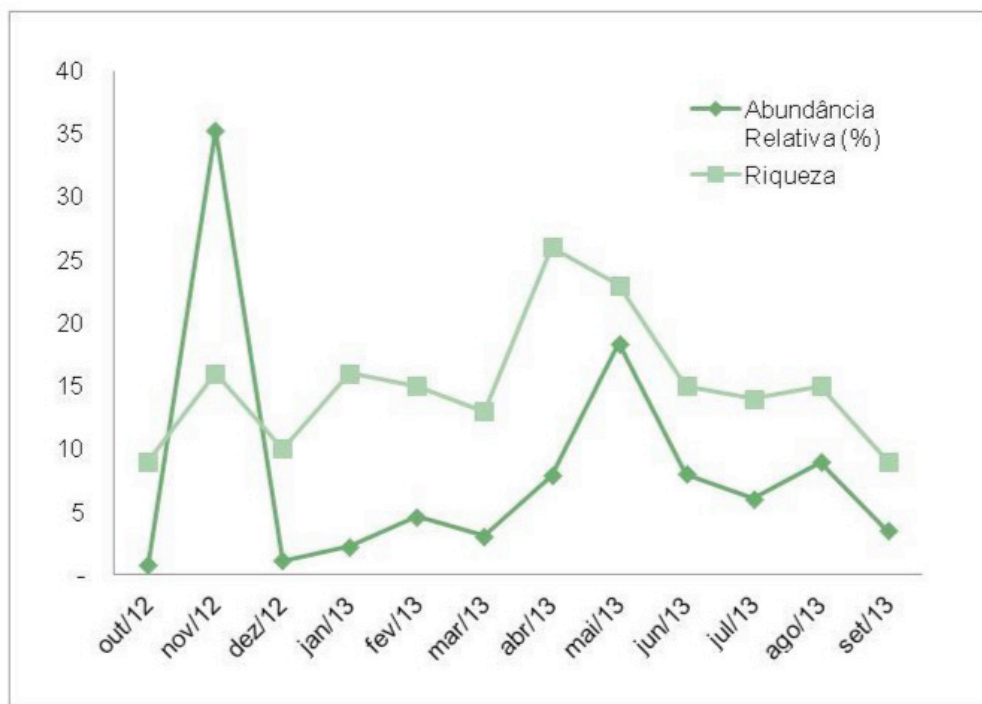


Figura 2. Abundância relativa e Riqueza das espécies coletadas Praia de Berlinque, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, Bahia, entre outubro/2012 a setembro/2013.

As famílias Muraenidae, Synodontidae, Fistulariidae, Kyphosidae, Lobotidae e Hemiramphidae ocorreram apenas uma única vez, correspondendo 19,35% do total. Nenhuma família esteve presente em todos os meses de coleta, as famílias Sciaenidae e Carangidae estiveram presentes em 91,67% dos meses coletados.

Das espécies coletadas, 38,6% apareceu apenas uma vez. De acordo com os níveis de constância de Dajoz (1973), 17% das espécies foram constantes, 35% acessórias e 48% acidentais (Figura 3). Nenhuma espécie coletada obteve 100% de frequência, as espécies *P. virginicus* e *O. punctatissimus* apresentaram os maiores percentuais de ocorrência (66,67% cada).

O grande percentual de espécies acidentais e acessórias evidencia que as populações estão em constante renovação ao longo do ano e que poucas estão adaptadas a viverem em ambientes arenosos (Oliveira-Silva et al., 2008).

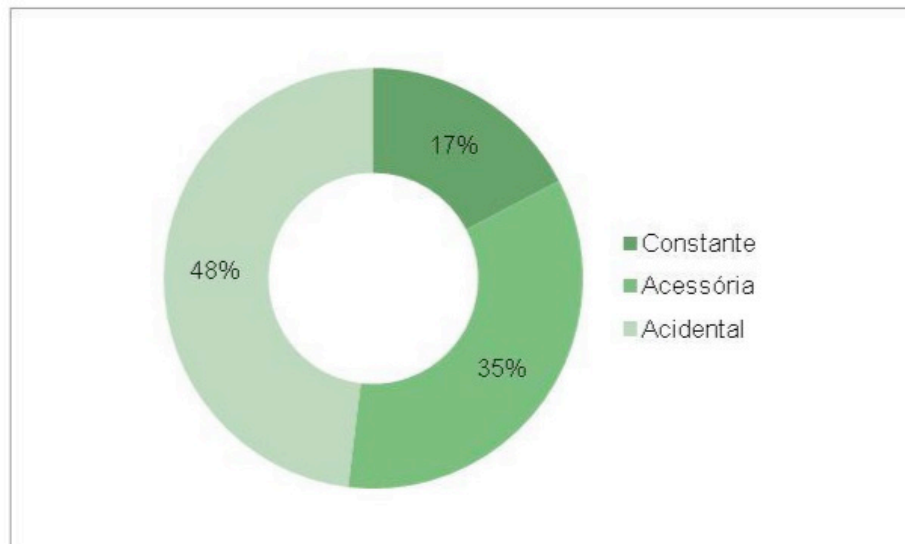


Figura 3. Contribuição percentual das espécies coletadas Praia de Berlinque, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, Bahia, entre outubro/2012 a setembro/2013.

A maior abundância relativa mensal foi obtida no mês de novembro de 2012 obtendo 35,31% (CPUE de 140,8 indivíduos/arrasto) seguido pelo mês de maio de 2013 com 18,36% (CPUE de 73,2) e a menor abundância foi registrada em outubro de 2012 constando 0,85% (CPUE de 3,4) (Figura 4).

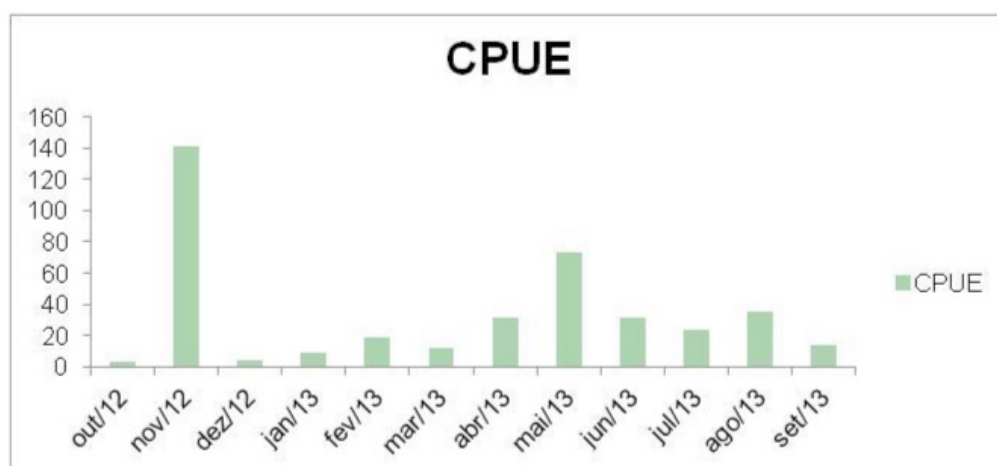


Figura 4. CPUE dos indivíduos coletados mensalmente na Praia de Berlinque, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, Bahia, entre outubro/2012 a setembro/2013.

Através das análises de agrupamento de similaridade, em nível de corte de 50%, houve a formação de apenas um grupo formado pelos meses junho e agosto de 2013. O mês que obteve uma similaridade mais próxima desse grupo foi julho de 2013, o qual obteve similaridade de 48% com o grupo citado. A maior similaridade entre esses meses possivelmente está associado ao número de indivíduos dentro deles, riquezas e índice pluviométrico semelhantes (Figura 5). O stress de 0,1542 evidencia que as similaridades estão adequadamente representadas pelas distâncias multidimensional do mapa.

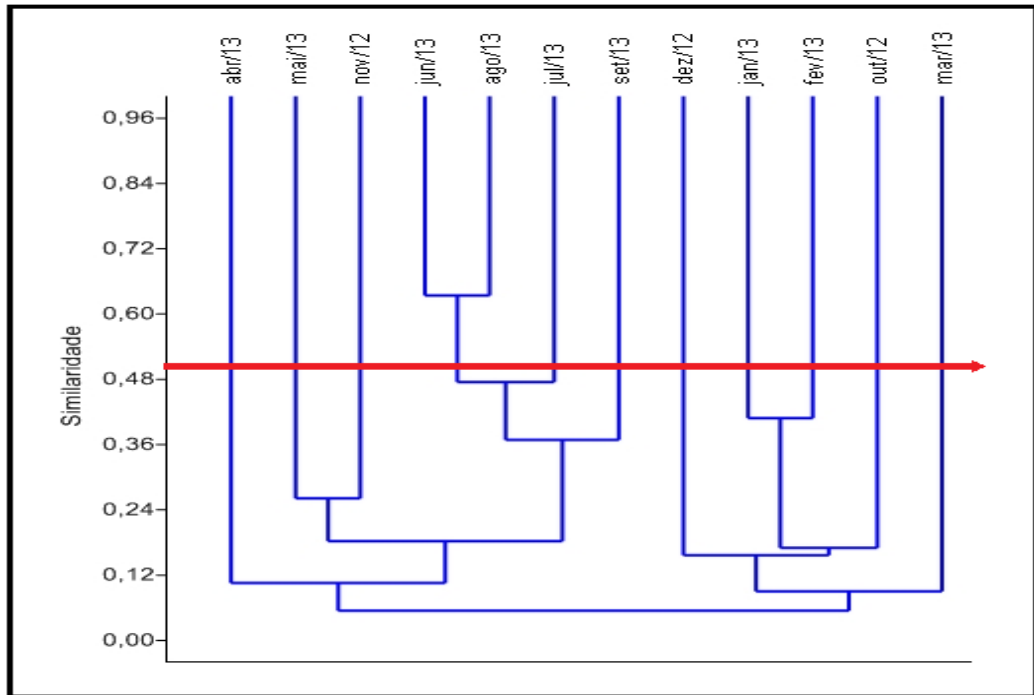


Figura 5. Dendrograma da similaridade da Praia de Berlinque, Ilha de Itaparica, Vera Cruz, Bahia, com base na composição temporal da ictiofauna registrada entre outubro/2012 a setembro/2013.

O dendrograma refletiu mudanças na composição temporal das espécies de Berlinque, padrão observado por outros autores (Godefroid et al., 1997; Moraes, 2003; Oliveira e Silva, 2008).

CONCLUSÃO

A praia apresenta a mesma composição presente na BTS, com exceção das espécies *Anchoviella brevirostris*, *Uraspis secunda*, *Lutjanus jocu*, *Anisotremus moricandi*, *Upeneus parvus* e *Tylosurus acus acus*. A espécie *A. moricandi* mesmo sendo descrita no Nordeste, ainda não havia sido coletada na região. As famílias Carangidae e Scianidae se mostraram frequentes em praias arenosas e as espécies *Albula vulpes*, *Carax latus*, *Trachinotus falcatus*, *Trachinotus carolinus*, *Eucinostomus gula*, *Pomadasys corvinaeformis*, *Conodon nobilis*, *Menticirrhus littoralis*, *Ophioscion punctassimus*, *Polydactylus virginicus* e *Sphoeroides greeleyi*, se confirmam espécies residentes da Ilha.

O grande percentual de espécies acidentais e acessórias encontrados e a análise do dendrograma de similaridade na praia de Berlinque confirmam a variação temporal da ictiofauna presente, afirmando que as praias arenosas estão em constante renovação ao longo do ano, sendo composta predominantemente por indivíduos de pequeno porte que utilizam essa área por encontrarem condições favoráveis ao seu crescimento, proteção contra predadores e recursos alimentares. Apresentou-se rica e com uma alta diversidade de espécies na maioria dos meses, principalmente no

período chuvoso, e ostenta maiores abundâncias nos meses mais quentes.

O estudo ressalta a grande diversidade de espécies encontrada na Ilha de Itaparica, a importância de novas pesquisas e a necessidade do aprofundamento e incremento de outros estudos da composição ictiofaunística de praias arenosas objetivando um maior conhecimento da biologia e ecologia desta comunidade para preservação e gestão das espécies.

REFERÊNCIAS

Andrades, R. C.; Gomes, M. P.; Martins, A. S. **Ecologia trófica de pampos (gênero Trachinotus; Carangidae) em praias arenosas do Espírito Santo e a importância de macroalgas destacadas para o suporte da ictiofauna.** III Congresso Brasileiro de Oceanografia, 2010.

BAHIA. **Roteiro Ecoturístico da Bahia – Baía de Todos os Santos. – Salvador.** Secretaria da Cultura e Turismo. Superintendência de Desenvolvimento do Turismo, 2000.

Barbalho, L. T. **Composição da Ictiofauna e Influência de fatores hidrográficos nas Praias de Ponta da Ilha (Ilha de Itaparica) e São Tomé de Paripe (Salvador), Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.** Tese de Mestrado, UFBA, 2007.

_____. **Ictiofauna da Praia de Aratuba (Ilha de Itaparica, município de Vera Cruz, Bahia): Diversidade, abundância e variação temporal.** Monografia (Trabalho de conclusão de bacharelado em Ciências Biológicas), UEFS, 2004.

Blaber, S. J. M.; Brewer, D. T.; Salini, J. P. **Fish communities and the nursery role of the shallow inshore waters of a tropical bay in the Gulf of Carpentaria, Australia.** Estuarine, Coastal and Shelf Science, v. 40, p.177-93, 1995.

Clark, K. R.; Warwick, R. W. **Change in Marine communities. An Approach to Statistical Analysis and interpretation.** 2nd edition. PRIMER-E: Plymouth, 2001.

Costa, M. F. **Inventário e análise temporal da ictiofauna ocorrente na Praia da Gameleira (Ilha de Itaparica), Vera Cruz (Bahia).** Monografia (Trabalho de conclusão de bacharelado em Ciências Biológica), UEFS, 2009.

Crawley K. R.; Hyndes G. A.; Ayzavian, S. G. **Influence of different volumes and types of detached macrophytes on fish community structure in surf zones of sandy beaches.** Marine Ecology Progress Series. v.307, p.233–246, 2006.

Dajoz, R. **Ecologia Geral.** 4. ed. Petrópolis, RJ: Vozes, 1973. 472 p.

Figueiredo, J. L.; Menezes, N. A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II Teleostei, n. 1.** São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1978. 110 p.

_____. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. VI. Teleostei, n. 5.** São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 2000. 116 p.

_____. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. III. Teleostei, n. 2.** São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1980. 90 p.

Godefroid, R. S.; Ofstaeetter, M.; Pach, H. L. **Structure of the fish assemblage in the surf zone of the beach at Pontal do Sul, Paraná.** Nerítica, v.11, p.77-93, 1997.

Godefroid, R. S.; Santos, C.; Hofstaeetter, M.; Spach, H. L. **Occurrence of Larvae and Juveniles of**

Eucinostomus argenteus*, *Eucinostomus gula*, *Menticirrhus americanus*, *Menticirrhus littoralis*, *Umbrina coroides* and *Micropogonias furnieri Pontal do Sul beach, Paraná. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.44, p.411-418, 2001.

Godefroid, R. S.; Spach, H. L.; Santos, C.; Maclaren, G.; Schwarz JR, R. **Mudanças temporais na abundância e diversidade da fauna de peixes do infralitoral raso de uma praia, sul do Brasil.** Iheringia Série Zoologia, v.94, p.95-104, 2004.

IUNC. **Red List of Threatened animals.** Gland, Switzerland. 2015.

Jesus, R.; Prost, C. **Importância da atividade artesanal de mariscagem para as populações nos municípios de Madre de Deus e Saubara, Bahia.** GEOUSP: Espaço e Tempo, v.30, p.123-137, 2011.

KIRIMURÊ. Instituto Kirimurê. **Baía de Todos os Santos.** 2014. Disponível em: <<http://www.btsinstitutokirimure.ufba.br/?p=59>>.

Menezes, N. A.; Figueiredo, J. L. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV. Teleostei, n. 3.** São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1980. 96 p.

_____. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil V. Teleostei, n. 4.** São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1985. 105 p.

Moraes, L. E. **Composição e variação temporal da ictiofauna do infralitoral da praia e Berlinque (Ilha de Itaparica – Bahia).** Monografia (Trabalho de conclusão de bacharelado em Ecologia), UEFS, 2003. 51 p.

Moura, A. **BTS e suas ilhas.** Grupo A Tarde. 2011. Disponível em < <http://baiadetodosossantos.atarde.uol.com.br/?p=99>>.

Oliveira-Silva, J. T.; Peso-Aguiar, M. C.; Lopes, P. R. D. **Ictiofauna das praias de Cabuçu e Berlinque: Uma contribuição ao conhecimento das comunidades de peixes na Baía de Todos os Santos – Bahia – Brasil.** Revista Biotemas, v.21, p.105-115, 2008.

Robertson, A. I.; Lenanton, R. C. J. **Fish community structure and food chain dynamics in the surf-zone of sandy beaches: the role of detached macrophyte detritus.** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v.84, p.265-283, 1984.

Silveira, L. F.; Beisiegel, B. D. M.; Curcio, F. F.; Valdujo, P. H.; Dixo, M.; Verdade, V. K.; ... Cunningham, P. T. M. **Para que servem os inventários de fauna?** Estudos avançados, v.24, p.173-207, 2010.

Souto, F. J. B. **O bosque de mangues e a pesca artesanal no Distrito de Acupe (Santo Amaro, Bahia): uma abordagem etnoecológica.** Acta Scientiarum Biological Sciences, v.30, p.275-282, 2008.

Souto, F. J. B.; Martins, V. S. **Conhecimentos etnoecológicos na mariscagem de moluscos bivalves no Manguezal do Distrito de Acupe, Santo Amaro-BA.** Biotemas, v.22, p.207-218, 2009.

PESCADORES E SUAS PERCEPÇÕES SOBRE A PESCA EM PEQUENA ESCALA: ESTUDO DE CASO NA VILA DOS PESCADORES, COMUNIDADE COSTEIRA NA AMAZÔNIA (BRAGANÇA-PARÁ)

Maria Eduarda Garcia de Sousa Pereira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado do Pará, Campus Cametá.

Thaila Cristina Neves do Rosário

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado do Pará, Campus Bragança.

Hanna Tereza Garcia de Sousa Moura

Universidade Federal do Pará Campus Bragança.
Mestre em Biologia Ambiental.

Elizete Neres Monteiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado do Pará, Campus Cametá.

Francisco José da Silva Santos

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado do Pará, Campus Bragança.

RESUMO: Este trabalho foi realizado na Vila dos Pescadores, Bragança-PA, comunidade costeira no litoral amazônico Brasileiro. Tendo como objetivo traçar o perfil socioeconômico dos pescadores e seus familiares, bem como, suas percepções ambientais sobre a atividade pesqueira. Para isso, foi realizada entrevistas e observações direta no campo. Os dados obtidos foram analisados no software Iramuteq, o qual permite fazer análises estatísticas sobre corpus textuais e sobre tabelas indivíduos/palavras. Os resultados obtidos na pesquisa indicam que os entrevistados, em sua maioria, são jovens adultos, com baixo nível de escolaridade.

A renda obtida nas atividades extrativas é insuficiente para atender as necessidades básicas familiar, contudo a pesca é a principal atividade de ocupação e renda. A atividade pesqueira é realizada na maioria das vezes por embarcações denominadas de canoas, limitando esses profissionais aos pescadores. Os pescadores e seus familiares conseguem perceber as modificações ao seu entorno, seja do ponto de vista ambiental, social e/ ou econômico. E esse olhar de dentro para fora da comunidade é indispensável para auxiliar no processo de gestão de políticas públicas, uma vez, que reporta a realidade/necessidade dos atores sociais. Do ponto de vista do recurso pesqueiro, podem fazer o papel de “sensibilizadores biológicos”, dada a relação muito próxima ao recurso pesqueiro, sentindo rapidamente a sua ausência ou abundância, diminuição ou aumento. O conhecimento gerado nessa pesquisa demonstra a importância da participação dos atores sociais (unidades familiares dos pescadores) no manejo dos recursos, bem como, a preservação dos saberes/culturas das comunidades tradicionais.

PALAVRAS-CHAVE: Conhecimento ecológico local, zona costeira amazônica, comunidade pesqueira.

FISHERMEN AND THEIR PERCEPTIONS ON SMALL SCALE FISHING:
CASE STUDY IN FISHERMAN'S VILLAGE, AMAZON COASTAL COMMUNITY
(BRAGANÇA-PARÁ)

ABSTRACT: This work was carried out in fisherman's village, Bragança-PA, a coastal community on the Brazilian Amazonian coast. Aiming to trace the socioeconomic profile of fishermen and their families, as well as their environmental perceptions about fishing activity. For this, interviews and direct observations were carried out in the field. The data obtained were analyzed using the Iramuteq software, which allows statistical analysis on textual corpus and on individual/ word tables. The results obtained in the research indicate that the majority of respondents are young and adult, with low level of education. Income from extractive activities is insufficient to meet basic family needs, but fishing is the main occupation and income activity. Fishing is mostly done by vessel called canoes, limiting these professionals to fishing. Fishermen and their families can perceive the changes in their surroundings, from the environmental, social and/ or economic point of view. And this look from the inside out of the community is indispensable to assist in the process of public policy management, since it reports the reality/ need of social actors. From the point of view of fishing resources, they can play the role of "biological sensitizers", given the very close relationship to the fishing resource, quickly sensing their absence or abundance, decrease or increase. The knowledge generated in this research demonstrates the importance of the participation of social actors (fishermen's family units) in resource management, as well as the preservation of knowledge / cultures of traditional communities.

KEYWORDS: Local ecological knowledge, Amazon coastal zone, fishing community.

INTRODUÇÃO

A atividade pesqueira é um dos ramos produtivos mais antigo, onde o homem buscava adaptar-se ao ambiente exterior com o objetivo de satisfazer suas necessidades básicas. Com o passar dos anos novas tecnologias possibilitaram a atuação do pescador extrativista, com direcionamento ao aumento da coleta/ produção visando atender tanto suas necessidades básicas como materiais (NUNES DA SILVA, 2012). Estima-se que 1 em cada 200 brasileiros sejam pescadores artesanais (MPA, 2011).

Somente o litoral amazônico brasileiro responde por 24,6% da produção nacional, com destaque aos estados do Pará e Amazonas. O Pará, contribui com 63% da produção desta região e 15,5% da produção nacional, constituindo-se no maior produtor de pescado do país (SANTOS, 2005). Apesar desses dados estarem desatualizados, serve para elucidar a importância dessa região, tanto a nível local, como nacional e internacional.

O fato da Amazônia deter a maior diversidade biológica e cultural brasileira,

requer responsabilidade ética de compreender a magnitude desta riqueza, o que é indispensável para exploração, uso responsável e conservação deste patrimônio (SABINO; PRADO, 2005). Contudo, o conhecimento sobre os recursos pesqueiros marinhos e estuarinos são insuficiente no litoral amazônico, representando a área menos amostrada e estudada da zona econômica exclusiva do Brasil (MARCENIUK et al., 2013).

Em vista dessa situação, a gestão dos recursos naturais poderia ser baseada em ecossistemas, usando dados limitados, porém, disponíveis, ou que possam ser reunidos de forma a incluir a participação das partes interessadas, principalmente os pescadores, através do conhecimento ecológico local (CEL) (JOHANNES, 1998; APPELDOOM, 2008; RUDDLE e HICKEY, 2008). O CEL dos pescadores tem sido útil no fornecimento de novos dados bioecológicos sobre migração, reprodução e alimentação de peixe, camarão e baleias (JOHANNES et al., 2000; HUNTINGTON et al., 2004; GERHARDINGER et al., 2006, 2009; SILVANO et al., 2006).

O CEL favorece uma abordagem interdisciplinar, correlacionando as populações humanas, recursos naturais e cultura (SOUTO, 2004; ALVES; SOUTO, 2010), possibilitando complementar o conhecimento técnico científico, já que aspectos multidimensionais dos usos do recurso são herdados. Ao passo que, o conhecimento técnico científico é derivado de observações sistemáticas e experimentos, que tem como alvo poucas facetas ambientais (BALRAM et al., 2004).

Apesar das inúmeras vantagens sobre o CEL dos pescadores, o conhecimento socioeconômico desses profissionais, bem como, a estrutura organizativa dessa atividade quase sempre são negligenciados nas pesquisas pesqueiras, ao passo, que são relevantes para implementação de medidas de manejo dos estoques, assim como, para o desenvolvimento econômico destas populações (MINTE-VERA, 1997). Por outro lado, Agostinho et al. (2007) salientam a necessidade de uma abordagem integrada do meio ambiente, peixes e dos pescadores para ordenamento da atividade da pesca em reservatórios.

Com base no exposto, esta pesquisa visa gerar conhecimento sobre os profissionais da pesca e seus familiares, bem como, suas percepções ambientais sobre a atividade pesqueira realizada na comunidade da Vila dos pescadores, Bragança, Pará.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A presente pesquisa foi realizada na comunidade da Vila dos Pescadores (00°51'07.0"S, 046°36'02.5"W), zona costeira bragantina (Pará), o qual compõe o litoral amazônico brasileiro (SOUZA-FILHO, 2005) (Figura 1).

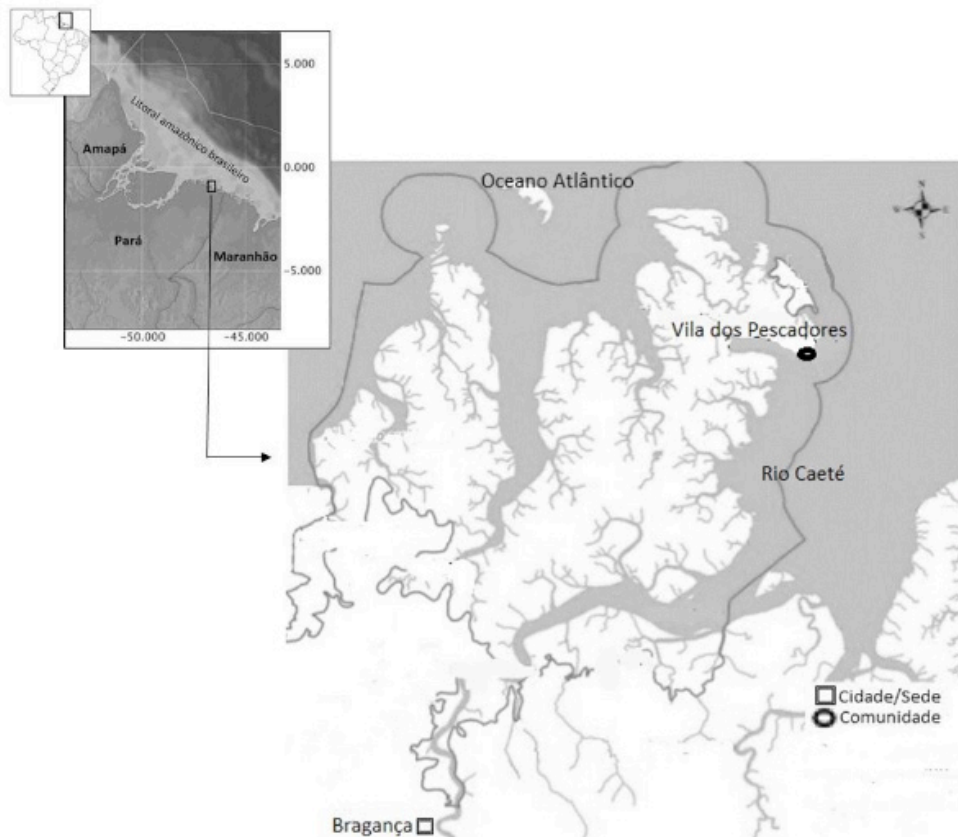


Figura 1. Localização da Vila dos Pescadores, zona costeira bragantina, Litoral amazônico brasileiro. Fonte: Adaptado de Ecoideia (2012).

A referida comunidade pertence a Reserva Extrativista Marinha Caeté-Taperaçu, no município de Bragança, estado do Pará. A reserva foi criada em maio de 2005 e abrange uma área de aproximadamente 42.068 ha (BRASIL, 2005). De acordo com o Sistema Nacional de Unidade de Conservação - SNUC (2000), a Reserva Extrativista é uma área utilizada por populações extrativistas tradicionais, cuja subsistência baseia-se no extrativismo e, complementarmente, na agricultura de subsistência e na criação de animais de pequeno porte, e tem como objetivos básicos proteger os meios de vida e a cultura dessas populações, e assegurar o uso sustentável dos recursos naturais da unidade.

A vilados pescadores tem como característica a migração de pessoas que vivem da pesca artesanal costeira, e seu acesso pode ser por via marítima ou terrestre, esta última através da rodovia PA-458 (MANESCHY, 1995). Essa comunidade está sujeita a macromarés que chegam as maiores alturas, principalmente, nos meses de março/abril e setembro/outubro (marés equinociais de sizígia) (SOUZA-FILHO, 2001; PEREIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007). O clima da área é equatorial, quente e úmido, caracterizado por uma estação muito chuvosa, entre os meses de janeiro e junho, e uma estação seca, nos demais meses do ano. A temperatura

média é de 26°C, podendo variar entre 20,4°C e 32,8°C (MARTORANO et al., 1993).

Coleta e análise dos dados

As informações foram obtidas por meio de entrevistas semiestruturadas (SELLTIZ, 1987), no período entre maio e agosto do ano de 2016, a trinta pescadores e seus familiares, residentes na Vila dos Pescadores. As entrevistas partiram de questionamentos básicos do tema estudado, com o intuito de entender a visão dos envolvidos a respeito do mesmo. Também, seguiu-se a observação participativa, que consiste em uma técnica que possibilita não somente a aproximação com aquilo que se deseja conhecer e estudar, como também permite construir um conhecimento partindo da realidade do campo (LOPES, 2000).

Os entrevistados foram selecionados com base no método “bola de neve”, no qual um entrevistado indica o outro (BAILEY, 1982; SILVANO, 2004). A identificação dos participantes foi mantida em sigilo, assegurando o anonimato e a confidencialidade das informações, não constando seus nomes nas bases de dados. A participação e o consentimento dos envolvidos foram obtidas após o esclarecimento quanto ao objetivo da pesquisa.

Com os dados levantados nesta pesquisa foi construído um panorama a respeito da situação social, econômica desses profissionais, abordando questões como estado civil, número de filhos, grau de escolaridade, faixa etária, renda, além da percepção ambiental voltados a atividade pesqueira.

Os dados socioeconômicos foram analisados a partir da criação de um banco de dados no software Microsoft Excel para elaboração dos gráficos. Adicionalmente, os dados ambientais foram analisados no IRAMUTEQ v0.7 alpha 2 (Análises Multidimensionais de Textos e Questionários), um software livre para a análise de dados textuais desenvolvido na Universidade de Toulouse, na França, baseado na linguagem R (RATINAUD, 2009). Análises de nuvem de palavras e de similitude será utilizada para identificar as palavras mais utilizadas e interpretar o diálogo com relação aos meios de transporte na pesca, apetrechos de pesca, formas de armazenamento e comercialização.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Perfil socioeconômico dos pescadores e seus familiares

No ano de 2013, foram identificados pelo Icmbio/Bragança 107 famílias na Vila dos Pescadores, dos quais 28% participaram da presente pesquisa. Esses comunitários residem na comunidade há mais de 20 anos (n=21, 70%) (Figura 2A) e nasceram em Bragança (n=18, 75% ♀; n=21, 68% ♂) (Figura 2B). O fato de a maioria

ter nascido e/ou residir na comunidade favorece o conhecimento local acerca do ambiente e da atividade pesqueira.

A maioria dos entrevistados ($n=25$, 83%) são casados ou amasiados (Figura 2C) e têm em média de 1 a 3 filhos ($n=12$, 40%) (Figura 2D). A faixa etária familiar é de 11 a 30 anos ($n=77$, 49,7%) (Figura 2E), o que caracteriza a população desta vila em transição de jovem para adulto.

Quanto à escolaridade foi verificado que a metade da população local concluiu apenas a 4ª série do ensino fundamental ($n=77$, 50%) (Figura 2F). Fato esse, já observado por Gomes et al. (2009) no ano de 2006 nessa mesma comunidade, na ocasião foi atribuído essa baixa escolaridade a ausência de escolas com ensino de 5ª a 8ª séries e Ensino Médio na comunidade, assim como, a incompatibilidade do horário do transporte para a cidade de Bragança. Além disso, os períodos de safra são incompatíveis com o calendário escolar (SILVA, 2004) e o conteúdo programático ministrado nas aulas, não condiz com a realidade da região (SILVA et al., 2006), levando ao desinteresse e desistência por parte dos discentes. Na presente pesquisa, passados 10 anos do estudo mencionado anteriormente também nessa comunidade, a realidade permanece a mesma, uma vez que os problemas relatados naquele período ainda são presentes nas vidas dos comunitários.

Com relação a ocupação todos os homens entrevistados são pescadores ($n=30$, 100%), as mulheres, na sua grande maioria, marisqueiras ($n=22$, 88%) e os filhos, estudantes ($n=47$, 47%) (Figura 2G). Com isso, observa-se que a pesca artesanal em pequena escala é a principal atividade econômica familiar, similar as demais comunidades costeiras bragantinas (MAGALHÃES et al., 2007; PEREIRA et al., 2007; SILVA et al., 2006; GOMES et al., 2009). A pesca artesanal é a forma de extrativismo mais acentuada nessa região e ocorre tanto no estuário do Rio Caeté como nas áreas costeiras próximas. Espírito Santo (2002) relatou que entre Junho de 2000 a junho de 2001, foram coletadas 3.522,4 toneladas de peixe na região Bragantina, sendo que a maioria coletada por barcos de pequeno porte com uso de redes (1196,3 ton.), seguida de pequenas embarcações e armadilhas fixas (748,2 ton.). A predominância de embarcações pequenas e não motorizadas entre os pescadores dessa região, indica a limitada capacidade de investimento na atividade pesqueira em Bragança, limitando a pesca nos limítrofes da bacia do Rio Caeté e em cabeceiras de rios próximos.

A renda mensal (Figura 2H) da maioria dos comunitários foi inferior a meio salário mínimo (63%, $n=19$), sendo isto atribuído à sazonalidade/produtividade e ao preço do pescado. De acordo com Gomes et al. (2009), a renda dos moradores está subdividida, de acordo com a faixa etária: (i) moradores com idade entre 15-24 anos, geralmente, tem a bolsa família como principal fonte de renda e realizam atividades pesqueiras apenas para consumo; (ii) moradores com idade entre 25 e 54 anos são, na maioria das vezes, pescadores artesanais, ou pequenos comerciantes; e (iii) moradores na faixa etária superior a 54 anos, em geral, são aposentados.

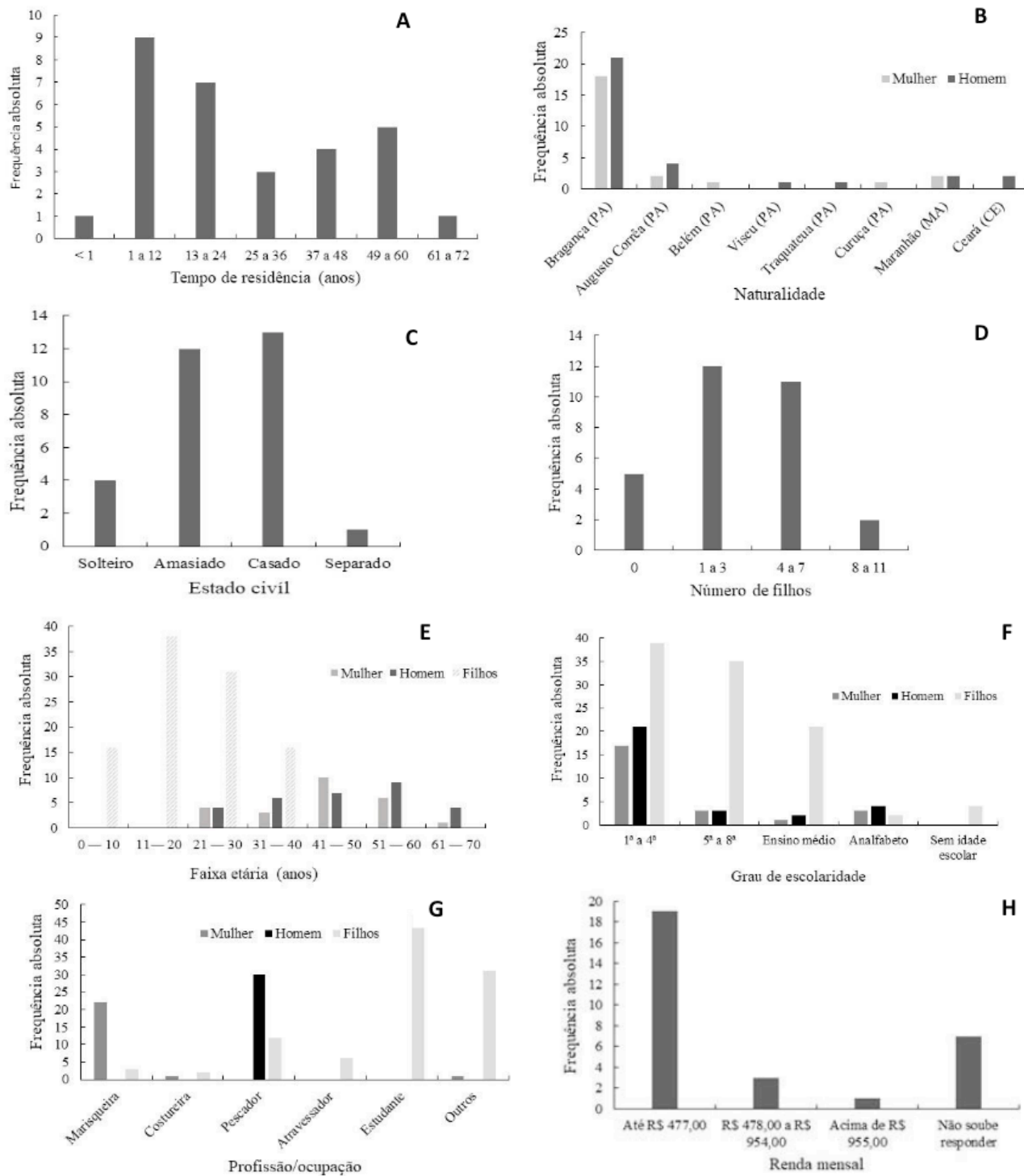


Figura 2. Perfil socioeconômico familiar dos comunitários da Vila dos pescadores com base no Tempo de residência na Vila dos Pescadores (A); Naturalidade dos entrevistados (B); Estado civil (C); Número de filhos (D); Faixa etária (E); Grau de escolaridade (F); Profissão/ocupação (G) e Renda familiar (H).

Características da pesca: do pesqueiro a comercialização do pescado

Os pescadores se deslocam aos pesqueiros, na maioria das vezes, através de canoas (62%) (Figura 3A e 4A). A atuação dessas embarcações ocorre, normalmente, na região estuarina, dada a sua limitação de deslocamento, diferentemente, dos barcos, que apresentam maior autonomia de mar, permitindo atuar tanto no estuário como na zona costeira. Adicionalmente, o local de captura influencia na duração das

viagens dessas pescarias, onde, barcos que atuam na região costeira apresentam em média de 3 a 10 dias, e canoas ou canoas motorizadas permaneceram aproximadamente 1,5 dia (ESPÍRITO-SANTO; ISAAC, 2012).

Nos pescadores, as capturas são realizadas com redes (79%) (Figura 3B e 4B). Segundo Silva et al. (2012) as redes são os apetrechos mais utilizados pelas embarcações para efetuar as capturas na península bragantina, representando de 80% a 65%, respectivamente, do total desembarcado dos sistemas essencialmente artesanais ocorrentes na região.

O Armazenamento do pescado é feito em caixas de isopor (45%) ou caixas de isopor e freezer (44%) (Figura 3C e 4C). Com isso, o pescado é comercializado na maioria das vezes “in natura” e fresco, ou seja, sem técnicas sofisticadas de conservação (SILVA et al., 2012), limitando o escoamento da produção e a qualidade do pescado. Essa forma de acondicionamento é observada em outros locais, como no mercado municipal de Macaé (Rio de Janeiro). Nesse mercado municipal, diferente do observado nessa pesquisa, são utilizadas caixas isotérmica no acondicionamento do pescado, possibilitando a manutenção da sua qualidade (BARROS, 2017).

A produção resultante dessas pescarias é comercializada, principalmente, pelos atravessadores (71%) (Figura 3D e 4D). Isso ocorre nas comunidades pesqueiras de Bragança, devido ao maior poder aquisitivo dos atravessadores em relação aos pescadores, onde os primeiros “financiam” a pescaria. Essa comercialização fragmentada não favorece a margem de lucro dos pescadores, que é submetido ao oligopólio de um cartel de marreteiros ou intermediários, caracterizando uma clara transferência de renda para os atores envolvidos na distribuição e comercialização do pescado (BRAGA et al., 2006).

Com base nessas características da pesca, pode caracterizá-la especificamente como uma pescaria de pequena escala, de fato artesanal, pois não existe nenhuma sofisticação nos apetrechos e insumos utilizados e as técnicas de capturas e localização dos cardumes são baseadas em conhecimentos empíricos e sem o uso de aparelhos ou tecnologia (ESPÍRITO-SANTO; ISAAC, 2012).

Segundo Espírito-Santo e Isaac (2012), a pesca artesanal de pequena escala é realizada a bordo de embarcações com menos de 12 metros de comprimento que atuam no estuário ou na região costeira do litoral amazônico, a menos de 50 m de profundidade. As principais artes de pesca utilizadas são as redes de emalhe, as armadilhas fixas e as linhas. Essa modalidade de pesca detém a maior porção da frota brasileira e responde por aproximadamente 60% do volume das capturas nacionais, além disso, representa uma importante fonte de renda e emprega boa parte da população que mora no litoral. Vale salientar que os desembarques pesqueiros da costa norte brasileira provêm em sua maioria, de capturas efetuadas pela frota artesanal e a dinâmica das capturas que é pouco conhecida (LUTZ et al., 2016).

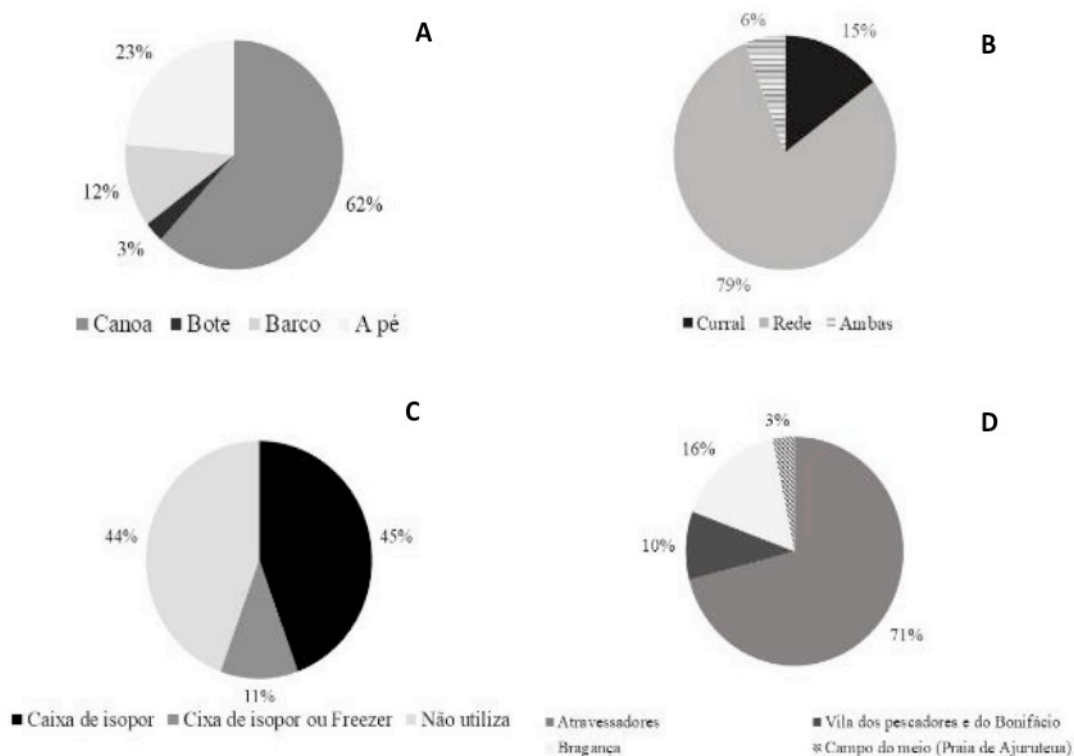


Figura 3. Deslocamento dos pescadores aos pesqueiros (A); Artes de pesca usadas nas capturas de pescado (B); Utensílios utilizados para armazenar o pescado (C); e Alternativas de comercialização do pescado (D).



Figura 4. Principais materiais utilizados na pesca artesanal de pequena escala na Vila dos Pescadores (Canoas (A), redes (B), Caixa de isopor e freezer (C) e alternativa de comercialização. Fonte: Autor.

Percepção ambiental dos pescadores sobre o descarte dos apetrechos de pesca, a madeira utilizada no curral e a produção do pescado

O meio ambiente pode ser percebido pelas pessoas de várias formas e, geralmente, alguns fatores influenciam na relação da percepção de diferentes comunidades, o que pode gerar respostas diferenciadas entre indivíduos de uma mesma comunidade (LOPES; GUEDES, 2013). Cada indivíduo percebe, reage e responde diferentemente frente às ações sobre o meio. As respostas ou manifestações são, portanto, resultado das percepções, dos processos cognitivos, julgamentos e expectativas de cada indivíduo (FAGIONATO, 2002).

O estudo da percepção ambiental serve de base para melhor compreensão das interações entre homem e o ambiente, suas expectativas, satisfações e insatisfações, julgamentos e condutas (ZAMPIERON et al., 2003).

De acordo com os pescadores entrevistados, após a perda da eficiência dos apetrechos de pesca, em sua maioria constituído de redes, são queimados, e uma minoria, reutilizam para cercar plantações (Figura 5A). A madeira utilizada nos currais é oriunda do manguezal (*Rhizophoramanglae, Avicenniasp*) após a liberação do órgão ambiental (Instituto Chico Mendes de Biodiversidade – ICMBio) (Figura 5B). Com relação aos pescados capturados, os pescadores notaram a redução de várias espécies, em ordem decrescente, a pescada gó (*Macrodomancyodon*), bandeirado (*Bagre bagre*) e o mero (*Epinephelusitajara*) (Figura 5C). Segundo esses profissionais, as principais causas que têm contribuindo para a redução desses recursos são: (i) a presença de grandes embarcações (industriais); (ii) o uso de redes de arrasto; e (iii) a grande quantidade de pescadores (Figura 6). Assim, os dados revelaram que a comunidade tem consciência dos problemas que afetam o ambiente no qual vive, como a redução dos estoques pesqueiros, o manuseio dos materiais de pesca, bem como, a preocupação com o ambiente, quando utilizam madeira do mangue de forma legal. Um ponto acrescentado pelos entrevistados, com relação a estrutura básica, foi a dificuldade de acesso a água potável.

Essas informações, apesar de simples e básicas, são de extrema importância ao educador ambiental ou gestor, possibilitando-os a investigar inicialmente como a comunidade se relaciona com o meio ambiente (recurso hídrico) e conseqüentemente, identificar os obstáculos existentes para, a partir de então, implementar práticas sócio-educativas na concepção de investigação-ação educacional (BERLINCK et al., 2003). Também, é uma importante ferramenta para a implantação de políticas públicas relacionadas ao meio ambiente e, conseqüentemente, às comunidades que dependem dos recursos naturais como forma de sustento (OLIVEIRA; CORONA, 2008).

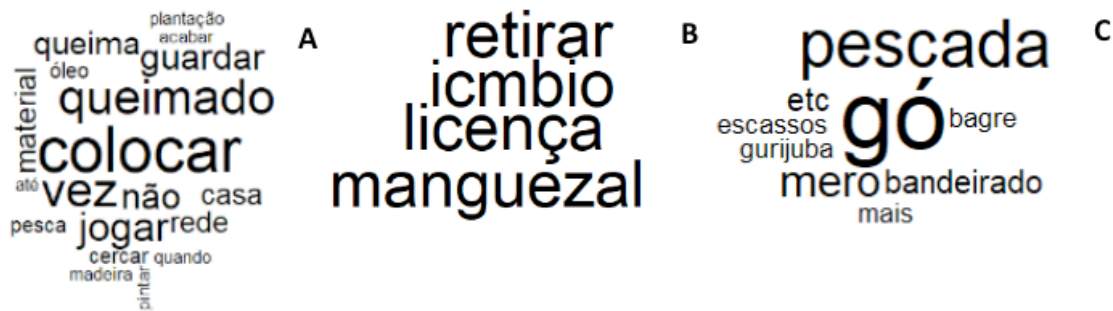


Figura 5. Nuvem de palavras sobre o destino dos apetrechos de pesca (A); Origem da madeira usada no curral de pesca (B); Situação da pesca e dos pescados (C).

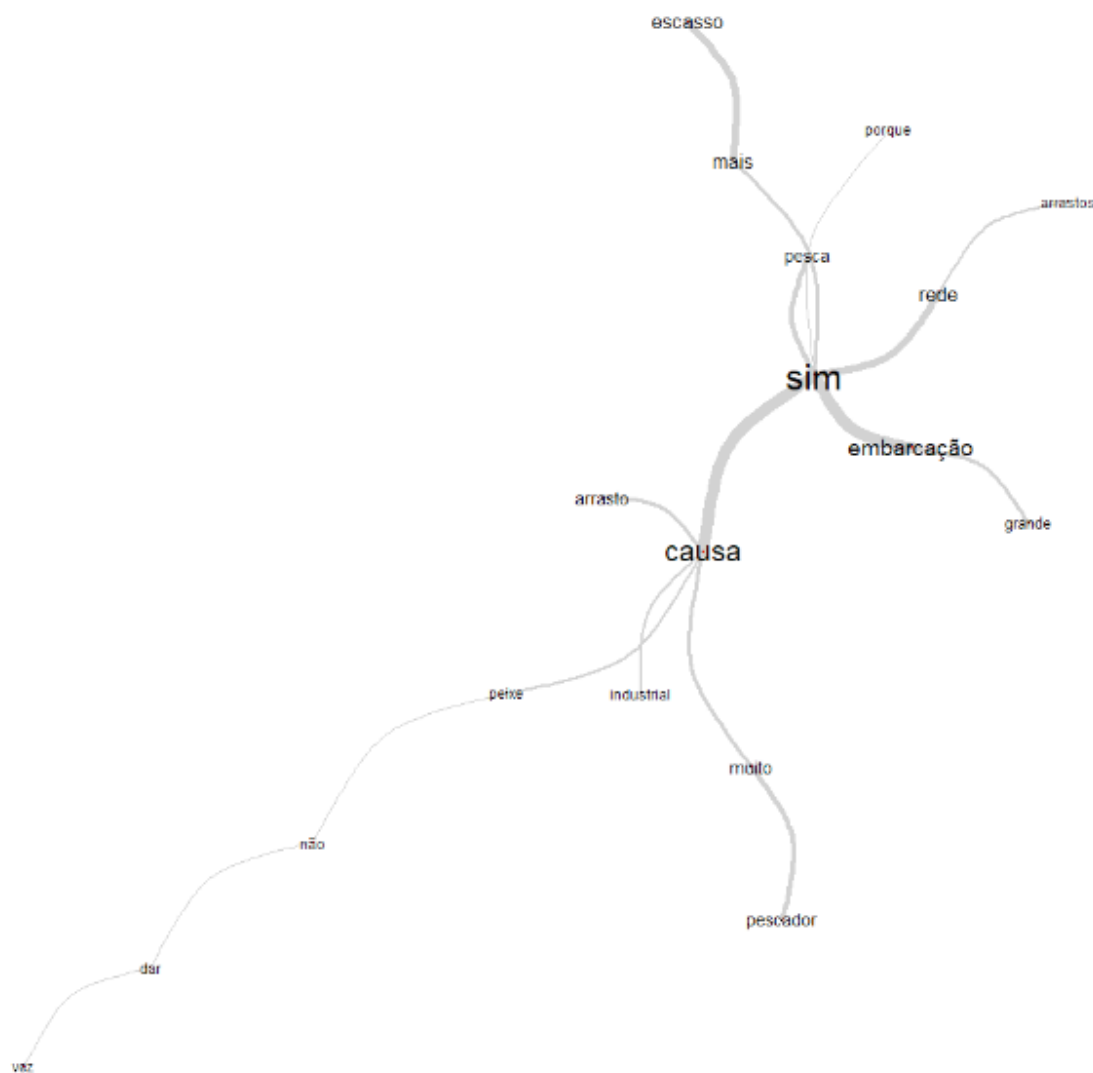


Figura 6. Arranjo das principais causas da redução do pescado segundo os pescadores da Vila dos Pescadores, Bragança-Pará.

CONCLUSÕES

Os pescadores e seus familiares conseguem perceber as modificações ao seu entorno, seja do ponto de vista ambiental, social e/ ou econômico. E esse olhar de dentro para fora da comunidade é indispensável para auxiliar no processo de gestão de políticas públicas, uma vez, que reporta a realidade/necessidade dos atores sociais. Do ponto de vista do recurso pesqueiro, podem fazer o papel de “vigilantes

da pesca”, dada a relação muito próxima ao recurso pesqueiro, sentindo rapidamente a sua ausência ou abundância, diminuição ou aumento.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringá: EDUEM. 501p. 2007.
- ALVES, A. G. C.; SOUTO, F. J. B. Etnoecologia ou etnoecologias? Encarando a diversidade conceitual. In: ALVES, A. G. C.; SOUTO, F. J. B.; PERONI (Orgs.). Etnoecologia em perspectiva: natureza, cultura e conservação. Recife: Nupeea, p.17-39, 2010.
- BAILEY, K. D. *Methods of social research*. The free Press. 2. ed. New York: Macmillan Publishers, 553 p., 1982.
- BALRAM, S.; DRAGIC´EVIC´, S.; MEREDITH, T. A collaborative GIS method for integrating local and technical knowledge in establishing biodiversity conservation priorities. *Biodiversity and Conservation*, v. 13, n.6, p.1195–1208, 2004
- BERLINCK, C. N., CALDAS, A. L. R., MONTEIRO, A.H.R.R., SAITO, C.H. Contribuição da Educação Ambiental na explicitação e resolução de conflitos em torno dos recursos hídricos. *Revista Ambiente e Educação*. v. 8, 2003.
- BERKES, F.; COLDING, J.; FOLKE, C. Rediscovery of traditional ecological knowledge as adaptive management. *Ecological Applications*. Knowledge, v.10, n.5, p.1251-262, 2000.
- BRAGA, C. F.; ESPIRÍTO-SANTO, R. V.; SILVA, B. B.; GIARRIZZO, T.; CASTRO, E. R. Considerações sobre a comercialização de pescado em Bragança – Pará. *Boletim técnico-científico do CEPNOR*. Belém, v.6, n.1, p.105-120, 2006.
- BRASIL. Presidência da República. Decreto de 20 de maio de 2005. 2005.
- ESPIRÍTO-SANTO, R. V.; ISAAC, V. J. - Desembarques da pesca de pequena escala no município de Bragança – PA, Brasil: Esforço e produção. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, v.25, n.1, p.31-48, 2012.
- GOMES, R. K. S.; PEREIRA, L. C. C.; RIBEIRO, C. M. M.; COSTA, R. M. Dinâmica Socioambiental em uma Comunidade Pesqueira Amazônica, PA-Brasil. *Revista da Gestão Costeira Integrada*. v.9, n.2, p.101-111, 2009.
- LOPES, I.A.C. Memória Feminina: cultura e sociedade na comunidade da Penha. João Pessoa. 63p. (Trabalho para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade Federal da Paraíba). 2000.
- LUTZ, Í. A. F.; LIMA, W. M. G.; GONÇALVES-FILHO, I. A.; CINTRA, I. H. A.; SILVA, B. B. Produção pesqueira desembarcada em um estuário do norte do Brasil (Bragança, Pará). *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, v. 4, n.2, p.125-136, 2016.
- MANESCHY, M. C. Ajuruteua, uma comunidade pesqueira ameaçada. Belém, Pará. Universidade Federal do Pará. CFCH. 167p., 1995.
- MARCENIUK, A. P.; CAIRES, R. A.; WOSIACKI, W. B.; DI DARIO, F. Conhecimento e conservação dos peixes marinhos e estuarinos (Chondrichthyes e Teleostei) da costa norte do Brasil. *Biota Neotropical*, v.13, n.4, P. 251–259, 2013.

- MARTORANO, L. G. et al. *Estudos climatológicos do Estado do Pará, classificação climática (Köppen) e deficiência hídrica (Thornthwhite, Mather)*. Belém: Sudam/Embrapa, SNLCS, 1993.
- MINTE-VERA, C. N. A pesca artesanal no reservatório Billings. 86p. Dissertação de mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP. São Paulo, Campinas. 1997.
- MPA. *Boletim Estatístico de Pesca e Aquicultura*. http://www.mpa.gov.br/images/docs/Informacoes_e_Estatisticas. 2011.
- PEREIRA, L. C. C.; FILHO, P. W. M. S.; RIBEIRO, M. J. S.; PINHEIRO, S. C. C.; NUNES, Z. M. P.; COSTA, R. M. Dinâmica socioambiental na Vila dos Pescadores (Amazônia Oriental, Pará, Brasil). *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, n. 13, p. 125-136, 2006.
- PEREIRA, L. C. C.; GUIMARÃES, D. O.; RIBEIRO, M. J. S.; COSTA, R. M.; SOUZA FILHO, P. W. M. Use and Occupation in Bragança Littoral, Brazilian Amazon. *Journal of Coastal Research*, SI, v. 50, 2007.
- RATINAUD, P. IRAMUTEQ: Interfase de R pour les Analyses Multidimensionnelles de Textes et de Questionnaires [Computer software]. Retrieved from <http://www.iramuteq.org>. 2009.
- SABINO, J.; PRADO, P. I. L. Vertebrados. In: LEWINSOHN, T. M. Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira – volumes I e II. Brasília: MMA. Série Biodiversidades, n. 15, 520p., 2005.
- SANTOS, M. A. S. A cadeia produtiva da pesca artesanal no estado do Pará: Estudo de caso nordeste paraense. *Amazônia: Ciência e Desenvolvimento*, Belém, v.1, n.1, 20p. 2005.
- SELLTIZ, C. Métodos de pesquisa nas relações sociais. Tradução de Maria Martha Hubner de Oliveira. São Paulo: EPU. 688p. 1987
- SILVANO, R. A. M. Pesca artesanal e etnoictiologia. p.187-222, In: BEGOSSI, A. *Ecologia de pescadores da Mata Atlântica e da Amazônia*. São Paulo: HUCITEC, NEPAM/UNICAMP, NUPAUB/USP, FAPESP, 2004.
- SILVANO, R. A. M.; BEGOSSI, A. Local Knowledge on a cosmopolitan fish ethnoecology of Pomatomus saltatrix (Pomatomidae) in Brazil and Australia. *Fisheries Research*, v. 71, p.43-59, 2005.
- SILVA, I. R.; PEREIRA L. C. C.; COSTA, R. M. Uso e ocupação em uma comunidade pesqueira na margem do estuário do rio Caeté (PA, Brasil). *Meio Ambiente e Desenvolvimento*, SI, v. 11. In press, 2006.
- SILVA, E. S. C.; CUNHA, D. S.; ARAÚJO, C. S. P.; SALES, A. D.; HOLANDA, F. C. A. F. Cadeia de comercialização do pescado desembarcado no posto fiscal de Bragança, Estado do Pará. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza. v.45, n. 1, p.82-87, 2012.
- SOUZA FILHO, P. W. M. Costa de Manguezais de Macromaré da Amazônia: Cenários Morfológicos, Mapeamento e Quantificação a partir de Dados de Sensores Remotos. *Revista Brasileira de Geofísica*, v.23, p.427-435, 2005.
- SOUZA-FILHO, P. W. M. Impactos Naturais e Antrópicos na Planície Costeira de Bragança, pp. 133 – 144, In Prost, M. T.; Mendes, A. C. (Org.). *Ecossistemas Costeiros: Impacto e Gestão Ambiental*. Museu Paraense Emílio Goeldi, Xp., Belém. 220p., 2001.
- ZAMPIERON, S. L. M.; FAGIONATO, S.; RUFFINO, P. H. P. Ambiente, representação social e percepção. In: SCHIEL, D.; VALEIRAS, S. M. N.; SANTOS, S. A. M. (Org./Ed.). *O estudo de bacias hidrográficas: uma estratégia para educação ambiental*. 2. ed. São Carlos: Rima. p.24-27. 2003.

INFLUÊNCIA DE CULTIVAR E DO PERÍODO DE COLHEITA NA PRODUTIVIDADE E NO PADRÃO DE FRUTOS DE MAMOEIROS, INTRODUZIDOS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, EM CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DO AMAZONAS

Lucio Pereira Santos

Pesquisador; Embrapa Amazônia Ocidental;
Manaus, Amazonas.

Enilson de Barros Silva

Professor; Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucurí; Diamantina, Minas Gerais.

Scheilla Marina Bragança

Pesquisadora; Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural; Linhares, Espírito Santo.

RESUMO: Com os objetivos de introduzir, avaliar e identificar cultivares adaptadas às condições de clima e solo do Estado do Amazonas, portadoras de elevado potencial produtivo e de características agronômicas favoráveis à qualidade, para futuras recomendações aos produtores, instalou-se um experimento com quinze cultivares de mamoeiros, espaçamento de 3,5 m x 2,0 m, em blocos casualizados, quatro repetições, unidade experimental de 10 plantas em linha. População de 600 plantas, após sexagem. O preparo da área e os tratos culturais seguiram as recomendações de Martins & Costa (2003), e o plantio no campo foi realizado no dia 29/04/2009. No dia 25/07/2009, instalou-se o sistema de irrigação com fitas gotejadoras. Foram avaliadas nos períodos jan/fev/mar e abr/mai/jun, as características Produtividade

Trimestral de Frutos Comerciais, Número Trimestral de Frutos Comerciais, Produção Trimestral de Frutos Não-comerciais e, Número Trimestral de Frutos Não-comerciais. Os dados médios foram submetidos à análise de variância usando-se o software PROG GLM, e as médias das características foram comparadas entre as cultivares por meio do Teste Scott-Knott. Realizaram-se também, de maneira ampla, as análises de correlação entre as produtividades (pesos) e os números de frutos, para cada uma das duas categorias (comercial e não-comercial). A cultivar “Caliman 01” se destacou entre as quinze cultivares testadas, tanto no primeiro como no segundo trimestre, apresentando as maiores produtividades trimestrais de frutos comerciais, respectivamente, 17,3 t./ha e 19,5 t./ha, nos períodos jan/fev/mar e abr/mai/jun.

PALAVRAS-CHAVE: variabilidade genética, qualidade, adaptabilidade, *Carica papaya*.

INFLUENCE OF CULTIVAR AND HARVEST PERIOD ON YIELD AND FRUITS PATTERN OF PAPAYA INTRODUCED FROM THE STATE OF ESPÍRITO SANTO IN EDAPHHOCLIMATIC CONDITIONS OF AMAZONAS

ABSTRACT: With the objectives of introducing,

evaluating and identifying cultivars adapted to the conditions of climate and soil of the state of Amazonas, with high productive potential and agronomic characteristics favorable to quality, for future recommendations to the producers, an experiment was installed with fifteen cultivars of papaya trees, spacing of 3.5 m x 2.0 m, in randomized blocks, four replications, experimental unit of 10 plants in line. Population of 600 plants, after sexing. The preparation of the area and the cultural tracts followed the recommendations of Martins & Costa (2003), and the planting in the field was carried out on day 29/04/2009. On day 25/07/2009, the irrigation system was installed with drip tapes. They were evaluated in the periods jan/feb/mar and apr/mai/jun, the characteristics quarterly productivity of commercial fruits, quarterly number of commercial fruits, quarterly production of non-commercial fruits and, quarterly number of non-commercial fruits. The mean data were subjected to analysis of variance using the software PROG GLM, and the means of the characteristics were compared among the cultivars through the Scott-Knott test. The analyses of correlation between yields (weights) and fruit numbers were also broadly performed for each of the two categories (commercial and non-commercial). The cultivar Caliman 01 stood out among the fifteen cultivars tested, both in the first and in the second quarter, presenting the highest quarterly yields of commercial fruits, respectively, 17.3 t./ha and 19.5 t./ha, in the periods jan/feb/mar and abr/mai/jun.

KEY WORDS: genetic variability, quality, adaptability, *Carica papaya*.

1 | INTRODUÇÃO

A cultura do mamoeiro representa grande importância econômica e social para o Brasil e outros países, inclusive de outros continentes, gerando emprego e renda o ano inteiro. Seu consumo em nível mundial vem crescendo, o que tem se constituído em importante oportunidade e fonte de divisas para o Brasil.

No Brasil, o mamoeiro é cultivado praticamente em todos os Estados. Porém, são nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte que são empregados maiores índices tecnológicos em sua produção.

Segundo IBGE (2017), a área de mamão plantada ou destinada à colheita no Brasil em 2017 foi de 26.714 ha, com uma área colhida de 26.526 ha, com uma produção de 1.057.101 toneladas, com rendimento médio de 39.852 kg/ha. Relata ainda o IBGE que o valor da produção neste ano foi de R\$ 927.159 (Mil Reais).

Procedendo a uma revisão de literatura sobre a cultura do mamoeiro no Amazonas, constatam-se produtividades extremamente baixas. Pacheco et al. (2006) afirmam que o Amazonas produziu, por 797 produtores, com um módulo médio de 0,81 ha/Produtor, 15.504 toneladas de frutos, numa área de 646,5 hectares, com um rendimento médio de 24 t./ha/ano.

O IBGE (2009) reporta que a quantidade produzida no Amazonas foi de 10.140 toneladas de frutos, numa área colhida de 709 hectares, de uma área total estabelecida de 717 hectares, com uma produtividade de apenas 14,3 t./ha/ano.

Afirma ainda o IBGE que naquele ano o valor da produção foi de R\$ 1566 (mil reais).

IBGE (2013) relata uma produção física do Estado de 21.682 t., de uma área colhida de 908 hectares, de um total de 1.017 hectares implantados, com média de produtividade de 23,9 t./ha/ano, com valor da produção de R\$ 38644 (mil reais).

A baixa produtividade das lavouras de mamão do Amazonas tem gerado volume físico de frutos insuficiente para atender à demanda local, o que vem pressionando os preços para cima, determinando, em grande parte do ano, sua comercialização nas principais redes de supermercados a preço superior às demais regiões produtoras do país. Somam-se a esse problema a baixa qualidade e a ausência de padrão/uniformidade dos frutos, a sazonalidade da oferta, dentre outras limitações tecnológicas que têm sido responsáveis pelo desabastecimento e pela falta de qualidade do mamão comercializado no mercado amazonense.

Visando contribuir com alternativas para reverter essa situação, realizou-se este trabalho com o objetivo geral de introduzir, avaliar e identificar cultivares adaptadas às condições de clima e solo do Estado do Amazonas, portadoras de elevado potencial produtivo e de características agrônômicas favoráveis à qualidade, para futuras recomendações aos produtores. Nesta etapa, o objetivo específico foi avaliar as influências de cultivares e de dois períodos de colheita, agrupados em trimestres (jan/fev/mar e abr/mai/jun) na produtividade dos genótipos de mamoeiros introduzidos, aferindo as características “peso” e “número” de frutos, discriminando entre frutos comerciais e não-comerciais.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no município de Iranduba/AM, em Latossolo Amarelo argilo-arenoso. As características químicas do solo são apresentadas no **Quadro 1**.

Prof. (cm)	pH ^{1/}	MO ^{2/}	P ^{3/}	K ^{3/}	Ca ²⁺ ^{4/}	Mg ²⁺ ^{4/}	Al ³⁺	H+Al ^{5/}	SB ^{6/}	t ^{7/}	T ^{8/}	V ^{9/}	m ^{10/}	Fe ^{3/}	Zn ^{3/}	Mn ^{3/}	Cu ^{3/}
	H ₂ O	g/kg	mg/dm ³		cmol _d /dm ³						%		mg/dm ³				
0-20	4,91	12,75	40	19	0,76	0,16	0,88	5,66	0,98	1,86	6,64	14,73	47,38	166	0,92	2,27	1,07
20-40	4,61	2,21	12	8	0,35	0,07	1,0	4,39	0,45	1,45	4,84	9,37	68,8	240	0,47	1,69	0,61

Quadro 1. Dados médios observados das características químicas do solo coletado antes da instalação do experimento, no dia 04 de dezembro de 2008

^{1/} H₂O 1:2,5; ^{2/} Matéria orgânica = C (carbono orgânico) x 1,724 - Walkley-Black; ^{3/} Extrator Mehlich 1; ^{4/} Extrator KCl 1 mol L⁻¹; ^{5/} Extrator acetato de cálcio 0,5 mol/L – pH 7,0; ^{6/} Soma de bases trocáveis; ^{7/} Capacidade de

A altitude da área experimental é de 50 m; latitude de 3° 15' S; longitude de 60° 20' W. O clima, segundo a classificação de Köppen, é tropical chuvoso tipo Af (Antonio, 2005).

Os tratamentos foram constituídos de quinze cultivares de mamão: Caliman M-5, Solo BS, THBGG, Sunrise Solo (Caliman), Regina, Plus Seed, Diva, Grand Golden, Sunrise Solo P. K., Isla, Taiwan, Caliman 01, Brilhoso, Golden e, BSA. A cultivar Regina foi selecionada, de forma empírica, por um produtor de Iranduba/AM. As cultivares nomeadas como *Plus Seed* e *Isla*, foram adquiridas no comércio local. As outras doze cultivares foram introduzidas do Estado do Espírito Santo.

O espaçamento adotado foi de 3,5 m x 2,0 m. Delineamento experimental de blocos casualizados. A unidade experimental constituída de 10 plantas em linha. A população, de 600 plantas, após sexagem.

O preparo da área e os tratos culturais seguiram as recomendações de Martins & Costa (2003), e o plantio no campo foi realizado no dia 29/04/2009. No dia 25/07/2009, instalou-se o sistema de irrigação com fitas gotejadoras.

Foram avaliadas, nos períodos jan/fev/mar e abr/mai/jun, as características “Produtividade Trimestral de Frutos Comerciais”, “Número Trimestral de Frutos Comerciais”; “Produção Trimestral de Frutos Não-comerciais” e, “Número Trimestral de Frutos Não-comerciais”. Portanto, apenas seis meses de colheitas foram avaliados, por motivos diversos que interferiram na sequência das avaliações de campo, com destaque para as doenças, que se tornaram bastante severas no segundo semestre do ano.

Os dados médios foram submetidos à análise de variância usando-se o software PROG GLM, e as médias das características foram comparadas entre as cultivares por meio do Teste Scott-Knott (1974). Realizaram-se também, de maneira ampla, as análises das correlações entre as produtividades (pesos) e os números de frutos, para cada uma das duas categorias (comercial e não-comercial).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito altamente significativo de “cultivar”, de “período de colheita” e da interação “cultivar x período de colheita”, para as quatro características estudadas: “produtividade trimestral de frutos comerciais” (PTFC), “produção trimestral de frutos não-comerciais” (PTFNC), “número trimestral de frutos comerciais” (NTFC) e, “número trimestral de frutos não-comerciais” (NTFNC) ($p < 0,01$).

O resumo da análise de variância desses dados é apresentado no **Quadro 2**.

FV	GL	Quadrado médio			
		PTFC	NTFC	PTFNC	NTFNC
Bloco	3	43,64**	208.768.406**	0,98	49.255.035**
Cultivar (C)	14	90,83**	426.106.538**	2,48**	224.999.911**
Período de colheita (PC)	1	1.718,17**	8.563.618.160**	4,75**	1.890.248.480**
C x PC	14	42,89**	330.199.665**	1,91**	47.508.806**
Erro	87	10,76	66.155.179	0,57	16.130.518
CV (%)		35	30	30	25
Média Geral		9,30	27.124	2,53	16.079

Quadro 2. Quadrados médios das variáveis “produtividade trimestral de frutos comerciais” (PTFC), “produção trimestral de frutos não-comerciais” (PTFNC), “número trimestral de frutos comerciais” (NTFC) e, “número trimestral de frutos não-comerciais” (NTFNC), nos períodos de colheita de **Jan/Fev/Mar e Abr/Mai/jun do ano de 2010**, de quinze cultivares de mamoeiros.

** Significativo a 1% pelo teste de F.

Para produtividade trimestral de frutos comerciais (PTFC) (**Quadro 3**), houve diferenças significativas entre as cultivares, nos dois períodos estudados. Caliman 01 se destacou entre todas, exibindo as maiores produtividades, tanto no período jan/fev/mar como também no período abr/mai/jun, respectivamente, 17,3 t./ha e 19,5 t./ha. No período jan/fev/mar houve grande variação da PTFC entre as cultivares, o que as classificaram em três grupos distintos, com a Caliman 01 se posicionando, de forma isolada, no primeiro grupo. Por sua vez, no período abr/mai/jun, a cultivar Caliman 01, apesar de em valores absolutos também ter ficado em primeiro lugar, não diferiu significativamente das cultivares Caliman M-5, Gran Golden, Isla, Regina, Solo B S, Sunrise Solo, Sunrise Solo P. K., Taiwan e, THBGG.

Nota-se também no **Quadro 3** que, as cultivares que constituíram os grupos “b” e “c” no período jan/fev/mar não são as mesmas que constituíram os grupos equivalentes no período abr/mai/jun.

Comparando os dois períodos entre si, notamos que apenas a cultivar Caliman 01 apresentou PTFC equivalentes em jan/fev/mar e abr/mai/jun, não diferindo entre si em nível de 5%, pelo teste Scott & Knott. As demais cultivares apresentaram maior PTFC no período abr/mai/jun, exceto a cultivar Brilhoso, que foi maior no período jan/fev/mar.

Cultivares de Mamoeiro	PTFC		PTFNC		NTFC		NTFNC	
	J/F/M	A/M/J	J/F/M	A/M/J	J/F/M	A/M/J	J/F/M	A/M/J
	(t/ha)				(N° Frutos/ha)			
Brilhoso	9,29 ^{bA}	2,84 ^{cB}	2,09 ^{bA}	0,59 ^{bB}	23.412 ^{bA}	8.568 ^{cB}	14.430 ^{cA}	3.927 ^{bB}
BSA	0,89 ^{cB}	9,78 ^{bA}	1,00 ^{cB}	2,04 ^{bA}	3.570 ^{cB}	28.221 ^{bA}	9.014 ^{dA}	9.889 ^{bA}
Caliman 01	17,25 ^{aA}	19,51 ^{aA}	3,27 ^{aA}	1,42 ^{bB}	34.168 ^{aA}	31.059 ^{bA}	10.846 ^{dA}	4.463 ^{bB}
Caliman M-5	9,00 ^{bB}	16,76 ^{aA}	3,23 ^{aA}	2,51 ^{aA}	33.708 ^{aB}	49.826 ^{aA}	22.252 ^{bA}	12.731 ^{aB}
Diva	3,90 ^{cB}	10,89 ^{bA}	3,47 ^{aA}	2,93 ^{aA}	18.978 ^{bB}	34.126 ^{bB}	28.671 ^{aA}	15.255 ^{aB}
Golden	1,32 ^{cB}	10,13 ^{bA}	2,37 ^{bA}	1,94 ^{bA}	5.055 ^{cB}	33.319 ^{aA}	23.512 ^{bA}	12.577 ^{aB}
Gran Golden	3,10 ^{cB}	13,44 ^{aA}	3,47 ^{aA}	2,86 ^{aA}	14.055 ^{cB}	42.062 ^{aA}	28.835 ^{aA}	15.754 ^{aB}
Isla	6,66 ^{cB}	12,66 ^{aA}	3,05 ^{aA}	1,74 ^{bB}	24.651 ^{bA}	31.595 ^{bA}	19.457 ^{bA}	8.390 ^{bB}
Plus Seed	2,23 ^{cB}	9,81 ^{bA}	3,10 ^{aA}	2,83 ^{aA}	9.867 ^{cB}	34.069 ^{bA}	31.402 ^{aA}	19.278 ^{aB}
Regina	2,61 ^{cB}	15,62 ^{aA}	1,32 ^{cB}	3,19 ^{aA}	9.125 ^{cB}	32.591 ^{bA}	10.428 ^{dA}	13.773 ^{aA}
Solo BS	6,10 ^{cB}	14,24 ^{aA}	2,97 ^{aA}	2,04 ^{bA}	22.498 ^{bB}	34.475 ^{bA}	17.939 ^{cA}	8.736 ^{bB}
Sunrise Solo	4,61 ^{cB}	13,69 ^{aA}	3,13 ^{aA}	3,10 ^{aA}	18.403 ^{bB}	36.607 ^{bA}	21.988 ^{bA}	16.772 ^{aA}
Sunrise Solo P. K.	6,93 ^{cB}	17,28 ^{aA}	2,49 ^{bA}	2,90 ^{aA}	25.622 ^{bB}	43.950 ^{aA}	15.951 ^{cA}	11.603 ^{aA}
Taiwan	3,89 ^{cB}	16,02 ^{aA}	2,47 ^{bA}	2,49 ^{aA}	14.066 ^{cB}	49.702 ^{aA}	20.720 ^{bA}	12.242 ^{aB}
THBGG	5,00 ^{cB}	13,65 ^{aA}	3,47 ^{aA}	2,33 ^{aB}	22.959 ^{bB}	43.400 ^{aA}	25.276 ^{bA}	16.265 ^{aB}

Quadro 3. Dados médios estimados das características “produtividade trimestral de frutos comerciais” (PTFC), “produção trimestral de frutos não-comerciais” (PTFNC), “número trimestral de frutos comerciais” (NTFC) e, “número trimestral de frutos não-comerciais” (NTFNC), nos períodos **Jan/Fev/Mar** e **Abr/Mai/Jun do ano de 2010**, de quinze cultivares de mamoeiro.

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na coluna (comparação de cultivares) e maiúsculas na linha (comparação entre os dois períodos da mesma característica), não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5%.

A cultivar Regina, que à época da implantação deste experimento era a mais cultivada pelos produtores do polo de Iranduba, ficou classificada no último grupo (c) no primeiro trimestre, porém, se recuperou e passou para o primeiro grupo (a) no segundo trimestre. Portanto, na comparação da PTFC da cultivar Regina, ela foi mais produtiva no período abr/mai/jun do que no período jan/fev/mar.

Para a característica número trimestral de frutos comerciais (NTFC) (**Quadro 3**), novamente notamos a superioridade da cultivar Caliman 01 que, no primeiro trimestre, produziu 34.168 frutos, não tendo diferido significativamente apenas da cultivar Caliman M5, que produziu 33.708 frutos. Quanto as demais cultivares, sete ficaram no grupo “b”, ao passo que as seis cultivares restantes se enquadraram no grupo “c”. Para o período do segundo trimestre, a maioria das cultivares (8), se posicionaram no grupo “b”, dentre elas a Caliman 01. Seis cultivares se posicionaram no grupo “a” e apenas uma no grupo “c”.

Na comparação dos dois períodos de colheita, destacaram-se, com maior NTFC e sem diferença significativa entre jan/fev/mar e abr/mai/jun, as cultivares Caliman 01 e Isla. Com números de frutos inferiores, porém, sem diferirem significativamente

entre os períodos, posicionou-se a cultivar Diva. Todas as demais cultivares apresentaram diferenças significativas de NTFC entre os dois períodos estudados.

Com relação à característica produção trimestral de frutos não-comerciais (PTFNC) (**Quadro 3**), que é uma característica indesejável, a cultivar mais produtiva em termos de peso e número de frutos comerciais, a Caliman 01, foi também, no primeiro trimestre avaliado, uma das maiores produtoras, em peso, de frutos não-comerciais. Isso ocorreu, provavelmente, devido a seu grande potencial produtivo. No período jan/fev/mar houve a estratificação das cultivares em três grupos, com destaques para as cultivares Regina e BSA, com as menores PTFNC, respectivamente, 1,32 t./ha e 1,00 t./ha.

Entretanto, no segundo semestre (abr/mai/jun), a PTFNC da Caliman 01 evidenciou uma queda (**Quadro 3**), colocando-a no grupo “b”, o que coincidiu com a elevação da sua produtividade de frutos comerciais no mesmo período (**Quadro 3**).

Na comparação da PTFNC entre os dois períodos, notam-se que as cultivares Caliman M-5, Diva, Golden, Gran Golden, Plus Seed, Solo B S, Sunrise Solo, Sunrise Solo P K e, Taiwan, não mostraram diferenças significativas desta característica entre jan/fev/mar e abr/mai/jun.

Para a PTFNC houve um fato curioso, envolvendo a melhor cultivar do experimento (Caliman 01) e a cultivar até então mais utilizada pelos produtores em seus plantios no polo de Iranduba (Regina) (**Quadro 3**). A Caliman 01 apresentou, no primeiro trimestre, uma das maiores PTFNC, o que a enquadrou no grupo “a”, sendo que, no segundo trimestre, houve queda desta produção, colocando-a no grupo “b”. Por sua vez, a cultivar Regina, que no primeiro trimestre havia se enquadrado no grupo “c”, no segundo trimestre pulou para o grupo “a”. Essa constatação evidencia que o fator genético, o clima do período, bem como a interação entre ambos, afetam diferentemente as cultivares, fazendo com que haja comportamento diferencial entre elas, com respostas diferenciadas para cada característica avaliada.

Quanto ao NTFNC (**Quadro 3**), no primeiro trimestre a Caliman 01 estava enquadrada no último grupo (d), com um dos números mais baixos de frutos não-comerciais tendo, no segundo trimestre, se posicionado no grupo “b”. Por sua vez, a cultivar Regina, que também estava no grupo “d”, no período abr/mai/jun passou para o grupo “a”. Presume-se que esse comportamento esteja relacionado ao clima, muito provavelmente às temperaturas mais elevadas do ar neste período, que podem afetar o florescimento e a formação dos frutos. Aqui cabe um comentário particular. Trata-se do fato de a cultivar Caliman 01 ser um híbrido, resultante do cruzamento de um parental do grupo varietal Solo com outro do grupo Formosa. E, como sabemos, os mamoeiros pertencentes ao grupo varietal Formosa possuem resistência às temperaturas do ar mais elevadas, sendo que, muito provavelmente, essa característica tenha sido herdada pela cultivar Caliman 01, o que tem feito dela uma das principais opções de cultivo para a Região Norte, devido ao seu vigor híbrido.

Comparando o NTFNC entre os dois períodos, notamos que as cultivares BSA,

Regina, Sunrise Solo e, Sunrise Solo P K se enquadraram no grupo “A” em jan/fev/mar e também em abr/mai/jun, portanto, sem diferenças significativas entre os períodos, ao passo que todas as demais cultivares evidenciaram maior número de frutos não-comerciais em jan/fev/mar.

Em uma análise ampla do **Quadro 3**, nota-se que, em geral, a PTFNC e o NTFNC foram maiores no primeiro trimestre, em comparação com o segundo trimestre, justamente o inverso que ocorreu com a PTFC e o NTFC. Estes resultados sugerem haver uma correlação entre estas variáveis e que, pelo menos em parte, esse fenômeno explicaria as diferenças de produtividade constatadas entre as cultivares, nos dois períodos estudados.

No **Quadro 4**, notamos que a correlação entre Produtividade Trimestral de Frutos Comerciais (PTFC) e Número Trimestral de Frutos Comerciais (NTFC) foi maior no primeiro trimestre (0,9062), comparada com a do segundo trimestre (0,7894), ao passo que, com a correlação Produção Trimestral de Frutos Não-Comerciais (PTFNC) e Número Trimestral de Frutos Não-Comerciais (NTFNC), ocorreu o inverso, com o segundo trimestre mostrando uma maior aderência entre as características peso e número de frutos. (0,8821 contra 0,6582).

Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
PTFNC (1° T)	NTFNC (1° T)	40	0,6582	5,3897	0,0000
PTFNC (2° T)	NTFNC (2° T)	40	0,8821	11,5410	0,0000
PTFC (1° T)	NTFC (1° T)	40	0,9062	13,2119	0,0000
PTFC (2° T)	NTFC (2° T)	40	0,7894	7,9270	0,0000

Quadro 4. Correlações de Pearson para produção e número de frutos (comerciais e não-comerciais), no primeiro trimestre (jan/fev/mar) e no segundo trimestre (abr/mai/jun)

Legenda: PTFNC (1° T) – Produção Trimestral de Frutos Não-Comerciais (kg/ha), no primeiro trimestre;

PTFNC (2° T) – Produção Trimestral de Frutos Não-Comerciais (kg/ha), no segundo trimestre;

NTFNC (1° T) – Número Trimestral de Frutos Não-Comerciais (unidade/ha) no primeiro trimestre;

NTFNC (2° T) – Número Trimestral de Frutos Não-Comerciais (unidade/ha) no segundo trimestre;

PTFC (1° T) - Produtividade Trimestral de Frutos Comerciais (kg/ha) no primeiro trimestre;

PTFC (2° T) - Produtividade Trimestral de Frutos Comerciais (kg/ha) no segundo trimestre;

NTFC (1° T) - Número Trimestral de Frutos Comerciais (unidade/ha) no primeiro trimestre;

NTFC (2° T) - Número Trimestral de Frutos Comerciais (unidade/ha) no segundo trimestre.

4 | CONCLUSÕES

A cultivar, o período de colheita e a interação entre ambos afetam a produtividade e o padrão de frutos do mamoeiro.

A cultivar Caliman 01 se destacou entre as quinze cultivares testadas, tanto no primeiro como no segundo trimestre, apresentando as maiores produtividades de frutos comerciais.

Os maiores números de frutos comerciais foram exibidos, no primeiro trimestre, pelas cultivares Caliman 01 e Caliman M-5 e, no segundo trimestre, pelas cultivares Caliman M-5, Golden, Gran Golden, Sunrise Solo P. K., Taiwan e THBGG.

Caliman 01, Caliman M-5, Diva, Gran Golden, Isla, Plus Seed, Solo B S, Sunrise Solo e, THBGG, em jan/fev/mar, exibiram as mais elevadas produções (peso) de frutos não-comerciais e, em abr/mai/jun, esta variável foi maior nas cultivares Caliman M-5, Diva, Gran Golden, Plus Seed, Regina, Sunrise Solo, Sunrise Solo P. K., Taiwan e, THBGG.

As cultivares Caliman 01, BSA e Regina (jan/fev/mar), evidenciaram os mais baixos números de frutos não-comerciais e, no período abr/mai/jun, os mais baixos foram Brilhoso, BSA, Caliman 01, Isla e, Solo B. S.

A cultivar Regina (muito utilizada pelos produtores) apresentou uma baixa produtividade (peso) de frutos comerciais no primeiro trimestre, tendo se recuperado no segundo trimestre.

A cultivar Regina (jan/fev/mar) evidenciou baixo número de frutos comerciais e, em abr/mai/jun, revelou aumento deste número.

A cultivar Regina (jan/fev/mar) mostrou baixa produção (peso) de frutos não-comerciais e, em abr/mai/jun, se posicionou entre as líderes desta variável.

A cultivar Regina (jan/fev/mar) mostrou baixo número de frutos não-comerciais e, em abr/mai/jun, se posicionou no grupo das cultivares com os maiores números desta característica.

Semente adquirida do comércio local, da marca *Plus Seed*, apresentou um dos piores resultados, com baixa produtividade (peso e número de frutos comerciais), além de ter se comportado como uma das recordistas de peso e número de frutos não-comerciais.

REFERÊNCIAS

ANTONIO, I. C. **Boletim agrometeorológico 1998**: Estação Agroclimatológica da Embrapa Amazônia Ocidental, no Km 29 da Rodovia AM 010. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005. 28 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 42).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção Agrícola Municipal, Rio de Janeiro, RJ, v. 36, p. 72, 2009. ISSN 1676-9260 (CD-ROM). ISSN 0101-3963 (meio impresso).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção Agrícola Municipal, Rio de Janeiro, RJ, v. 40, p. 79, 2013. ISSN 1676-9260 (CD-ROM). ISSN 0101-3963 (meio impresso).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção Agrícola Municipal, Rio de Janeiro, RJ, 2017. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA (meio eletrônico) <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>

MARTINS, D. dos S., COSTA, A. de F. S. da. (Eds.) **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória, ES: Incaper, 2003. 497 p.

PACHECO, A. da S.; SILVA, R. da V.; SANTOS, U. S. G. dos. **RELATÓRIO DE ATIVIDADES DO IDAM – ANO 2006**. IDAM/AM, Manaus, 2006, 77 p.

SCOTT, A. J., KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507-12, 1974.

CRÉDITOS DE TODAS AS FOTOS: LUCIO PEREIRA SANTOS



Figura 1. Preparo do substrato para enchimento das bandejas de germinação.



Figura 2. Bandejas de poliestireno expandido cheias com o substrato da marca Amafibra e identificadas, de acordo com cada tratamento/cultivar.



A



B

Figura 3. Semeio das cultivares nas bandejas (A) e início da emergência das plântulas (B).



Figura 4. Emergência das plântulas no viveiro de produção de mudas.



Figura 5. Preparo do solo para o transplântio das mudas para o campo.



Figura 6. Mistura dos fertilizantes e fechamento dos sulcos para o plantio.



Figura 7. Instalação do sistema de irrigação com fitas gotejadoras.



Figura 8. Mudas transplantadas para o campo e sistema de irrigação acionado.



Figura 9. Plantio realizado em cima de camalhões (canteiros), mantendo-se a vegetação natural roçada nas entrelinhas.



Figura 10. Lavoura em franco desenvolvimento, mostrando stand perfeito e estado nutricional adequado.



Figura 11. Plantas adultas exibindo vigor e detalhe da manutenção da vegetação natural roçada, nas entrelinhas.



Figura 12. Vista aproximada de uma parcela.

MÉTODOS QUÍMICOS NA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA DE *Brachiaria brizantha* (HOCHST EX A. RICH.) STAPP

Tiago de Oliveira Sousa

Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Produção Vegetal
Diamantina - Minas Gerais.

Mahany Graça Martins

Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Produção Vegetal
Diamantina - Minas Gerais.

Marcela Carlota Nery

Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Agronomia
Diamantina - Minas Gerais.

Marcela Azevedo Magalhães

Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Zootecnia
Diamantina - Minas Gerais.

Thaís Silva Sales

Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Produção Vegetal
Diamantina - Minas Gerais.

Letícia Lopes de Oliveira

Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Produção Vegetal
Diamantina - Minas Gerais.

Letícia Aparecida Luiz de Azevedo

Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Agronomia
Diamantina - Minas Gerais.

Bruno de Oliveira Fernandes

Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Agronomia
Diamantina - Minas Gerais.

RESUMO: Entre as forrageiras produzidas e mais comercializadas no Brasil, destaca-se o gênero *Brachiaria*, principalmente às cultivares da espécie *Brachiaria brizantha*. Entretanto, o desempenho das sementes dessa espécie na formação das pastagens é dificultado devido à presença de dormência. Nesse contexto, objetivou-se com a presente pesquisa, determinar qual método químico é mais eficiente para superar a dormência de sementes de *B. brizantha* cv. Marandu e cv. Piatã. Foi utilizado quatro lotes de sementes de *B. brizantha*, cv. Marandu e cv. Piatã. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x2 (quatro lotes de sementes x dois métodos de quebra de dormência), para cada cultivar. Foram utilizados os métodos químicos com KNO_3 e H_2SO_4 . Para o nitrato de potássio, as sementes foram semeadas em substrato umedecido com solução de KNO_3 na concentração de 0,2%. Já para o ácido sulfúrico, as sementes foram imersas em H_2SO_4 (98%, 36N) por 15 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente durante 5 minutos e secas à sombra. Avaliou-se a primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação e a taxa de germinação. A partir dos resultados obtidos é possível observar que houve diferenças significativas entre os tratamentos testados.

PALAVRAS-CHAVE: Germinação; Sementes;

CHEMICAL METHODS IN OVERCOMING DORMANCY OF *Brachiaria brizantha* (HOCHST EX A. RICH.) STAPF

ABSTRACT: Among the forages produced and most commercialized in Brazil, the genus *Brachiaria* stands out, especially the cultivars of *Brachiaria brizantha* species. However, the performance of seeds of this species in pasture formation is difficult due to the presence of dormancy. In this context, the objective of this research was to determine which chemical method is more efficient to overcome the dormancy of *B. brizantha* cv. Marandu and cv. Piatã. Four seed lots of *B. brizantha*, cv. Marandu and cv. Piatã. Four seed lots of *B. brizantha*, cv. Marandu and cv. Piatã. The experimental design was completely randomized in a 4x2 factorial scheme (four seed lots x two dormancy breaking methods) for each cultivar. Chemical methods were used with KNO_3 and H_2SO_4 . For potassium nitrate, the seeds were sown in a substrate moistened with KNO_3 solution at a concentration of 0.2%. For sulfuric acid, the seeds were immersed in H_2SO_4 (98%, 36N) for 15 minutes and then washed in running water for 5 minutes and dried in the shade. The first germination count, germination speed index and germination rate were evaluated. From the results obtained it is possible to observe that there were significant differences between the tested treatments.

KEYWORDS: Germination; Seeds; Forages.

1 | INTRODUÇÃO

O cultivo de espécies forrageiras no Brasil aconteceu de forma extensiva, em grandes áreas e com pouco ou nenhum investimento tecnológico. Mesmo assim, nos últimos anos as melhorias nas áreas de pastagem são grandes. As forrageiras tem sido a maior fonte de alimento do rebanho bovino no Brasil, ocupando mais de 158 milhões de hectares (CENSOAGRO 2017). Esses dados, aliado ao Sistema Plantio Direto que visa a rotação e implantação de culturas de cobertura antes ou após a cultura econômica, ressalvam a importância da semente como insumo básico para a formação dos pastos.

Os avanços da pecuária e a demanda por sementes de forrageiras, colocou o Brasil como maior produtor, maior exportador e maior consumidor de sementes de forrageiras tropicais (ABRASEM, 2016). A *Brachiaria brizantha* é a espécie mais cultivada no país e com maior volume de sementes destinadas a exportação e se destaca entre as diferentes espécies forrageiras cultivadas no país (SILVA et al., 2014).

No entanto, as sementes de *B. brizantha* possuem dificuldade para germinar devido à ocorrência de dormência inata ou natural, interferindo diretamente no estabelecimento uniforme da pastagem (COSTA et al., 2011), contribuindo para o

aparecimento de plantas infestantes nas pastagens, principalmente no estágio inicial de formação. A dormência da *B. brizantha* pode estar relacionado a vários fatores, dentre eles as causas físicas, provavelmente relacionadas a restrições impostas pela cobertura da semente, glumelas, pericarpo e tegumento (BINOTTI et al., 2014) e causas fisiológicas presentes em sementes recém colhidas, progressivamente suprimidas durante o armazenamento.

De acordo com as instruções das Regras de Análise de Sementes, a superação da dormência das sementes dessa espécie, pode ser realizada através da escarificação química, com utilização de ácido sulfúrico (H_2SO_4) ou pelo umedecimento com solução aquosa contendo nitrato de potássio (KNO_3). Nesse contexto, objetivou-se com a presente pesquisa, determinar qual método químico é mais eficiente para superar a dormência de sementes de *B. brizantha* cv. Marandu e cv. Piatã.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Sementes do Departamento de Agronomia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, Diamantina, MG.

Foram utilizados quatro lotes de sementes de *B. brizantha* das cultivares Marandu e Piatã, provenientes de diferentes regiões de produção, sendo expostos na tabela 1.

<i>B. brizantha</i> cultivar Marandu		
Lotes	Local de produção	Safra
L1	Minas Gerais	2016/2017
L2	São Paulo	2016/2017
L3	Mato Grosso	2016/2017
L4	São Paulo	2016/2017
<i>B. brizantha</i> cultivar Piatã		
L1	Minas Gerais	2016/2017
L2	São Paulo	2016/2017
L3	Mato Grosso	2016/2017
L4	São Paulo	2017/2018

Tabela 1: Lotes de sementes de *B. brizantha* provenientes de diferentes regiões de produção.

As sementes foram submetidas ao processamento para a retirada de impurezas, por meio da utilização de soprador de coluna de ar (mod South Dakota) para a separação da fração de sementes puras dos lotes. Após, foram homogeneizadas para obtenção da amostra média de trabalho, conforme Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009).

Para avaliação da quebra de dormência das sementes, foi testado as seguintes metodologias:

- I. **Ácido sulfúrico:** As sementes ficaram imersas em ácido sulfúrico (98%, 36N) concentrado por 15 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente durante 5 minutos e secas à sombra;
- II. **Nitrato de potássio:** As sementes foram semeadas em substrato umedecido com KNO_3 (0,2%);
- III. **Testemunha:** Foram utilizadas sementes, sem qualquer acondicionamento. O substrato de germinação foi umedecido com água destilada.

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 50 sementes por lote, semeadas em três folhas de papel mata-borrão umedecidas com água destilada, na quantidade de 2,5 vezes o peso do substrato, em gerbox, e acondicionados em germinador do tipo B.O.D (Brasil, 2009) à temperatura de 30°C (Vieira et al., 1998a). As avaliações foram realizadas ao 7º dia (**primeira contagem da germinação**) e encerradas ao 21º dia (contagem final), computando-se as plântulas normais. O **índice de velocidade de germinação** (IVG) foi obtido, computando-se diariamente as sementes germinadas e calculadas de acordo com Maguire (1962).

Para o experimento, foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os testes de quebra de dormência foram arranjados em esquema fatorial 4 x 4 (quatro lotes de sementes para cada cultivar x quatro métodos de quebra de dormência). Os resultados das análises do perfil dos lotes e quebra de dormência, foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico “R” (R CORE TEAM, 2013).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados foi possível observar que houve diferenças significativas entre os tratamentos na primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação e germinação da cultivar Marandu (Tabela 2).

A escarificação das sementes proporcionada com a utilização do ácido sulfúrico (H_2SO_4) na cultivar marandu ocasionou uma aceleração do processo de germinação, arretando em uma maior porcentagem de germinação na primeira contagem, no índice de velocidade de germinação e na germinação final (Tabela 2). Com exceção do lote 1, todos os demais lotes que foram submetidas ao tratamento com imersão em H_2SO_4 , obtiveram uma porcentagem acima do padrão mínimo para comercialização (60%) exigido para a espécie (Brasil, 2008; 2010).

Conforme Cardoso et al. (2014), nas espécies do gênero *Brachiaria* a expressão da dormência está associada a causas físicas, provavelmente relacionadas a restrições impostas pela cobertura da semente (lema, pálea, pericarpo e tegumento)

que pode atrapalhar a absorção de água e a entrada de oxigênio, além de impedir a protrusão da radícula. De acordo com Marcos Filho (2005), Lima *et al.* (2015), com a utilização de tratamentos químicos (ácido sulfúrico) é possível remover esta estrutura, melhorando a germinação no aspecto de quantidade.

Tratamentos	Cultivar Marandu				Média
	L1	L2	L3	L4	
Primeira contagem de germinação (%)					
H ₂ SO ₄	53 aC	71 aAB	63 aBC	79 aA	66 a
KNO ₃	6 cB	30 cA	38 bA	15 cB	22 c
Testemunha	9 bC	49 bA	48 bA	34 bB	35 b
CV (%)	14,95				
Índice de velocidade de germinação					
H ₂ SO ₄	8,75 aB	11,25 aAB	12,50 aA	11,00 aAB	10,87 a
KNO ₃	1,00 bC	3,75 bB	6,25 cA	1,75 bBC	3,31 c
Testemunha	1,00 bB	6,25 bA	8,75 bA	3,50 bB	4,87 b
CV (%)	19,30				
Germinação (%)					
H ₂ SO ₄	53 aC	71 aAB	63 abBC	79 aA	66 a
KNO ₃	6 cC	34 cA	39 cA	20 cB	25 c
Testemunha	10 bC	57 bA	49 bAB	38 bB	38 b
CV (%)	14,34				

Tabela 2. Valores médios da primeira contagem de germinação (PC), índice de velocidade de germinação (IVG) e germinação (G) em lotes (L1, L2, L3 e L4) de B, brizantha cultivar Marandu submetidas a diferentes tratamentos para quebra da dormência.

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com a utilização do nitrato de potássio (KNO₃), não foi possível superar a dormência das sementes da cultivars marandu, sendo inferior até mesmo em relação a testemunha. De acordo com Vieira *et al.* (1998b) e Bonome *et al.* (2006), este sal de baixo peso molecular, pode penetrar nos tecidos das sementes de braquiária causando fitotoxidez, ocasionando efeito prejudicial sobre a germinação. Fleck *et al.* (2001) também relataram que o aumento da concentração de fontes nitrogenadas (nitrato de potássio, nitrato de amônio e sulfato de amônio) ocasiona efeito inibitório da germinação e redução de sua velocidade para outras espécies como *Bidens pilosa* e *Sida rhombifolia*.

Para a cultivar piatã, a escarificação com H₂SO₄ foi o tratamento que obteve os melhores resultados na quebra de dormência, proporcionando uma rápida germinação e uma maior porcentagem de germinação, tanto na primeira contagem quanto na porcentagem final. Esses resultados denotam que as causas da dormência das sementes das cultivares Marandu e Piatã estavam apenas externamente, sendo as restrições impostas pela cobertura da semente o principal fator que levam o impedimento da germinação, tornando o método com escarificação com ácido sulfúrico os mais eficientes na superação da dormência. Tais resultados corroboram com a hipótese de que a principal tipo de dormência em *B. brizantha* é atribuída aos

envoltórios (gluma, pálea e lema), que constituem barreira para a germinação devido à restrição ao movimento da água, restrição às trocas gasosas e restrição mecânica (Cardoso *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014).

Tratamentos	Lotes				Média
	L1	L2	L3	L4	
Primeira contagem de germinação (%)					
H ₂ SO ₄	52,00 aA	46,00 aA	59,00 aA	62,00 aA	54,00 a
KNO ₃	41,00 abA	5,00 bB	37,00 bA	22,00 bAB	26,00 c
Testemunha	30,00 bA	10,00 bA	30,00 bA	31,00 bA	25,00 c
CV (%)					19,22
Índice de velocidade de germinação					
H ₂ SO ₄	7,26 aA	7,89 aA	10,82 aA	7,84 aA	8,45 a
KNO ₃	6,09 aA	0,67 bB	5,92 bcA	2,77 cAB	3,86 c
Testemunha	3,73 bA	1,59 bA	4,76 cA	4,28 bdA	3,59 c
CV (%)					15,25
Germinação (%)					
H ₂ SO ₄	55,00 aA	49,00 aA	59,00 aA	68,00 aA	57,00 a
KNO ₃	41,00 abA	5,00 bB	39,00 bA	23,00 cA	27,00 c
Testemunha	32,00 bAB	11,00 bB	31,00 bAB	40,00 bA	28,00 c
CV (%)					18,86

Tabela 3: Valores médios da primeira contagem de germinação (PC), índice de velocidade de germinação (IVG) e germinação (G) em lotes (L1, L2, L3 e L4) de *B. brizantha* cultivar Piatã submetidas a diferentes tratamentos para quebra da dormência.

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna e maiúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A utilização do nitrato de potássio não foi eficiente para quebrar a dormência das sementes da cultivar piatã. Esse resultado corrobora com os encontrados por Wisintainer *et al.* (2010) em sementes de *B. ruziziensis* e Libório *et al.* (2017), em sementes de *B. humidicola*, onde relataram que a utilização do KNO₃ não superou a dormência das sementes, sendo a imersão das sementes em H₂SO₄ o mais recomendado.

4 | CONCLUSÕES

O nitrato de potássio não foi eficiente na quebra de dormência das sementes de *B. brizantha*.

O tratamento com ácido sulfúrico é eficiente para superar a dormência das sementes de *B. brizantha*.

REFERÊNCIAS

ABRASEM. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças. Brasília. **ANUÁRIO 2016**. 2016. Disponível em: <http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2013/09/Anuario_ABRASEM_2016_SITE.pdf>. Acesso em: 24/07/19.

BINOTTI, F. F. S.; JUNIOR, C. I. S.; CARDOSO, E. D.; HAGA, K. I.; NOGUEIRA, D. C. Tratamentos pré-germinativos em sementes de Brachiaria. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.9, n.4, p.614-618, 2014.

BONOME, L. T. S.; GUIMARÃES, R. M.; OLIVEIRA, J. A.; ANDRADE, V. C.; CABRA, P. S. Efeito do condicionamento osmótico em sementes de Brachiaria brizantha cv. Marandu. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 422-428, 2006.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30 de 21 de maio de 2008: **Normas e padrões para produção e comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008. Disponível em: http://www.adagri.ce.gov.br/Docs/legislação_vegetal/IN_30_de_21.05.2008.pdf. Acesso em: 20 abr. 2019.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 30 de 26 de outubro de 2010: Alteração da Instrução Normativa nº 30 de 21 de maio de 2008**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2010. Disponível em: <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>. Acesso em: 20 abr. 2019.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, 2009. 395 p.

CARDOSO, E. D.; SÁ, M. E.; HAGA, K. I.; BINOTTI, F. F. S.; NOGUEIRA, D. C.; FILHO, W. V. V. Desempenho fisiológico e superação de dormência em sementes de Brachiaria brizantha submetidas a tratamento químico e envelhecimento artificial. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.1, p.21-38, 2014.

CENSOAGRO. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Divulgação preliminar 26/07/2018**. 2018. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/8510fa66acebe7034165215eb169b6ab.pdf> Acesso em: 20/07/19.

COSTA, C. J.; ARAÚJO, R. B.; BÔAS, H. D. DA C. V. Tratamentos para a superação de dormência em sementes de Brachiaria humidicola (Rendle) Schweick. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.41, n.4, p.519-524, 2011.

FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D.; VIDAL, R. A.; MEROTTO JÚNIOR, A. Efeitos de fontes nitrogenadas e de luz na germinação de sementes de Bidens pilosa e Sida rhombifolia. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.3, p.592-600, 2001.

LIBÓRIO, C. B.; VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D.; VALLE, C. B.; LIMA, N. D.; MONTEIRO, L. C. Potassium nitrate on overcoming dormancy in Brachiaria humidicola 'BRS Tupi' seeds. **Ciência Rural**, v.47: 06, e20160500, 2017.

LIMA, K. N.; TEODORO, P. E.; PINHEIRO, G. S.; PEREIRA, A. C. E TORRES, F. E. Superação de dormência em capim-Braquiária. **Nucleus**, v. 12, n. 2, p. 167-174, 2015.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p.176-77, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2.^a ed. Londrina: ABRATES, 660 p, 2005.

R CORE TEAM. R Foundation for Statistical Computing. **A language and environment for statistical computing**. Version. 3.0.1. Vienna, Austria: R Core Team, 2013.

SILVA, A. L. M. S.; TORRES, F. E.; GARCIA, L. L. P.; MATTOS, E. M.; TEODORO, P. E. Tratamentos para quebra de dormência em Brachiaria brizantha. **Revista de Ciências Agrárias**, v.37, n.1, p.37-41,

2014.

VIEIRA, H. D.; SILVA, R. F.; BARROS, R. S. Efeito de substâncias reguladoras de crescimento sobre a germinação de sementes de braquiarião cv. Marandu. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.2, p.143-148, 1998a.

VIEIRA, H. D.; SILVA, R. F.; BARROS, R. S. Superação da dormência de sementes de *Brachiaria brizantha* (hochst.ex a.rich) stapf cv. Marandu submetidas ao nitrato de potássio, hipoclorito de sódio, tiouréia e etanol. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.2, p.44-47, 1998b.

WISINTAINER, C.; REZENDE, L. M.; OLIVEIRA, S. A. Superação da Dormência em Sementes de *Brachiaria ruziziensis*. In: **Seminário de Iniciação Científica e V Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação**, VIII. Ipameri: Resumos. Ipameri: UEG, 2010.

MICROBIOMA BACTERIANO: EXTRAÇÃO E PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS

Juliano Oliveira Santana

Universidade Estadual de Santa Cruz,
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus,
Bahia

Karina Peres Gramacho

Centro de Pesquisa do Cacau, Ceplac/Cepec,
Itabuna, Bahia.

Katiúcia Tícila de Souza de Nascimento

Universidade Estadual de Santa Cruz,
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus,
Bahia.

Rachel Passos Rezende

Universidade Estadual de Santa Cruz,
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus,
Bahia.

Carlos Priminho Pirovani

Universidade Estadual de Santa Cruz,
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus,
Bahia.

RESUMO: O filoplano é constituído por uma superfície plana e paisagem uniforme delimitada pela cutícula. Neste ambiente ainda são observadas veias, sulcos, glândulas secretoras e estômatos. Vários microrganismos podem colonizar este espaço, sendo as bactérias os habitantes mais abundantes. Técnicas padrões em laboratório de microbiologia permitem identificar 1% ou menos da diversidade bacteriana na maioria das amostras ambientais. A criação de bibliotecas metagenômicas veem

oferecer oportunidade para a bioprospecção de genes de interesse de microrganismos não-cultiváveis. A metagenômica é um novo campo de investigação que utiliza ferramentas da biologia molecular e da bioinformática para investigar a diversidade microbiana e acessar o vasto potencial biotecnológico oculto no mundo microscópico. Várias metodologias de extração e preparo de bibliotecas metagenômicas já foram descritas como o microbioma de solo, águas oceânicas, órgãos humanos, cavernas, etc. Neste capítulo descrevemos uma extração de biblioteca metagenômica diretamente do filoplano de *Theobroma cacao*, como também todo procedimento laboratorial de preparo da biblioteca acompanhada de ilustrações dos cálculos para facilitar a replicação dos procedimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Bactéria, microbioma, folhas.

BACTERIAL MICROBIOMA: EXTRACTION AND PREPARATION OF METAGENOMIC LIBRARIES

ABSTRACT: Phylloplane consists of a flat surface and uniform landscape delimited by the cuticle. In this environment veins, furrows, secretory glands and stomata are still observed. Several microorganisms can colonize this

space, with bacteria being the most abundant inhabitants. Standard microbiology laboratory techniques allow the identification of 1% or less of bacterial diversity in most environmental samples. The creation of metagenomic libraries offers an opportunity for bioprospecting genes of interest to non-cultivable microorganisms. Metagenomics is a new field of research that utilizes molecular biology and bioinformatics tools to investigate microbial diversity and access the vast biotechnological potential hidden in the microscopic world. Several methodologies for extraction and preparation of metagenomic libraries have already been described, such as soil microbiome, oceanic waters, human organs, caves. This chapter we describe a metagenomic library extraction directly from *Theobroma cacao* phylloplane, as well as all laboratory preparation procedures accompanied by calculus illustrations to facilitate the replication of the procedures.

KEYWORDS: Bacteria, microbiome, leaves.

1 | INTRODUÇÃO

A superfície das folhas, denominada de filoplano, representa a maior superfície biológica do planeta, ocupando uma área foliar de vegetação estimada em 509 bilhões de Km² [1,2]. Por serem abundantes no filoplano, os microrganismos possuem papéis cruciais na proteção e crescimento das plantas, entretanto, não são bem caracterizados, exceto para alguns patógenos causadores de epidemias e doenças de interesse econômico na agricultura e silvicultura [3,4,5].

No filoplano, as comunidades microbianas são diversas e variam entre espécies de plantas [6,7,8,9], incluindo muitos gêneros diferentes de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, algas, protozoários, oomicetos e nematoides [10,11,12,13]. As bactérias são as colônias mais numerosas no filoplano, sendo encontrado uma média de 10⁶ a 10⁷ células/cm² [14,15]. Algumas técnicas microscópicas demonstraram que as bactérias não são distribuídas uniformemente em toda superfície da folha [2,16], mas que estão localizadas em aglomerados particulares, como na base dos tricomas glandulares [2,17,18], estômatos [19,20], junções celulares [1,2,21] e estrias das veias [2,16,18].

As comunidades bacterianas apresentam padrões distintos de colonização no filoplano em diferentes estações do ano e idade da folha. A diversidade é menor durante os meses quentes e secos e maior durante as estações chuvosas e frias [22]. Em folhas jovens, as comunidades são compostas de um maior número de microrganismos em qualquer estação do ano em relação às folhas maduras e senescente [22,23].

Os microrganismos são transferidos para o filoplano principalmente pela ação das chuvas, ventos, insetos, e pelo intercâmbio ambiental [10,24,25], enfrentando um ambiente variável ocasionado por temperaturas, umidade e radiação ultravioleta [1,2,26,27]. No entanto, alguns estudos mostram que os microrganismos comensais

não são apenas um conjunto aleatório aderido ao filoplano, mas podem ser regulados pelas plantas [28,29].

As populações microbianas epifíticas habitam e se reproduzem no filoplano à custa dos exsudatos (fenilpropanoides, flavonoides, taninos, quinonas) do hospedeiro e podem ser capazes de influenciar o processo de infecção das espécies patogênicas [15,18,30,31], sendo que a disponibilidade de nutrientes na superfície foliar varia, ocasionando alterações nas populações [2,32]. Além disso, as comunidades epifíticas neutralizam fatores de estresse físico-químico, tais como luz ultravioleta, sal, temperatura, entre outros [33,34].

Entre as barreiras físicas na superfície foliar, encontra-se a cutícula e tricomas. A cutícula é descrita como uma cobertura impermeável (hidrofóbica) de cera produzida pelas células epidérmicas foliares. Ela atua na aderência para colonização microbiana e impedimento à penetração de patógenos [35,36,37,38]. Os tricomas são células especializadas da epiderme encontradas em diversas partes das plantas nas angiospermas, inclusive no filoplano, exercendo papéis na absorção de água, temperatura da folha e defesa contra insetos [39,40].

O *Theobroma cacao* L. é uma planta nativa da Amazônia, pertencente à família das Malváceas [41]. Possui dois grandes grupos de origem de acordo com suas características morfológicas, genética e localização geográfica [42,43]. O cacau possui grande importância industrial e alimentícia, uma vez que de suas amêndoas fermentadas e torradas, são obtidas o líquido, manteiga e torta, que são consideradas matérias-primas, para obtenção do chocolate [44].

Com a finalidade de se analisar as comunidades microbianas do filoplano do cacau utilizando técnicas moleculares de última geração (metagenômica) [45], o lavado aquoso foliar de dois genótipos do *T. cacao* contrastantes para resistência à vassoura-de-bruxa, foram utilizados como amostras biológicas para desenvolver uma metodologia de extração eficiente e preparo da biblioteca.

2 | O FILOPLANO

As superfícies planares das folhas são denominadas de filoplano [46] e são delimitadas pela cutícula [1]. O microbioma presente neste habitat é vasto, com uma área foliar global estimada em 508 milhões km², que corresponde a 1 trilhão km² de superfície foliar, se incluir as faces abaxial e adaxial, uma área de aproximadamente o dobro da superfície terrestre [1,2]. Pela sua extensão, a área foliar representa sozinha a maior superfície biológica do planeta e cada Km² estima-se abrigar 10¹⁸ bactérias, superando em número as células das próprias plantas, hospedando ainda uma comunidade diversificada ainda não estimada de invertebrados, fungos e outros microrganismos [3]. Esta superfície ainda apresenta um ambiente oligotrófico que passa por frequentes mudanças devido à exposição ao ciclo diurno e a condições extremas, incluindo radiação ultravioleta (UV), mudanças frequentes na

disponibilidade de nutrientes e água, além de mudanças na temperatura [1,2].

No filopiano são encontradas estruturas como os tricomas glandulares, cutícula e estômatos (Figura 01), que fornecem um primeiro ponto de contato entre os microrganismos e defesa para as muitas plantas [47,48]. Essas estruturas pré-formadas atuam como barreiras físicas à penetração e ou, colonização por fitopatógenos [49].

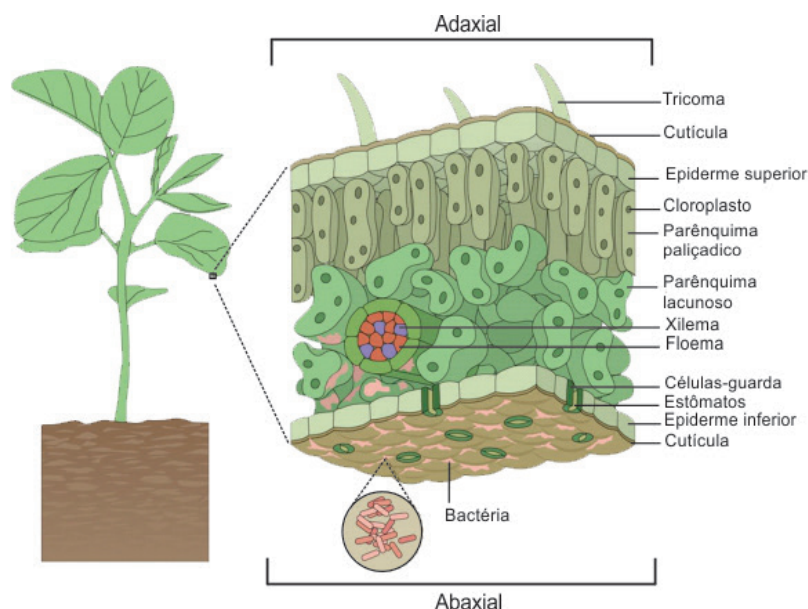


Figura 01: Representação esquemática do filopiano. Fonte: adaptada de Vorholt, 2012.

Os tricomas podem interferir nas funções da planta em virtude de suas propriedades físicas (tamanho e densidade), na absorção de água, defesa contra insetos e nutrição de larvas [50], secreção de metabólitos secundários [51,52] e proteínas antipatogênicas [53,54,55]. Atuam ainda na homeostase de íons e no sequestro e compartimentação dos metais pesados [56,57]. Alguns estudos sugerem que os tricomas desenvolvem mecanismos de defesa dependentes de enxofre [58,59] e glutatona [60] contra as respostas ao estresse oxidativo e para controle redox.

A cutícula, que cobre a epiderme, é composta por cutina e cera [15] que separa a folha do ar circundante do meio ambiente e contribui para proteger e impedir a desidratação do filopiano [35,61]. A cutina é rica em polissacarídeo que forma a camada cuticular, por outro lado, a cera constrói uma camada subjacente menos abundante em polissacarídeos [37]. Essas estruturas formam uma barreira lipofílica com baixa permeabilidade que limita a difusão de nutrientes na superfície da folha controlando o crescimento de microrganismos [62]. Poucos estudos abordaram a presença de estruturas de superfície e proteínas específicas que permitem a adesão de microrganismos à cutícula hidrofóbica. As proteínas da família de hemaglutininas em *Dickeya dadantii* [63] e *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* [64] demonstraram ser importantes para a ligação e agregação nessas espécies.

Os estômatos, outra estrutura do filopiano, desempenham papéis fundamentais

no controle de água e trocas gasosas entre a planta e o ambiente [65]. O vapor de água que difunde através de estômatos se condensa e cria filmes de água microscópicos na superfície da folha [66]. A depender da quantidade de estômatos distribuídos no filoplano, dos seus tamanhos e das aberturas, os patógenos podem ter dificuldade no processo de penetração e interação parasitária com o hospedeiro [67]. As células-guarda, que circundam o estômato, possuem a capacidade de detectar PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) perto do poro estomático em resposta à infecção. Algumas cepas bacterianas produzem um fator de virulência, denominado coronatina, que reabre os estômatos [68] e permite a entrada de patógenos e trocas gasosas [65].

2.1 Origem e localização do microbioma

O filoplano está exposto a uma notável diversidade de microrganismos [69,70,71]. Essas comunidades microbianas são depositadas no plano foliar pela ação do vento [25], ciclo da chuva, contato com animais [72] e insetos [73]. Após a exposição inicial, alguns desses microrganismos são capazes de colonizar o filoplano [3,74] e ocuparem nichos recém-formados enquanto as folhas se expandem [1].

Outro modo de transmissão de uma comunidade microbiana simbiótica para planta, baseia-se na teoria hologenômica, na qual o holobionte com todos seus microrganismos são considerados como uma unidade evolutiva [75]. Um fragmento de uma planta que cai no solo, pode se enraizar e transformar em uma planta com alguns dos simbiontes da planta original e ainda incorporar outros microrganismos do solo [72]. Em um estudo realizado com duas espécies diferentes de *Hydra* colonizadas por diferentes comunidades de microrganismos, as duas espécies de *Hydra* foram povoadas com microrganismos semelhantes, tanto no laboratório, quanto na natureza, mesmo após mais de 30 anos de manutenção dos cnidários no laboratório [76].

O microbioma diversificado pode localizar-se em diferentes lugares do filoplano [28,69]; imagens obtidas com microscopia eletrônica e de fluorescência (Figura 02), mostram que os microrganismos estão presentes nas depressões entre células epidérmicas, na base dos tricomas, veias e em torno dos estômatos [2,18]. Essa variabilidade na distribuição espacial dos microrganismos simbiontes na superfície foliar pode ser influenciada pela presença de nutrientes e metabólitos secretados ou depositados no filoplano [77], provocando um crescimento microbiano seletivo [78].

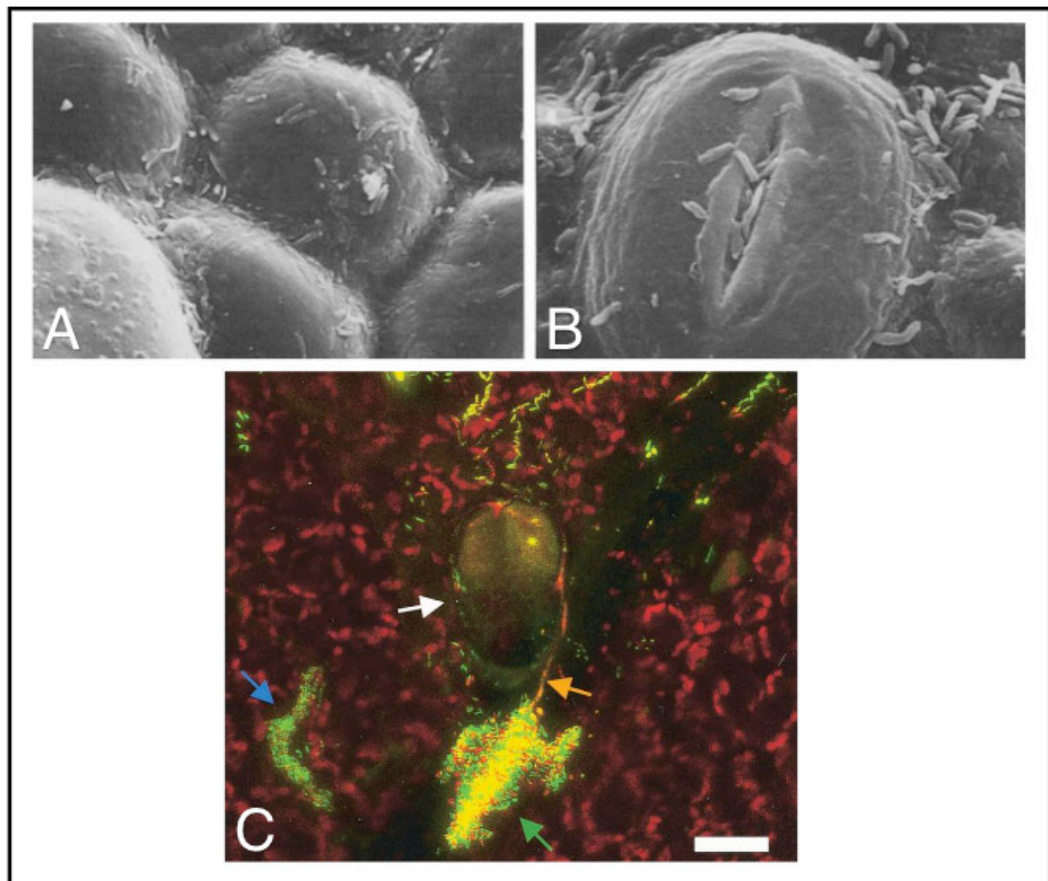


Figura 02: Microrganismos distribuídos no filoplano. (A) Bactérias nas depressões entre células epidérmicas do filoplano de tomate. (B) Bactérias ao redor de um estômago do filoplano de tomate. (C) Microscopia de fluorescência da flora microbiana do filoplano de feijão. Flecha verde: agregado bacteriano misto. Flecha laranja: hifa fúngica. Flecha branca: bactérias na base de um tricoma glandular. Flecha azul: bactérias nas junções das células. Fonte: Mariano e McCarter, 1993 [18] e Lindow e Brandl, 2003 [2].

2.2 Nutrientes e metabólitos

Os microrganismos podem se desenvolver no filoplano, pois este ambiente pode proporcionar uma variedade de nutrientes e metabólitos secundários, sendo encontrados exsudados foliares, resíduos orgânicos, grãos de pólen, secreções produzidas por afídeos e outras substâncias inorgânicas [9,79,80]. Os exsudados são importantes para sustentar a comunidade microbiana, no qual são encontradas substâncias orgânicas como, açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, fenóis e vitaminas [81].

Os nutrientes inorgânicos encontrados no filoplano, como o potássio, cálcio, magnésio, sódio e manganês, geralmente são lixiviados com maior facilidade, com perda de 25% de nutrientes em folhas jovens [82]. Os minerais que são lixiviados com dificuldade (menos de 1 %) são o ferro, zinco, cloro e fósforo [81]. Contudo, substâncias orgânicas, principalmente carboidratos, também representam a maior quantidade de materiais que podem ser lixiviados.

A água é formada e propagada no filoplano influenciadas pelas protuberâncias e calhas produzidas pelas células epidérmicas que determinam a forma e o tamanho das áreas baixas na superfície [83]. A disponibilidade de nutrientes contendo carbono

nas folhas é o principal determinante da colonização das comunidades epifíticas [84], sendo os açúcares simples, como glicose, frutose e sacarose, as fontes de carbono dominantes no filoplano [77, 81]. Esses abundantes nutrientes estão disponíveis devido a vazamentos localizados secretados pelos tricomas glandulares ou extravasados nos locais de lesões, influenciando grandes agregados bacterianos [85].

O metanol está presente em superfícies de folhas de plantas como um subproduto da desmetilação da pectina durante o metabolismo da parede celular da planta [80]. O perfil proteico da metaproteômica do filoplano das plantas *Glycine max*, *Trifolium repens* e *Arabidopsis thaliana* mostram que as proteínas pertencentes ao *Methylobacterium* spp. estão envolvidas na assimilação do metanol e são encontradas em abundância na filosfera [28].

2.3 Adaptação microbiana

A composição do microbioma do filoplano pode ser influenciada por fatores ambientais, incluindo radiação UV [26], clima [86,87], poluição [88] e adubação nitrogenada [89], bem como fatores bióticos, como a idade da folha [22] e a presença de outros microrganismos [2,90]. A luz UV pode ameaçar a sobrevivência dos microrganismos no filoplano ao danificar seu DNA, como também o aparelho fotossintético e os lipídios da membrana da planta [37,91].

Estudos em laboratório com bactérias associadas a folhas, examinaram a tolerância a UV na faixa de 254 nm. O gene *recA*, que está envolvido no reparo de dano no DNA, contribui para a tolerância UV. A inativação de *recA* em *Pseudomonas syringae*, residente do filoplano, diminuiu a sua tolerância a UV em cultura em várias ordens de grandeza [92]. Outro mecanismo de proteção nas bactérias, é a produção de carotenoides, no qual são sintetizados 80 carotenoides diferentes por bactérias fotossintéticas [93]. Estes neutralizam os derivados de oxigênio reativos que são gerados por radiação visível e próxima à UV [15].

2.4 Composição das comunidades microbianas

Utilizando técnicas independentes de cultivo, no filoplano, são observadas uma ampla variedade de gêneros, incluindo bactérias, fungos, oomicetos, vírus, protozoários, leveduras e algas [10,12,13,94]. As bactérias são numericamente dominantes no filoplano e a formação de agregados bacterianos pode constituir entre 30 a 80% da população total [85,95]. Esses agregados são particularmente comuns nas depressões formadas nas junções de células epidérmicas, ao longo das veias e nas bases dos tricomas [96].

Embora uma variedade de microrganismos possa ser associada ao filoplano, como residentes transitórios, as condições ambientais selecionam alguns que persistem, multiplicam-se e representam os verdadeiros moradores do filoplano [74]. Enquanto o solo parece ser uma das fontes mais prováveis de microbiota, a

comparação de comunidades bacterianas na superfície foliar e do solo, revelou que uma fração muito pequena (0,5%) de unidades taxonômicas operacionais compartilhadas entre os dois ambientes [7]. Análise do ar que circunda acima da vegetação, mostrou que as plantas são fontes locais de microrganismos existentes no ar. As análises do microbioma revelaram que 50% das bactérias presentes no ar, são de origem vegetal local [25].

2.4.1 Bactérias do filoplano

Entre os principais microrganismos bacterianos presentes no filoplano, destacam-se: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria e Cyanobacteria [8,28,97,98,99]. Alguns fatores como o clima, localização geográfica e tipos de espécies de plantas, vem demonstrando ser importantes na distribuição das frequências dos filos.

A proteobacteria é o grupo comumente encontrado no filoplano de várias espécies de plantas e regiões geográficas [28,97,100,101]. Este filo é composto por bactérias gram-negativas, a maioria anaeróbias, e é dividido em seis classes, sendo a Alfabroteobactéria o grupo mais abundante no filoplano, conforme estudos realizados em algumas florestas de diferentes continentes. Em folhas de várias árvores de uma floresta localizada no Canadá, as alfabroteobactérias foram dominantes em 68% entre as classes caracterizadas [98], como também na Malásia com 27% [7] e no Panamá, com 22,8% [102]. O grupo das betaproteobactérias é relatado como responsável pela oxidação da amônia. Quatro gêneros já foram relatados em *Prunus* L., sendo o gênero *Massilia* dominante na superfície foliar neste tipo de classe [8].

No grupo da gamaproteobacteria, alguns gêneros e espécies são bem estudados e descritos na literatura. A *Pseudomonas syringae*, um patógeno bacteriano que causa doenças de importância econômica para uma ampla gama de espécies de plantas, é capaz de crescer epifiticamente e entrar nos tecidos das folhas através de estômatos ou feridas, causando doenças através da multiplicação em espaços intercelulares [103]. *P. syringae* tem sido amplamente utilizada para elucidar os mecanismos das interações planta-patógeno [68,104].

A *Candidatus Portiera aleyrodidarum*, outra espécie que pertence ao grupo da gamaproteobacteria, é uma bactéria endossimbionte da *Bemisia tabaci*, e possui habilidade de fornecer ao seu hospedeiro, aminoácidos e carotenoides [105]. Os carotenoides são compostos que a *B. tabaci* geralmente obtêm da dieta, contudo, estes são limitantes na seiva do floema [106]. Por sua vez, os aminoácidos que a *C. Portiera aleyrodidarum* tem a habilidade de sintetizar para seu hospedeiro, são a treonina, triptofano e a serina [73,105].

As espécies do gênero *Lysobacter*, incluída no grupo da gamaproteobacteria, é um grupo de bactérias ambientais que estão emergindo como uma nova fonte de antibióticos [107,108,109]. A *Lysobacter enzymogenes*, por exemplo, é uma bactéria

ubíqua, benéfica, associada à planta, emergente como um novo agente de controle biológico. Essa bactéria apresentou respostas transcricionais e antagônicas a *P. aphanidermatum*, um Oomycete patogênico de plantas [110], como também ação na degradação em paredes celulares de fungos em *Cucumis sativus* e *Solanum lycopersicum* [107,111]. Recentemente, a espécie *Stenotrophomonas pavanii*, inserida também do grupo da gamaproteobacteria, isolada de planta do arroz (*Oryza sativa* L.), demonstrou capacidade de reduzir clorpirifos nas plantas e grãos de arroz e ainda atuar na promoção do crescimento da planta [112].

No grupo da alphaproteobacteria, a espécie *Sphingomonas azotifigens*, foi relatada com habilidade de fixação de nitrogênio [113]. Outras espécies deste gênero possuem a capacidade de expressar proteínas transportadoras TonB, que são capazes de auxiliar no transporte de substratos grandes como as vitaminas, açúcares e sideróforo [28] e ainda atua como reguladores de respostas relacionadas ao estresse ou transporte, como PhyR e EcfG [3]. O PhyR é composto por um domínio amino-terminal que exibe identidade de sequência com fatores sigma de Função Extracitoplasmática (ECF) [114]. Por sua vez, o EcfG é um fator sigma de resposta geral a estresses, cuja atividade é regulada por um mecanismo de mimetização de fator sigma [3].

Firmicutes é um grupo diverso de bactérias que apresenta alta resistência ao stress provocado por ambiente oligotrófico e de baixa umidade. Várias cepas de *Paenibacillus* [115], pertencente a este filo, foram propostas como agentes de biocontrole potencialmente efetivos contra *Verticillium longisporum* [116]. *Paenibacillus* spp. podem produzir um biofilme em torno de raízes de plantas funcionando como uma camada protetora impedindo que os agentes patogênicos tenham acesso ao tecido vegetal [117]. Também são capazes de proteger as plantas contra organismos patogênicos incluindo a produção de uma variedade de antimicrobianos e inseticidas e ainda desencadeia uma resistência sistêmica induzida [118].

3 | CACAUEIRO

O cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta que pertence ao gênero *Theobroma*, família *Malvaceae* e a ordem *Malvales* e apresenta características morfológicas variadas dentro da espécie [119]. O cacau, o fruto, ganhou importância pelas questões alimentares e industriais, já que as amêndoas são matéria-prima para a produção de chocolates e derivados [44]. O avanço da doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* [120], juntamente com fatores climáticos e desvalorização do produto, favoreceram o declínio da lavoura cacaueteira.

O fitopatógeno *M. perniciosa* é um fungo basidiomiceto que possui duas fases: saprofítica e parasítica [120]. As plantas infectadas desencadeiam mudanças morfológicas, histológicas e fisiológicas nos frutos, brotações vegetativas e nas as almofadas florais, sofrendo hipertrofia e hiperplasia, tornando-as inviáveis

para produção de frutos, provocando necrose e morte dos tecidos infectados [44,121,122,123].

Entre os genótipos do *T. cacao* mais comercializados no mercado, o CCN51, possui como características frutos amarelo-alaranjados quando maduros, sementes com coloração interna púrpura clara [124] e apresenta resistência à vassoura-de-bruxa [53,125,126]. O genótipo Catongo, por sua vez, apresenta frutos amarelos quando maduros, despigmentação no interior das sementes e de folhas tenras [127,128], sendo uma variedade suscetível à doença vassoura-de-bruxa [129].

3.1 Filoplano do *Theobroma cacao*

O filoplano do *T. cacao* é formado por estruturas físicas como os tricomas glandulares, cutícula e os estômatos que juntos fornecem o primeiro ponto de contato entre os microrganismos e capacidade de defesa para o cacaueteiro. Diferenças anatômicas entre os genótipos CCN51 e Catongo, foram observadas durante a quantificação da densidade de tricomas glandulares curtos (SGTs) [53]. O filoplano do genótipo CCN51 apresenta maior índice de tricomas glandulares em relação ao genótipo Catongo (Figura 03). A variedade Catongo apresenta nas folhas jovens, uma média de aproximadamente 700 SGTs/cm², enquanto a variedade CCN51, uma média de aproximadamente 1600 SGTs/cm².

A inoculação de suspensão de basidiósporos de *M. pernicioso* nos genótipos CCN51 e Catongo, mostrou que o grupo de plantas que tem somente o solo molhado (por gotejamento) a taxa de infecção pelo fungo e severidade da doença é menor em relação às plantas irrigadas por aspersão. Este estudo concluiu que no filoplano do *T. cacao*, existem componentes hidrossolúveis importantes para a defesa da planta [53].

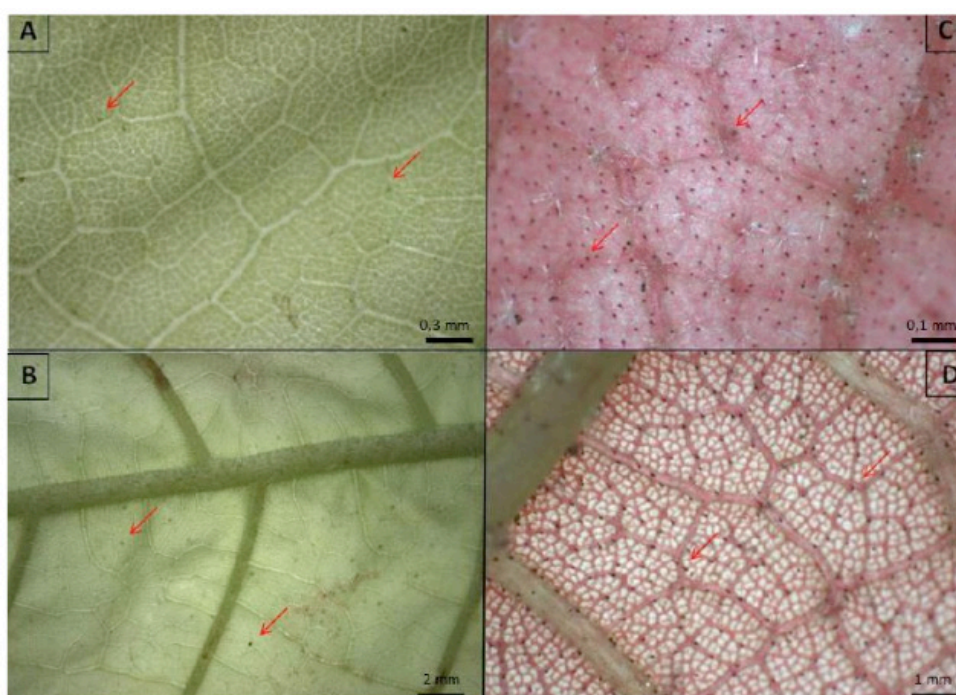


Figura 03. Distribuição de tricomas glandulares curtos em folhas jovens. A e B, superfície foliar adaxial e abaxial, respectivamente, da variedade Catongo. C e D, folha de CCN51 com sua superfície adaxial e abaxial, respectivamente. As setas apontam os tricomas glandulares curtos (SGTs). Fonte: Almeida et al., 2017.

4 | METAGENÔMICA

A grande maioria dos microrganismos não são cultiváveis em condições padrão de laboratório, e quase todo o conhecimento da vida microbiana até pouco tempo era baseada em métodos de isolamento e cultivo em laboratórios. Muitas espécies procariontas e eucariotas não podem ser isoladas facilmente de amostras ambientais ou não podem ser cultivadas “*in vitro*” [130]. Estimativas indicam que apenas 1-5% dos microrganismos do ambiente são cultivados [131]. A grande variedade não cultivada veio ampliar o conhecimento da interação entre o microbioma e seu hospedeiro. Através de técnicas utilizando a biologia molecular, a metagenômica surgiu como uma ferramenta para caracterizar comunidades complexas e descrever a diversidade biológica sem a necessidade de isolamento ou cultivo microbiano. O método da metagenômica implica a extração de DNA total de uma comunidade para que todos os genomas sejam sequenciados e classificados [132].

As tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) possibilitaram a aplicação de duas estratégias em metagenômica: os dependentes de *primers* e amplificação, como o sequenciamento do gene do RNAr 16S que se compara o resultado contra um banco de dados, e os independentes de *primers*, como a técnica sem seleção de alvos (*shotgun*) [133].

Atualmente os novos kits de extração de DNA total e as plataformas NGS permitem a construção de bibliotecas com alta cobertura, proporcionando uma maior representatividade taxonômica das amostras [134]. As plataformas NGS, como 454 GS FLX Sequencing (Roche) [135], MiSeq e HiSeq (Illumina) [134], e Ion Torrent (Life Technologies) [136], compreendem equipamentos com capacidade de sequenciamento da ordem de milhões ou bilhões de bases.

Os resultados obtidos pela plataforma Illumina aumenta a profundidade do sequenciamento por amostras. Esta plataforma produz elevado número de sequências, porém seus reads eram relativamente curtos e representava limitações para o estudos do microbioma, o que foi resolvido com o surgimento da plataforma MiSeq com reads pareados de 250 a 300 pb resultando em informações taxonômicas mais precisas e confiáveis [137].

4.1 Amplificação do gene do RNAr de 16S

O estudo do gene 16S ribossomal (16S RNAr) envolve a maioria dos métodos moleculares empregados no estudo do microbioma. As características do gene 16S o tornaram um dos marcadores moleculares mais utilizados. Este gene contém uma região altamente conservada, as quais permitem o desenho de primers específicos

para inferir relações filogenéticas, ecológicas e evolutivas [133].

A análise filogenética do gene 16S rRNA, também tem sido aplicada para a determinação de distribuição taxonômica. Essa atribuição requer dados de referência disponíveis em bancos de dados, para classificações ao nível de gênero e espécie [138]. Esta região codificadora ainda apresenta diversas porções, dentre elas algumas conservadas e outras hipervariáveis numeradas de 1 a 9 (V1 a V9), sendo para bactérias a região V2 ou V3 as mais indicadas para análise de microbioma bacteriano para distinguir a nível de gênero [139]. Assim, essas sequências se tornaram também um padrão na detecção e quantificação de populações [140].

As ferramentas de bioinformática atualmente mais utilizadas para processar os dados do sequenciamento do rRNA 16S são o Qiime (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) [141] e o *pipeline* do Uparse [142]. Através dessas ferramentas, as sequências são agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) para realização das análises filogenéticas e de diversidade. As OTUs são classificadas de acordo com os bancos de dados de DNA ribossomal, como os do SILVA [143] e Greengenes [144].

5 | MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DO MICROBIOMA

As plantas de interesse devem ser cultivadas em casa de vegetação, mantidas em temperatura ambiente e irrigação controlado por gotejamento para evitar a lavagem das superfícies foliares. Conforme a metodologia do projeto de pesquisa, as plantas devem ser selecionadas aleatoriamente escolhendo as amostras biológicas e as triplicatas experimentais para posterior extração do DNA metagenômico.

As folhas jovens devem ser coletadas no período de 15 a 20 dias após a formação do primórdio foliar. A obtenção do microbioma total do filoplano é obtido através de lavagem de folhas com água de acordo com o método descrito por Shepherd [46], no qual cada folha deverá ser lavada com agitação e imersão por 15 segundos em um béquer contendo 200 ml de água destilada (autoclavada) mantida sobre refrigeração, em seguida retirar a folha da água e escorrer até a última gota (Figura 05). Este procedimento evita a perda de água durante as lavagens subsequentes. As folhas que apresentarem alguma lesão no filoplano não deverão ser expostas à lavagem, pois o objetivo é apenas capturar microrganismos do filoplano.



Figura 04. Lavagem das folhas. Obtenção do lavado foliar.

Foto: Acervo do autor

O microbioma dissolvido no lavado foliar será capturado através de filtração utilizando uma seringa com membrana de celulose de 0,22 μm para reter os microrganismos. Posteriormente, a membrana deverá ser distribuída em tubos eppendorf, congelados em nitrogênio líquido e liofilizados até a completa eliminação da água. Uma quantidade de 0,5 g de membrana liofilizada deverá ser pesada e na sequência realiza a maceração até a obtenção do pó. A extração do DNA metagenômico é utilizando o Kit PowerSoil® DNA Isolation (MoBio Laboratories, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do DNA deverá ser observada em gel de agarose a 0,8% (p / v) como também sua concentração e pureza utilizando o Nanodrop (Thermo Scientific, EUA).

6 | PREPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS

6.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificação de fragmento do gene ribossomal 16S rRNA (Klindworth et al., 2013) de bactérias deverá ser realizada PCR em reação com volume final de 25 μL , contendo 2 μL de DNA, 12,5 μL de HiFi HotStart ReadyMixPCR Kit (Kapa Biosystems), 10 μL (5 μL do *F* e 5 μL do *R*) dos oligonucleotídeos universais (Tabela 01) em concentração final de 10 pM.

Primer	Sequência 5' – 3'	Tamanho Amplicon
16SMetagF	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTA CGGGNGGCWGCAG	550 pb
16SMetagR	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGG ACTACHVGGGTATCTAATCC	

Tabela 01 – Oligonucleotídeos universais utilizados na reação de PCR

Para melhor validação utilizando métodos estatísticos, a reação deverá ser realizada em triplicata nas seguintes condições: desnaturação inicial do DNA molde por 3 min a 95 °C, seguida de 25 ciclos compostos de 30 s a 95 °C de desnaturação, 55 °C para anelamento dos oligonucleotídeos, 72 °C de extensão do primer e 5 min a 72 °C de extensão final. Após a reação de PCR, deverá ser realizada uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% para avaliar a amplificação.

6.2 Purificação

Todo o volume das amostras biológicas obtidas a partir do PCR deverá ser purificada utilizando o Kit AMPure® XP, composta por esferas e uma placa magnéticas (Figura 05). As lavagens deverão ser realizadas em duas etapas com Etanol 80% preparado na hora. Após a secagem das esferas com os fragmentos amplificados pela PCR, adicionará 52,5 µL de Tris 10 mM (pH 8,5), incubado à temperatura ambiente durante 2 minutos e em seguida transferido cuidadosamente o sobrenadante para uma nova placa.

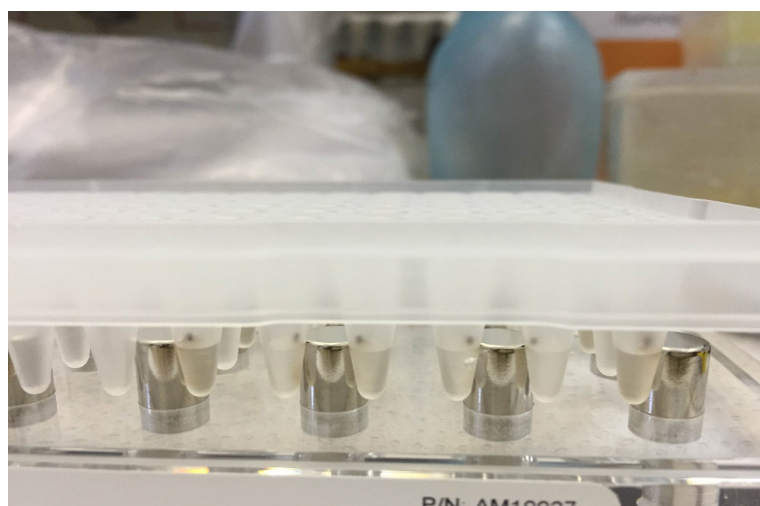


Figura 05: Placa magnética. Placa de 96 poços acoplada a uma placa magnética durante a purificação dos PCR's. Fonte: Acervo do Autor.

6.3 Index

Índices deverão ser adicionados nas amostras para diferenciar cada biblioteca

durante o sequenciamento utilizando o kit “NexTera XT Index”. Uma nova PCR é realizada com volume final de 50 μ L, contendo 5 μ L da primeira purificação (biblioteca), 25 μ L de HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems), 5 μ L do “Nextera XT Index 1 Primers (N7XX)”, 5 μ L do “Nextera XT Index 2 Primers (S5XX)” e 10 μ L de água ultra pura. Os indexs (Index 1 Primers e Index 2 Primers) devem ser previamente selecionados (Tabela 02) pelo software MiSeq Control v2.6. É recomendamos o uso de um rack de processamento de PCR (Figura 06), como o dispositivo de fixação para auxiliar na combinação adequada dos Index durante a etapa de preparo das bibliotecas.

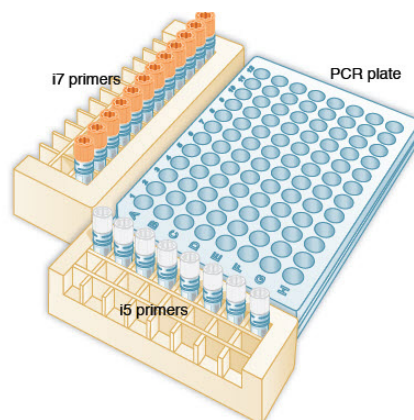


Figura 06: Rack de organização dos Index. Dispositivo de fixação da placa de índice TruSeq.
Fonte: <https://international.neb.com>.

Seguindo recomendações do protocolo da Illumina (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation), a PCR deve ser realizada com número específico de ciclos para garantir que as bibliotecas produzam resultados de alta qualidade. A reação deverá ser realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial do DNA molde por 3 min a 95 °C, seguida de 8 ciclos compostos de 30 s a 95 °C de desnaturação, 55 °C para anelamento, 72 °C de extensão do primer e 5 min a 72 °C de extensão final. Após a reação, as bibliotecas deverão ser novamente purificadas (Kit AMPure® XP) e a verificação do comprimento esperado das sequências são aproximadamente 630 pb, e deverão validadas em gel de agarose 1%.

Biblioteca	Index (I7)	Index (I5)
01	TAAGGCGA	CTCTCTAT
02	CGTACTAG	CTCTCTAT
03	AGGCAGAA	CTCTCTAT
04	TCCTGAGC	CTCTCTAT
05	GGA CTCCT	CTCTCTAT
06	TAGGCATG	CTCTCTAT

Tabela 02 – Exemplos de seleção dos Index que podem ser sugeridos pelo software MiSeq Control v2.6

6.4 Quantificação e sequenciamento das bibliotecas

As bibliotecas de DNA podem ser quantificadas por um ensaio de RT-qPCR utilizando o kit “Kapa Library Quantification” para plataformas de sequenciamento Illumina. As amostras deverão ser diluídas para 1:1.000.000 em solução Tris-HCl + 0,05% Tween 20 e preparadas para quantificação com volume final de 20 μL , contendo 12 μL de MasterMix, 4 μL da biblioteca diluída e 4 μL de água ultra pura. Seis padrões de concentrações variadas (20 pM, 2pM, 0,2pM, 0,02pM, 0,002pM e 0,0002pM) também devem ser adicionados para compor a curva de referência da quantificação. Na placa de 96 poços todas as amostras deverão ser aplicadas em triplicatas, seguindo-se a seguinte ordem: os padrões, as bibliotecas diluídas e os brancos.

Uma curva padrão de quantificação absoluta deverá ser construída a partir dos valores encontrados no RT-qPCR, sendo inseridos os 6 padrões com seus valores conhecidos e os valores das bibliotecas. As concentrações das amostras são calculadas através de fórmulas gerando uma biblioteca mãe em nM. Posteriormente deverá ser criado um “*pool*” de 4nM de todas as bibliotecas sendo este também quantificado pela técnica de RT-qPCR.

Após a segunda quantificação do “*pool*” a biblioteca deverá ser deixada em uma concentração final de 2nM. Num tubo limpo adicionará 5 μL do “*pool*”, no qual deverá ser desnaturado com 5 μL de NaOH 0,2 M e incubando em temperatura ambiente por 10 minutos. Após incubação deverá ser adicionado ao tubo que contém o *pool* das bibliotecas 990 μL da solução de HT1 (Tampão de hibridação) do kit Miseq Reagent NanoKit Illumina®. O PhiX deverá ser diluído para 10pM com o tampão HT1. Com o volume de 1 mL (10 μL da desnaturação e 990 μL de HT1), 480 μL deverão ser diluídos em 120 μL de PhiX 10 pM (PhiX Control Kit v3) totalizando um volume final de 600 μL . Para iniciar o sequenciamento, o “*pool*” da biblioteca finalmente deverá ser transferido para o cartucho de reagentes do MiSeq® Reagente Kit V3 no equipamento MiSeq Illumina® juntamente com a flowcell.

6.5 Calculando a concentração da biblioteca

Para calcular a concentração final da biblioteca um dos resultados provenientes do software do RT-qPCR será utilizado nos cálculos. Outros valores também são utilizados nos cálculos, como o tamanho das bandas do controle e das bibliotecas indicados pelos marcadores nos géis de agarose. Por outro lado, os valores como: ajuste, concentração em pM, concentração em nM, volume de trabalho (V_t) e volume de diluição (V_d), são calculados posteriormente (Quadrado 01).

$$\text{Ajuste} = \frac{\text{Abundância} \times \text{pb do Controle (gel)}}{\text{pb da biblioteca (gel)}}$$

$$\text{Concentração em pM} = \text{Ajuste} \times \text{Diluição utilizada}$$

$$\text{Vt (2 nM)} = \frac{4 \times 30}{\text{Concentração em nM}}$$

$$\text{Vd} = 30 - \text{Vt (2 nM)}$$

Quadrado 01 – Ilustração dos cálculos para diluição final da biblioteca

O ajuste é calculado multiplicando a “Abundância” pelo tamanho da banda do controle fornecido pelo marcador no do gel de agarose, depois dividir o valor encontrado pelo tamanho da banda da biblioteca também fornecido pelo marcador (Figura 07). A Abundância (Quantity) é um parâmetro fornecido após o término da quantificação pelo aparelho de RT-qPCR.

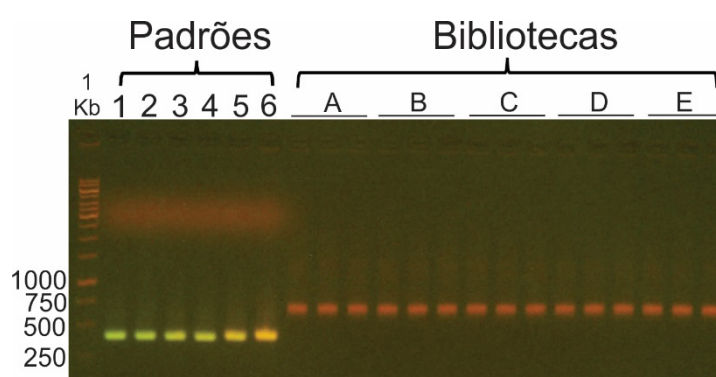


Figura 07: Gel de agarose – Quantificação das bibliotecas. Padrões com aproximadamente 452 pb e as bibliotecas (A,B,C,D e E) com aproximadamente 630 pb.

A diluição da biblioteca mãe é referente as sucessivas diluições que são realizadas para não ocasionar “over-cluster” durante o sequenciamento no equipamento (Tabela 03). Antes de calcular o volume da alíquota que precisará ser retirada da biblioteca para o sequenciamento, a mesma deverá ser convertida de pM para nM e finalmente diluir para 2 nM. Essa diluição final de 2 nM é sugerida se na última quantificação as bibliotecas ficaram fora da curva dos padrões.

Volume retirado	Biblioteca utilizada	Volume de H ₂ O adicionado	Diluição
1 µL	Mãe	99 µL	1:100
10 µL	1:100	90 µL	1:1.000
5 µL	1:1000	95 µL	1:20.000
2 µL	1:20.000	98 µL	1:1.000.000

Tabela 03 – Diluição da biblioteca antes de realizar o sequenciamento.

7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho foi descrito pela primeira vez uma metodologia para a extração de DNA da microbiota do filopiano de *Theobroma cacao* L. como também o preparo das bibliotecas. Esta metodologia possibilitou a extração de DNA microbiano com minimização da contaminação de DNA proveniente de estruturas do apoplasto. A partir do DNA metagenômico extraído foi construída uma biblioteca e descrita uma metodologia de realização dos cálculos para preparo do sequenciamento e quantificação da biblioteca. A metodologia utilizada obteve grande rendimento, o sequenciamento produziu um total de 27,2 milhões de reads [145] da região variável V3-V4 do RNAr 16S. Uma biblioteca metagenômica bem montada ajudará a elucidar a seletividade de microrganismos no filopiano e compreender a interação entre o microbioma e seu hospedeiro.

REFERÊNCIAS

Vorholt J. A. **Microbial life in the phyllosphere**. Nat. Rev. Microbiol. 2012; 10:828-840.

Lindow S. E. & Brandl M. T. **Microbiology of the phyllosphere**. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69:1875-1883.

Rastogi G., Coaker G.L., Leveau J.H. **New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches**. FEMS Microbiol. Lett. 2013; 348:1-10.

Pane C, Zaccardelli M. **Evaluation of *Bacillus* strains isolated from solanaceous phylloplane for biocontrol of *Alternaria* early blight of tomato**. Biological Control. 2015; 84:11-18.

Pinho D, Sousa S, Pinheiro M, Egas C, Gomes AC. **Unravelling the diversity of grapevine microbiome**. PloS One. 2014; 9(1):e85622.

Yang C.-H., Crowley D.E., Borneman J., Keen N.T. **Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98:3889-3894.

Kim M., Singh D., Lai-Hoe A., Go R. et al. **Distinctive phyllosphere bacterial communities in tropical trees**. Microb. Ecol. 2012; 63:674-681.

Jo Y., Cho J.K., Choi H., Chu H., Lian S., Cho W.K. **Bacterial communities in the phylloplane of *Prunus* species**. J. Basic Microbiol. 2015; 55(4):504-508.

Junker R.R., Loewel C., Gross R., Dötterl S., Keller A., Blüthgen N. **Composition of epiphytic bacterial communities differs on petals and leaves**. Plant Biology. 2011; 13(6):918-924.

Andrews J.H., and R. F. Harris. **The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces.** Annu. Rev. Phytopathol. 2000; 38:145-180.

Agler T.A., Ruhe J., Kroll S., Morhenn C., Kim S.T., Weigel D., et al. **Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation.** PLoS Biol. 2016; 14(1):e1002352.

Mora-Ruiz Mdel R, Font-Verdera F, Díaz-Gil C., Urdiain M., Rodríguez-Valdecantos G., González B., Orfila A., Rosselló-Móra R. **Moderate halophilic bacteria colonizing the phylloplane of halophytes of the subfamily *Salicornioideae* (*Amaranthaceae*).** Syst Appl Microbiol. 2015; 38(6):406-416.

Singh R.P., Reddy R.K. **Unraveling the function of the macroalgal microbiome.** Front Microbiology. 2016; 6:1-8.

Beattie G. A., Lindow S.E. **The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves.** Annu. Rev. Phytopathol. 1995. 33:145-172.

Hirano S. S., Upper C.D. **Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000; 64:624-653.

Leben C. **Relative humidity and the survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants.** Phytopathology. 1988; 78:179-185.

Bashan Y., Sharon E., Oleon Y., Henis Y. **Scanning electron and light microscopy of infection and symptom development in tomato leaves infected with *Pseudomonas* tomato.** Physiol. Plant Pathol. 1981; 19:139-144.

Mariano R.L.R., McCarter S.M. **Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species.** Microb. Ecol. 1993; 26:47-58.

Mansvelt E.L., Hattingh M.J. **Scanning electron microscopy of invasion of apple leaves and blossoms by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.** Can. J. Bot. 1989; 55(2):533-538.

Miles W.G., Daines R.H., Rue I.W. **Presymptomatic egress of *Xanthomonas pruni* from infected peach leaves.** Phytopathology. 1977; 67:895-897.

Davis C.L., Brlamky R.H. **Use of immunogold labelling with scanning electron microscopy to identify phytopathogenic bacteria on leaf surfaces.** Appl. Environ Microbiol. 1991; 57:3052-3055.

Ercolani G. L. **Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time.** Microb. Ecol. 1991; 21:35-48.

Thompson I. P., Bailey M. J., Fenlon J. S., Fermor T. R., Lilley A. K., Lynch J. M., McCormack P. J., McQuilken M. P., and Purdy K. J. **Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*).** Plant Soil. 1993; 150:177-191.

Berlec A. **Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: search for plant probiotics.** Plant Sci. 2012; 193-194:96-102.

Lymperopoulou D.S., Adams R.I., Lindow S.E. **Contribution of vegetation to the microbial composition of nearby outdoor air.** Appl Environ Microbiol. 2016; 82(13):3822-3833.

Kadivar H., Stapleton A.E. **Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity.** Microb. Ecol. 2003; 45(4): 353-361.

Lindemann J., and Upper C. D. **Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants.** Appl.

Environ. Microbiol. 1985; 50:1229-1232.

Delmotte N., Knief C., Chaffron S., Innerebner G., Roschitzki B., Schlapbach R., von Mering C., Vorholt J.A. **Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria.** PNAS. 2009; 106:16428-16433.

Redford A.J., Bowers R.M., Knight R., Linhart Y., Fierer N. **The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves.** Environ Microbiol. 2010; 12(11):2885-2893.

Wilson M., Hirano S.S., Lindow S.E. **Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf.** Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65:1435-1443.

Ryffel F., Helfrich E.J., Kiefer P., Peyriga L., Portais J.C., Piel J., Vorholt J.A. **Metabolic footprint of epiphytic bacteria on *Arabidopsis thaliana* leaves.** ISME J. 2016; 10(3):632-643.

Winter C., Moeseneder M.M., Herndl G.J. **Impact of UV radiation on bacterioplankton community composition.** Appl Environ Microbiol. 2001; 67(2):665-672.

Gourion B., Francez-Charlot A., Vorholt J.A. **PhyR is involved in the general stress response of *Methylobacterium extorquens* AM1.** J Bacteriol. 2008; 190:1027-1035.

Kaczmarczyk A., Hochstrasser R., Vorholt J.A., Francez-Charlot A. **Complex two-component signaling regulates the general stress response in Alphaproteobacteria.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014; 111:E5196-E5204.

Nawrath C. **Unraveling the complex network of cuticular structure and function.** Curr Opin Plant Biol. 2006; 9(3):281-287.

Buschhaus C., Jetter R. **Composition and physiological function of the wax layers coating *Arabidopsis* leaves: β -amyirin negatively affects the intracuticular water barrier.** Plant Physiol. 2012; 160(2):1120-1129.

Yeats T.H., Rose J.K. **The formation and function of plant cuticles.** Plant Physiol. 2013; 163(1):5-20.

Ueda H., Mitsuhashi I., Tabata J., Kugimiya S., Watanabe T., Suzuki K., Yoshida S., Kitamoto H. **Extracellular esterases of phylloplane yeast *Pseudozyma antarctica* induce defect on cuticle layer structure and water-holding ability of plant leaves.** Appl Microbiol Biotechnol. 2015; 99(15):6405-6415.

Harada E., Kim J.A., Meyer A.J., Hell R., Clemens S., Choi Y.E. **Expression profiling of tobacco leaf trichomes identifies genes for biotic and abiotic stresses.** Plant and Cell Physiology. 2010; 51(10):1627-1637.

Karioti A., Toulakou G., Bilia A.R., Psaras G.K., Karabourniotis G., Skaltsa H. **Erinea formation on *Quercus ilex* leaves: anatomical, physiological and chemical responses of leaf trichomes against mite attack.** Phytochemistry. 2011; 72(2-3):230-237.

Sounigo O., Lachenaud P., Bastide P., Cilas C., N'Goran J., Lanaud C. **Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding.** J Appl Genet. 2003; 44(3):339-353.

Almeida A.F., Valle R.R. **Ecophysiology of the cacao tree.** Braz. J. Plant Physiol. 2007; 19(4):425-448.

Rosário M., Perrucho T., Fowler R. L., Sales J. C. **Cacau: história e evolução no mundo.** Ilhéus:

Ceplac, p.46, 1978.

Purdy L.H., Schmidt R.A. **Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management.** Annu. Rev. Phytopathol. 1996; 34:573-594.

Von Mering C. **Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments.** Science. 2007; 315:1126-1130.

Doan HK, Leveau JHJ. 2015. **Artificial surfaces in phyllosphere microbiology.** Phytopathology. 2015; 105(8):1036-42.

Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW. **New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome.** Ann Bot (Lond). 2004; 93(1):3-11.

Harrison NA, Davis MJ. **Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subs *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon-stuning disease.** Phytopathology. 1988; 722-727.

Silva RA, Reis VM, Baldani JI, Olivares FL. **Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos.** Embrapa Agrobiologia. 2008; 49 p.

Werker E. **Trichome diversity and development.** Adv. Bot. Res. 2000; 31:1-35.

Bednarek P, Osbourn A. **Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense.** Science. 2009; 324(5928):746-8.

Nagel J, Culley LK, Lu Y, Liu E, Matthews PD, Stevens JF, et al. **EST analysis of hop glandular trichomes identifies an *O*-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol.** Plant Cell. 2008; 20:186-200.

Almeida DSM, Gramacho KP, Cardoso THS, Micheli F, Alvim FC, Pirovani CP. **Cacao Phylloplane: The first battlefield against *Moniliophthora perniciosa*, Which Causes Witches' Broom Disease.** Phytopathology. 2017; 107(7):864-871.

Kroumova AB, Shepherd RW, Wagner GJ. **Impacts of phylloplanin gene knockdown and of *Helianthus* and *Datura* phylloplanins on *Peronospora tabacina* spore germination and disease potential.** Plant Physiol. 2007; 144:1843-1851.

Morrissey JP, Osbourn AE. **Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis.** Microbiol Mol Biol Rev. 1999; 63(3): 708-24.

Broadhurst CL, Chaney RL, Angle JS, Mangel TK, Erbe EF, Murphy CA. **Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes.** Environ. Sci. Technol. 2004; 38:5797-5802.

Domínguez-Solís JR, López-Martín MC, Ager FJ, Ynsa MD, Romero LC, Gotor C. **Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*.** Plant Biotechnol. 2004; 2:469-476.

Gutiérrez-Alcalá G, Gotor C, Meyer AJ, Fricker M, Vega JM, Romero LC. **Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells.** Proc. Natl Acad. Sci. 2000; 97:11108-11113.

Wienkoop S, Zoeller D, Ebert B, Simon-Rosin U, Fisahn J, Glinski M, et al. **Cell-specific protein profiling in *Arabidopsis thaliana* trichomes: identification of trichome-located proteins involved in sulfur metabolism and detoxification.** Phytochemistry. 2004; 65:1641-1649.

Amme S, Rutten T, Melzer M, Sonsmann G, Vissers JPC, Schlesier B, et al. **A proteome approach**

defines protective functions of tobacco leaf trichomes. Proteomics. 2005; 5:2508-2518.

Kerstiens G. **Plant Cuticles - an Integrated Functional Approach.** Plant Biology Abstracts. 1997; 47:50-60.

Lindow SE, Andersen GL. 1996. **Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves.** Appl. Environ. Microbiol. 1996; 62:2978-2987.

Rojas CM, Ham JH, Deng WL, Doyle JJ, Collmer A. **HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings.** Proc. Natl Acad. Sci. 2002; 99: 13142-13147.

Das A, Rangaraj N, Sonti RV. **Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice.** Mol. Plant Microbe Interact. 2009; 22:73-85.

Vacher C, Hampe A, Porté AJ, Sauer U, Compant S, Morris CE. **The phyllosphere: microbial jungle at the plant–climate interface.** Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2016; 47:1-24.

Burkhardt J, Hunsche M. **“Breath figures” on leaf surfaces-formation and effects of microscopic leaf wetness.** Front. Plant Sci. 2013; 4:422.

Lee SC, Luan S. **ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses.** Plant Cell Environ. 2012; 35: 53-60.

Melotto M, Underwood W, He SY. **Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases.** Annu. Rev. Phytopathol. 2008; 46:101-22.

Bodenhausen N, Horton MW, Bergelson J. **Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*.** PLoS One. 2013; 8(2):e56329.

Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P. **Structure and functions of the bacterial microbiota of plants.** Annu Rev Plant Biol. 2013; 64:807-38.

Russell JA, Dubilier N, Rudgers JA. **Nature’s microbiome: introduction.** Mol Ecol. 2014; 23(6):1225-37.

Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. **Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution.** FEMS Microbiol Rev. 2008; 32(5):723-35.

Sudakaran S, Kost C, Kaltenpoth M. **Symbiont acquisition and replacement as a source of ecological innovation.** Trends Microbiol. 2017; 25(5):375-390.

Müller DB, Schubert OT, Röst H, Aebbersold R, Vorholt JA. **Systems-level proteomics of two ubiquitous leaf commensals reveals complementary adaptive traits for phyllosphere colonization.** MCP. 2016; 15(10):3256-3269.

Rosenberg E, Sharon G, Atad I, Zilber-Rosenberg I. **The evolution of animals and plants via symbiosis with microorganisms.** Environ Microbiol Rep. 2010; 2(4):500-506.

Fraune S, Bosch TCG. **Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan *Hydra*.** Proc Natl Acad Sci. 2007; 104:13146-13151.

Mercier J, and Lindow SE. **Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes.** Appl Environ Microbiol. 2000; 66(1):369–374.

- Müller T & Ruppe S. **Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology**. FEMS Microbiol Ecol. 2014; 87:2–17.
- Brysch-Herzberg M. **Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe**. FEMS Microbiology Ecology. 2004; 50:87-100.
- Galbally IE, and Kirstine W. **The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol**. J Atmos Chem. 2002; 43(3):195-229.
- Tukey HB. **The leaching of substances from plants**. Annu Rev Plant Physiol. 1971; 21(1):305-324.
- Tukey HB, Tukey Jr HB, Wittwer SH. **Loss of nutrients by foliar leaching as determined by radioisotopes**, Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 1958; 71:496-506.
- Mechaber WL, Marshall DB, Mechaber RA, Jobe RT, and Chew FS. **Mapping leaf surface landscapes**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93(10):4600-4603.
- Wilson M, and Lindow SE. **Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning**. Appl. Environ. Microbiol. 1994; 60:4468-4477.
- Monier JM, Lindow, SE. **Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces**. 2003; 100(26):15977-15982.
- Lambais MR, Crowley DE, Cury JC, Büll RC, Rodrigues RR. **Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest**. Science. 2006; 312(5782):1917.
- Freiberg E. **Influence of microclimate on the occurrence of cyanobacteria in the phyllosphere in a premontane rain forest of Costa Rica**. Plant biol. 1999; 1(2):244-252.
- Yutthammo C, Thongthammachat N, Pinphanichakarn P, Luepromchai E. **Diversity and activity of PAH-degrading bacteria in the phyllosphere of ornamental plants**. Microb Ecol. 2010; 59(2):357-368.
- Ikeda S, Anda M, Inaba S, Eda S, Sato S, Sasaki K, Tabata S, Mitsui H, et al. **Autoregulation of nodulation interferes with impacts of nitrogen fertilization levels on the leaf-associated bacterial community in soybeans**. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(6):1973-80.
- Suda W, Nagasaki A, Shishido M. **Powdery mildew-infection changes bacterial community composition in the phyllosphere**. Microbes Environ. 2009; 24(3):217-23.
- Rozema J, van de Staaij J, Björn LO, Caldwell M. **UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation**. Trends Ecol Evol. 1997; 12:22-28.
- Willis DK, Hrabak EM, Lindow SE, Panopoulos NJ. **Construction and characterization of *Pseudomonas syringae* recA mutant strains**. Mol. Plant-Microbe Interact. 1988; 1:80-86.
- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O. **Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability**. Crit Rev Food Sci Nutr. 2000; 40(3):173-289.
- Koskella B. **Phage-mediated selection on microbiota of a long-lived host**. Curr Biol. 2013; 23(13):1256-60.
- Morris CE, Monier J-M, Jacques MA. **A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere**. Appl Environ Microbiol.

1998; 64(12):4789-4795.

Baldotto LEB & Olivares FL. **Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system.** Can. J. Microbiol. 2008; 54:918-931.

Knief C, Delmotte N, Chaffron S, Stark M, Innerebner G, Wassmann R, von Mering C, Vorholt JA. **Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice.** ISME J. 2012; 6(7):1378-90.

Laforest-Lapointe I, Messier C, Kembel SW. **Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure.** Microbiome. 2016; 4(1):27.

Ortega RA, Mahnert A, Berg C, Müller H, Berg G. **The plant is crucial: specific composition and function of the phyllosphere microbiome of indoor ornamentals.** FEMS Microbiol Ecol. 2016; 92(12).

Knief C, Frances L, Cantet F, Vorholt JA. **Cultivation-independent characterization of *Methylobacterium* populations in the plant phyllosphere by automated ribosomal intergenic spacer analysis.** Appl. Environ. Microbiol. 2008; 74: 2218-2228.

Pinto C, Pinho D, Sousa S, Pinheiro M, Egas C, Gomes AC. **Unravelling the diversity of grapevine microbiome.** 2014; 9(1):e85622.

Kembel SW, O'Connorb TK, Arnoldb HK, Hubbell SP, Wrightd SJ, Greenb JL. **Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest.** PNAS. 2014; 111(38):13715-13720.

Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P et al. **Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology.** Mol Plant Pathol. 2012; 13:614-629.

Innerebner G, Knief C, Vorholt JA. **Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system.** Appl. Environ. Microbiol. 2011; 77: 3202-3210.

Santos-Garcia D, Farnier PA, Beitia F, Zchori-Fein E, Vavre F, Mouton L, Moya A, et al. **Complete genome sequence of “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*” BT-QVLC, an obligate symbiont that supplies amino acids and carotenoids to *Bemisia tabaci*.** J Bacteriol. 2012; 194(23):6654-6655.

Sloan DB, Moran NA. **Endosymbiotic bacteria as a source of carotenoids in whiteflies.** Biol Lett. 2012; 8(6):986-9.

Folman LB, Postma J, van Veen JA. **Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber.** Microbiol Res. 2003; 158(2):107-15.

Han Y, Wang Y, Yu Y, Chen H, Shen Y, Du L. **Indole-induced reversion of intrinsic multiantibiotic resistance in *Lysobacter enzymogenes*.** Appl Environ Microbiol. 2017; 83(17).

Wang R, Xu H, Zhao Y, Zhang J, Yuen GY, Qian G, Liu F. **Lsp family proteins regulate antibiotic biosynthesis in *Lysobacter enzymogenes* OH11.** AMB Express. 2017; (1):123.

Zhao Y, Qian G, Chen Y, Du L, Liu F. **Transcriptional and antagonistic responses of biocontrol strain *Lysobacter enzymogenes* OH11 to the plant pathogenic Oomycete *Pythium aphanidermatum*.** Front Microbiol. 2017; 8: 1025.

Sullivan RF, Holtman MA, Zylstra GJ, White JF, Kobayashi DY. **Taxonomic positioning of**

- two biological control agents for plant diseases as *Lysobacter enzymogenes* based on phylogenetic analysis of 16S rDNA, fatty acid composition and phenotypic characteristics. *J Appl Microbiol.* 2003; 94(6):1079-86.
- Feng F, Ge J, Li Y, He S, Zhong J, Liu X, Yu X. **Enhanced degradation of chlorpyrifos in rice (*Oryza sativa* L.) by five strains of endophytic bacteria and their plant growth promotional ability.** *Chemosphere.* 2017; 184:505-513.
- Castanheira NL, Dourado AC, Pais I, Smedo J, Scotti-Campos P, Borges N, Carvalho G, Barreto Crespo MT, Fareleira P. **Colonization and beneficial effects on annual ryegrass by mixed inoculation with plant growth promoting bacteria.** *Microbiol Res.* 2017; 198:47-55.
- Lonetto MA. et al. **Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase or factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions.** *Microbiology.* 1994; 91:7573-7577.
- Rybakova D, Schmuck M, Wetzlinger U, Varo-Suarez A, Murgu O, Müller H., et al. **Kill or cure? The interaction between endophytic *Paenibacillus* and *Serratia* strains and the host plant is shaped by plant growth conditions.** *Plant Soil.* 2016; 405:65-79.
- Rybakova D, Rack-Wetzlinger U, Cernava T, Schaefer A, Schmuck M, Berg G. **Guerra aérea: um diálogo volátil entre o patógeno vegetativo *Verticillium longisporum* e seu antagonista *Paenibacillus polymyxa*.** *Front Plant Sci.* 2017; 8: 1294.
- Timmusk S, Grantcharova N, Wagner EGH. ***Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms.** *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71:7292-7300.
- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan ZC. **Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review.** *Microb. Cell Fact.* 2016; 15:203.
- Alverson WS, Whitlock BA, Nyffeler R, Bayer C, Baum DA. **Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data.** *Am J Bot.* 1999; 86(10):1474-1486.
- Aime M.C.; Phillips-Mora W. **The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae.** *Mycologia,* 2005; 97(5):1012-1022.
- Calle H, Cook AA, Fernando SY. **Histology of witches' broom caused in cacao by *Crinipellis pernicioso*.** *Phytopathology.* 1982; 72:1479-1481.
- Ceita GO, Macêdo JNA, Santos TB.; et al. **Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora pernicioso*.** *Plant Science.* 2007; 173:106-117.
- Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella AWV, Schiavinato MA, Cascardo JMC, et al. **Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*.** *J. Exp. Bot.* 2005; 56:865-877.
- Campo EC & Andía FC. **Cultivo y beneficio del cacao CCN-51.** Quito. El Conejo. 1997.
- Boza EJ, Motamayor JC, Amores FM, Cedeño-Amador S, Tondo CL, Livingstone DS, Schnell RJ, Gutiérrez OA. **Genetic characterization of the cacao cultivar CCN51: its impact and significance on global cacao improvement and production.** *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2014; 139(2):219-229.
- Lopes UL, Monteiro WR, Pires JL, Clement D, Yamada MM, Gramacho KP. **Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results.** *CBAB.* 2011; 1:73-81.

- Bondar G. **Cacau branco na Bahia. Espécies e variedades de cacau. Boletim da Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado da Bahia.** 20:7-30. 1958.
- Ferreira ACR, Ahnert D, Melo NBA, Mello DLN. **Guia de beneficiamento de cacau de qualidade.** Ilhéus: Instituto CABRUCÁ, 2013.
- Gramacho ICP, Magno AES, Mandarino EP, Matos A. **Cultivo e Beneficiamento do Cacau na Bahia.** 1ª ed. Ilhéus. CEPLAC/CEDEX. 1992.
- Bailly J, Fraissinet-Tachet L, Verner MC, Debaud JC, Lemaire M, Wésolowski-Louvel M. **Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach.** ISME J. 2007; 1(7):632-42.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. **Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.** Microbiol Rev. 1995; 59(1):143-69.
- Kunin V, Copeland A, Lapidus A, Mavromatis K, Hugenholtz P. **A bioinformatician's guide to metagenomics.** Microbiol Mol Biol Rev. 2008; 72(4): 557-578.
- Delmont TO, Robe P, Cecillon S, Clark IM, Constancias F, Simonet P, et al. **Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity.** Appl Environ Microbiol. 2011; 77(4):1315-24.
- Bartram AK, Lynch MD, Stearns JC, Moreno-Hagelsieb G, Neufeld JD. **Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads.** Appl Environ Microbiol. 2011; 77(11):3846-52.
- Elizabeth A, Trachtenberg, Cherie L. Holcomb. **Next-Generation HLA Sequencing Using the 454 GS FLX System.** Methods Mol Biol. 2013; 1034: 197–219.
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Barreiro C, Pérez-Redondo R. **Genome Sequencing of Steroid Producing Bacteria Using Ion Torrent Technology and a Reference Genome.** Methods Mol Biol. 2017; 1645:45-58.
- Jeon YS, Park SC, Lim J, Chun J, Kim BS. **Improved pipeline for reducing erroneous identification by 16S rRNA sequences using the Illumina MiSeq platform.** J Microbiol. 2015; 53(1):60-69.
- Mlot C. **Microbial Diversity Unbound: What DNA-based techniques are revealing about the planet's hidden biodiversity.** BioScience. 2004; 54(12):1064-1068.
- Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connel N, Alland D. **A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria.** J Microbiol Methods. 2007; 69(2): 330-339.
- Zongzhi L, Todd ZD, Gary LA, Rob K. **Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers.** Nucleic Acids Res. 2008; 36(18): e120.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. **QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.** Nat Methods. 2010; 7(5):335-336.
- Edgar RC. **Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.** Bioinformatics. 2010; 26(19):2460-1.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. **The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools.** Nucleic Acids Res. 2013; 41:D590-D596.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. **Greengenes, a chimera-**

checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(7):5069-72.

Santana JO, Gramacho KP, de Souza Eduvirgens Ferreira KT, Rezende RP, et al. **Witches' broom resistant genotype CCN51 shows greater diversity of symbiont bacteria in its phylloplane than susceptible genotype catongo.** BMC Microbiol. 2018; 23;18(1):194.

MODELO PARA A MELHORIA DO PROCESSO DE REGULARIZAÇÃO DA AQUICULTURA PRATICADA EM RESERVATÓRIOS DA UNIÃO BRASILEIRA

Sara Monaliza Sousa Nogueira

Programa de Planejamento Energético da
Universidade Federal do Rio de Janeiro (PPE/
COPPE/UFRJ) – RJ
saranogueira@ppe.ufrj.br

Marco Aurélio dos Santos

Programa de Planejamento Energético da
Universidade Federal do Rio de Janeiro (PPE/
COPPE/UFRJ) – RJ

Sandro Alberto Vianna Lordelo

Programa de Pós-graduação em Engenharia de
Produção da Universidade Federal Fluminense
(TPP/UFF) – RJ

José Rodrigues de Farias Filho

Programa de Pós-graduação em Engenharia de
Produção da Universidade Federal Fluminense
(TPP/UFF) – RJ

RESUMO: A aquicultura brasileira praticada em reservatórios federais está sendo desencorajada pelo atual sistema legal do país, devido à burocracia e ao envolvimento de muitas agências. Esta pesquisa fornece um levantamento dos problemas relacionados aos atuais processos de Licenciamento Ambiental e Cessão de Uso de espaço físico de corpos d'água de domínio da União para fins de aquicultura. E tem por objetivo, propor um modelo que reúne teorias para melhoria destes processos. Para isso, foram aplicados

68 questionários com agentes-chave do setor, de diferentes regiões do país. A metodologia do *Grounded Theory* foi usada para organizar, codificar e analisar os dados coletados e delinear o modelo das principais teorias emergentes. O modelo revela 17 grandes problemas relacionados aos processos de regularização da atividade aquícola e faz 21 recomendações para melhorar e acelerar tais processos. Colocando-se essas ações em prática, acredita-se que a aquicultura nacional seria capaz de atrair novas e antigas partes interessadas em investir no setor, reduzindo o número de empreendimentos ilegais e tornando a atividade mais sustentável.

PALAVRAS-CHAVE: Cessão de Uso; Licenciamento Ambiental; Gestão da Aquicultura Brasileira; *Grounded Theory*; pesquisa qualitativa.

MODEL FOR IMPROVING THE AQUACULTURE REGULARIZATION PROCESS DEVELOPED IN BRAZILIAN FEDERAL RESERVOIRS

ABSTRACT: The Brazilian aquaculture in Federal reservoirs is being discouraged by the country's current legal system due to the bureaucracy and the involvement of many agencies. This research provides a survey of

the problems related to the current processes of Authorization of Aquaculture in Federal Waterbodies and Environmental Licensing of the activity and develops a model that gathers theories for improving these processes. In order to do this, 68 questionnaires were applied to key-agents of the sector from different regions of the country. Also, a Grounded Theory methodology was used to organize, code, and analyze the data collected and to outline the model of the main emerging theories. The model reveals 17 major problems related to aquaculture regularization processes and makes 21 recommendations for improving and accelerating the current processes. Putting some of these actions into practice, it's believed that fish farming would be able to attract new and old interested parties, reducing many illegal enterprises and making the activity more sustainable.

KEYWORDS: aquaculture authorization; environmental licensing; Brazilian aquaculture management; grounded theory; qualitative research.

1 | INTRODUÇÃO

A produção aquícola brasileira vem crescendo nas últimas décadas (SEBRAE, 2015). Em 2017, foram produzidas mais de 690 mil toneladas (t), somente a piscicultura continental, representando um crescimento de quase 8% em relação ao ano anterior (PEIXEBR, 2018). Com destaque para a criação de tilápias em tanques-rede, que é realizada especialmente em águas da União (SCORVO FILHO *et al.*, 2010).

A aquicultura brasileira é tida como um setor do agronegócio bastante promissor (CNA, 2011). As perspectivas são muito boas. Calcula-se que a produção deverá crescer 52% acima do nível médio dos últimos anos até 2024 (OECD-FAO, 2015). Segundo a FAO (2013), o Brasil deve produzir 20 milhões de toneladas em 2030, tornando-se um dos maiores produtores mundiais de pescado.

Apesar dos números animadores, há muitos fatores que impedem essa expansão, tais como: a dificuldade na obtenção de licenças, a carência de assistência técnica, o manejo inadequado, a falta de padronização e de pesquisas na área (SIDONIO *et al.*, 2012a).

A regularização de projetos aquícolas em águas públicas é um desses principais fatores. Ela é muito morosa, dispendiosa e composta por um amplo conjunto de atos administrativos normativos regulamentadores (decretos, portarias, resoluções, etc.), muitas vezes conflitantes entre si (AYROZA *et al.*, 2006; 2008).

A aquicultura em reservatórios públicos também é afetada diretamente por leis referentes a solo, água, meio ambiente, conservação de recursos naturais, caça e pesca, sanidade animal, saúde pública, leis sanitárias, dentre outras (ELER e MILLANI, 2007). Além disso, envolve um grande número de instituições federais e estaduais (AYROZA e AYROZA, 2011).

A aquicultura é considerada uma atividade recente e que, por isso, exige maiores

informações e uma adequação da regulamentação atual para o seu desenvolvimento sustentado (AYROZA *et al.*, 2006; SIDONIO *et al.*, 2012b; GOULART *et al.*, 2013).

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar as principais dificuldades relacionadas ao atual processo de regularização nas atividades aquícolas praticadas em reservatórios públicos da União brasileira. E desenvolver um modelo que compila as principais medidas de mudança para um melhor ordenamento dos atuais processos de Cessão de Uso de Águas Públicas e de Licenciamento Ambiental dessa atividade, e favoreça um desenvolvimento sustentável desse setor.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho é fruto de uma metodologia de pesquisa qualitativa. Esta técnica é um método investigativo usado quando não se pode obter resultados através de procedimentos estatísticos ou outros meios de quantificação, pois os fenômenos são dinâmicos ou complexos, e as variáveis relevantes não são facilmente identificadas (CRESWELL, 2013; SALDAÑA, 2013; YIN, 2015).

A pesquisa foi realizada entre os meses de dezembro de 2016 e agosto de 2017, por meio de aplicação de um questionário composto por cinco perguntas abertas, a fim de possibilitar maior obtenção de dados qualitativos (CRESWELL, 2013; SALDAÑA, 2013; YIN, 2015).

Participaram desta, produtores de peixes, consultores técnicos, representantes de órgãos e entidades públicas ligadas à aquicultura e pesquisadores de renome no campo científico, selecionados por amostragem não probabilística (CRESWELL, 2013), de diferentes estados brasileiros, escolhidos por pesquisa bibliográfica com base em seus conhecimentos, percepções e experiências em relação aos objetivos desta pesquisa, ou por indicação dos outros participantes.

No primeiro momento, aplicou-se um questionário-piloto, que serviu de base para a construção e validação do definitivo. As respostas deste foram organizadas e codificadas conforme as técnicas de análise de conteúdo (BARDIN, 1977) e do “*Grounded Theory*” (CORBIN e STRAUSS, 2014), que realiza a análise sistemática de dados qualitativos coletados a partir de observações, questionários, entrevistas e estudos de caso, na qual uma teoria emerge de dados (CHAMAZ, 2006; CRESWELL, 2013; CORBIN e STRAUSS, 2014).

Esta parte do processo foi realizado com o auxílio do *software* da *SQR International Pty Ltd.*, o *NVivo™*, versão 10 (JOHNSTON, 2006), a fim de agrupar dados com similaridade, definir categorias e relacioná-las, formando a base para a teorização (CHAMAZ, 2006; CRESWELL, 2013; CORBIN e STRAUSS, 2014).

Depois, voltou-se ao campo, para aplicar o questionário definitivo com os demais participantes da pesquisa. Suas respostas também foram organizadas, codificadas e categorizadas a fim de criar novas categorias e confirmar ou modificar as categorias

originais, até ser atingido o ponto de saturação teórica, momento em que novas coletas de dados não trazem nenhum dado novo ou relevante, apenas repetem o que já foi dito (CORBIN e STRAUSS, 2014), encerrando a fase de aplicação dos questionários.

Para complementar e validar os dados primários, foram utilizados dados secundários a partir de artigos e livros (SALDAÑA, 2013; YIN, 2015) e realizada a análise comparativa constante dos dados, ações fundamentais do *Grounded Theory*, possibilitando o surgimento das teorias (CHAMAZ, 2006; CORBIN e STRAUSS, 2014).

E, a partir das teorias emergentes, a estrutura do modelo conceitual foi criada. Na sequência, voltou-se a entrevistar um terço dos participantes para validar o modelo proposto (CHAMAZ, 2006; CORBIN e STRAUSS, 2014).

3 | RESULTADOS

Ao todo, foram 68 questionários respondidos completamente, sendo 17 deles realizadas com produtores de peixes, de dez estados brasileiros; 17 com consultores técnicos, em sua maioria engenheiros de pesca, com média superior a quinze anos de experiência em elaboração de projetos e implantação de empreendimentos aquícolas; 17 com agentes institucionais de órgão públicos ligados ao desenvolvimento da pesca e aquicultura nacional; e outros 17 com pesquisadores brasileiros de renome em estudos sobre a aquicultura nacional.

A primeira pergunta do questionário indagava: *“Como você considera o desenvolvimento da atividade aquícola praticada nos reservatórios da União nos últimos anos? Por quê?”* A análise de conteúdo apontou que o desenvolvimento desse setor cresceu nos últimos anos. Contudo, esse crescimento tem se dado de forma lenta, abaixo do real potencial nacional, e ainda, com um grande número de produtores sem estar regularizado pelos órgãos competentes.

As duas questões seguintes, perguntava e pedia, respectivamente, ao entrevistado: *“Como você avalia o processo licenciamento ambiental e de solicitação de cessão de uso de águas de domínio da União para fins de aquicultura? Por quê?”*; e, *“Pontue os principais entraves desses processos.”*

Dentre os motivos declarados, estão: a grande morosidade na avaliação dos processos de cessão de uso e licenciamento ambiental; legislação complexa e burocrática; a falta de preparo das equipes responsáveis pela emissão das licenças e autorizações; instrumentos normativos obsoletos e que geram insegurança jurídica aos produtores; baixo número de estudos sobre os impactos ambientais gerados pela aquicultura; o alto custo; a ineficiência e a rigidez dos processos; dentre outros, ilustrados na Figura 1.



Figura 1. Representação dos pontos críticos do atual processo de regularização aquícola mais citados pelos entrevistados, em sentido anti-horário iniciando em “moroso”.

Fonte: Os autores.

De acordo com os dados levantados, os procedimentos atuais adotados no Brasil são ineficientes e compostos por muitas regras, etapas e exigências. Por exemplo: a obrigação de preenchimento de questionários que solicitam informações desnecessárias; a repetição de documentos apresentados nas diversas fases; a exigência de mapas com escalas de plantas incompatíveis com as impressoras atuais; modelagem de cálculo do número de gaiolas defasada; o esquema de sinalização e coordenadas exigidas no projeto pela Marinha incompatível com a modelagem moderna; insuficiência de estudos ambientais; a necessidade de anuência de vários órgãos da administração e de vigilância a uma série de normativas legais; dentre outros que geram tais características negativas ao processo.

Além disso, foi enfatizado que as constantes mudanças na estrutura política do setor – a extinção do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) em outubro de 2015, com a ligação da pasta de Secretaria de Aquicultura e Pesca ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); seu remanejamento para o Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDIC) em março de 2017; a volta da mesma para a Presidência da República em janeiro de 2018, com status de Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP); e agora o seu retorno ao MAPA em janeiro de 2019 – têm atrasado as apreciações dos processos de cessão de uso e gerado instabilidade e insegurança ao setor.

Outro ponto salientado foi a demora que levam os processos de cessão das áreas aquícolas tramitando dentro dos órgãos. Alguns entrevistados afirmaram que a análise de um processo pode passar de 10 anos, e mesmo assim, muitos não são deferidos, ou se deferem, liberam uma área pequena, o que inviabiliza a produção.

Os principais argumentos descritos pelos entrevistados para explicar tal morosidade estão no fato da necessidade de anuência por muitos órgãos distintos, muitas vezes conflitantes entre si, no processo ser totalmente físico, sem a

utilização de recursos digitais, e na falta de preparo dos técnicos responsáveis pelo licenciamento ambiental.

Foi apontado o despreparo e insegurança dos técnicos, devido pela falta de conhecimento teórico e prático da aquicultura, dos reais impactos dela, e que por isso, ficam com receio de assinarem os pareceres positivamente, apoiados no princípio da precaução, acabam por se omitirem ou exigirem documentos desnecessários, ou indeferem o pedido de licença. Tais atitudes geram uma sensação de descaso dos órgãos licenciadores com os aquicultores, e atribuem a característica de discricionariedade ao processo, ficando este à mercê das convicções subjetivas e ideológicas desses técnicos.

As duas últimas questões do questionário perguntavam: “O que poderia ser modificado (aspectos técnicos, legais, etc.) para melhorar tais processos?”; e “Como/ de que forma poderiam se dar essas alterações?”. As propostas mais representativas e relevantes feitas pelos respondentes da pesquisa, podem ser observadas na Tabela 1.

Revisar e/ou alterar a legislação vigente, federal e estaduais, para os processos de cessão de área e licenciamento ambiental, em especial, do atual Decreto nº 4.895/2003;
Publicar novos Decretos e outros atos normativos específicos alinhados à atual realidade do setor;
Reduzir a instabilidade política com relação às constantes mudanças da pasta;
Simplificar a análise dos processos, reduzindo os trâmites administrativos;
Reduzir o número de órgãos envolvidos na anuência das autorizações e licenças;
Criar um órgão único e específico de fiscalização, regulamentação e controle;
Padronizar a nível nacional os procedimentos e as normas dos licenciamentos ambientais estaduais;
Trazer o processo federal para o âmbito estadual ou mesmo municipal;
Promover uma maior interação e consonância das políticas públicas da União, estados e municípios, com facilitação da comunicação entre os órgãos competentes;
Informatizar o processo, pela implantação de um sistema eletrônico para a submissão dos projetos;
Estipular e fazer cumprir os prazos para a análise dos processos pelos órgãos licenciadores;
Capacitar os analistas ambientais sobre a atividade e seus impactos;
Aumentar o corpo técnico dos órgãos de licenciamento e de assistência técnica;
Ampliar o número de parcerias entre institutos de pesquisa e extensão e órgãos de meio ambiente;
Promover a assistência técnica aos aquicultores sobre as etapas, normas e critérios, provocando sua compreensão e, assim, a redução do número de processos submetidos incompletos ou inadequados;
Orientar os aquicultores sobre a atividade aquícola, seus impactos ambientais, boas práticas de manejo, medidas de biossegurança, etc.;
Tornar a gestão mais participativa, incluindo todos os interessados da atividade (governo, produtores, cooperativas, indústrias, extensionistas rurais, universidades, sociedade civil, etc.);
Reduzir o custo das taxas recolhidas nos processos;
Ampliar o número de casos sujeitos à dispensa de licitação e ao licenciamento simplificado;
Expandir os programas de acesso a crédito, fomento e assistência técnica aos aquicultores regularizados, viabilizando o acesso às tecnologias e investimentos;

Realizar um planejamento econômico-financeiro para a aquicultura a curto e longo prazo a fim de estimular a expansão da atividade, a geração de emprego e renda, etc.;
Realizar mais estudos ambientais;
Garantir a observação às normas ambientais pelos empreendimentos aquícolas;
Garantir o monitoramento e à fiscalização ambiental pelos órgãos responsáveis.

Tabela 1. Principais propostas apresentadas nos questionários para aperfeiçoar os processos de Licenciamento Ambiental e Cessão de Uso das Águas da União para Fins de Aquicultura no Brasil.

Fonte: Os autores.

Tais propostas são direcionadas aos órgãos responsáveis pelo planejamento, gestão e controle da atividade de piscicultura praticada em reservatórios da União brasileira e, consideradas pelos entrevistados, de grande importância e necessidade na resolução dos problemas relacionados aos atuais processos de Cessão de Uso de Águas Públicas e de Licenciamento Ambiental dessa atividade.

Somando as considerações mais representativas e relevantes dadas pelos participantes da pesquisa às considerações feitas por parte destes durante a etapa de validação e à fase de corroboração por pesquisas bibliográficas e pelo conhecimento teórico-prático dos autores da pesquisa, conforme as recomendações do *Grounded Theory* de Corbin e Strauss (2014), foi possível construir o modelo (Figura 2) com 21 propostas necessárias para aprimorar o processo de regularização de empreendimentos aquícolas localizados em águas da União brasileira.

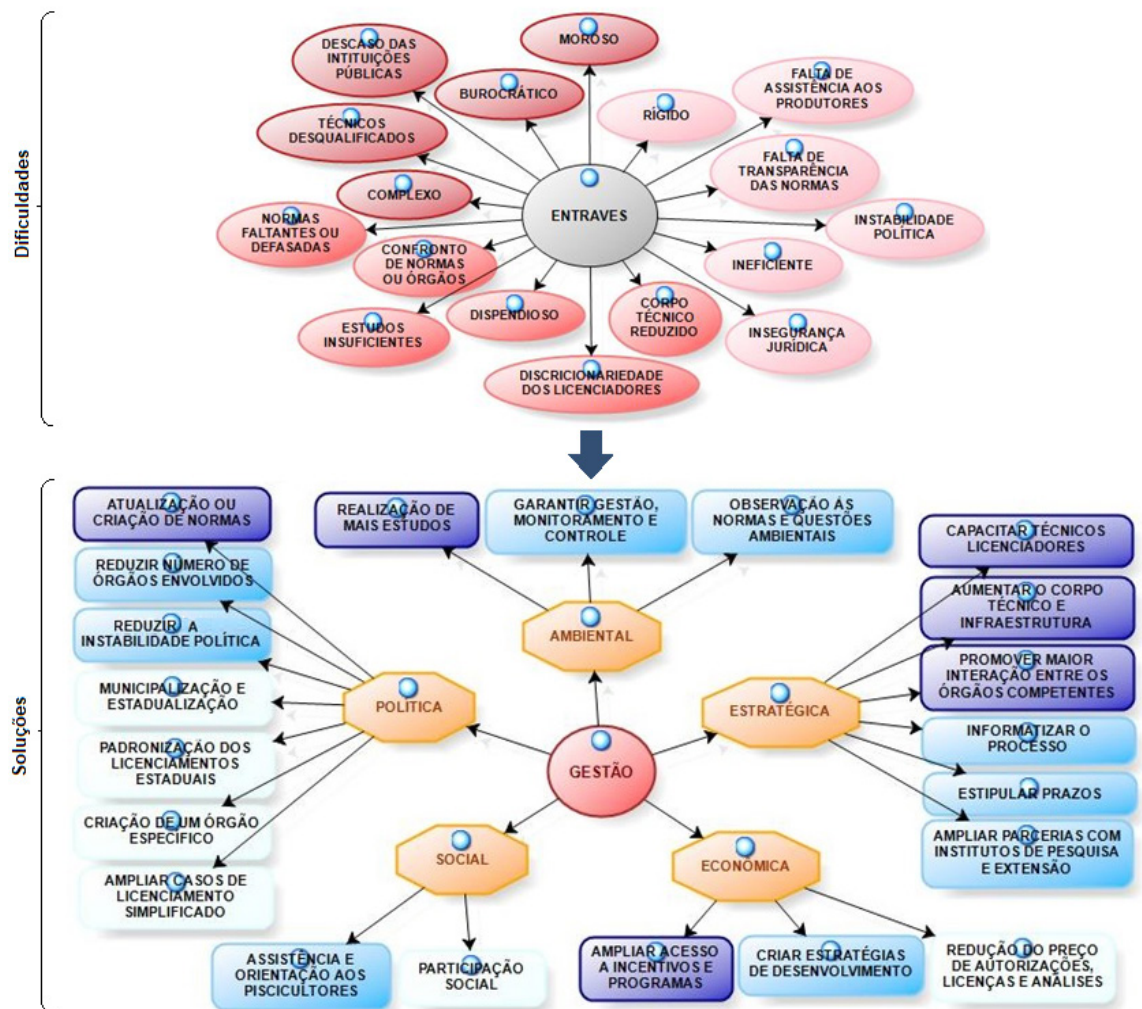


Figura 2. Modelo para o aperfeiçoamento da conformação da aquicultura continental realizada em reservatórios da União brasileira

Legenda: Quanto mais intensa a cor azul, maior a relevância do atributo.

Fonte: Os autores.

4 | DISCUSSÃO

O *Grounded Theory* é uma metodologia única devido ao caráter holístico e interativo de seus princípios (comparação constante, codificação, amostragem e saturação teórica), que permite o pesquisador desenvolver a teoria (O'REILLY *et al.*, 2012). Neste caso, o seu uso permitiu uma profunda compreensão dos fenômenos aqui investigados e facilitou a categorização dos dados para que as associações e interpretações fossem mais claras e compreensíveis (CORBIN e STRAUSS, 2014), possibilitando a construção do modelo.

Durante o processo de estruturação do modelo, notou-se que a palavra-chave da teoria emergente era “*Gestão*”. Assim, este foi definido como ponto central do desenho. A partir deste, ramificaram-se as atividades que precisam ser reparadas ou implantadas para melhorar e dinamizar os processos de licenciamento ambiental e cessão de uso das águas da união para fins de aquicultura.

As propostas foram ilustradas nas caixas retangulares de coloração azul do modelo. Quanto mais intensa a cor azul, maior o número de vezes que está proposição foi citada por diferentes respondentes do questionário, e por isso, classificada como de maior relevância para o estudo. E, de acordo com o assunto, estas foram subdivididas em cinco grandes áreas: Política, Social, Econômica, Estratégica e Ambiental.

Essas grandes áreas não são independentes. Pelo contrário, elas são conexas entre si. Visto que, por exemplo, muitas das medidas estratégicas e econômicas estão condicionadas às políticas para a liberação de recursos. Como também, as políticas devem atender às questões ambientais. Ou ainda, ações sociais são previstas em programas econômicos.

As propostas desse modelo constituem um conjunto de ações de planejamento e gestão que permitem uma melhor orientação no estabelecimento do conjunto de normas necessárias, neste cenário atual, e um funcionamento equilibrado, dinâmico e sustentável da atividade aquícola. E ainda, propiciam a redução de riscos e custos e garantem uma produção com uma maior qualidade e segurança ao meio ambiente, e suas informações constituem elementos fundamentais na tomada de decisão das organizações públicas. Assim, as ações propostas por este, são direcionadas aos órgãos legislativos e executivos responsáveis pelo desenvolvimento da atividade, tais como Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretarias de Meio Ambiente, dentre outros.

A implantação imediata de todas as 21 propostas pelos órgãos responsáveis demandaria muito estudo, tempo e recursos. Assim, sugere-se inicialmente, a adoção de pelo menos, das propostas mais relevantes (em azul mais escuro na Figura 2), evidenciaria um grande passo na reformulação da atual aquícola brasileira.

Por exemplo, relacionados às gestões social e econômica, têm-se as urgências na ampliação dos programas de capacitação e assistência técnica aos aquícolas e de acesso a créditos, visto que, diante dos muitos problemas da atividade aquícola brasileira (AYROSA *et al.*, 2006; 2008; DOTTI *et al.*, 2012; SIDONIO *et al.*, 2012a; 2012b), os produtores sentem-se desestimulados na atividade, pois a condição de informalidade geram multas e embargos e impede que estes recebam capacitação, créditos e investimentos públicos (AYROSA *et al.*, 2006; OSTRENSKY *et al.*, 2008; DOTTI *et al.*, 2012; BRABO *et al.*, 2017).

De ordem estratégica, são indispensáveis as medidas relacionadas à capacitação dos analistas ambientais e os gestores responsáveis pela emissão das licenças ambientais, a fim de limitar as responsabilidades na aplicação do licenciamento ambiental, reduzindo a discricionariedade e insegurança jurídica destes (OSTRENSKY *et al.*, 2008; HOFMANN, 2015; BRABO *et al.*, 2017). Bem como a ampliação do seu corpo técnico, a fim estruturar e aprimorar as ações de fiscalização, monitoramento e controle da atividade aquícola (HOFMANN, 2015; BRABO *et al.*, 2017).

Em relação ao impacto da atividade ao meio ambiente, sabe-se que a mesma ocasiona diversos problemas ambientais, diretos e indiretos, como a diminuição da biodiversidade, alterações no ciclo hidrológico (TUNDISI, 2006), alteração da qualidade de água (MACEDO e SIPAÚBA-TAVARES, 2010), efeitos colaterais do uso de antibióticos (SEBRAE, 2015), propagação de espécies invasoras, (VITULE *et al.*, 2009; ATTAYDE *et al.*, 2011; SIMBERLOFF *et al.*, 2013), alteração da disponibilidade hídrica para abastecimento público, o aumento dos custos de tratamento da água, prejuízos à atividades econômicas e à saúde humana, dentre outros (TUNDISI, 2008).

Falando de impactos, sabe-se que muitos dos produtores que buscam a formalização de seus negócios decidem aguardar o deferimento de suas autorizações produzindo, na expectativa de se regularizarem logo. No entanto, seus processos se arrastam por muitos anos (AYROZA *et al.*, 2008; BRABO *et al.*, 2014). Esta situação, somada aos produtores irregulares que não buscam a legalização de seus empreendimentos e à rápida e desordenada expansão da aquicultura, tem causado preocupação quanto aos impactos que essa atividade pode causar ao meio ambiente (CARVALHO e RAMOS, 2010).

Diante disso, das medidas propostas relacionadas à gestão ambiental, destaca-se a indispensabilidade de constantes estudos nos reservatórios públicos onde haja cultivos de peixes. Como: eutrofização de corpos hídricos (MACEDO e SIPAÚBA-TAVARES, 2010), avaliação de impactos ambientais, pesquisa e desenvolvimento (P&D) (SIDONIO *et al.*, 2012b) e, principalmente, a avaliação da capacidade suporte de tais corpos hídricos (DAVID *et al.*, 2015; BUENO *et al.*, 2017; CANZI *et al.*, 2017) e outras medidas de controle, planejamento, organização e implementação de aquicultura em reservatórios de forma sensível e sustentável (BRABO *et al.*, 2014).

Cabe salientar que, uma parcela dos entrevistados, principalmente de pesquisadores, argumentou que a legislação sobre a aquicultura praticada em tanques-rede em águas públicas estimula a produção de peixes não-nativos. Isso é fato. No Brasil, a espécie de peixe que domina a produção é exótica, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), responsável por mais de 87% de todas as solicitações de cessão de uso de águas da União (MPA, 2015) e quase metade da produção pesqueira dos últimos anos (IBGE, 2015; 2016).

Esses entrevistados enfatizaram a necessidade de haver incentivos para ampliar a produção de espécies nativas ou até mesmo restringir o cultivo de peixes não-nativos a somente tanques escavados, de forma evitar escapes, disseminação de doenças e outros impactos ambientais causados pela disseminação das espécies exóticas (VITULE *et al.*, 2009; ATTAYDE *et al.*, 2011; SIMBERLOFF *et al.*, 2013; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; AZEVEDO-SANTOS *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2016), a fim de garantir com maior segurança ambiental uma produção sustentável.

Por outro lado, também foi declarado, por outros grupos de entrevistados, em especial, produtores e consultores técnicos, que a piscicultura praticada em tanques-

rede, responsável por mais de 80% dos pedidos de autorização e licenciamento em águas da União (AYROZA, 2012), é vista como uma atividade de baixa degradação ambiental, uma vez que ela não extrai água e sua produção atual, 580 mil t (IBGE, 2016), em águas continentais da União está bem abaixo da capacidade de suporte estimada pela Agência Nacional de Águas (ANA), que é de cerca de dois milhões de toneladas/ano (MPA, 2015).

A literatura também confirma que se esta atividade é bem manejada, respeitando as capacidades de suporte, pode ser desenvolvida de forma sustentável (CYRINO *et al.*, 2010; DIEMER *et al.*, 2010; CARVALHO e RAMOS, 2010) e gerando impactos socioeconômicos positivos, como o ganho financeiro com a venda do pescado; e geração de trabalho e renda aos pequenos produtores da região (HENRY-SILVA e CAMARGO, 2008).

Esses contrassensos ressaltam a importância de se realizarem mais estudos relacionados ao ambiente aquático e à aquicultura (SIDONIO *et al.*, 2012a), a fim de se obter, em alguns anos, a análise da evolução da qualidade da água, dos impactos causados pela atividade, além de ajudar a estabelecer claramente os critérios de avaliação dos impactos da aquicultura e dar suporte à gestão ambiental da aquicultura (ELER e MILLANI, 2007) e aos analistas técnicos e ambientais nos processos de licenciamento ambiental e cessão de uso.

Por fim, de ordem política, é necessário somar todas essas informações coletadas, mudar as políticas institucionais e construir uma governança que gere resultados positivos nos arranjos produtivos das organizações e instituições gerando resultados favoráveis à gestão responsável dos recursos naturais (TIAGO e GIANESELLA, 2003; TIAGO e CIPOLLI, 2010), a fim de tornar a aquicultura um instrumento prioritário no combate à pobreza e na promoção de segurança alimentar (SIDONIO *et al.*, 2012a).

Para isso o governo (órgãos legislativos e executivos responsáveis pelo desenvolvimento da atividade, tais como Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretarias de Meio Ambiente, dentre outros) deve adotar políticas de incentivo, promoção e fomento da atividade; implementar leis e fiscalização; apoiar e investir em P&D e atividades de extensão; adequar a infraestrutura produtiva; buscar o desenvolvimento de novas tecnologias; exigir boas práticas de produção e segurança alimentar (SIDONIO *et al.*, 2012b); e inserir uma legislação ambiental que norteie a busca pelo desenvolvimento sustentável (ELER e MILLANI, 2007).

Para Ayroza (2012) as atividades de regularização dos empreendimentos de piscicultura devem direcionar a atividade para a viabilidade econômica com sustentabilidade ambiental, evitar o conflito no uso dos recursos hídricos e promover o desenvolvimento regional.

Após o estabelecimento da maioria dessas medidas iniciais, a adoção aos poucos das demais propostas de cada grande área, consolidaria o avanço da modernização desse setor (SIDONIO *et al.*, 2012a), trazendo maior agilidade e transparência aos

processos, o que possivelmente atrairia novos e antigos interessados a entrarem de forma regular na atividade (CAVALLI et al., 2011).

Logo, a formalização dos empreendimentos aquícolas, resultado secundário esperado por este trabalho, provocaria uma sucessão de eventos positivos no setor, diretos e indiretos, tais como: maior conscientização dos aquicultores; a redução do número de empreendimentos ilegais; a facilitação do acesso a créditos e investimentos públicos; a geração de novos empregos e aumento da renda; a possibilidade do país tornar-se autossuficiente na produção de pescado e insumos, substituindo as importações pela produção nacional; dentre outros que contribuiriam para um desenvolvimento mais dinâmico e sustentável da produção nacional de pescados (BOYD, 1999; ASSAD e BURSZTYN, 2000; VALENTI, 2000).

Vale ressaltar que após a regularização de empreendimentos aquícolas em águas públicas da União, é muito importante que sejam realizados monitoramentos sistemáticos da qualidade da água destes corpos hídricos, a fim de manter a qualidade do corpo hídrico, evitando fatos como o aporte de nutrientes no reservatório e doenças. Caso contrário, esses empreendimentos podem acarretar degradação ambiental.

5 | CONCLUSÕES

O modelo proposto foi aceito pelos avaliadores e por isso, considerado válido quanto a seu conteúdo, compreensão, originalidade, poder de generalização, abstração e aplicabilidade, desenvolvido com base nos critérios estabelecidos pela técnica da *Grounded Theory*. Tais considerações apontadas pelo modelo, não só se justificam, como demonstram o quanto são indispensáveis pesquisas como esta.

A pesquisa abordou especialmente os aspectos relacionadas à regulamentação do licenciamento ambiental e cessão de uso de águas da União para fins de atividade aquícola, e a maior parte das ações propostas por este trabalho estão à dimensão político-institucional. Por isso, sugere-se que sejam realizados estudos complementares sobre os demais gargalos da aquicultura nas demais dimensões e aspectos, para que seja melhorado o planejamento e ordenamento de toda a cadeia produtiva.

Além disso, este trabalho é fruto de uma pesquisa qualitativa, um método investigativo usado quando não se pode obter resultados através de procedimentos estatísticos ou outros meios de quantificação, pois os fenômenos são dinâmicos ou complexos, e as variáveis relevantes não são facilmente identificadas. Assim, outros estudos do tipo quantitativo podem ser realizados também a fim de corroborar e complementar as informações trazidas por este estudo.

Outra coisa que cabe ser destacada é que, apesar do compromisso pela busca contínua para a melhoria da elaboração da teoria derivada de dados, fazendo revisões contínuas e aprimorando a análise desta, há a possibilidade de incompletude da

construção teórica, representada por brechas e falhas que a integração da teoria pode apresentar. Somente com a aplicação destas propostas, transformando-as assim em práticas, é que se pode avaliar a completude ou não desta.

A perspectiva, é que este modelo seja utilizado, o quanto antes, à nível nacional, gerando a redução do número de empreendimentos ilegais e permitindo que anualmente um maior número de empreendimentos aquícolas nacionais adquiram suas licenças e autorizações, contribuindo para uma expansão mais ordenada, equilibrado e sustentável da aquicultura, e provocando as demais mudanças positivas ao setor aqui acreditadas.

Por fim, conclui-se que esta pesquisa alcançou os objetivos traçados, pois auxiliou na compreensão das atuais dificuldades relacionadas à regulamentação da atividade aquícola praticada em reservatórios públicos brasileiros, especialmente dos relacionados ao processo de obtenção da cessão de uso e do licenciamento ambiental, e propôs algumas soluções para essas dificuldades que precisam ser superadas no alcance do seu desenvolvimento sustentável.

Este trabalho pode se somar a outros estudos e auxiliar na construção de panoramas, na formação de opinião e nas tomadas de decisão de governança públicas, como mudanças de políticas e construção de instrumentos normativos que visam o seu desenvolvimento sustentado; e quem sabe, tornar a aquicultura praticada em reservatórios da União brasileira numa atividade econômica de grande expressão no PIB nacional, assim como ocorre nas produções de carnes bovinas, avícolas e suínas; e torná-la, assim, um instrumento na promoção da alimentação saudável à base de peixes, no combate à fome e à pobreza, na promoção da segurança alimentar, na geração de emprego e renda, e na preservação dos recursos naturais.

6 | AGRADECIMENTOS

Aos respondentes do questionário pela colaboração. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo do primeiro autor. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em pesquisa do último autor.

REFERÊNCIAS

ASSAD, L.T.; BURSZTYN, M. **Aqüicultura Sustentável**. In: Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia, 303–323. 2000.

ATTAYDE, J.L., BRASIL, J., MENESCAL, R.A. **Impacts of introducing Nile tilapia on the fisheries of a tropical reservoir in North-eastern Brazil**. *Fisheries Management & Ecology*, 18 (6): 437–443. 2011. doi: 10.1111/j.1365-2400.2011.00796.x.

AYROZA, D. M. M. de R. **Características limnológicas em áreas sob influência de piscicultura em tanques-rede no reservatório da UHE Chavantes, Rio Paranapanema, SE/S, Brasil**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da

UNESP - CAUNESP, Jaboticabal –SP. 2012.

AYROZA, D. M.M.R.; AYROZA, L. M. S. **Regularization of Aquacultural Operation**. In: Carolina Bilibio; Oliver Hensel; Jeferson Selbach. Sustainable water management in the tropics and subtropics and case studies in Brazil. 1ed. Jaguarão/RS: Fundação Universidade Federal do Pampa, UNIKASSEL, 703-732. 2011.

AYROZA, D.M.M.R.; FURLANETO, F.P.B.; AYROZA, L.M. S. **Regularização de projetos de piscicultura no estado de São Paulo**. *Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária [Online]*, 1(1): 33-41. 2008. URL: <http://www.apta.sp.gov.br/Publicacoes/T&IA/T&IAv1n1/Revista_Apta_Artigo_115.pdf>

AYROZA, D.M.M.R.; FURLANETO, F.P.B; AYROZA, L.M.S. **Regularização dos projetos de tanques-rede em águas públicas continentais de domínio da União no Estado de São Paulo**. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 36, 1-32. 2006.

AZEVEDO-SANTOS, V. M.; PELICICE, F. M.; LIMA-JUNIOR, D. P.; MAGALHÃES, A. L. B.; ORSIE, M. L.; VITULEF, J. R. S.; AGOSTINHO, A. A. **How to avoid fish introductions in Brazil: education and information as alternatives**. *Natureza & Conservação*, 13 (2): 123-132. 2015. doi 10.1016/j.ncon.2015.06.002

BARDIN, L. **Análise de conteúdo**. Lisboa: Edições 70. 1977. 226p.

BOYD, C.E. **Aquaculture sustainable and environmental issues**. *World Aquaculture*, 30(2): 10-13. 1999.

BRABO, M. F.; VERAS, G. C.; PAIVA, R. S.; FUJIMOTO, R. Y. **Aproveitamento aquícola dos grandes reservatórios brasileiros**. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 40(1): 121 – 134. 2014.

BRABO, M.F.; PEREIRA, L.F.S.; SANTANA, J.V.M.; CAMPELO, D.A.V.; VERAS, G.C. **Visão técnica da gestão ambiental da piscicultura no nordeste do estado do Pará**. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, 5 (2): 11-18. 2017. doi: 10.2312/ActaFish.2017.5.2.11-18

BRASIL. **DECRETO Nº 4.895**, de 25 de novembro de 2003. Dispõe sobre a autorização de uso de espaços físicos de corpos d'água de domínio da União para fins de aquicultura, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, Brasília, 25 de novembro de 2003, nº. 22, Seção 1, p. 2.

BUENO, G.W.; BUREAU, D.; SKIPPER-HORTON, J.O.; ROUBACH, R.; MATTOS, F.T.; BERNAL, F.E.M. **Modelagem matemática para gestão da capacidade de suportede empreendimentos aquícolas em lagos e reservatórios**. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 52(9): 695-706. 2017. doi: 10.1590/S0100-204X2017000900001

CANZI, C.; ROUBACH, R.; BENASSI, S.F.; MATOS, F.T.; MOTTER, I.; BUENO, G.W. **Selection of sites for establishing aquaculture parks, and estimation of fish production carrying capacity, for a tropical reservoir in South America**. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, 20: 1–13. 2017. doi: 10.1111/lre.12168

CARVALHO, E.D.; RAMOS, I.P. **A Aquicultura em grandes represas Brasileiras: Interfaces ambientais, socioeconômicas e sustentabilidade**. *Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia*, 38(1): 49-57. 2010.

CAVALLI, R.O.; DOMINGUES, E.C.; HAMILTON, S. **Desenvolvimento da produção de peixes em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(supl. especial): 155-164. 2011.

CHAMAZ, K. **Constructing Grounded Theory: A Practical Guide Through Qualitative Analysis**. London: Sage Publications. 2006. 208 p.

- CNA. **Diagnóstico nacional da atividade aquícola**. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil – CNA, Brasília/DF. 2011. 12p.
- CORBIN, J.; STRAUSS, A. **Basics of Qualitative Research: Techniques and Procedures for Developing Grounded Theory**. 4th ed. Thousand Oaks, CA: Sage Publications. 2014. 456 p.
- CRESWELL, J. W. **Qualitative Inquiry and Research Design: choosing among five approaches**. 3rd ed. Thousand Oaks, CA: Sage Publications. 2013. 448 p.
- CYRINO, J.E.P.; BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K. **A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39 (suplemento especial): 68-87. 2010.
- DAVID, G.S.; CARVALHO, E.D.; LEMOS, D.; SILVEIRA, A.N.; DALL'AGLIO-SOBRINHO, M. **Ecological carrying capacity for intensive tilapia (*Oreochromis niloticus*) cage aquaculture in a large hydroelectrical reservoir in Southeastern Brazil**. *Aquacultural Engineering*, 36: 30-40. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2015.02.003>
- DIEMER, O.; NEU, D.H.; FEIDEN, A.; LORENZ, E.K.; BITTENCOURT, F.; BOSCOLO, W.R. **Dinâmica nictimeral e vertical das características limnológicas em ambiente de criação de peixes em tanquesrede**. *Ciência Animal Brasileira*, 11(1): 2431. 2010. doi: 10.5216/cab.v11i1.6754
- DOTTI, A.; VALEJO, P.A.P.; RUSSO, M. R. **Licenciamento ambiental na piscicultura com enfoque na pequena propriedade: uma ferramenta de gestão ambiental**. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 3(1): 6-16. 2012. doi: 10.6008/ESS2179-6858.2012.001.0001
- ELER, M.N.; MILLANI, T.J. **Métodos de estudos de sustentabilidade aplicados a aquicultura**. *Revista Brasileira de Zootecnia [Online]*, 36 (suplemento especial): 33-44. 2007. URL: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982007001000004>>.
- FAO. **Statistical Yearbook 2013**. Food and Agriculture Organization of the United Nations World Food and Agriculture – FAO, Rome. 2013. 289p.
- GOULART, M.C.F.; MERINO, E.A.D.; MERINO, G.S.A.D. **Gestão de design na maricultura como fator estratégico para a competitividade**. *Strategic Design Research Journal*, 6(3): 127-136. 2013. doi: 10.4013/sdrj.2013.63.04
- HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M. **Impacto das atividades de aquicultura e sistemas de tratamento de efluentes com macrófitas aquáticas – relato de caso**. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 34(1): 163-173. 2008.
- HOFMANN, R.M. **Gargalos do licenciamento ambiental federal no Brasil**. Câmara dos Deputados, Brasília/DF. 2015. 111p.
- IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, Rio de Janeiro, RJ, 43: 1-39. 2015.
- IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, Rio de Janeiro, RJ, 44: 1-53. 2016.
- JOHNSTON, L. **Software and Method: Reflections on Teaching and Using QSR NVivo in Doctoral Research**. *International Journal of Social Research Methodology*, 9(5): 379-391. 2006. <https://doi.org/10.1080/13645570600659433>
- LIMA, L.B.; OLIVEIRA, F.J.M.; GIACOMINI, H.C.; LIMA-JUNIOR, D.P. **Expansion of aquaculture parks and the increasing risk of non-native species invasions in Brazil**. *Reviews in Aquaculture*,

LIMA-JÚNIOR, D.P.; LIMA, L.B.; VITULE, J.R.S.; ORSI, M.L.; AZEVEDOSANTOS, V.M. **Modificação das diretrizes do CONAMA nº 413/2009 sobre licenciamento ambiental da aquicultura: retirando os “obstáculos normativos” para a criação de espécies não nativas em águas brasileiras.** Associação Brasileira de Limnologia. *Boletim ABLimmo*, 40(2): 3-11. 2014.

MACEDO, C.F.; SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações.** *Boletim do Instituto de Pesca*, 36(2): 149-163. 2010.

MPA. Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira - 2015/2020. Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA, Brasília, DF. 2015. 61 p.

O'REILLY, K.; PAPER, D.; MARX, S. **Demystifying Grounded Theory for Business Research.** *Organizational Research Methods*, 15(2): 247–262. 2012. doi: 10.1177/1094428111434559

OECD/FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015-2024.** Organization for Economic Co-operation and Development – OECD & Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO Publishing, Paris. 2015. 148p.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer.** Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca/Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, Brasília: [s.n.]. 2008. 276p.

PEIXEBR. **Anuário PeixeBR da Piscicultura 2018.** PeixeBR Associação Brasileira da Piscicultura. Edição Texto Comunicação Corporativa. São Paulo/SP. 2018.

SALDAÑA, J. **The Coding Manual for Qualitative Researchers.** 2nd ed. Thousand Oaks, CA: Sage Publications. 2013. 328p.

SCORVO FILHO, J.D.; FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; ALVES, J.M.C.; SOUZA, F.R.A. **A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(suplemento especial): 112-118. 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001300013>.

SEBRAE. **Aquicultura no Brasil - série estudos mercadológicos.** Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE, Brasília/DF. 2015. 76p.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; LIMA, J.; BURNS, V.; JÚNIOR, A.J.A.; AMARAL, J. V. **Experiências internacionais aquícolas e oportunidades de desenvolvimento da aquicultura no Brasil: proposta de inserção do BNDES.** Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES). *Agroindústria, BNDES Setorial*, 36(1): 179-218. 2012b.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; JÚNIOR, A.J.A.; MUNGIOLI, R. **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades.** Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES). *Agroindústria, BNDES Setorial*, 35(1): 421-463. 2012a.

SIMBERLOFF, D.; MARTIN, J.L.; GENOVESI, P, MARIS, V.; WARDLE, D.A.; ARONSON, J.; COURCHAMP, F.; GALIL, B.; GARCÍA-BERTHOU, E.; PASCAL, M.; PYŠEK, P.; SOUSA, R.; TABACCHI, E.; VILÀ, M. **Impacts of biological invasions: what's what and the way forward.** *Trends in Ecology & Evolution*, 28(1): 58-66. 2013. doi: 10.1016/j.tree.2012.07.013

TIAGO, G.G.; CIPOLLI, M.N. **Análise Interdisciplinar da Governança Ambiental da Aquicultura na Região Metropolitana de São Paulo.** *Boletim do Instituto de Pesca*, 36(1): 123-133. 2010.

TIAGO, G.G.; GIANESELLA, S.M.F. **O uso da água pela aquicultura: Estratégias e ferramentas de implementação de gestão.** *Boletim do Instituto de Pesca*, 29(1): 1-7. 2003.

- TUNDISI, J.G. Novas perspectivas para a gestão dos recursos hídricos. *Revista USP*, São Paulo, 70, 24-35. 2006. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2316-9036.v0i70p24-35>
- TUNDISI, J.G. Recursos hídricos no futuro dos Recursos: problemas e soluções. *Estudos avançados [online]*, 22(63): 7-16. 2008. URL: www.scielo.br/pdf/ea/v22n63/v22n63a02.pdf
- VALENTI, W.C. **Aquaculture for sustainable development**. In: VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. *Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia. 17-24. 2000.
- VITULE, J.R.S., FREIRE, C.A., SIMBERLOFF, D.. **Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad**. *Fish and Fisheries*, 10: 98-108. 2009. doi: 10.1111/j.1467-2979.2008.00312.x
- YIN, R.K. **Qualitative research from start to finish**. 2nd ed. Guilford Press. 2015. 386p.

NOVA VARIEDADE SEMINAL DE *STEVIA REBAUDIANA*: OBTENÇÃO DE FRAÇÕES COM ALTO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FOLHAS

Paula Gimenez Milani

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica
Maringá – Paraná

Maysa Formigoni

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica
Maringá – Paraná

Antonio Sergio Dacome

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica
Maringá – Paraná

Livia Benossi

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica
Maringá – Paraná

Maria Rosa Trentin Zorzenon

Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós graduação em Ciência de Alimentos
Maringá – Paraná

Simone Rocha Ciotta

Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós graduação em Ciência de Alimentos

Cecília Edna Mareze da Costa

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Fisiológicas
Maringá – Paraná

Silvio Claudio da Costa

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica
Maringá – Paraná

RESUMO: O objetivo deste estudo foi determinar a composição e o potencial antioxidante de folhas de uma nova variedade de *Stevia rebaudiana* (Stevia UEM-13). Folhas de estévia UEM-13 contêm rebaudiosídeo A como o glicosídeo principal, enquanto que a maioria das plantas de estévia selvagens contêm o esteviosídeo. Além disso pode ser multiplicado por semente, o que reduz o custo de técnicas de cultura de plantas como outras variedades clonais são multiplicados por botões, que exigem sistemas de produção de plântulas sofisticados e dispendiosos. O etanol e o metanol foram usados na extração para determinar os compostos bioativos. O extrato metanólico foi fracionado sequencialmente com hexano, clorofórmio, acetato de etilo e isobutanol, e a concentração mais elevada de compostos fenólicos e flavonoides foi obtido na fração acetato de etilo (524,20 mg de ácido gálico equivalente / g; 380,62 µg quercetina equivalente / g). O conteúdo de glicosídeos variou bastante entre as frações (0,5% - 65,3%). O maior potencial antioxidante foi encontrado no extrato metanólico e a fração de acetato de etila com 93,5% e 97,32%, respectivamente. Além de ser uma excelente fonte para a obtenção de extratos ricos em glicosídeos, esta nova variedade pode também ser usada como matéria-prima para a produção de extratos ou frações com uma quantidade significativa de

atividade antioxidante e potencial para serem utilizados como aditivos em alimentos.

Palavras-chave: Compostos bioativos, glicosídeos, extratos de folhas, compostos fenólicos, nova cultura de célula.

NEW SEMINAL VARIETY OF *STEVIA REBAUDIANA*: OBTAINING FRACTIONS WITH HIGH ANTIOXIDANT POTENTIAL OF LEAVES

ABSTRACT: The aim of this study was to determine the composition and antioxidant potential of leaves of a new variety of *Stevia rebaudiana* (Stevia UEM-13). Stevia leaves of UEM-13 contain rebaudioside A as the main glycoside, while most wild Stevia plants contain stevioside. Furthermore, can be multiplied by seed, which reduces the cost of plant culture techniques as other clonal varieties are multiplied by buds, requiring sophisticated and expensive seedling production systems. Ethanol and methanol were used in the extraction to determine the bioactive compounds. The methanolic extract was fractionated sequentially with hexane, chloroform, ethyl acetate and isobutanol, and the highest concentration of phenolic compounds and flavonoids was obtained in the ethyl acetate fraction (524.20 mg galic acid equivalent/g; 380.62 μ g quercetin equivalent/g). The glycoside content varied greatly among the fractions (0.5% - 65.3%). Higher antioxidant potential was found in the methanol extract and the ethyl acetate fraction with 93.5% and 97.32%, respectively. In addition to being an excellent source for obtaining of extracts rich in glycoside, this new variety can also be used as raw material for the production of extracts or fractions with a significant amount of antioxidant activity and potential to be used as additives in food.

KEYWORDS: Bioactive compounds, glycosides, leaf extracts, phenolic compounds, new cultivar of Stevia.

1 | INTRODUCTION

The chapter in question was previously published as an article in the journal Anais da Academia Brasileira de Ciências, volume 89 (3), no ano de 2017 (doi 10.1590/0001-3765201720170174). Plants are an important source of structurally different active natural products and biological properties. These active ingredients can play adjuvant and important roles in traditional medicine in many countries (Tadhani *et al.*, 2007). The beneficial effects are produced by different active ingredients and other compounds of low molecular weight such as vitamins, carotenoids, flavonoids, anthocyanins, tannins and other phenolic compounds (Tadhani *et al.*, 2007; WöLwer-Rieck, 2012), which have different mechanisms of action. It is known that phenolic compounds and flavonoids are important for the normal development and protection of plants (WöLwer-Rieck, 2012), but their high antioxidant activity as food additives for humans must still be further investigated.

Stevia rebaudiana Bertoni, a plant from the Asteraceae family, is native to

Paraguay and it is cultivated in many countries, including Brazil, Argentina, Japan, China, the United States and European countries (Dacome *et al.*, 2005). It is important in the food industry because the leaves contain sweet-tasting diterpene glycosides, among which stevioside and rebaudioside A (RebA) are included (Carakostas *et al.*, 2008). These glycosides are 450 times sweeter than sucrose (Williams e Burdock, 2009), which has led to commercial interest, mainly for food and beverages. The Stevia plants have more than 100 compounds (WöLwer-Rieck, 2012) and extracts from the leaves have been traditionally used in the treatment of diseases such as diabetes (Tadhani *et al.*, 2007; Shukla, S. *et al.*, 2009). Stevia extracts can exert beneficial effects on human health, including anti-hypertension (Chan *et al.*, 2000) and anti-hyperglycemic effects (Abudula *et al.*, 2008), antiviral activities against the human rotavirus, it is not cariogenic and has beneficial properties for glucose metabolism and renal function (Shukla, Shruti *et al.*, 2009). The beneficial effects of these compounds on human health have been previously studied. Research aimed at obtaining Stevia extracts containing significant levels of sweeteners and these compounds (Kaushik *et al.*, 2010; Gawel-Bęben *et al.*, 2015). The results showed that there is still no consensus on the ideal method of obtaining both compounds (sweeteners and bioactive compounds) in significant concentrations.

The composition of Stevia leaf extracts and the concentration of these bioactive compounds vary according to the solvents used and the different types of extraction methods. Significant results were found in the ethanol and methanol extracts and ethyl acetate solvents (Shukla, Shruti *et al.*, 2009; WöLwer-Rieck, 2012). However, further studies should be conducted on different varieties of plants and improved extraction methods need to be developed for better results. In addition, more studies should be conducted in order to obtain the best method and the best fractions of the bioactive compounds from stevia are present in higher concentrations. The Center for Studies in Natural Products (NEPRON), State University of Maringá (UEM) started in 1990 studies in order to obtain sweeteners or stevia extracts with high levels of RebA, sweetener better sensory profile than stevioside. The first projects (“Biotechnological Applications of *Stevia rebaudiana* Products (Bert.) Bertoni”) resulted in the development of a selection of stevia plants with high content of this glycoside. The research resulted in obtaining two varieties M1 Alvarez and Stevia UEM-320, the latter forward three times as RebA compared with a variety of wild-type plant, and therefore the majority glycoside in the plant selected (Alvarez e Couto, 1984).

The cultivation of these clonal varieties, made by cutting method, presented some disadvantages over the years, as difficulties and rooting problems, increased susceptibility to environmental variations and attack predators, and need maintenance ideal conditions for plant growth. Currently the researchers NEPRON are developing projects in order to obtain varieties of stevia third generation that can be reproduced and grown for seed minimizing costs, increasing the viability of

farming, reproducibility and marketing, and decreasing the mortality of plants. Thus, this study was developed from a new seminal variety of *Stevia rebaudiana* called Stevia UEM-13.

The aim of this study was to present the glycoside composition, bioactive compounds and antioxidant potential of leaves from a new variety of *Stevia rebaudiana* (Stevia UEM-13). Was evaluated the concentration of these bioactives in different extracts and fractions produced by different extraction methods, and also identified in which these fractions have greater functional potential for use in food, pharmaceutical and cosmetic products.

2 | EXPERIMENTAL SECTION

2.1 Experimental material

The plants of *Stevia rebaudiana* of the seminal variety UEM-13 grown at NEPRON (UEM) were collected at maximum vegetative growth stage. These shrubs were previously dried in an oven at 60°C and the leaves were subsequently separated from the stems and branches, placed in polyethylene bags, and stored at -18°C before developing different extracts. The chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2 Aqueous extract from the stevia leaves UEM-13

A 2.0 g sample of previously ground Stevia leaves UEM-13 were transferred to a 250 ml beaker; 100 mL of deionized distilled water was added and boiled for five minutes. After this procedure, the material was decanted and filtered under vacuum. The procedure was repeated twice with 100 ml and 50 ml of water, respectively. After the last filtration, the extract was transferred to a 250 ml volumetric balloon and filled up with distilled water. We used this extract to analyze glycosides, phenolic compounds and flavonoids.

2.2.1 Ethanol extract of leaves by maceration (EELM)

The extraction system was established using 500 g of previously ground *Stevia rebaudiana* leaves of the seminal variety UEM-13, placed in a 2.0 L glass beaker and 1.5 L of P.A absolute ethanol (99.5%) was added. The system stood for 24 hours in the dark at room temperature, to obtain the first fraction. The same procedure was repeated to obtain 7 fractions (extraction until exhaustion). The extracts were combined and dried in a rotary evaporator (Buchi) at 50 °C under vacuum. The powder obtained was used to evaluate the glycosides, phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant activity.

2.2.2 Ethanol extract of the leaves by Soxhlet (EELS)

The previously dried and ground *Stevia rebaudiana* leaves (100 g) of the seminal variety UEM-13 were placed in 500 ml of absolute ethanol (99.5%) and added to the system using the Soxhlet apparatus. The extract was filtered and dried in a rotary evaporator (Buchi) at 50°C under vacuum and the dry powder was analyzed.

2.2.3 Methanol extract of the leaves by Soxhlet (MELS)

The previously dried and ground *Stevia rebaudiana* leaves (100 g) of the seminal variety UEM-13 were placed in 500 ml of P.A methanol and added to the system using the Soxhlet apparatus (extraction until exhaustion). The extract was filtered and dried in a rotary evaporator (Buchi) at 50 °C under vacuum and the powder was analyzed. Extract fractionated with different solvents. The fractionation was performed as follows, as shown in figure 1.

2.2.4 Hexane fraction (HF)

A 100 g sample of dried *Stevia rebaudiana* leaves of the seminal variety UEM-13 were extracted with 400 ml of methanol were packaged in apparatus Soxhlet for 4 hours. The extraction was repeated to obtain a colorless methanolic extract (extraction until exhaustion). The extracts were combined and dried in a rotary evaporator (Büchi) at 50 °C. A sample of 35.8 g of dried methanolic extract in a rotary evaporator (Büchi) was dissolved with distilled and deionized water (400 mL). The aqueous solution was extracted with 1000 mL of hexane and the mixture was separated in a separation funnel. The process was repeated. The aqueous and hexane fractions were obtained. The hexane fractions were pooled and dried in a rotary evaporator (Büchi) at 50 °C under vacuum and the fluid (HF) was analyzed.

2.2.5 Chloroform fraction (CF)

The resulting aqueous fraction from the hexane extraction was extracted with 1000 mL of chloroform in duplicate. The mixture was separated in a separation funnel and the aqueous and chloroform fractions were obtained. The chloroform fraction was dried in a rotary evaporator (Buchi) at 50 °C under vacuum. The resulting powder (CF) was analyzed.

2.2.6 Ethyl acetate fraction (EF)

The resulting aqueous fraction from the chloroform extraction was extracted with 1000 mL of ethyl acetate in duplicate. The mixture was separated in a separation funnel and the ethyl acetate (organic) fraction obtained was dried in a rotary evaporator

(Buchi) at 50 °C under vacuum. The powder (EF) was analyzed.

2.2.7 Isobutanol fraction (IF)

The resulting aqueous fraction from the ethyl acetate extract was extracted with 1000 mL of isobutanol in duplicate and the fractions were separated in a separation funnel. The fraction with isobutanol dried using rotary evaporator (Buchi) at 50 °C under vacuum. The resulting powder (IF) was analyzed.

2.2.8 Aqueous fraction (AF)

The quantity of the fraction referred to as IF (isobutanol) was reduced in a rotary evaporator and then dried on a bench-top spray dryer (Spray Dryer, Buchi) and the resulting powder (aqueous fraction - AF) was analyzed.

2.3 Analysis

2.3.1 2Glycosides

The glycosides compounds of leaves, extracts and fractions were assayed according to the method described by Dacome *et al.* (2005).

2.3.2 Total phenolic compounds

The phenolic compounds of leaves, extracts and fractions were assayed according to the method described by Singleton *et al.* (1999) (with modifications). A solution of 1 mg/mL of aqueous extract of the leaves was prepared to analyze the leaves. For the extract analysis, a solution of absolute ethanol (99.5%) was prepared at a concentration of 0.5 mg/mL of ethanolic leaf extract by maceration, ethanolic leaf extract through Soxhlet and methanolic leaf extract through Soxhlet. The hexane, chloroform and isobutanol fractions were prepared at a concentration of 1 mg/mL of absolute ethanol. The ethyl acetate fraction was solubilized in ethanol at a concentration of 0.1 mg/mL. The concentration of phenolic compounds was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per extract/g using a standard curve prepared with water for the analysis of leaves (aqueous extract) (0-30 µg/mL) and in ethanol for analysis of extract fractions (0-80 µg/mL).

2.3.3 Total flavonoids

The quantification of total flavonoids was determined by Zhishen *et al.* (1999) (with modifications). All extracts and fractions were prepared at a concentration of

1 mg/mL of ethanol, except the ethyl acetate fraction (0.5 mg/mL). The absorbance reading of samples was 510 nm. Data were expressed as rutin and quercetin equivalents.

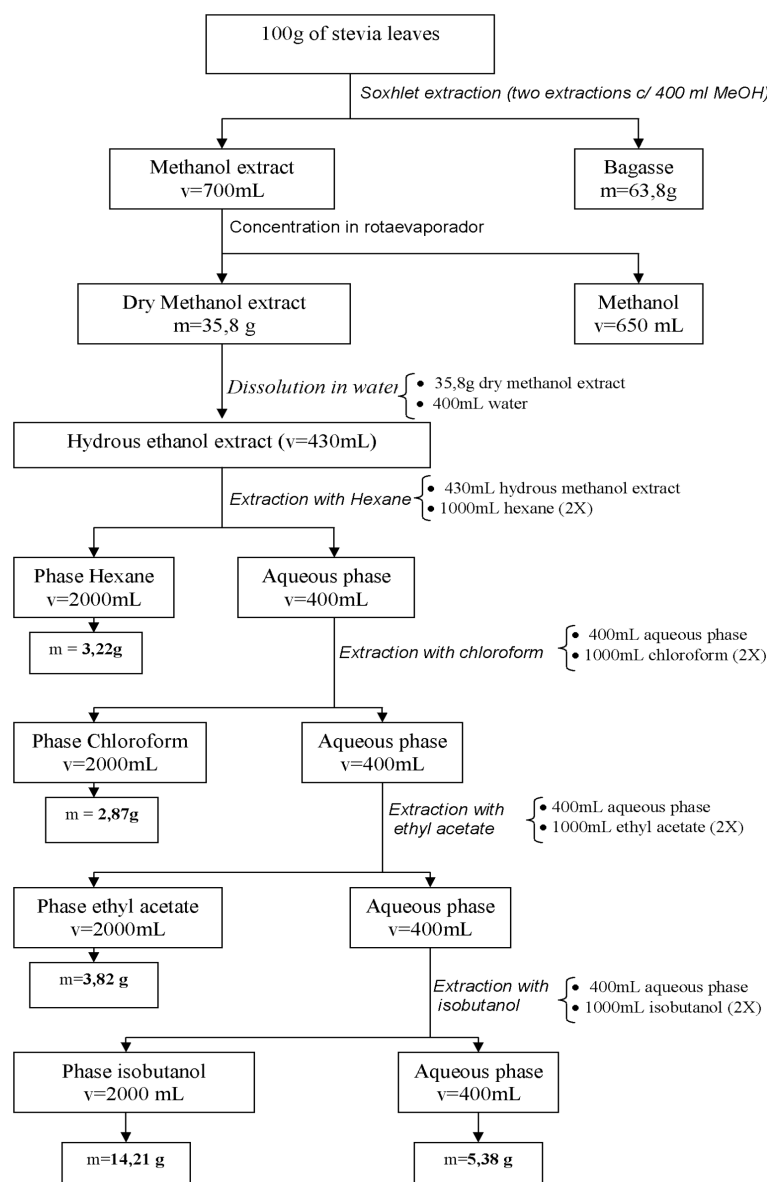


Figure 1 - Flow chart for obtaining stevia extract.

2.3.4 Antioxidant activity

The elimination of free radical activity from the extracts and *Stevia rebaudiana* fractions of the seminal variety UEM-13 was measured by the ability to eliminate DPPH (Blois, 1958). The results were expressed as inhibition percentage of free radicals by the sample according to the following formula: % Inhibition = $(A_0 - A_t)/A_t \times 100$. The symbol A_0 stands for control absorbance and A_t for absorbance of each extract or fraction. All analyses were performed in triplicate and results expressed as mean values. Gallic acid was used as the standard.

2.4 Statistical analysis

Each analysis was performed in triplicate. The results of all the analyses were expressed as mean \pm standard error of the mean and submitted to ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$). We used the Statistical Analysis System (SAS, Institute Inc., Cary, North Carolina, United States, 2006) statistical software version 9.1.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Total glycosides

Table I shows the glycoside content (stevioside and rebaudioside A and C), total phenolics and flavonoids pooled from the leaves used in this study. Importantly, the Stevia leaves UEM-13 contain a higher content of rebaudioside A than of stevioside, and it is a variety of elite that can be reproduced by seeds, also increasing its advantage over crop varieties by cuttings. This is pioneering work with this cultivar. Stevia UEM-13 therefore presented a ratio RebA/Stev much higher (2.27) than the wild varieties that have inferior values to 1 (Kovylyayeva *et al.*, 2007; Gardana *et al.*, 2010; Madan *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2013). The new cultivar has significant levels of bioactive compounds when compared with other wild varieties (Pasquel *et al.*, 2000; WöLwer-Rieck, 2012; Gawel-Bęben *et al.*, 2015).

The Stevia leaves UEM-13 used in this study presented 14.8% of total glycosides. This seminal variety showed high rebaudioside A content, indicating to be an elite variety. Table II shows the extraction yield of glycosides observed in the extraction methods, total glycoside content (stevioside and rebaudioside A, C and D), phenolic compounds (gallic acid equivalents) and total flavonoids (quercetin equivalent). The ethanol extraction method by maceration presented low yield and low percentage of glycosides, when compared with the extraction method in Soxhlet apparatus. Both extracts showed significant amounts of phenolic compounds and flavonoids and a significant percentage of antioxidant activity; these results indicate that treatment with alcoholic solvents may contribute to the extraction of other substances present in the stevia leaves, extracting substantial amounts of glycosides. Periche *et al.* (2015) study effective extraction procedures for maximization of the yield of steviol glycosides and total phenolic compounds as well as antioxidant activity in stevia extracts. The results showed significant correlations and experimental conditions greatly influence this achievement. The choice of solvent and extraction method, temperature, time and ratio changes the performance of the

	Compound phenolics	Total flavonoids	Glycosides	Stev	Reb A	Reb C	RebA/Stev
Leaves	2.36 %	17.63 %	14.8 %	4.0 %	9.1 %	1.7 %	2.27

TABLE I: Total glycoside content (stevioside and rebaudioside A and C) from Stevia UEM-13.

Stev= Stevioside; Reb A= Rebaudioside A; Reb C= Rebaudioside C.

extraction. This work indicates that the fractioning with different solvents can change the proportion of sweeteners and antioxidants, showing in most of them a negative correlation.

Pasquel *et al.* (2000) show that pretreatment of stevia leaves with solvents such as ethanol and CO₂ prior to the conventional extraction process can improve the quality of the sweetener obtained, contributing to the reduction of the bitter aftertaste. Hexane, chloroform and ethyl acetate fractions do not contain significant concentrations of glycosides, unlike isobutanol that extracted 60.3% of sweeteners, making this the best solvent to extract higher yields of sweeteners in the industrial processes.

3.2 Total phenolic compounds

The content of phenolic compounds present in the Stevia leaves UEM-13 (aqueous extract of leaves) was 23.61 mg/g GAE (Gallic Acid Equivalent). Figure 2 shows the concentration of phenolic compounds of the *Stevia rebaudiana* leaf extracts and fractions of the variety UEM-13. These results demonstrate the high antioxidant potential of the extracts from the Stevia leaves, particularly the methanol and ethyl acetate extracts (107.08 mg/g, 524.2 mg/g, respectively).

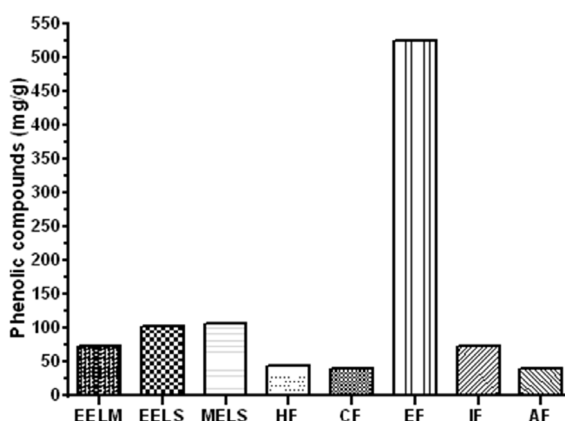


Figure 2 - Total phenolic extracts from Stevia leaves UEM- 13 expressed as mg of gallic acid equivalents per extract/g. The letters represent the following: EELM: Ethanolic Extract of Leaves (maceration); EELS: Ethanolic Extract of Leaves (Soxhlet); MELS: Methanolic Extract of Leaves (Soxhlet); HF: Hexane Fraction; CF: Chloroform Fraction; EF: Ethyl acetate Fraction; IF: Isobutanol Fraction, AF = Aqueous Fraction.

SHUKLA, S. *et al.* (2009) found 61.5 mg/g GAE from the ethanol extract of Stevia leaves through Soxhlet. (Gawet-Bęben *et al.*, 2015) found similar values of phenolic compounds in ethanol extract of dried leaves from *Stevia rebaudiana*. The

values found in the present study indicate that these compounds should be further evaluated for their antioxidant potential in food and drinks, and further demonstrates that the ethyl acetate fraction has the greatest potential for will provide additional benefits in terms of oxidative.

Type of extract	Extraction yield (g/100g)	Total glycosides (g/100g)	Phenolics compounds (g/100g)	Total flavonoids (g/g)
EELM	6.13 ± 0,01	26.0 ± 0,01	7.27 ± 0,01	0.28 ± 0,02
EELS	29.50 ± 0,01	31.8 ± 0,01	10.26 ± 0,02	0.32 ± 0,01
MELS	38.82 ± 0,02	30.5 ± 0,05	10.70 ± 0,05	0.35 ± 0,05
HF	8.99 ± 0,01	0.1 ± 0,01	4.47 ± 0,01	0.29 ± 0,01
CF	8.01 ± 0,01	1.1 ± 0,04	3.96 ± 0,03	0.26 ± 0,02
EF	10.67 ± 0,02	0.05 ± 0,01	52.42 ± 0,03	0.38 ± 0,01
IF	39.69 ± 0,01	70.8 ± 0,02	7.29 ± 0,01	0.24 ± 0,01
AF	15.02 ± 0,01	1.14 ± 0,01	2.33 ± 0,01	0.07 ± 0,01

TABLE II: Total compounds present in the *Stevia rebaudiana* extracts and fractions.

EELM: Ethanolic Extract of Leaves (maceration); EELS: Ethanolic Extract of Leaves (Soxhlet); MELS: Methanolic Extract of Leaves (Soxhlet); HF: Hexane Fraction; CF: Chloroform Fraction; EF: Ethyl Acetate Fraction; IF: Isobutanol Fraction, AF: Aqueous Fraction.

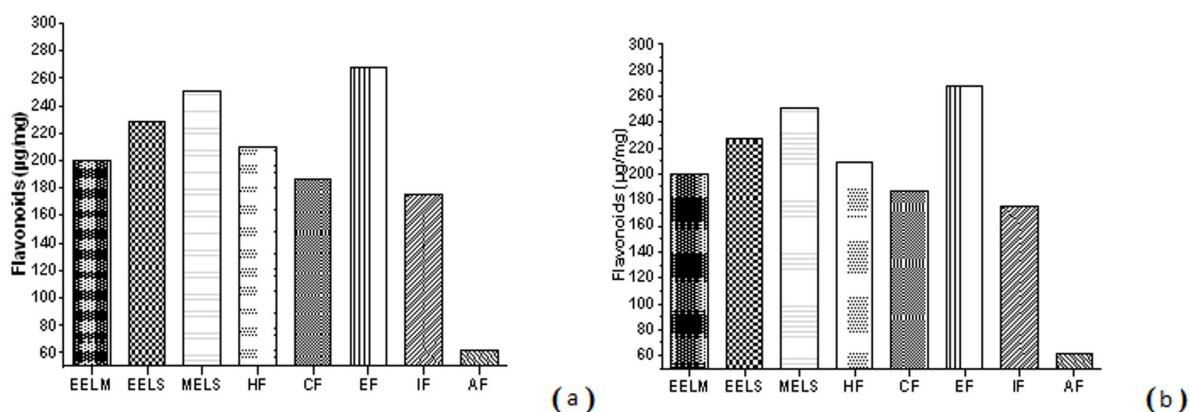


Figure 3 - Total flavonoid extracts from the Stevia leaves UEM-13 expressed as μg of quercetin equivalent per extract/mg (a) and μg of rutin equivalents per extract/mg; (b) μg of quercetin equivalents per extract/mg. The letters represent the following: EELM: Ethanolic Extract of Leaves (maceration); EELS: Ethanolic Extract of Leaves (Soxhlet); MELS: Methanolic Extract of Leaves (Soxhlet); HF: Hexane Fraction; CF: Chloroform Fraction; EF: Ethyl acetate Fraction; IF: Isobutanol Fraction, AF = Aqueous Fraction.

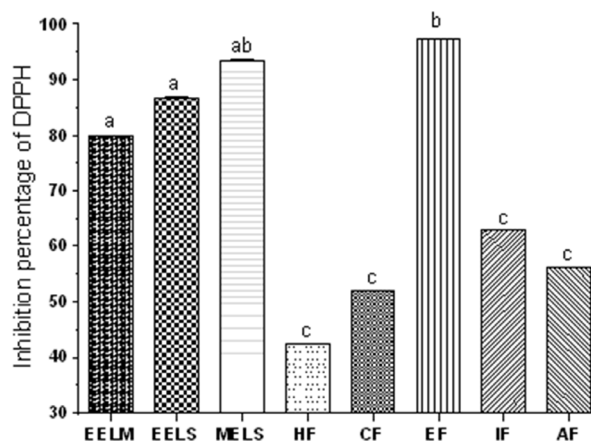


Figure 4 - Percentage of inhibition of DPPH radicals from leaf extracts of Stevia UEM-13 (1 mg/ml). Mean values with different superscript letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The letters represent the following: EELM: Ethanolic Extract of Leaves (maceration); EELS: Ethanolic Extract of Leaves (Soxhlet); MELS: Methanolic Extract of Leaves (Soxhlet); HF: Hexane Fraction; CF: Chloroform Fraction; EF: Ethyl acetate Fraction; IF: Isobutanol Fraction, AF = Aqueous Fraction.

3.3 Total flavonoids

Different concentrations of these compounds can be found in leaves, callus, and different *Stevia rebaudiana* extracts, depending on the conditions, type of solvent and extraction method used (Madan *et al.*, 2010). In the present study the concentration of flavonoids present in the Stevia leaves UEM- 13 (aqueous extract) was $176.33 \mu\text{g}/\text{mg}$. After the extraction process, significant concentrations of flavonoids were found in the methanol and ethyl acetate extract, demonstrating the antioxidant potential of the extract (Figures 3a and 3b).

3.4 Antioxidant activity

Studies show that Stevia leaf extracts may exhibit high antioxidant potential (Periche *et al.*, 2015). The antioxidant activity of the aqueous extract from the leaves of Stevia UEM-13 was 42.26% (1 mg/mL). The Figure 4 shows the percentages of inhibition of DPPH radicals of the extracts evaluated in this study. It can be seen that, in general, all extracts showed important antioxidant potential, particularly the methanol extract of leaves obtained by extraction and through Soxhlet. The methanol extract and ethyl acetate fraction showed inhibition of DPPH radical of the 93.5% and 97.32% at a concentration of 1 mg/ml. These extracts had higher levels of phenolic compounds and flavonoids which indicates high antioxidant activity. The IC_{50} for each extract (EEMF, EESF, MESF, HF, CF, EF, IF, AF) were $626.5 \mu\text{g}/\text{mL}$, $576.70 \mu\text{g}/\text{mL}$, $534.75 \mu\text{g}/\text{mL}$, $1175 \mu\text{g}/\text{mL}$, $963.02 \mu\text{g}/\text{mL}$, $513.76 \mu\text{g}/\text{mL}$, $792.64 \mu\text{g}/\text{mL}$, $889.20 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The fraction with the highest potential is the ethyl acetate.

4 | CONCLUSIONS

This study shows for the first time the glycosides content, phenolic compounds

and antioxidant activity of seminal variety from *Stevia rebaudiana*, Stevia UEM-13, confirming that a variety with high RebA content and can be reproduced by seeds.

The evaluation of extraction and fractionation of this plant using different solvents and methodologies resulted in extracts of different antioxidant capacity, which can be used to enrich the literature and contribute to their application in foods, pharmaceuticals and cosmetics. A diet rich in antioxidants may contribute significantly to prevent degenerative diseases, cardiovascular and metabolic diseases. Thus, natural and industrialized foods enriched with flavonoids and phenolic compounds contribute to the reduction of these diseases. The present study showed that ethanol, methanol and ethyl acetate extracts of *Stevia rebaudiana* leaves (Stevia UEM-13) have a great potential antioxidant and so can be used as possible additives to enhance the functionality of food and beverages.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the State University of Maringá and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) agency. The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- ABUDULA, R. et al. **Rebaudioside A directly stimulates insulin secretion from pancreatic beta cells: a glucose-dependent action via inhibition of ATP-sensitive K-channels.** *Diabetes Obes Metab*, v. 10, n. 11, p. 1074-85, Nov 2008. ISSN 1462-8902.
- ALVAREZ, M.; COUTO, A. C. C. **Processo de fracionamento dos componentes das folhas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni.** *Fund. Univ. Est. de Maringá e Banco do Brasil. Pedido de privilégio no Brasil, protocolo*, n. 84, p. 02-752, 1984.
- BLOIS, M. S. **Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.** *Nature*, v. 181, n. 4617, p. 1199, 1958. ISSN 1476-4687.
- CARAKOSTAS, M. C. et al. **Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 7, p. S1-S10, 2008. ISSN 0278-6915.
- CHAN, P. et al. **A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension.** *British journal of clinical pharmacology*, v. 50, n. 3, p. 215-220, 2000. ISSN 0306-5251.
- DACOME, A. S. et al. **Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods.** *Process Biochemistry*, v. 40, n. 11, p. 3587-3594, 2005. ISSN 1359-5113.
- GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; SIMONETTI, P. **Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry.** *Journal of chromatography A*, v. 1217, n. 9, p. 1463-1470,

2010. ISSN 0021-9673.

GAWĘŁ-BĘBEN, K. et al. **Stevia rebaudiana Bert. leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants.** *Molecules*, v. 20, n. 4, p. 5468-5486, 2015.

GUPTA, E. et al. **Nutritional and therapeutic values of Stevia rebaudiana: A review.** *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 7, n. 46, p. 3343-3353, 2013. ISSN 1996-0875.

KAUSHIK, R. et al. **Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts.** *Journal of Food Science and Technology*, v. 47, n. 1, p. 27-33, 2010. ISSN 0022-1155.

KOVYLYAEVA, G. I. et al. **Glycosides from Stevia rebaudiana.** *Chemistry of Natural Compounds*, v. 43, n. 1, p. 81-85, 2007. ISSN 0009-3130.

MADAN, S. et al. **Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni-a review.** 2010. ISSN 0976-0512.

MILANI, P. et al. **New seminal variety of stevia rebaudiana: obtaining fractions with high antioxidant potential of leaves.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 3, p.1841-1850, 2017. ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690.

PASQUEL, A. et al. **Extraction of stevia glycosides with CO₂+ water, CO₂+ ethanol, and CO₂+ water+ ethanol.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 17, n. 3, p. 271-282, 2000. ISSN 0104-6632.

PERICHE, A. et al. **Influence of extraction methods on the yield of steviol glycosides and antioxidants in Stevia rebaudiana extracts.** *Plant foods for human nutrition*, v. 70, n. 2, p. 119-127, 2015. ISSN 0921-9668.

SHUKLA, S. et al. **In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 9, p. 2338-2343, 2009. ISSN 0278-6915.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent.** In: (Ed.). *Methods in enzymology*: Elsevier, v.299, 1999. p.152-178. ISBN 0076-6879.

TADHANI, M. B.; PATEL, V. H.; SUBHASH, R. **In vitro antioxidant activities of Stevia rebaudiana leaves and callus.** *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, n. 3-4, p. 323-329, 2007. ISSN 0889-1575.

WILLIAMS, L. D.; BURDOCK, G. A. **Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation.** *Food and chemical toxicology*, v. 47, n. 8, p. 1831-1836, 2009. ISSN 0278-6915.

WÖLWER-RIECK, U. **The leaves of Stevia rebaudiana (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review.** *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 60, n. 4, p. 886-895, 2012. ISSN 0021-8561.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. **The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals.** *Food chemistry*, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999. ISSN 0308-8146.

OS CENTROS DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS E O PRISIONAL: REFLEXIBILIDADE AMBIENTAL E NA SAÚDE

Paulo Barrozo Cassol

Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria - RS

Edenilson Perufe frigo

Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria - RS

Alberto Manuel Quintana

Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria - RS

RESUMO: Pesquisa qualitativa, que objetivou conhecer a percepção dos moradores da localidade do Distrito de Santo Antônio, na região sul do Brasil, sobre os centros de tratamento de resíduos e o prisional e a sua reflexibilidade ambiental e na saúde. Para a produção dos dados foi utilizada a entrevista com 14 moradores, no período de outubro e novembro de 2016, sendo interpretadas pela análise categorial de conteúdo. Os resultados evidenciaram os impactos ambientais e na saúde, frente a poluição e a insegurança. Conclui-se que se necessita de ações e melhorias sociais e ambientais afim de minimizarem os impactos ambientais na localidade, que embora delimitados geograficamente, o rural e o urbano estão mais próximos nas divisões sociais.

PALAVRAS CHAVE: Saúde; Meio ambiente; Percepção; Ambiente rural.

WASTE TREATMENT CENTERS AND PRISON: HEALTH AND ENVIRONMENTAL REFLEXIVITY

ABSTRACT: Qualitative research, which aimed to know the perception of residents of the locality of the district of Santo Antônio, in the southern region of Brazil, about the waste treatment centers and the prison and their environmental and health reflexivity. For the production of data, an interview with 14 residents was used, from October to November 2016, and interpreted by categorical content analysis. The results showed the environmental and health impacts, against pollution and insecurity. It is concluded that social and environmental actions and improvements are needed in order to minimize the environmental impacts in the locality, which although geographically delimited, rural and urban are closer in the social divisions.

KEYWORDS: Health; Environment; Perception; Rural environment.

1 | INTRODUÇÃO

O ambiente rural brasileiro é complexo, sendo influenciado por fatores sociais e econômicos que impactam no trabalho e na saúde das pessoas, nessa perspectiva temos as repercussões ambientais das grandes

culturas, contaminações químicas provenientes de agrotóxicos e fertilizantes, a diminuição de áreas naturais diante da crescente expansão agropecuária. Sendo desafiador promover e garantir a qualidade de vida (PERES, 2009).

Próximo ao início do século XX, a maioria do lixo gerado era na sua maior parte orgânico, o qual se reintegrava aos ciclos naturais, no entanto com a industrialização e as concentrações populacionais, ultrapassou-se o limiar da capacidade de resiliência da natureza, devido à crescente produção de lixo, a qual não sendo descartado de forma adequada, pode gerar contaminações no ar, na água e no solo, bem como a proliferação de vetores transmissores de doenças (BRASIL, 2005). Em simetria dos impactos ambientais gerados pelas atividades humanas, os centros urbanos, embora delimitados geograficamente do meio rural, produzem diversos poluentes e resíduos, e outras situações sociais como a produção de lixo, a pobreza e a criminalidade

Por essa perspectiva, o rural e o urbano não se diferenciam apenas pela divisão social e espacial, onde as cidades são caracterizadas pelas indústrias, enquanto o campo se relaciona com a produção agrícola. Atualmente no meio rural o uso da terra é multifacetado, sendo utilizado, além das atividades agropecuárias, por outros motivos como: prestação de serviços, locais de residência entre outros. Por essa perspectiva o rural é compreendido como um espaço de relações econômicas, sociais e políticas em que os habitantes do campo desenvolvem em relação à terra (PONTE, 2004). Nessa direção, onde a complexa dinâmica social impacta no meio ambiente, devido as ingerências sociais e econômica, promovendo assim mudanças, onde alguns projetos e edificações se distanciam dos centros urbanos e se estabelecem em regiões pouco povoadas, como no campo, o que pode trazer localmente intensos impactos ambientais.

Nesta linha estabeleceu-se no Distrito de Santo Antônio, pertencente ao Município de Santa Maria, dois grande dois empreendimentos um centro de tratamento de resíduos e o outro destinado ao setor prisional.

O Distrito de Santo Antônio, o qual tem como sede o município de Santa Maria, RS. Possui uma área de 51,70 Km e contava com uma população de 807 habitantes, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010). A cobertura vegetal do distrito é dividida em duas partes, com uma área coberta por campos e outra área com vegetação subtropical e os morros, destaca-se o morro de Santo Antônio. Economicamente se compõe por propriedades com atividades de policultura, produção de leite e hortigranjeiros e não possui estradas pavimentadas (VIERO, 2003). A economia local se caracteriza por pequenas propriedades, cultivares e a produção leiteira em pequena escala (CASSOL, 2017).

Em relação ao conceitual em saúde a Organização Mundial de Saúde (OMS) define saúde como um estado de bem-estar físico, mental e social, onde um dos fatores determinantes da saúde são as condições ambientais (BRASIL, 2004). Com o processo do adoecimento emergem questões relacionadas às suas causas,

e considera-se de relevância apontar os determinantes ambientais, o que torna importante estudos no sentido de conhecer como está se apresentando, considerando-a no contexto da população do meio rural.

Diante do exposto, esta pesquisa objetivou conhecer a percepção dos moradores da localidade de Santo Antônio, distrito do município de Santa Maria, sobre os centros de tratamento de resíduos e o prisional e a flexibilidade ambiental e na saúde.

2 | MÉTODO

Pesquisa de abordagem qualitativa exploratória e descritiva, este estudo (recorte) da Dissertação de Mestrado originada da Dissertação de Mestrado denominada: “Saúde interface meio ambiente na localidade de Santo Antônio – Santa Maria - RS”, do Programa de Pós-Graduação em Extensão Rural da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), apresentado em 2017. O Projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob Parecer CAAE Nº 60156916.4.0000.5346. O cenário do estudo ocorreu em uma localidade denominada Distrito de Santo Antônio (CASSOL, 2017).

Quanto aos sujeitos do estudo: o convite à participação na pesquisa foi realizado por meio de contato pessoal com os moradores da localidade de Santo Antônio, e ocorreram de forma aleatória e não fixos apenas a um local da região, objetivando assim a participação de moradores de diferentes pontos do distrito. Como critérios de inclusão: ser residente desta localidade; e os critérios de exclusão os moradores menores de dezoito anos. Os sujeitos participantes na pesquisa foram 14 sujeitos, sendo 04 do sexo masculino e 10 do sexo feminino; e a faixa etária da grande maioria acima dos trinta anos, sendo 04 aposentados e o restante de diversificadas profissões.

As entrevistas foram realizadas nos meses de outubro e novembro de 2016, e foram individuais e gravadas, sendo as respostas abertas, sem delimitações de respostas preestabelecidas pelo entrevistador. Para manter o anonimato dos participantes foi adotado um sistema de códigos para identificá-las, sendo empregada a letra “P” como letra inicial de participante, seguida de um número (P1, P2, P3...). Para a coleta de dados, utilizou-se a entrevista semidirigida (TURATO, 2011). Iniciou-se a mesma com a seguinte pergunta: **como você vê o meio ambiente, o lugar onde você vive, e como ele pode agir na sua saúde?** Para tal, o entrevistador fez uso dos seguintes eixos norteadores: **ambiente rural, saúde, trabalho, meio ambiente, cotidiano**. Os depoimentos foram transcritos e as informações foram organizadas e submetidas à análise categorial de conteúdo proposta por Turato (2011).

3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

A partir da análise do conteúdo dos depoimentos, elegeu-se para este artigo a seguinte categoria temática:

3.1 Os centros de tratamento de resíduos e o prisional: flexibilidade ambiental e na saúde na percepção da comunidade de Santo Antônio

Tanto o centro de tratamento de resíduos bem como a Penitenciária Estadual de Santa Maria, são regidos pela legislação brasileira, não faz parte dos objetivos deste trabalho discutir os aspectos jurídicos e funcionais destes estabelecimentos e sim apontar a percepção dos moradores quanto aos impactos na saúde, gerados por estes na localidade onde foi realizado o estudo.

Quanto aos resíduos sólidos, comumente são denominados de lixo, sendo em partes descartados e conforme a utilização da tecnologia, estes podem ser reciclados, ou reutilizados. Nesta perspectiva, o centro de tratamento de resíduos, iniciou suas atividades em 2009, em substituição ao depósito de lixo Municipal o qual era conhecido como o “lixão” da caturrita”, no entanto popularmente este local continua sendo denominado de “lixão” pelos moradores da região (Fonte: informações coletadas na pesquisa, 2016).

Nessa linha o centro de tratamento de resíduos do Distrito Santo Antônio recebe diariamente toneladas de resíduos, e de acordo com os depoentes, o uso do centro para o processamento do lixo é uma ação que causa intenso impacto na localidade, tal percepção está sustentada nos depoimentos relacionados a seguir:

O lugar aqui do distrito é dividido em partes com problemas, como tu já foi ali do lado, no corredor da Santa Marta, de repente já deve ter visto a parte do rincão ali, que tem o presídio que tem a [empresa] que era o lixão a céu aberto, agora é uma reciclagem, aqui é área com mais problema na questão de saúde, de poluição. (P7)

Outra coisa que prejudica bastante a nossa saúde é esse lixão, esse lixão é um problemão pra nós. (P10)

Então, o aterro sanitário é uma das realidades que vai interferir na saúde das pessoas entendeu. Na minha área, moram entorno daquilo ali, ao redor, digamos assim, do outro lado tem a tal de recicladora. Então são dois impactos ambientais na minha visão: um é o aterro já aterrado e o outro é a recicladora. É lixo por todo lado ali. (P8)

Percebe-se uma associação entre o ambiente e a saúde, diante do impacto ambiental, onde a crescente produção de lixo gera um processo de acúmulo de materiais descartados em locais que nem sempre possui um tratamento adequado, causando prejuízos ao ambiente. O centro de tratamento de resíduos foi criado para diminuir os impactos ambientais na região, no entanto ainda continua sendo uma fonte de preocupação dos moradores do Distrito de Santo Antônio ao associarem o aterro sanitário e a recicladora como fonte de poluição com repercussões negativas

em sua ambiência.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente aponta como impacto ambiental, qualquer tipo alteração, física, química ou biológica no meio ambiente. Sendo gerada por matéria ou energia resultante das atividades humanas, as quais podem ser diretas ou mesmo indiretamente, acometer: a saúde, o bem-estar da população, a economia; a biota; as propriedades dos recursos ambientais, a estéticas e sanitárias do meio ambiente (BRASIL, 1988). Nesta perspectiva, os impactos referentes ao “lixão” se refletem em diversos elementos importantes, como o atmosférico, e sua consequência para a respiração humana conforme os depoimentos a seguir:

A parte ruim que tem aqui é o lixão ali, quanto o vento vem para esse lado cheira, o chorume que eles largam lá é horrível, estraga. O lixão é péssimo, estragou o lugar praticamente. O cheiro é horrível, o ar quando não vem o vento do lado do lixão é bom, muito bom. Mas quando tá; tem dias que tu tem que fechar a janela para pode dormir, não sei se esse cheiro não é prejudicial à saúde, esse cheiro. (P2)

Olha o nosso problema, a gente já tinha conversado ali, é a usina, conforme de manhã cedo, não é todo dia, mas com frequência vem aquele cheiro do gás do lixo, então entra dentro de casa, e custa a sair o cheiro. (P6)

O que a gente identifica, a parte mais urbana que é aqui tem a esse problema da [empresa] que tem o cheiro, o cheiro interfere, e às vezes a gente sente o cheiro até aqui [distante], o cheiro de lá vem, depende do dia que está mais úmido, menos úmido a gente sente mais, isso afeta a saúde não tem dizer que não. (P7)

Percebem-se os prejuízos ao conforto e qualidade de vida dos moradores, diante, de odor desagradável, proveniente do centro de tratamento de resíduos. Nesse viés, as preocupações também estão relacionadas à poluição, quanto ao ar ser nocivo à saúde, sobre o que este cheiro poderia causar, dúvidas preocupantes e também no imaginário, pois não possuem as respostas, não há informações claras, gerando dessa forma certo grau de insegurança.

A poluição do ar ou atmosférica pode ocorrer de alguma fonte de matéria ou mesmo de energia, onde a sua intensidade, concentração, tempo de ação podem tornar o ar impróprio ou nocivo à saúde humana. Incluindo danos aos materiais, à fauna e à flora, desta forma à qualidade de vida da comunidade (BRASIL, 2014).

Quanto ao chorume este é gerado pela degradação da matéria orgânica, possui uma coloração escura, podendo causar poluição tanto no solo como na atmosfera, sendo malcheiroso em razão da constituição de seus gases entre eles o metano e o sulfídrico (FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE, 2006; PEREIRA; MELO, 2008). Nessa esteira do mau cheiro oriundo dos processos referente ao lixo, os depoimentos apontam outra consequência:

Claro que lá dentro a empresa sempre vai dizer que tão fazendo tudo corretamente. É assim, o cheiro do lixo ali da reciclagem ele vai para toda essa região, então o que dá para perceber já vou me adiantando, é muita alergia. (P8)

É o da reciclagem, o mau cheiro que aquilo ali tem, vem em toda nossa região

aqui. Às vezes, quando o vento vem de lá, tu sente. Então não adianta tu tratar as pessoas, se tu não tem, e a própria poluição vem da cidade, nos aqui não temos vem de lá. Mas no verão o cheiro é muito forte. A maioria aparecendo doença de pele e renite e o médico trata e trata, e é isso aí que está acontecendo. E até as chácaras que estão querendo vender, o pessoal não estão querendo comprar. (P11)

Nesta perspectiva este estudo corrobora com o autor, o qual aponta que os gases poluentes em grande quantidade na atmosfera, apresentam forte relação com o aparecimento das doenças respiratórias, entre elas a reação alérgica e a asma (FREGONEZI, et al 2015). Nesse espiral crescente de impactos na região, outros elementos naturais passam a serem motivos de preocupação conforme os depoimentos a seguir:

É o que a gente identifica, a parte mais urbana que é aqui, tem esse problema da [empresa] que tem o cheiro, que embora tendo um aterro sanitário não é tão sanitário assim, não é como se preconiza um aterro sanitário, tem muito do lixo ali que não é reciclado, é simplesmente enterrado. Então isso polui o solo, polui o lençol freático. (P7)

O que me preocupa, não tenho conhecimento, mas ficou preocupada com a água que vai para solo, que já tá contaminada, que vai contaminar. A gente pensa em fazer um poço artesianos, então fico pensando em relação à água, acho que seria esse ponto que me preocupa. (P12)

Essa minha área é próxima do aterro sanitário, assim antigússimo, nisso os impactos ambientais vão muito, muito tempo, ele está aterrado agora. Agora tá aterrado aquela parte do antigo lixão, só que aí tem aquele chorume, aquele chorume que tem umas piscinas, que eu nunca fui até lá. As piscinas que na verdade são os chorumes, então é lógico que isso vai afetar na saúde das pessoas. (P8)

Nesta ótica dos impactos no ambiente e com forte relação à questão sanitária, temos um fator preocupante relacionado à contaminação do solo e do próprio lençol freático, o chorume ao se infiltrar no meio ambiente com suas substâncias contaminantes, incluindo os metais pesados, gera um grau de poluição tanto para o solo como para o lençol freático. O que poderia resultar em problemas de saúde, no caso do consumo de água contaminada, visto que grande parte da população da região utiliza água de poço ou fonte, para o consumo próprio, para os animais, incluindo também a irrigação de hortas e cultivares.

Os “lixões” podem causar alterações ou poluição do solo, das águas superficiais, como também das águas subterrâneas, pela infiltração do chorume (PEREIRA, MELO, 2008) O chorume é também denominado de lixiviado ou percolado, possui grandes concentrações de matéria orgânica e substâncias sólidas e caso não receba um tratamento adequado, pode penetrar no solo contaminando as águas subterrâneas (ELK, 2007).

Alguns metais e também alguns semimetals, quando absorvidos, conforme a concentração podem gerar graves distúrbios ao organismo humano. A exemplo o semimetal arsênio pode causar doenças cardiovasculares, renais, intestinais e pôr

fim a morte. Enquanto os metais pesados como o chumbo, pode ocasionar danos neurológicos, (dores de cabeça, convulsões, delírios e tremores musculares), gastrointestinais (vômitos e náuseas) e renais e morte; já o mercúrio causa danos neurológicos e respiratórios, disfunções renais e gastrointestinais, distúrbios visuais e auditivos, tremores musculares, paralisia cerebral e até a morte; quanto ao cádmio pode provocar dores abdominais, náuseas e vômitos e paralisia renal (MASSABNI, 2006).

Essa percepção das consequências do centro de tratamento dos resíduos, que pode refletir no ar, na água, na saúde dos indivíduos, incluindo a flora e fauna local também impacta em outro segmento da região, conforme os depoimentos a seguir:

A [empresa] ocupa mais a estrada por que é caminhão pesado, caminhão de lixo, carreta, o tamanho de carreta que passa aí, fazem os buracos, às vezes tu tem de parar para dar o lado, te tapam de terra. Eles como uma firma grande poderia muito bem por pedras, sei lá ajeitar um pouco, eles que ocupam, a gente tem carro, mas ocupa duas vezes para ir para trabalhar e voltar. Eu na frente da minha casa, estou botando cascalho, pedra para ir tapando os buracos. (P4)

Os caminhões também passam aqui com várias toneladas, e estragam as estradas. A estrada é sempre péssima pelos caminhões pesados do lixão. (P2)

Passam aqueles caminhões pesados do lixão e aí estragam bastante a estrada, seria bom uma pavimentação. (P3)

A partir da situação em que as estradas são danificadas, o deslocamento e a acessibilidade são prejudicados, gerando assim uma interferência, negativa na qualidade de vida. Nessa esteira, percebe-se que havia por parte dos moradores uma expectativa que a empresa que processa os resíduos e que utiliza as estradas de forma intensa com seus veículos pesados, pavimenta-se ou adota-se um sistema de manutenção adequado das estradas por onde trafegam os seus veículos, tornando-as próprias para uso dos cidadãos em geral.

Neste crescente vórtice de impactos, produzidos pela empresa de tratamento de resíduos na região, a situação de danificar as estradas, a qual prejudica o trânsito tanto de carros como de pedestre, ainda temos o elemento da poeira com um importante agravante:

A questão do chorume que vai sendo largado pelos caminhões do lixo na rua, também afeta [a saúde]. Dependendo do calor, depende de tudo, é derramado tudo na estrada, também polui e isso afeta. (P7)

Eu, por exemplo, adquiri assim umas alergias, por estar ali na poeira diária, porque é uma poeira poluída, porque os caminhões passam por ali, entendeu. Eu trabalho ali, é mais ali que estou, e os trabalhadores que moram ali, as pessoas que moram ali também. Então eles são agredidos diariamente por aquela poeira, é uma poeira poluída, toda poeira já é ruim, mas aquela ali é mais carregada de lixo e de muita coisa. (P8)

À medida que a poeira passa a receber materiais residuais contaminantes (biológicos e não biológicos), esta passa a ser um agente propagador nocivo,

potencializado pelo próprio movimento dos veículos com o seu deslocamento de ar e de forma mais intensa pela ação dos ventos. Sendo que sua ação não se restringe ao centro de processamento de resíduos, mas também pelas estradas da região, percorridos pelos caminhões, incluindo as suas margens das estradas e numa espiral crescente de propagação os ventos podem carrear esta poeira contaminada das estradas, por longas distâncias e assim podem depositar-se nas residências nos campos e cultivares e nas águas, possibilitando dessa forma gerar intensos agravos ambientais.

Em relação à usina de processamento de resíduos seus impactos não se restringiram ao meio natural, as consequências de sua implantação, atingiram proporções em outro cenário, o social, ao excluir os excluídos, conforme os depoimentos a seguir:

Eu sou a favor do lixão reabrir, sabe. Por que quando o lixão estava aberto, as pessoas trabalhavam ali, eu não tenho vergonha de dizer, a gente trabalhava ali, quase todo mundo trabalhava ali. A [empresa] ali ó, que é era para dar serviço aqui pra gente aqui do corredor, que era para o pessoal daqui que trabalharia lá, mas não. Todo mundo deve ter oportunidade, mas eu acho que eles deveriam ver quem trabalhou lá [no lixão], tem pessoas ali que nunca trabalhou no lixão, que nunca viu o lixão, e as pessoas que realmente precisam trabalhar não pegaram. (P4)

Foi tirado o pessoal de trabalhar no lixão para trabalhar na [empresa], mas a reciclagem na [empresa], é meia dúzia de gente trabalhando ali, quando começou acho que era para mais de cem pessoas, eu acho. Na transição do lixão e usina aí sim a prioridade foi aqui, hoje algum que outro se manteve, os moradores tem que trabalhar fora do distrito, algum que outro se manteve ali, mas não é fácil hoje de conseguir. No meu ponto de vista não contribui nada, para a localidade não contribui nada, a única coisa que pode se dizer que contribui, foi tirar o pessoal do meio do lixão, mas também tirou a renda da maior parte do pessoal daqui. (P6)

A recicladora, tu olha os benefícios, tantos trabalhadores que moram na região, é legal. Mas próximos, mas não são tantos trabalhadores daqui [do Distrito]. (P8)

O trabalho no antigo lixão, com todo o potencial insalubre envolvendo as questões sanitárias relacionadas às doenças, ainda assim era uma fonte de renda de grande número de moradores do Distrito de Santo Antão. Os indivíduos, denominados de catadores, utilizavam o lixão em busca de materiais que eram reutilizados ou recicláveis, a falta de trabalho os torna excluídos em sentido de oportunidade social, dessa forma a busca de objetos no lixão, era um meio de sobrevivência. A partir dos relatos da perda do espaço de catarem materiais do lixão, percebeu-se uma nova exclusão dos já excluídos. Ainda nesse vórtice de exclusão, segundo os depoimentos, o lixão fechou para se implementar uma usina recicladora, com a expectativa dos catadores de saírem do ambiente insalubre do lixão para trabalhar na empresa recicladora, situação que ocorreu no momento de transição, e depois grande parte perdeu a oportunidade de trabalhar na empresa recicladora. Uma situação que conduz ainda mais a pobreza e aponta como está o nível de desenvolvimento e organização social da região.

Embora os “lixões” apresentem uma questão sanitária crítica à saúde, sendo permeada de vetores como ratos, insetos, vírus e bactérias e nesse sentido torna-se um ambiente nocivo, em que pode gerar diversas doenças: como leptospirose, dengue, diarreia, febre, infecções; ainda assim apresentam uma repercussão relacionada à questão social. Onde diversos indivíduos, ou mesmo famílias, por motivos de falta de oportunidade de trabalho, utilizam-se do lixão como meio de sobrevivência, são os catadores de resíduos (PEREIRA; MELO, 2008).

Outro estabelecimento de destaque no Distrito de Santo Antônio é a Penitenciária Estadual de Santa Maria, a qual teve a sua inauguração em fevereiro de 2011, possuindo a capacidade total de 766 detentos, do sexo masculino (A RAZÃO, 2016). Um estabelecimento deste porte produz diversos impactos como podemos observar nos depoimentos que seguem:

Só negativamente, porque fica mal falado, estragou, o lugar fica mal falado. Para a economia não trouxe nada, porque não fizeram nem a estrada [pavimentação]. A estrada é sempre péssima pelos caminhões pesados do lixão, então não teve benefício o presídio, só difamou o lugar. (P2)

Tanto que a gente pensou que com o presídio ia melhorar pelo menos a rua, mas só piorou, porque a gora é caminhão de lixo é os ônibus esses carros as carretas, essas, esses carrinhos que trazem os presos, a escolta que dizem e tudo por aí, mas ninguém se lembra de passar uma retro, sei lá eu, podiam por uma pedra. (P4)

Nessa esteira de estabelecimentos de grande porte, percebe-se que havia por parte dos moradores uma expectativa em relação ao centro prisional, que utiliza as estradas com seus veículos, pavimenta-se ou adota-se um sistema de manutenção das estradas por onde trafegam os seus veículos, tornando-as próprias para uso dos cidadãos em geral. Situação que não ocorreu, gerando ainda mais a frustração em relação aos grandes empreendimentos que utilizam o espaço físico do Distrito, mas não trazem benefícios diretos para a região. Nesta perspectiva percebe-se que o centro prisional, ao oposto de trazer benefícios, acabou gerando uma outra situação, conforme os depoimentos abaixo:

Com o presídio piorou a criminalidade, não tem hora para soltar preso. Esses dias de tardinha eu estava sentada com meu marido ali na frente, era que umas onze horas da noite, nós estávamos sentados e parou um cara. Ah quero um executivo [ele falou]. Mas eu não faço executivo [eu respondi]. Não, mas tu vai fazer um executivo [ele falou]. Era um preso que soltaram, vê se hora de soltar preso, e eles passam tudo aqui ó sabe, então para mim o presídio piorou no meu ponto de vista. (P4)

Há de violência, porque acaba transitando muita gente do presídio, queira não queira uns estão lá dentro, mas outros estão aqui fora, esta parte aqui tem mais problemas. (P7)

Pois é eu não sei te dizer, sei que houve uma mobilização em relação ao presídio, deve ser a questão de geografia. A minha opinião é que é complicado, por exemplo, o presídio está geograficamente, não adianta se iludir, é uma área de risco, é completamente uma área de risco ali onde eu trabalho diariamente, então

chega à tardinha dou um jeito de ir para casa, não tem mais segurança hoje em dia, mas pelo mesmo a gente tenta ir para casa e se enfiar dentro de casa, entendeu. (P8)

O presídio para mim, acho que as pessoas em volta ficaram receosas, preocupadas com a situação, que às vezes falam, aí que fugiu um presidiário. Aí tu fica pensando meu deus! Que nem na minha casa já apareceu um correndo lá, disseram que tinha fugido daqui. Então a gente fica [preocupada]. Eu vi, mas achei que fosse alguém entrando porque às vezes entram assim [na propriedade], depois fiquei sabendo que era um presidiário fugindo. Então dá né, um medo, um receio. (P10)

Ao considerarmos população do Distrito de 807 habitantes (IBGE, 2010), embora atualmente esse número populacional possa variar um pouco, e compararmos com população prisional de 766 indivíduos apenados na Penitenciária Estadual de Santa Maria (A RAZÃO, 2016); chegamos a números quantitativamente surpreendentes entre a população da localidade e a prisional, fator que potencializa os sentimentos de insegurança. Nestes aspectos, as inquietudes relacionadas à insegurança, ligados a situação prisional e circulação de indivíduos que devem algo a justiça, ocorrem um prejuízo à qualidade de vida dos moradores do Distrito de Santo Antão, onde sentimento de insegurança, receio e medos são elementos que inferem e podem causar prejuízos na saúde mental da população da região.

Portanto grandes empreendimentos, como a Penitenciária Estadual de Santa Maria e o Centro de Tratamento de Resíduos Sólidos, ambos com grau de importância que transcendem a nível municipal e regional, não impactaram no sentido do desenvolvimento no Distrito de Santo Antão, como a melhoria da renda, ampliação das possibilidades de trabalho e da mobilidade por meio de conservação das estradas, não gerou aportes a qualidade de vida local. Diante dos depoimentos esses estabelecimentos não contribuíram para melhorias sociais no distrito, gerando sentimentos de frustrações e ainda trouxeram prejuízos à ambiência e a qualidade de vida e conseqüente a saúde a partir da ótica dos moradores da região.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa permitiu clarear diversos pontos sombreados sobre as questões de saúde interface meio ambiente, no meio rural, bem como os variados aspectos de poluição na localidade onde foi realizado o estudo. A partir da visão ampliada em saúde preconizada pela Organização Mundial de Saúde, que envolve as dimensões físicas, mentais, sociais e ambientais, possibilitou apontar diversos segmentos que minimizam a qualidade de vida, a partir da ótica dos moradores da região.

Nesta perspectiva o Distrito de Santo Antão possui dois grandes empreendimentos, o centro de tratamento de resíduos e o presídio estadual, sendo que a sua localização geográfica não gerou desenvolvimento para a localidade, nem em sentido social como melhorias na renda ou de ampliar as oportunidades de

trabalho, em oposição emergiu situações de insegurança e poluição que impactam nas diversas dimensões da saúde. Quanto ao presídio estadual e o centro de tratamento de resíduos, ambos utilizam de forma intensa as estradas da região, diante disso havia uma expectativa que estes pavimentassem as estradas, fato que não ocorreu, e para ampliar mais o estado precário das estradas, os caminhões pesados que transportam os resíduos, favorece o processo de danificar as vias, assim esses estabelecimentos não contribuíram com melhorias quanto à mobilidade da região e também nas questões de ocupação efetiva de mão de obra local. Seguindo por esse cenário, as condições ambientais do entorno, a ambiência, e seus reflexos sobre a saúde, o estudo apontou que a poluição atmosférica, a residual, repercutem de forma intensa na região.

Ao pensar em poluição, usualmente nos remete a pensar em centros industriais e urbanos, no entanto o Distrito de Santo Antão apresenta diversas modalidades neste quesito de ambiente poluído. Quanto à poluição atmosférica, do centro de tratamento de resíduos emerge um cheiro forte o qual é carregado pelo ar, sendo atribuído pelos moradores como proveniente do chorume, e que atinge longas distâncias, afetando assim a qualidade de vida local, associado a isso, também ocorre à poluição proveniente da poeira das estradas, agravada pelo tráfego intenso dos caminhões que transportam resíduos e os possíveis contaminantes relacionados a estes. A poluição atmosférica, somada à poeira das vias são um meio importante, relacionado às doenças respiratórias e alérgicas, a poeira carregada pelos ventos pode atingir as residências, cultivos e corpos hídricos. Nessa linha da poluição ou contaminação da água emerge uma questão importante quanto à situação do lençol freático, diante das particularidades da região que possui um aterro sanitário de longa data.

Percebe-se que temas considerados urbanos como a poluição, questões sociais como insegurança, pobreza, receio da violência, atualmente estão fazendo parte do campo, onde foi realizado o estudo. Os matizes identificadores sobre o que era rural ou urbano estão mesclando-se, o campo não é mais exclusivo para produção agropecuária, sendo sutil as diferenças entre esses dois espaços, que embora delimitados geograficamente, o rural e o urbano estão mais próximos nas divisões sociais, atualmente o campo apresenta-se multifacetado.

REFERÊNCIAS

BRASIL, 1988. Conselho Nacional do Meio Ambiente, **RESOLUÇÃO CONAMA N° 001, de 23 de janeiro de 1986.**

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de saneamento.** 3. ed. rev. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente e da Educação Saúde. **Manual de educação para o consumo sustentável.** Brasília, 2005.

BRASIL. 2014. Ministério do meio ambiente. **Qualidade do ar.**

CASSOL, Paulo B. **Saúde interface meio ambiente na localidade de Santo Antônio – Santa Maria – RS.** Brasil, 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado em Extensão Rural) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria.

ELK, A.G.H. P.V. **Redução de emissões na disposição final.** RIO DE JANEIRO: IBAM, 2007.

PERES, F. **Saúde, trabalho e ambiente no meio rural brasileiro.** Ciênc. saúde coletiva vol.14 no.6 Rio de Janeiro Dec. 2009.

PEREIRA, S.S. ; MELO, J. A.B. **Gestão dos resíduos sólidos urbanos em Campina Grande/ PB e seus reflexos socioeconômicos.** Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional. v. 4, n. 4. SP, 2008.

PONTE, K.F. **(Re) Pensando o Conceito do Rural.** Revista NERA. V. 7, n. 4, janeiro/julho, 2004.

PUJOL, Raul. Penitenciária Estadual de Santa Maria está lotada. **A Razão.** Santa Maria, 06 jun. 2016.

MASSABNI, A.C. **Os metais e a saúde humana.** Instituto de Química Araraquara-UNESP. Conselho federal de química IV região, 2006.

FREGONEZI, R.L. et al. **Poluição atmosférica relacionada às doenças respiratórias: abordagem de abrangência em prol da prática clínica.** Rev. da universidade vale do rio verde. três corações, v. 13, N. 1, P. 697-706, 2015.

Fundação Estadual do Meio Ambiente. **Orientações básicas para a operação de aterro sanitário .** Fundação Estadual do Meio Ambiente. --- Belo Horizonte: FEAM, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **Cidades.** 2010.

TURATO, E. R. **Tratado da metodologia da pesquisa clínico-qualitativa:** construção teórico-epistemológica, discussão comparada e aplicação nas áreas da saúde e humanas. 5. ed. Petrópolis: Vozes, 2011.

VIERO, Lia Margot Dornelles, 2003. **Atlas Escolar Municipal:** evolução Política administrativa de Santa Maria, RS. Santa Maria, RS: Diário de Santa Maria, 2006.

PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA PARA CARACTERIZAÇÃO DA FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA TRATADA COM COMBINAÇÕES QUÍMICAS DE FUNGICIDAS SISTÊMICOS E DE CONTATO

Milton Luiz da Paz Lima

Instituto Federal Goiano campus Urutaí,
Laboratório de Fitopatologia,
Urutaí, GO

Gleina Costa Silva Alves

Instituto Federal Goiano campus Urutaí,
Laboratório de Nematologia,
Urutaí, GO

Matheus do Carmo Leite

Instituto Federal Goiano campus Urutaí,
Laboratório de Nematologia,
Urutaí, GO

Andressa de Souza Almeida

Instituto Federal Goiano campus Urutaí,
Laboratório de Nematologia,
Urutaí, GO

Rafaela Souza Alves Fonseca

Instituto Federal Goiano campus Urutaí,
Laboratório de Fitopatologia,
Urutaí, GO

Cleberly Evangelista dos Santos

Instituto Federal Goiano campus Urutaí,
Laboratório de Fitopatologia,
Urutaí, GO

Marciel José Peixoto

Instituto Federal Goiano campus Urutaí,
Laboratório de Fitopatologia,
Urutaí, GO

Flavia de Oliveira Biazotto

Instituto Federal Goiano campus Urutaí,
Laboratório de Fitopatologia,
Urutaí, GO

Lettícia Alvarenga

Instituto Federal Goiano campus Urutaí,
Laboratório de Fitopatologia,
Urutaí, GO

Justino José Dias Neto

Universidade de Brasília, Depto Fitopatologia,
CEP 70910-900,
Brasília, DF

Wesler Luiz Marcelino

Esalq, Depto de Fitopatologia, Av. Pádua Dias,
CEP 13418-900,
Piracicaba, SP

RESUMO: Uma das alternativas que potencializam a eficiência do controle químico à ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja são esforços na melhoria da eficiência do espectro de ação de fungicidas loco sistêmicos ou não sistêmicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar Critérios epidemiológicos para caracterização da severidade da ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja tratada com combinações químicas de fungicidas sistêmicos e de contato. Na safra 2017, utilizando a cultivar NS7237[®] (ciclo 118-148 dias) avaliaram-se cinco tratamentos químicos compostos por cinco repetições em DBC. Todos os cinco tratamentos (exceção à testemunha) foram acompanhados de quatro aplicações, aos 47, 62, 76 e 93 dias após o plantio (DAP), dos

fungicidas propiconazol + difenoconazol, fluxapiraxade + piraclostrobina, trifloxistrobina + protioconazol e azoxistrobina + ciproconazol. Avaliou-se aos 76 dias após o plantio (DAP) nove parâmetros epidemiológicos representados pela severidade (SEV) número de lesões (NL), o tipo de lesão (TL), intensidade de esporulação (IE), número de urédias (NU), produtividade de urediniósporos (PU), número de urediniósporos/urédia (NUUr), número de lesões mm⁻² (NLmm²) e número de urédias mm⁻² (NUmm²). Analisaram-se as variáveis dependentes via ANOVA, Friedmann Test e análise de componentes principais. A testemunha apresentou estatisticamente as maiores médias dos nove parâmetros de epidemiológicos (efeito fungicida). A SEV e o NLmm² foram estatisticamente menores no T5 (Nimbus®+Mancozeb, Assist®+Mancozeb, Áureo®+Mancozeb e Nimbus®+Mancozeb) tanto pelo teste F como Friedman Test. O tratamento T4 foi o que mais reduziu significativamente a PU e o NUD. O uso de fungicidas sistêmicos e não sistêmicos representou uma importante estratégia de manejo químico da ferrugem-asiática da soja aos 76 DAP.

PALAVRAS-CHAVE: carboxamidas, benzimidazol, trifloxistrobina; protioconazol; mancozeb; fosfito de Cu; azoxystrobina, mancozeb, eficácia, mistura.

RESISTANCE PARAMETERS FOR ASIAN RUST CHARACTERIZATION OF SOYBEANS TREATED WITH CHEMICAL COMBINATIONS OF SYSTEMIC AND CONTACT FUNGICIDES

ABSTRACT: One of the alternatives that potentiate the efficiency of soybean rust control (*Phakopsora pachyrhizi*) is an effort to improve the spectrum efficiency of systemic or non-systemic fungicides. The objective of this work was to evaluate epidemiological criteria for characterization of the severity of Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) from soybean treated with chemical combinations of systemic and contact fungicides. In the 2017 crop, using NS7237® cultivar five chemical treatments composed of five replicates in DBC were evaluated. All five treatments (except for the control) were accompanied by four applications, at 47, 62, 76 and 93 days after planting (DAP), of the fungicides propiconazole + diphenconazole, fluxapiraxade + pyraclostrobin, trifloxystrobin + prothioconazole and azoxystrobin + cyproconazole. The number of lesions (NL), the type of lesion (TL), sporulation intensity (SI), number of urea (NU) and the number of urea (NU) were evaluated at 76 days after planting (DAP), urediniospore productivity (PU), number of urediniospores/urea (NUU), number of lesions mm⁻² (NLmm²) and number of urethias mm⁻² (NUmm²). The dependent variables were analyzed through ANOVA, Friedmann Test and analysis of main components. The control group presented statistically the highest means of the nine resistance parameters (fungicidal effect). SEV and NLmm² were statistically lower in T5 (Nimbus® + Mancozeb, Assist® + Mancozeb, Aureo® + Mancozeb and Nimbus® + Mancozeb) by both the F and Friedman Test tests. The T4 treatment further significantly reduced PU and NUD. The use of systemic and non-systemic fungicides represented an important strategy for the chemical management of soybean rust at 76 DAP.

KEYWORDS: carboxamides, benzimidazole, trifloxystrobin; prothioconazole; mancozeb; phosphite of Cu; azoxystrobin, mancozeb, efficacy, mixture.

INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill - Fabaceae) é uma espécie originária da Ásia, na região da Manchúria, onde vem sendo cultivada há centenas de anos. Graças às suas características nutritivas e industriais, e também a sua adaptabilidade à diferentes latitudes, solos e condições climáticas, seu cultivo se expandiu por todo mundo, constituindo-se hoje numa das principais plantas cultivadas (MEDICE et al., 2007).

O rápido crescimento e expansão se devem principalmente à descoberta da soja como excelente fonte de proteína e óleo, entre de 30% e 53% de proteínas podem ser encontrada nos grãos. O rápido desenvolvimento de tecnologias para a seleção e o melhoramento de cultivares adaptadas, também tem alavancado a expansão desta cultura no mundo (SEDIYAMA et al., 2015).

De acordo com o quinto levantamento da safra 2017/2018 realizado pela Conab, a produção nacional deve atingir a marca de 111,5 milhões de toneladas, sendo que o Centro-oeste apresenta 50.769,5 milhões de toneladas em uma área plantada de, 15.620,9 milhões hectares, sendo a área total 35.022,8 milhões hectares, as médias nacionais de produtividades são de 3.185 kg ha⁻¹, e o Centro-oeste apresenta uma produtividade 3.250 kg ha⁻¹ (CONAB, 2018).

No entanto, anualmente o produtor chega a perder de 15 a 20 % de sua produção devido à ocorrência de doenças (MATSUO et al., 2015). Atualmente as doenças mais comuns durante o ciclo da cultura da soja são o míldio (*Peronospora manshurica* (Naumov) Syd.) no início do ciclo (DUNLEAVY, 1987); a ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.&P.Syd.) principalmente em todo ciclo reprodutivo; mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) e mancha-alvo (*Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei) nos ciclos vegetativo e reprodutivo; oídio (*Microsphaera diffusa* Cooke & Peck.), mancha-parda (*Septoria glycines* Hemmi) e cretamento-foliar (*Cercospora sojina* Hara) podridão-carvão (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.) e antracnose (*Colletotrichum* spp. Corda) doenças de final de ciclo (HENNING, 2009).

A ferrugem-asiática causada pelo fungo *P. pachyrhizi*, no entanto, desde a sua chegada ao Brasil na safra 2000/2001 é uma das doenças mais severas que afetam o aparato fotossintético (YORINORI et al., 2005). Os sintomas podem surgir em qualquer estágio fenológico, que são caracterizados por pequenas lesões, de coloração castanha à marrom escura, presentes na face inferior da folha, onde se observa minúscula protuberância em forma garrafa por onde emitem propágulos de dispersão e formação de ciclos secundários da doença no campo (MATSUO et al.,

2015). Dependendo da cultivar ou do tratamento químico (prevenção ou erradicação à infecção) os tipo de características e formação de urediniosporos variam em grandes amplitudes na soja (GODOY et al. 2006).

Existe uma centena de fungicidas registrados no MAPA devido estes representarem uma importante estratégia de manejo (YORINORI, 2002), como os triazóis, que agem como inibidores da demetilação da síntese de esteróis (DMIs), importante componente da membrana celular dos fungos, podendo ser aplicados sozinhos ou em misturas (GODOY e CANTERI, 2004); ou as estrobilurinas ou inibidores da quinona oxidase (QoI), que obtiveram espaço no sistema de cultivo devido a perda de eficiência dos triazóis. No entanto, em safras recentes, tanto os DMIs como os QoIs tem proporcionado menor eficiência de controle, propulsionando o registro de fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) as chamadas carboxamidas, retornando aos patamares de eficiência obtidos inicialmente com o surgimento da doença. Contudo a resistência as carboxamidas também já foi relatada (MIYAMOTO et al., 2009).

Outra forma de potencializar a eficiência das aplicações de fúngicas para controle da ferrugem-asiática deve-se ao uso de combinações compatíveis de adjuvantes adicionados a calda de pulverização com o objetivo de prolongar a proteção oferecida, melhorar as propriedades da calda, obviamente associado à tecnologia de aplicação adequada (AZEVEDO, 2011). Os adjuvantes podem influenciar diversos fatores da aplicação de defensivos agrícolas, aumentando a eficiência biológica ou modificando determinadas propriedades da solução. Podem influenciar ainda, o desempenho da aplicação, através da diminuição da deriva, melhorando o molhamento e o espalhamento sobre a superfície foliar (CUNHA et al., 2003), a eficiência de absorção do ingrediente ativo do fungicida e a velocidade de absorção (MARTINS, 2009; XU, 2010).

Assim, adição de adjuvantes às caldas de pulverização é um tema que desperta interesse, porém, também gera dúvidas e controvérsias, bem como a utilização de uma tecnologia emergente, que tem a capacidade de reduzir doenças visando produtividade e qualidade, com baixo impacto econômico e ambiental, o emprego de indutores de resistência para controlar tal enfermidade (VENTURA; COSTA, 2002). A resistência induzida envolve a ativação do sistema de autodefesa da planta, mecanismos estes latentes de resistência, que pode ser obtida pela aplicação de agentes elicitores bióticos, como microrganismos viáveis ou inativados ou por agentes elicitores abióticos (STADNIK, 2000).

Neste contexto, recentemente tem-se utilizado fertilizantes naturais como os fosfitos que tem ganhado importância no controle de doenças por atuarem como ativadores de mecanismos de resistência das plantas por meio do estímulo da produção de substancias de defesas (JACKSON et al., 2000). As principais vantagens apresentadas pelo uso dos fosfitos são: rápida absorção do produto pelas plantas, favorecimento da absorção de Ca, B, Zn, Mn, Mo, K e outros elementos

e principalmente controle e prevenção de doenças fúngicas (VITTI et al., 2005). Existem, no mercado, fontes de fosfitos de zinco, manganês, cálcio, boro, cobre e potássio, no entanto, para o controle de doenças o fosfito de cobre tem se destacado comparado aos demais. Vale ressaltar que o cobre apresenta também ação preventiva e curativa contra a maioria das doenças bacterianas (NOJOSA et al., 2005).

Outra estratégia para o controle e diminuição da resistência da ferrugem-asiática da soja é a utilização de fungicidas protetores como: o mancozeb, fungicida de contato, que apresenta atividade sobre múltiplos alvos nas células, estando relacionados principalmente com a atividade sobre grande número de enzimas, importantes para o metabolismo celular (STURDIK & DROBNICA, 1980; GORDON, 2010; GULLINO et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar critérios epidemiológicos para caracterização da severidade da ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja tratada com combinações químicas de fungicidas sistêmicos e de contato.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no ano agrícola 2016/2017, implantado na Estação Experimento RC Cruz, Fazenda Esmeralda, (rodovia BR 050, latitude: 17°29'31.35", longitude: 48°12'56.93", altitude: 908 m), localizado no município de Ipameri, GO. O solo foi caracterizado como sendo Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico.

O sistema de plantio adotado foi o plantio direto, portanto, adotando a cultivar NS7237[®] (105 a 115 dias de ciclo). A adubação foi parcelada em três etapas, sendo a primeira antes do plantio, com aplicação a lanço de 100 kg ha⁻¹, no sulco de plantio foi aplicado 180 kg.ha⁻¹ do adubo formulado 05-33-00 e 120 kg de cloreto de potássio (KCl) a lanço após o plantio.

A semeadura foi realizada em 04/12/2016, sendo as sementes tratadas com o i.a. thiametoxan (Cruiser[®] 350 fs) na dosagem de 0,150 L 100 kg⁻¹ de semente, fludioxonil + metalaxyl (Maxim XI[®]) na dosagem de 0,150 L 100 kg⁻¹, na dosagem de 0,170 L 100 kg⁻¹ de semente e cinetina + ácido giberélico + ácido 4-indol3-ilbutírico (Stimulate[®]) na dosagem de 0,300 L 100 kg⁻¹ de semente.

Para o controle das plantas daninhas foi realizado aplicações de herbicidas aos 30 dias após o plantio (dap). Os herbicidas utilizados foram glifosato (Roundap Transorb R[®]) na dosagem de 3,0 L ha⁻¹ e o fluazifope-p-butílico (Fusilade 250 EW[®]) na dosagem de 0,750 L ha⁻¹ dos produtos comerciais. O volume de calda utilizado para a aplicação tanto dos herbicidas, inseticidas, adubos foliares e fungicida foi de 200 L ha⁻¹.

Para o controle de pragas foi realizado a primeira aplicação de inseticidas aos 30 dap. Os inseticidas utilizados foram o Bifentrina + carbosulfano (Talisman[®]) na dosagem de 1,0 L ha⁻¹, e Bifentrina (Talstar[®] 100 EC) 0,200 L ha⁻¹. Estes inseticidas

foram usados para o controle de lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) e vaquinha (*Diabrotica speciosa*).

O experimento num delineamento em blocos casualizados, foi constituído de quatro blocos com cinco tratamentos (Tab. 1), totalizando 20 parcelas. Cada parcela apresentou dimensões de 9x4 m, resultando numa área total de 36 m² por parcela. O espaçamento de entre linhas utilizado foi de 0,5 m, e entre plantas de 0,2 m, sendo desprezados 0,5 m das extremidades das duas linhas centrais, totalizando uma área útil de 24 m². As avaliações e ou coletas das folhas para análises epidemiológicas foram realizadas nas seis linhas centrais. O número total de plantas por linha foi de 45 plantas, totalizando 405 plantas por parcela.

	BL 1	BL 2	BL 3	BL 4
L1	T1	T3	T2	T4
L2	T2	T1	T1	T3
L3	T3	T4	T3	T1
L4	T4	T5	T5	T2
L5	T5	T2	T4	T5

Tabela 1. Distribuição das combinações químicas nos blocos e linhas de cultivo (croqui) de soja cv. NS7237© safra 2016/2017.

Cada tratamento foi constituído de diferentes misturas de fungicidas, adjuvantes e óleo mineral, além da testemunha absoluta (sem aplicação de fungicida) (Tab. 2).

Trats.	i.a.	NC	Dos.Fun (L ha)	Adj	Dos.Adj (L ha ⁻¹)
T1. Testemunha	nd	nd	nd	nd	nd
T2. Fungicida Padrão	Propiconazol+Difenoconazol	Score Flex	0,15	Nimbus	0,4
	Fluxapiraxade+Piraclostrobina	Orkestra	0,3	Assist	0,5
	Trifloxistrobina+Protioconazol	Fox	0,4	Áureo	0,37
	Azoxistrobina+Cirpoconazol	Priori Xtra	0,3	Nimbus	0,5
T3. Fungicida Padrão + duo e Veeper	Propiconazol+Difenoconazol	Score Flex	0,15	Duo	0,75
	Fluxapiraxade+Piraclostrobina	Orkestra	0,3	Veeper	0,5
	Trifloxistrobina+Protioconazol	Fox	0,4	Duo	0,75
	Azoxistrobina+Cirpoconazol	Priori Xtra	0,3	Veeper	0,5
T4. Fungicida Padrão + Fulland	Propiconazol+Difenoconazol; Fosfito de Cu	Score Flex	0,15+0,5	Nimbus+Fulland	0,4+0,5
	Fluxapiraxade+Piraclostrobina; Fosfito de Cu	Orkestra	0,3+0,5	Assist+Fulland	0,5+0,5

T5. Fungicida Padrão + Mancozeb	Trifloxistrobina+Protioconazol; Fosfito de Cu	Fox	0,4+0,5	Áureo+Fulland	0,37+0,5
	Azoxistrobina+Cirpoconazol; Fosfito de Cu	Priori Xtra	0,3+0,5	Nimbus+Fulland	0,5+0,5
	Propiconazol+Difenoconazol; Mancozeb	Score Flex; Unizeb Gold	0,15+1,5 kg/ha	Nimbus	0,4
	Fluxapiroxade+Piraclostrobina; Mancozeb	Orkestra; Unizeb Gold	0,3+1,5 kg/ ha	Assist	0,5
	Trifloxistrobina+Protioconazol; Mancozeb	Fox; Unizeb Gold	0,4+1,5 kg/ ha	Áureo	0,37
Azoxistrobina+Cirpoconazol; Mancozeb	Priori Xtra; Unizeb Gold	0,3+1,5 kg/ ha	Nimbus	0,5	

Tabela 2. Listagem dos tratamentos (trats) formados pelas combinações químicas, nomes comerciais (NC), ingredientes ativos (i.a.), dosagens dos fungicidas (Dos.Fun), tipos de adjuvantes (Adj) e dosagens dos adjuvantes (Dos.Adj) aplicadas e data de aplicação sobre a cv. NS7237[®], cultivada no município de Ipameri, GO, safra 2016/2017*.

*nd - não determinado.

Aos 76 dias após o plantio (dap) utilizando escala diagramática (Fig. 1) avaliou-se a severidade (S%) de folhas formuladas por Godoy et al. (2006). Para isso, em cada bloco foram coletadas cinco folhas por bloco (aleatoriamente), totalizando 20 folhas por tratamento. Estas folhas foram recortadas utilizando cortador em formato esférico (diâmetro 11 mm) retirando-se na porção mediana do trifólio principal. Estes discos foram transferidos para micro tubos de 1,5 mL contendo solução água destilada estéril e Tween 80 [0,1 %] que foram identificados e mantidos sobre refrigeração (15 °C).

A partir deste momento em laboratório realizou-se agitação dos discos depositados em 100 mL de solução contendo água destilada + espalhante adesivo. Sobre cada disco recortado da área foliar avaliou-se o tipo de lesão (TL) que foi mensurado a partir da comparação em microscópio estereoscópico dos três tipos de lesões observadas que foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bromfield (1984) onde TAN “tanish” de coloração palha com pouca necrose, RB “redish-brown” de coloração marrom avermelhada escura com necrose extensa e MX “mixed” quando se observou a presença dos dois tipos de lesões.

Em seguida a intensidade de esporulação (IE) que foi avaliada comparando-se a apresentação das lesões no disco foliar recortado com a escala representada pelas classes RB1, RB2, RB3, RB4 e TAN (Fig. 2) adaptada por Miles (2006) e quanto ao parâmetro quantitativo - severidade da doença (Fig. 1).

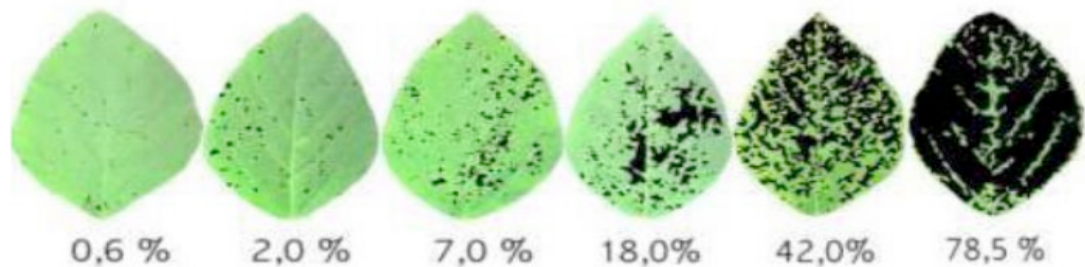


Figura 1. Escala diagramática utilizada para avaliação da severidade da ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), nas combinações aplicadas em soja Brasmax Bônus, cultivada em Ipameri, GO, na safra 2016/2017 (proposta por GODOY et al., 2006).

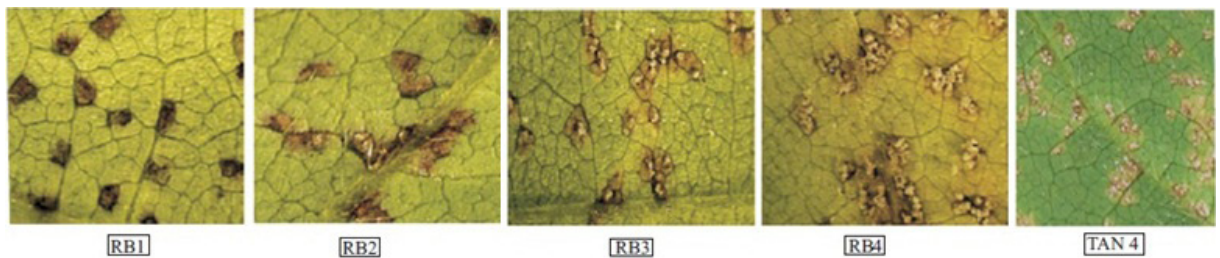


Figura 2. Intensidade da esporulação de *Phakopsora pachyrhizi* em folhas de soja. RB1: sem presença de urediniósporos; RB2: presença esparsa de urediniósporos, algumas lesões sem urediniósporos; RB3: presença moderada de urediniósporos em todas as lesões; RB4/TAN4: presença abundante de urediniósporos em todas as lesões (MILES, 2006).

O número de urédias por disco (NUD) foi quantificado em microscópio estereoscópico aumento de 100 x, quantificando o número de erupções (forma de garrafa) que muitas vezes apareciam agregadas nos discos foliares amostrados. Da mesma forma quantificou-se o número de lesões por mm^2 (NL mm^2), sendo inicialmente quantificado o número de lesões por disco (diferente do número de urédias por disco) e cada disco apresentava uma área da folha representada por $3,14 \times 5,5^2$ (Área da circunferência = $\pi \times r^2$), totalizando 34,54 mm^2 , e aplicando-se a fórmula $\text{Lmm}^2 = \text{NL por disco} / 34,54$. Da mesma forma foi realizada a contabilização do número de urédias por mm^2 (NU mm^2).

A produtividade de urediniósporos (PU) foi avaliada contabilizando alíquotas do todo volume de solução água destilada + Tween® depositando gotículas na superfície de uma lamina de microscópio ótico que no aumento de 200 X avaliou-se utilizando a metodologia de varredura o número de urediniósporos por discos = PU. Com base no número de urédias por discos, realizou-se a razão de PU pelo número de urédias por discos para se chegar número de urediniósporos por urédia (NUUr).

Os dados obtidos nos experimentos, para cada característica avaliada, foram submetidos à análise de frequência para características qualitativas e à análise de variância (teste de hipótese paramétrico) e Friedman Test (Teste de hipótese não paramétrico) para características quantitativas. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade (ambos os testes de hipótese) tanto quando avaliados utilizando um modelo paramétrico como não paramétrico.

Os parâmetros epidemiológicos da ferrugem-asiática foram submetidos aos

testes de normalidade e homogeneidade na forma multivariada, e visto que estes a atendem, realizou-se a MANOVA para comparar eventuais diferenças entre as combinações químicas (tratamentos) e quando detectadas foi submetido ao procedimento biplot com elipses de 95 % de confiança.

1 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não rejeitou-se a hipótese de nulidade para as diferenças entre as médias das variáveis dependentes com as combinações de tratamentos químicos, ou seja, não houve diferença significativa da S%, NLD, NUD, PU, NUUr e NLmm² (Tab. 3). Contudo, as variáveis dependentes mencionadas não apresentaram distribuição normal havendo a necessidade de testes não paramétricos para distinção através dos níveis de significância do teste Tukey (exceção NUmm²).

Na severidade avaliada em laboratório, a testemunha apresentou a maior porcentagem de área lesionada, estatisticamente iguais aos tratamentos T2 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e óleo mineral, 2^a. aplicação aos 62 dap de fluxapiraxade + piraclostrobina e óleo mineral, 3^a. aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e óleo vegetal, 4^a. aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e óleo mineral] e T4 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; fosfito de Cu e óleo mineral, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiraxade + piraclostrobina; fosfito de Cu e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol; fosfito de Cu e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; fosfito de Cu e óleo mineral]. O tratamento T3 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e tiofanato metílico, 2^a. aplicação aos 62 dap de fluxapiraxade + piraclostrobina e tiofanato metílico, 3^a. aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e tiofanato metílico, 4^a. aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e tiofanato metílico], ou seja, fungicidas pertencentes ao grupo dos triazóis, estrobilurinas e benzimidazóis, e o tratamento T5 [representado pela 1^a aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; mancozeb e óleo vegetal, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiraxade + piraclostrobina; mancozeb e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol; mancozeb e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; mancozeb e óleo mineral] (Tab. 4). A área de tecido lesionado por ferrugem-asiática foi reduzida tanto em misturas aos padrões (triazóis e estrobilurinas) com carboxamidas (T2), benzimidazol e fosfito de Cu (sistêmico + contato) (T4) e mancozeb (T5). Esta diversidade de fungicidas com diferentes princípios de ação, importantes como estratégias antirresistência (Juliatti et al. 2015) a ferrugem-asiática não foi estudado por Xavier et al. (2015), que restringiu-se a verificar a sensibilidade de isolados de *P. pachyrhizi* a somente triazóis.

Não rejeitou-se a hipótese de nulidade ou não houve diferença significativa pelo teste de Scott-Knott para os parâmetros calculados NLD, NUD e NUmm² (Tab. 4).

Em relação à PU a testemunha e o tratamento T5 [representado pela 1^a aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; mancozeb e óleo vegetal, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina; mancozeb e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol; mancozeb e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; mancozeb e óleo mineral] apresentaram maiores médias para este parâmetro avaliado, sendo as menores médias observadas em T2 [representado pela 1^a aplicação aos 47 dap de propiconazol+difenoconazol e óleo mineral, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e óleo mineral], T3 [representado pela 1^a aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e tiofanato metílico, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina e tiofanato metílico, 3^a aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e tiofanato metílico, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e tiofanato metílico] e T4 [representado pela 1^a aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; fosfito de Cu e óleo mineral, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina; fosfito de Cu e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap trifloxistrobina + protioconazol; fosfito de Cu e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; fosfito de Cu e óleo mineral] (Tab. 4). Todos os tipos de combinações dos fungicidas padrões (triazóis com estrobilurinas), com carboxamidas, bezimidazóis e fosfito de Cu reduziram a produção de urediniósporos, logo reduzindo a disseminação de dispersão de fontes secundárias de inóculo de acordo com Bergamin Filho e Amorin (2011). Xavier et al. (2015) recomendaram o controle com novos fungicidas afim de ocasionar retardamento da seleção de isolados resistentes a fungicidas promovendo a vida útil dos mesmo.

O NUUr apresentou médias estatisticamente iguais entre a testemunha e o tratamento e T5 [representado pela 1^a aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; mancozeb e óleo vegetal, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina; mancozeb e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol; mancozeb e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; mancozeb e óleo mineral], diferenciando dos tratamentos T2 [representado pela 1^a aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e óleo mineral, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e óleo mineral], T3 [representado pela 1^a aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e tiofanato metílico, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina e tiofanato metílico, 3^a aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e tiofanato metílico, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e tiofanato metílico] e T4 [representado pela

1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; fosfito de Cu e óleo mineral, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina; fosfito de Cu e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap trifloxistrobina + protioconazol; fosfito de Cu e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; fosfito de Cu e óleo mineral], que tiveram impacto em razão do número de uredinósporos por urédia, pelo fato dos tratamentos contendo padrões (XAVIER et al., 2015) com carboxamidas, benzimidazóis e fosfito de Cu (VITTI et al. 2005) reduzirem ciclos secundários da epidemia policíclica (BERGAMIN FILHO, 1995) ocasionado por esse patossistema.

O NLmm² foram observadas maiores médias na testemunha e nos tratamentos T2 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e óleo mineral, 2^a. aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina e óleo mineral, 3^a. aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e óleo vegetal, 4^a. aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e óleo mineral], T3 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e tiofanato metílico, 2^a. aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina e tiofanato metílico, 3^a. aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e tiofanato metílico, 4^a. aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e tiofanato metílico] e T4 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; fosfito de Cu e óleo mineral, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina; fosfito de Cu e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap trifloxistrobina + protioconazol; fosfito de Cu e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; fosfito de Cu e óleo mineral], apresentando menor média no tratamento T5 [representado pela 1^a aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; mancozeb e óleo vegetal, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina; mancozeb e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol; mancozeb e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; mancozeb e óleo mineral]. O número de leões na área foliar foi reduzido quando aplicado na mistura padrão o fungicida de contato mancozeb, comportamento contrário aos parâmetros epidemiológicos estudados anteriormente. Os estudos de distinção do efeito de combinações de fungicidas utilizando como ferramenta parâmetros epidemiológicos assim como Koga (2008) que distinguiu cultivares quanto à resistência, permite a verificação de comportamentos diferenciais pela aplicação dessas combinações, como os comportamentos expressos por cultivares com genética diferenciada.

Dentre os parâmetros epidemiológicos à ferrugem-asiática avaliados, pode se observar que os tratamentos T4 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; fosfito de Cu e óleo mineral, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapiroxade + piraclostrobina; fosfito de Cu e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap trifloxistrobina + protioconazol; fosfito de Cu e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; fosfito de Cu e óleo mineral] e T5, como os que mais reduziram os parâmetros epidemiológicos. O fosfito de Cu, considerado

como um indutor de resistência, utilizado no tratamento T4, mostrou-se eficiente associados a fungicidas usuais, assim como, observado por Carvalho (2010).

A porcentagem de área lesionada por decorrência da ferrugem-asiática com aplicação dos tratamentos com combinações químicas obteve uma redução da severidade na ordem de 1,16 a 1,6 vezes de redução em relação à testemunha. Sobre a variável S% todos os tratamentos aplicados provocaram reduções da área de tecido lesionado pela ferrugem-asiática. Meneghetti et al. (2010), e Miles et al. (2007), também observaram menores níveis de severidade da ferrugem-asiática utilizados triazóis e estrobilurinas em misturas. A mistura de fungicidas com mecanismo de ação distintos amplia a eficácia de controle possibilitando o aumento do espectro de ação, garantindo maior efeito residual, além de reduzir o risco do surgimento de populações do patógeno resistentes ao fungicida.

A variável NLD observou-se o contrário, em que os tratamentos T2 [representado pela 1ª. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e óleo mineral, 2ª. aplicação aos 62 dap de fluxapiraxade + piraclostrobina e óleo mineral, 3ª. aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e óleo vegetal, 4ª. aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e óleo mineral], T3 [representado pela 1ª. aplicação aos 47 dap de propiconazol+ difenoconazol e tiofanato metílico, 2ª. aplicação aos 62 dap de fluxapiraxade + piraclostrobina e tiofanato metílico, 3ª. aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e tiofanato metílico, 4ª. aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e tiofanato metílico] e T4 [representado pela 1ª. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; fosfito de Cu e óleo mineral, 2ª aplicação aos 62 dap de fluxapiraxade + piraclostrobina; fosfito de Cu e óleo mineral, 3ª aplicação aos 76 dap trifloxistrobina + protioconazol; fosfito de Cu e óleo vegetal, 4ª aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; fosfito de Cu e óleo mineral] obtiveram medias de NLD superiores à testemunha, na ordem de 0,93 a 0,96 vezes a mais que a testemunha.

Os tratamentos resultaram em uma redução do NUD na amplitude de 1,03 a 1,21 vezes a menos.

A PU foi a variável analisada que mais obteve eficácia no controle, não só com relação à testemunha, mas também com os demais parâmetros epidemiológicos avaliados, com exceção do tratamento T5. Os tratamentos que melhor apresentaram eficácia no controle foram o T2 [representado pela 1ª . aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e óleo mineral, 2ª. aplicação aos 62 dap de fluxapiraxade + piraclostrobina e óleo mineral, 3ª. aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e óleo vegetal, 4ª. aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e óleo mineral], com 2,04 vezes de redução da produtividade de urediniósporos, T3 com redução de 2,93 vezes e o tratamento T4 [representado pela 1ª. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; fosfito de Cu e óleo mineral, 2ª aplicação aos 62 dap de fluxapiraxade + piraclostrobina; fosfito de Cu e óleo mineral, 3ª aplicação aos 76 dap trifloxistrobina + protioconazol; fosfito de Cu e óleo vegetal, 4ª

aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; fosfito de Cu e óleo mineral] com eficácia de 2,66 vezes de redução das medias do parâmetro PU. Contudo, o tratamento T5 se comportou de maneira oposta aumentando a produtividade de urediniósporos em 0,91 vezes. Lemes et al. (2015) apontaram que para controle da ferrugem-asiática a alternativa atual é além de misturas dos triazóis e estrobilurinas, misturas com carboxamidas e protetores, resgatando princípios ativos utilizados no passado.

Foi observado uma redução do NUUr na ordem de 2,71 vezes no tratamento T2, 3,07 vezes no tratamento T3 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e tiofanato metílico, 2^a. aplicação aos 62 dap de fluxapirroxade + piraclostrobina e tiofanato metílico, 3^a. aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e tiofanato metílico, 4^a. aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e tiofanato metílico] e 3,81 vezes no tratamento T4 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; fosfito de Cu e óleo mineral, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapirroxade + piraclostrobina; fosfito de Cu e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap trifloxistrobina + protioconazol; fosfito de Cu e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; fosfito de Cu e óleo mineral], no entanto, o tratamento T5 apresentou um aumento de 0,54 vezes para este parâmetro epidemiológico, provavelmente pela ação fitotóxica provocando o desenvolvimento de ciclo secundários da doença, decorrentes da formação de urediniósporos, provocando uma epidemia similar a testemunha (BERGAMIN FILHO et al., 2006).

O NLmm² não houve redução para os tratamentos químicos. O tratamento T2 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e óleo mineral, 2^a. aplicação aos 62 dap de fluxapirroxade + piraclostrobina e óleo mineral, 3^a. aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e óleo vegetal, 4^a. aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e óleo mineral], T3 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e tiofanato metílico, 2^a. aplicação aos 62 dap de fluxapirroxade + piraclostrobina e tiofanato metílico, 3^a. aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina + protioconazol e tiofanato metílico, 4^a. aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e tiofanato metílico] e T4 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol; fosfito de Cu e óleo mineral, 2^a aplicação aos 62 dap de fluxapirroxade + piraclostrobina; fosfito de Cu e óleo mineral, 3^a aplicação aos 76 dap trifloxistrobina + protioconazol; fosfito de Cu e óleo vegetal, 4^a aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol; fosfito de Cu e óleo mineral], havendo uma redução no NL.mm² apenas no tratamento T5, na ordem de 1,33 vezes.

O NUmm² para todos os tratamentos houve um aumento na eficácia, de 1,05 vezes para o tratamento T2 [representado pela 1^a. aplicação aos 47 dap de propiconazol + difenoconazol e óleo mineral, 2^a. aplicação aos 62 dap de fluxapirroxade + piraclostrobina e óleo mineral, 3^a. aplicação aos 76 dap de trifloxistrobina +

protioconazol e óleo vegetal, 4^a. aplicação aos 93 dap de azoxistrobina + ciproconazol e óleo mineral] e 1,25 vezes para o T5.

As variáveis que mais explicaram a diferença entre os tratamentos foram a severidade, produtividade de urediniósporos, e por fim, o número de urediniósporos por urédia. Os tratamentos que sofreram menor intensidade destes parâmetros epidemiológico a ferrugem-asiática foram T3, T4 e T2, ao contrário do tratamento T1 que apresentou as maiores médias dos parâmetros que mais explicaram as diferenças entre os tratamentos (Fig. 3).

A confluência dos tratamentos T2, T3 e T4, demonstrou que esses tratamentos são relacionados entre si, diferenciando estatisticamente do tratamentos testemunha (T1) e do tratamento T5. Os parâmetros epidemiológico relacionados entre si também resultaram três grupos representados por NLmm², IE, NU mm² e NUD (grupo 1), PU (grupo 2) e NUUr (grupo 3).

2 | CONCLUSÕES

Os tratamentos T3, T4 e T2 produziram maior efeito de redução dos parâmetros de epidemiológico à ferrugem-asiática.

A razão dos valores dos parâmetros epidemiológicos da testemunha pelos tratamentos químicos foi um artifício pouco utilizado em literaturas que permitiu identificar maiores patamares de eficácia para as variáveis PU.

Os parâmetros que mais contribuíram para na distinção dos tratamentos para controle da ferrugem-asiática foram NL mm², IE, NU mm², NUD, PU e NUUr.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, L.A.S. Adjuvantes agrícolas para a proteção de plantas. IMOS Gráfica e Editora, 2011. 264 p.

BERGAMIN FILHO, A. Epidemiologia das doenças de plantas. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 3^a Ed, Vol. I. Editora Agronômica Ceres Ltda., São Paulo SP. 1995.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Epidemiologia de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos. 4 ed. São Paulo: Ceres, v. 1, p. 101-118, 2011.

BERGAMIN FILHO, A.A. Epidemiologia comparativa: ferrugem da soja e outras doenças. In: ZAMBOLIM, L. (Org.). Ferrugem-asiática-da-soja. Viçosa: UFV, v. 1, p. 15-35, 2006.

BROMFIELD, K.R. Soybean rust. Saint Paul: American Phytopathological Society. 65p. (American Phytopathological Society. Monograph, 11), 1984.

CARVALHO, E.A. Indutores de resistência no manejo da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow), 65 p., 2010. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos – Quinto levantamento Fevereiro/2018. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília – DF, 2018.

CUNHA, J.P.A.R.; TEIXEIRA, M.M.; COURY, J.R.; FERREIRA, L.R. Avaliação de estratégias para redução da deriva de agrotóxicos em pulverizações hidráulicas. *Planta daninha*, v. 21, n. 2, p. 325-332, 2003 .

GODOY, C.V.; CANTERI, M.G. Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, n. 1, p. 97-101, 2004.

GODOY, C.V.; KOGA, L.J.; CANTERI, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira*, v.31, p.63-68, 2006.

GORDON, E.B. Captan and folpet. In: Krieger, R. (Ed.) *Hayes Handbook of Pesticide Toxicology*. Elsevier, New York. p. 1915–1949, 2010.

GULLINO, M.L.; TINIVELLA, F.; GARIBALDI, A.; KEMMITT, G.M.; BACCI, L.B. Mancozeb Past Present and Future. *Plant Dis.* 94(9): 1076-1087, 2010.

HENNING, A.A.; ALMEIDA, A.M.R.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S.; YORINORI, J.T.; COSTAMILAN, L.M.; FERREIRA, L.P.; MEYER, M.C.; SOARES, R.M.; DIAS, W.P. Manual de identificação de doenças da soja. 4ª. Ed. Embrapa, Soja, Londrina, PR, 2009.

JACKSON, T.J.; BURGESSA, T.; COLQUHOUN, I.; HARDYA, G. E. STJ. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, London, v. 49, p. 147-154, 2000.

JULIATTI, F.C.; BORTOLIN, D.I.; BAUTE, N. Proteção urgente redução da eficácia de fungicidas sistêmicos na cultura da soja e uso de fungicidas protetores. *Cultivar Grandes Culturas*, v.16, p. 16-20, 2015.

KOGA, L.J. Ferrugem asiática da soja: resistência, controle químico e tolerância. 2008. 92f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, PR, 2008.

LEMES, E.; GAVASSONI, W.L. Ferrugem asiática da soja. In: LEMES, E.; CASTRO, L.; ASSIS, R. *Doenças da soja, melhoramento genético e técnicas de manejo*. Editora Milenium, p. 35-51, 2015.

MARTINS, D. CARBONARI, C.A.; TERRA, M.A.; MARCHI, S.R. Ação de adjuvantes na absorção e translocação de glyphosate em plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*). *Planta daninha*, v. 27, n. 1, Mar. 2009.

MATSUO, E.; LOPES, E.A.; SEDIYAMA, T. Manejo de doenças. In: SEDIYAMA, T. SILVA, F.; BORÉM, A. *Soja do plantio a colheita*. Editora UFV. Viçosa, p. 288-309, 2015.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R.T.; MAGNO JÚNIOR, R.G.; LOPES, E.A.G.L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.31, n.1, p.83-90, 2007.

MENEGHETTI, R.C.; BALARDIN, R.S.; DALLA CORTE, G.; DALAFAVERA, D.; DEBONA, D. Avaliação da ativação de defesa em soja contra *Phakopsora pachyrhizi* em condições controladas. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.34, n.4, p. 823-829, 2010.

MILES, M.R.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L. Evaluation of the soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Health Progress*, DISPONÍVEL EM :< <https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2006/germplasm/>, publicado em 2006, acessado em

março de 2018.

MILES, M.R.; LEVY, C.; MOREL, W.; MUELLER, T.; STEINLAGE, T.; RIJ, N. van; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L. International fungicide efficacy trials for the management of soybean rust. *Plant Disease*, v. 91, n. 11, p. 1450-1458, 2007.

MIYAMOTO, T.; ISHII, H.; SEKO, T.; KOBORI, S.; TOMITA, Y. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathology*, v. 58, p. 1144-1151, 2009.

NOJOSA, G.B.A.; RESENDE, M.L.V.; RESENDE, A.V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: Cavalcanti, L.S.; Di Piero, R.M.; Cia, P.; Pascholati, S.F.; Resende, M.L.V.; Romeiro, R.S. (Eds). *INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS A PATÓGENOS E INSETOS*. Piracicaba, SP: FEALQ, v. 1, p. 139-153, 2005.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. Soja do plantio a colheita. Universidade Federal de Viçosa, Editora UFV, Viçosa, MG, pp. 9-26, 2015.

STADNIK, M. Indução de resistência a oídios. In: Congresso paulista de fitopatologia, Campinas. *Anais do Congresso Paulista de Fitopatologia*. Campinas: GPF. v. 23, pp. 176-181, 2000.

STURDIK, E.; DROBNICA L. Effect o 2,3-dinitrilo-1,4-dithia-9,10-antraquinone on Ehrlich ascites carcinoma and yeast cells. *Chemical Biology Interactions*, v. 30, p.105-114, 1980.

VENTURA, J.A.; COSTA, H. Controle de doenças em pós-colheita no mamão: estágio atual e perspectivas. *Summa Phytopathologica*, v. 28, n. 2, p.137-138, 2002.

VITTI, G.C.; LUZ, P.H.C.; OTTO, R.; QUEIROS, F.E.C.; PACKER, L.A. Utilização de fosfitos em cana-de-açúcar. In: Simpósio de Tecnologia de Produção de Cana-de-açúcar, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: GAPE-GELQ-ESALQ/USP, p. 17, 2005.

XAVIER, S.A.; KOGA, L.J.; BARROS, D.C.M.; CANTERI, M.G.; LOPES, I.O.N.; GODOY, C.V. Variação da sensibilidade de populações de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas inibidores da desmetilação no Brasil. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.3, p.191-196, 2015.

XU, L.; ZHU, H.; OZKAN, E.H. Adjuvant effects on evaporation time and wetted are a off droplets on waxy leaves. *American Society of Agricultural and Biological Engineers* v. 53, p. 13-20, 2010.

YORINORI, J.T. Situação atual das doenças potenciais no Cone Sul. In: Congresso Brasileiro de Soja e Mercosoja, 2., 2002, Foz do Iguaçu. *Anais Foz do Iguaçu: [s.n.]*. p. 171-186, 2002.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; HARTMAN, G.L.; GODOY, C.V.; NUNES JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Braziland Paraguay. *Plant Disease*, v.89, p. 675- 677, 2005.

Fatores de Variação	S %	NLD	NUD	PU	NUUr	NLmm ²	NUmm ²
Valor de F _{4,36}	3,5036*	0,1786*	0,7813*	5,8011**	3,0362*	2,9127 *	0,7963 ^{ns}
Coefficiente de Variação	31,6%	31,10%	27,51%	71,41%	160,63%	28,80%	8,77%
Coefficiente de Friedman Test	3,209*	0,443 ^{ns}	0,276 ^{ns}	6,268*	13,815*	2,632*	0,218 ^{ns}

Tabela 3. Testes de hipótese paramétricos (valor F) e não paramétricos (coeficiente de Friedmann), coeficiente de variação para as variáveis severidade (S%), número de lesões por

disco (NLD), número de urédias por disco (NUD), produtividade de urédias (PU), número de urediniósporos por urédia (NUUr), número de lesões por mm² (NL mm²) e número de urédias por mm² (NU mm²).

Tratamentos	S%	NLD	NUD	PU	NUUr	NLmm ²	NUmm ²
T1 Testemunha	26,9 a	6,2 a	15,3 a	17,6 a	2,06 a	0,08 ab	0,20 a
T2 Fungicida Padrão	22,8 ab	6,4 a	14,8 a	8,6 b	0,76 b	0,08 ab	0,19 a
T3 Fungicida Padrão + Duo e Viper (tiofanato metílico)	18,5 bc	6,6 a	13,5 a	6,0 b	0,67 b	0,09 a	0,17 a
T4 Fungicida Padrão + Fulland(Fosfito de cu)	23,0 ab	6,6 a	13,5 a	6,6 b	0,54 b	0,08 ab	0,17 a
T5 Fungicida Padrão + Unizeb Gold(Mancozeb)	16,7 c	6,0 a	12,6 a	19,2 a	3,77 a	0,06 b	0,16 a

Tabela 4. Médias obtidas a partir do teste não paramétrica dos tratamentos e as variáveis severidade (S%), número de lesões por disco (NLD), número de urédias por disco (NUD), produtividade de urédias (PU), número de urediniósporos por urédia (NUUr), número de lesões por mm² (NL mm²) e número de urédias por mm² (NU mm²).

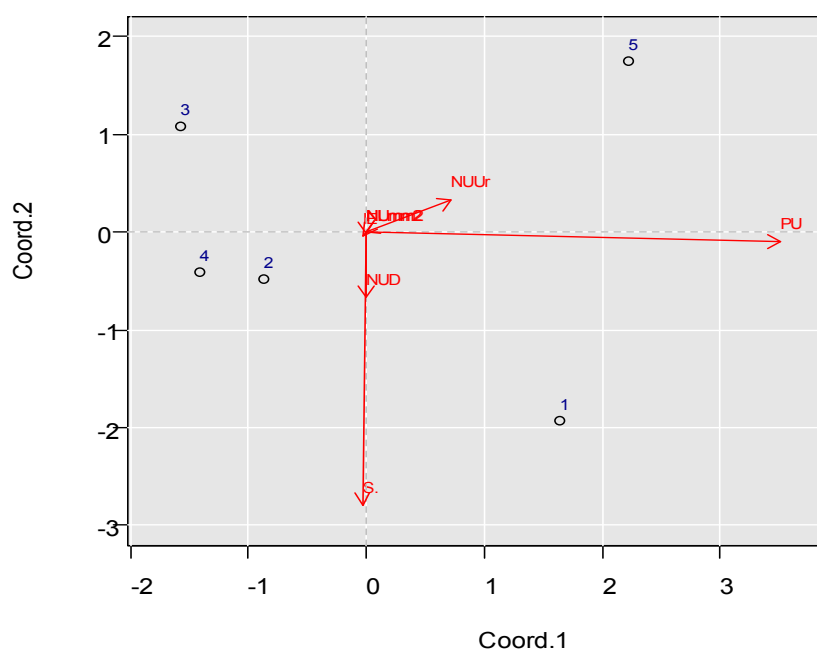


Figura 3. Componentes principais dos parâmetros epidemiológicos severidade (S%), tipo de lesão (TL), intensidade de esporulação (IE), número de lesões por disco de tecido vegetal (NLD), número de urédia por disco (NUD), produtividade de urediniósporos (PU), número de urediniósporos por urédia (NUUr), número de lesões por mm² e número de urédias por mm².

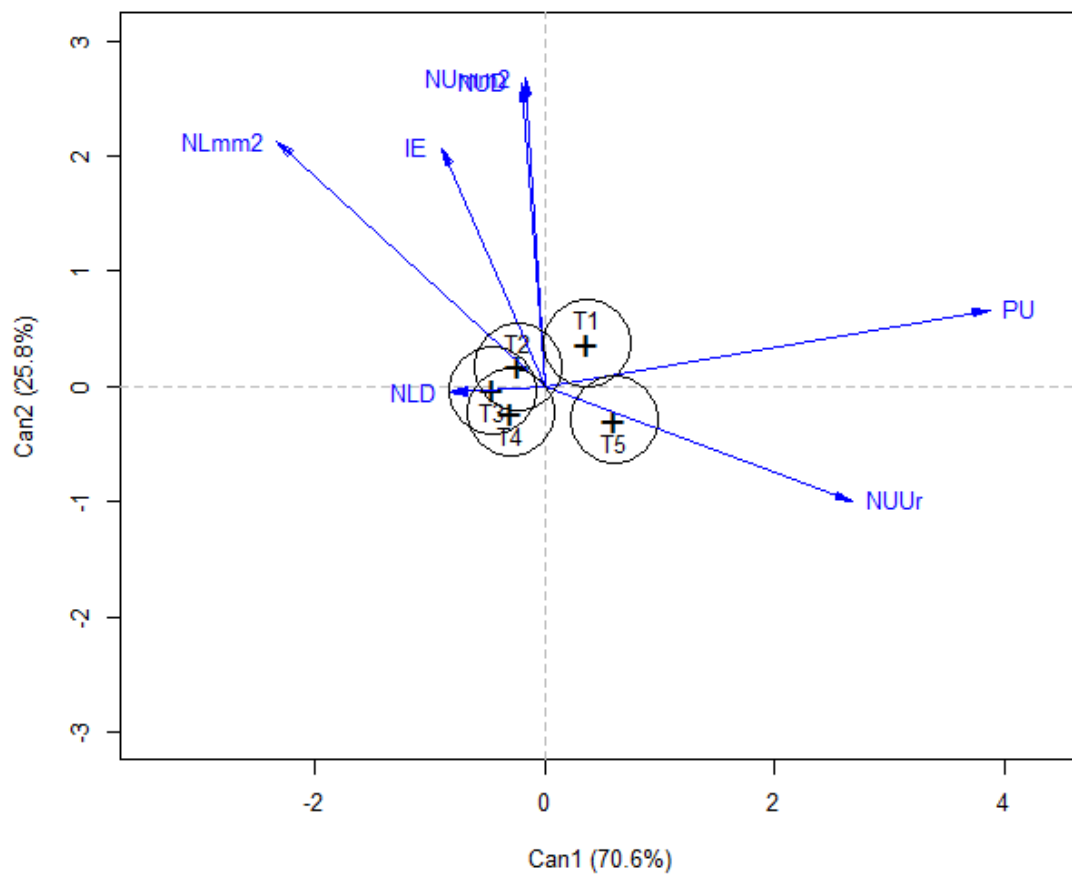


Figura 4. Variáveis canônicas para os parâmetros epidemiológicos a ferrugem asiática (setas) e os escores médios das cinco combinações químicas (esferas) do ensaio avaliado em Ipameri, GO, safra 2016/2017.

PRODUÇÃO DA SOJA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES ÉPOCAS DE APLICAÇÃO DE BIOESTIMULANTE

Cristiano de Freyn

Agronomia – PUCPR

Toledo – Paraná

Alexandre Luis Müller

Professor Agronomia – PUCPR

Toledo – Paraná

Dyogo Bortot Brustolin

Mestrando UNIOESTE

Toledo – Paraná

André Prechlak Barbosa

Professor Agronomia – PUCPR

Toledo – Paraná

Martios Ecco

Professor Agronomia – PUCPR

Toledo – Paraná

Vitor Hugo Rosseto Belotto

Agronomia – PUCPR

Toledo – Paraná

Luiz Henrique da Costa Figueiredo

Agronomia – PUCPR

Toledo – Paraná

Vinícius Fernando Carrasco Gomes

Agronomia – PUCPR

Toledo – Paraná

Matheus Henrique de Lima Raposo

Agronomia – PUCPR

Toledo – Paraná

Anderson José Pick Benke

Agronomia – PUCPR

Toledo – Paraná

Arlon Felipe Pereira

Agronomia – UFPR

Palotina – Paraná

Alan Benincá

Toledo – Paraná

RESUMO: A soja está entre as culturas mais cultivadas no mundo, no Brasil destaca-se com a maior área de cultivo. A aplicação de bioestimulantes exógenos é uma prática crescente, com o intuito de melhorar o desempenho fisiológico da cultura. O uso de bioestimulantes é uma técnica considerada eficiente. Esses produtos contêm em sua formulação hormônios vegetais, que atuam na planta a nível fisiológico, resultando em incrementos no crescimento e desenvolvimento vegetal. Assim o objetivou-se avaliar a produção da soja em função da aplicação de regulador vegetal em diferentes estádios de desenvolvimento da cultura. Para isso foi desenvolvido um estudo no município de Palotina – PR na safra 2015/16, utilizando-se o delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições e cinco tratamentos, representados pela aplicação foliar de Stimulate® nos estádios fenológicos, V3, V6, R1 e R5 na dose de 0,25 L ha⁻¹, e uma testemunha sem aplicação. Ao final do ciclo da soja foram avaliadas a altura de planta, altura de inserção

da primeira vagem, número de vagens por planta, número grãos por vagem, massa de mil grãos e produtividade. Os resultados demonstraram ausência de efeito significativo para épocas de aplicação de bioestimulante, não interferindo em nenhuma das variáveis avaliadas. Conclui-se assim, que o uso do bioestimulante Stimulate® nesta dosagem e nas condições do presente trabalho, aplicados em diferentes estádios fenológicos não interferem nas características produtivas da soja.

PALAVRAS-CHAVE: *Glycine max* L. Hormônios vegetais. Stimulate®.

SOYBEAN PRODUCTION AS A FUNCTION OF DIFFERENT APPLICATION TIMES OF BIOSTIMULANT

ABSTRACT: Soybeans are among the most cultivated crops in the world, in Brazil it stands out with the largest cultivated area. The application of exogenous biostimulants is a growing practice in order to improve the physiological performance of the crop. However, there has been little increase in cultivation areas and low increase in national productivity, so new studies that seek to maximize productivity are essential. The use of biostimulatory bioregulators is considered an efficient technique.. These products contain in their formulation plant hormones, which act on the plant physiologically, resulting in increases in plant growth and development. The objective of this study was to evaluate soybean yield as a function of the application of plant biostimulant in different stages of crop development. For this, a study was carried out in the municipality of Palotina - PR in the 2015/16 crop, using a randomized block design with four replications and five treatments, represented (leaf application of Stimulate® in the phenological stages, V3, V6, R1 and R5 at a dose of 0.25 L ha⁻¹, and a control without application). At the end of the soybean cycle, plant height, first pod insertion height, number of pods per plant, number of beans per pod, one thousand grain weight and yield were evaluated. The results showed no significant effect for times of biostimulant application, not interfering in any of the evaluated variables. It is concluded that the use of Stimulate® biostimulant at this dosage and under the conditions of the present work, applied at different phenological stages does not interfere with the soybean productive characteristics.

KEYWORDS: *Glycine max*. Plant Hormones. Stimulate®.

1 | INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das mais importantes culturas na economia mundial. Seus grãos são muito usados pela agroindústria (produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal), indústria química e de alimentos. Recentemente, vem crescendo também o uso como fonte alternativa de biocombustível (COSTA NETO & ROSSI, 2000).

O gênero *Glycine*, pertence à família Fabaceae, tendo origem o leste de Ásia, sendo a terceira maior família do grupo das angiospermas, compreendendo cerca de

727 gêneros e 19.325 espécies (LEWIS, 2005).

A soja é o principal grão produzido no Brasil e o principal item de exportação do país, tendo uma importante participação no Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Além disso, a soja é matéria-prima fundamental para diversos setores industriais (PETTER et al., 2016).

Para obter elevadas produtividades da cultura da soja é necessário que o genótipo responda as condições ambientais favoráveis e ao manejo adequado da cultura, seguindo técnicas recomendadas para o sistema de plantio, fertilização do solo entre outros fatores relacionados ao ambiente de produção.

Segundo Castro e Vieira (2001), o termo bioestimulante se refere à mistura de reguladores vegetais, ou de um ou mais reguladores vegetais com outros compostos de natureza bioquímica diferente (aminoácidos, nutrientes, vitaminas etc.).

Alguns estudos forneceram a base de que os bioestimulantes melhoraram a absorção e o acúmulo de nutrientes da planta (ZOHAIB et al., 2018).

Os bioestimulantes são definidos como substâncias capazes de promover maior crescimento de plântulas e plantas, o que justifica a necessidade de pesquisas para definir formas e épocas de aplicação desse produto, bem como a sua influência em estádios fenológicos mais avançados, com o intuito de obter um método para elevar a produção nacional (SOUZA & SILVA, 2013).

Devido ao pequeno crescimento na área de cultivo disponível para as culturas, principalmente para a soja ano após ano, se faz necessário que os produtores aumentem a produtividade de suas lavouras, tentando sempre diminuir os custos de produção, aliado aos impactos ambientais. Todos esses contribuem a utilizar bioestimulantes e adubos foliares como uma alternativa.

O Stimulate[®], é o produto mais utilizado no Brasil como bioestimulante, está disponível na forma líquida, sendo composto por 3 reguladores vegetais, contendo 90 mg L⁻¹ (0,009%) de cinetina (citocinina), 50 mg L⁻¹ (0,005%) de ácido giberélico (giberelina) GA3, 50 mg L⁻¹ (0,005%) de ácido indolbutírico (auxina) e 99,981% de ingredientes inertes (ADAPAR, 2016).

O uso de bioestimulantes tem sido uma prática agrônômica relativamente nova e com resultados contraditórios em várias culturas agrícolas. Diante desses dados são necessárias novas informações em relação ao uso destes em nossa região, proporcionando assim melhoras na produtividade.

Através dessas informações, o trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e a produtividade da soja em função da aplicação de regulador vegetal em diferentes estádios de desenvolvimento da cultura.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de campo, em uma propriedade rural na cidade de Palotina-PR, a qual possui uma localização geográfica de 24°

17' 02" S e 53° 50' 24" W e apresenta uma altitude aproximada de 333 metros ao nível do mar. O solo da região é classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico, com textura argilosa (SBCS, 2018), e o clima da região, segundo a classificação de Koppen é denominado Subtropical.

O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, composto por cinco tratamentos e quatro repetições por tratamento, totalizando 20 parcelas experimentais. Os tratamentos foram representados por: aplicação foliar de Stimulate® nos estádios fenológicos, V3, V6, R1 e R5 na dose de 0,25 L ha⁻¹, e uma testemunha sem aplicação. A escala fenológica utilizada foi a desenvolvida por Fehr e Caviness (1977).

A parcela experimental foi constituída por 4,05 m de largura, correspondendo a nove linhas de soja com espaçamento entre linhas de 0,45 m, e 5,0 metros de comprimento (área= 20,25 m²). A população de planta utilizada foi de 30 plantas por metro quadrado.

Para a semeadura se utilizou a cultivar NIDERA 5727 IPRO® que possui hábito de crescimento indeterminado, boa sanidade, excelente capacidade de engalhamento, potencial para antecipar a semeadura de safrinha de milho, um ciclo superprecoce, entre 115 a 133 dias.

A semeadura foi realizada no dia 07 de outubro de 2015, com nove linhas de plantio, espaçamento de 0,45 m entre linhas. A adubação na base foi realizada a partir do formulado 02-20-18 na dose de 250 kg ha⁻¹.

Para as aplicações utilizou-se um pulverizador costal elétrico à bateria, com vazão de 4 L ha⁻¹, com pressão de 4 BAR (58 PSI).

Aprimeira aplicação do bioestimulante foi realizada no estádio de desenvolvimento V3, que corresponde à segunda folha trifoliada completamente desenvolvida (terceiro nó), a segunda aplicação foi efetuada no estádio V6, correspondente a quinta folha trifoliada completamente desenvolvida (sexto nó), a terceira aplicação no estádio R1, que é o início da floração e a última aplicação em R5 que corresponde a fase de início de enchimento de grão.

Durante o desenvolvimento da cultura se fez necessário o emprego da aplicação aos 25 DAE de Glyphosate com dosagem de 2 L ha⁻¹ para o controle de plantas indesejáveis e aplicação fungicida pertencente ao grupo dos triazóis. Foi feito ainda uma segunda e terceira aplicação de fungicida aos 40 e 60 DAE respectivamente para prevenção de doenças. Foi realizada também uma aplicação de organofosforado, com dose de 200 g ha⁻¹, para o controle de Percevejo verde-pequeno (*Piezodorus guildini*), Percevejo marrom (*Euchistus heros*) e Percevejo da soja (*Nezara viridula*).

No final do ciclo da cultura foi realizada a colheita no dia 30 de janeiro de 2016, e foi considerada como parcela útil as três fileiras centrais 1,35 m x 4,0 m de comprimento, área útil 5,4 m².

Nesse momento foram avaliadas as seguintes características agrônômicas em 10 plantas escolhidas aleatoriamente dentro da parcela: número de vagens por planta, altura de plantas (m) e número de grãos por vagem.

O número de vagens por planta foi avaliado através da contagem de forma manual do número de vagens presentes nas 10 plantas que foram escolhidas aleatoriamente na parcela. Para altura de plantas e altura de inserção da primeira vagem, foram realizadas medições com auxílio de régua milimetrada, e seus resultados expressos em centímetros. O número de grãos por vagem foi realizado através da retirada de todas vagens das plantas, e assim, realizada a contagem.

Ainda se avaliou após a colheita e trilha das vagens a massa de mil grãos (g) e a produtividade (kg ha^{-1}).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico SISVAR[®] 4.0 conforme o delineamento adotado, e se necessário foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao observar a análise de variância dos dados, pode-se verificar que não foram obtidas diferenças significativas para nenhum dos parâmetros avaliados a um nível de probabilidade de 5% de erro pelo teste F.

Assim, a ausência de diferença significativa está ligada a adequada condição climática ocorrida durante a condução do experimento, que possibilitou a cultura da soja uma adequada disponibilidade hídrica e em intervalos regulares, durante todo seu ciclo produtivo, aliado a adequada temperatura. Pois, embora o bioestimulante Stimulate[®] seja composto por hormônios vegetais e atuar em níveis fisiológicos e bioquímicos, sua ação pode ser influenciada dentre outros fatores pela condição de fertilidade do solo, pragas e doenças (SANTOS et al., 2014) e também por fatores climáticos como a precipitações e altas temperaturas (RODRIGUES et al., 2004).

Desta forma, sem a ocorrência de um estresse ambiental, a soja conseguiu se desenvolver adequadamente, resultando em ausência de diferenças significativas. Soma-se a essa condição que durante todo o ciclo da cultura foram aplicados tratamentos culturais, possibilitando a soja se desenvolver livre de pragas e doenças.

A cultura da soja neste estudo não apresentou incrementos de altura (ALT) com o uso de Stimulate[®].

Dessa maneira, resultados contrários ao obtido no presente estudo são relatados por Carvalho et al (2013), que estudando a aplicação de bioestimulante na cultura da soja encontraram aumento significativo na altura de plantas. Bertolin et al. (2008) também obtiveram maiores alturas de planta utilizando-se Stimulate[®].

Na Tabela 1 observa-se os valores médios dos parâmetros avaliados para cada tratamento empregado. Pode-se observar que em todos os tratamentos a ALT não respondeu à aplicação do bioestimulante.

Tratamentos	ALT ^{ns} (cm)	NVP ^{ns}	NGV ^{ns}	MMG ^{ns} (g)	PROD ^{ns} (kg ha ⁻¹)
Testemunha	86	36	2,5	189	3784
Estádio V3	86	36	2,5	186	3999
Estádio V6	87	34	2,5	186	3969
Estádio R1	85	35	2,5	194	4066
Estádio R5	84	33	2,5	186	3971

Tabela 1 - Valores médios de altura de planta (ALT), número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), massa de mil grãos (MMG) e produtividade (PROD).

^{ns} não significativo ($p < 0,05$).

Para o NVP era esperado que a aplicação Stimulate® acarretasse um incremento, por esse ter em sua composição giberelina, hormônio ligado a floração, contudo, o mesmo não ocorreu. Como não tivemos incrementos em altura de planta, possivelmente o número de nós na haste principal foi próximo em todos os tratamentos, conduzindo assim a ausência de respostas.

Buzzelo (2010) não encontrou diferença no número de vagem por plantas de soja em função da aplicação de diferentes bioestimulantes em Pato Branco – PR. Aliado a isso, Souza et al. (2013) não encontrou diferenças no número de grãos por vagem com a aplicação de trinexapac-ethyl em soja R1.

Souza et al. (2013), relatam ausência de significância para o NGV, e relacionam tal resposta ao fator genético. Eles ainda citam que em outras plantas com frutos do tipo legume, no caso o feijoeiro, tal resposta é observada, pois seu legume contém uma maior variação no número de grãos assim incrementos podem ser mais facilmente observados.

A ausência de resposta na MMG liga-se a ausência de diferença obtidas para o NVP e NGV, ou seja, a planta possuía número de drenos, vagens e grãos, semelhantes, assim, a translocação de fotoassimilados ocorreu de forma igualitária entre todos os tratamentos, resultando em ausência de resposta.

Corroborando com os dados obtidos neste estudo, Prieto et al., (2017) observou que a aplicação de bioestimulante no que se refere à massa de 1000 grãos de soja, não apresentou influência. Segundo Balbinot Jr et al. (2015) esta variável é dependente das características genéticas das plantas e ao manejo da cultura.

Para a produtividade da cultura da soja em todos os tratamentos empregados, bem como a média geral ficaram acima do relatado para o estado do Paraná para a safra de 2015/2016, que foi de 3090 kg ha⁻¹ (CONAB, 2016).

A produtividade da cultura da soja é a característica agrônômica de maior importância, visto que os grãos são a parte a ser comercializada e apresenta valor comercial. Contudo, para que a produtividade seja incrementada vários fatores devem ser associados e somar-se para que ocorra incrementos em produtividade, tais como fatores climáticos e edáficos.

Prieto et al. (2017), diferindo dos resultados apresentados neste trabalho, encontrou acréscimo na produtividade de grãos cultura da soja com à aplicação de bioestimulante, na qual a aplicação no estágio V1 da soja permitiu aumento de 6,78% (171 kg ha⁻¹) comparado à testemunha.

Como demonstrado na discussão dos resultados, vários trabalhos demonstram o efeito positivo do Stimulate[®], e que ele tem seu efeito influenciado por diferentes fatores envolvidos no sistema produtivo da soja.

Nestas condições, tem-se que considerar que os resultados obtidos podem ter sofrido ação de outros meios, não controláveis. Assim, novos estudos devem ser realizados para verificar o comportamento do Stimulate[®], envolvendo dentre outros, estádios fenológicos, tratos culturais e cultivares de soja.

4 | CONCLUSÃO

A produção da soja não apresentou melhora significativa sob as aplicações isoladas de Stimulate[®] em diferentes estádios fenológicos.

A ausência de diferença significativa está ligada a adequada condição climática durante a condução do experimento. Soma-se a essa condição que durante todo o ciclo da cultura foram aplicados tratos culturais, possibilitando a soja se desenvolver livre de pragas e doenças.

REFERÊNCIAS

ADAPAR – Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. **Bula Stimulate[®]**. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Outros/STIMULATE.pdf>> Acesso em: 28 junho 2016.

BALBINOT Junior, A.A.; PROCÓPIO, S.O.; DEBIASI, H.; FRANCHINI, J.C.; PANISON, F. **Semeadura cruzada em cultivares de soja com tipo de crescimento determinado**. Semina: Ciências Agrárias, v.36, p.1215- 1226, 2015.

BERTOLIN, D. C.; SÁ, M. E.; HAGA, K. Y.; ABRANTES, F. L.; NOGUEIRA, D. C. **Efeito de bioestimulante no teor e no rendimento de proteína de grãos de soja**. Agrarian, Dourados, v. 1, n. 2, p. 23-34, 2008.

Boletim informativo Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (SBCS). Vol. 44, n. 1. pg 52. Campinas: SBCS, 2018.

BUZZELLO, G. L. **Uso de reguladores no controle do crescimento e no Desempenho agrônomo da cultura da soja cultivar CD 214 RR**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2010.

CARVALHO, J. C.; VICCELLI, C. A.; ALMEIDA, D. K. **Produtividade e desenvolvimento da cultura da soja pelo uso de regulador vegetal**. Acta Iguazu, Cascavel, v. 2, n.1, p. 50-60, 2013.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 2001.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: Conab, 2016.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. **Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura**. Química Nova, v.23, p. 4, 2000.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development. Special Report**, 8. Iowa State University, Ames, USA, 1977. 12 p.

LEWIS, G, P. **Legumes of the World. Royal Botanic Gardens Kew**, 577p. 2005.

PETTER, F.A. et al. **Elevada densidade de semeadura aumenta a produtividade da soja? Respostas da radiação fotossinteticamente ativa**. Bragantia, v.75, n.2, p.173-183, 2016.

PRIETO, C. A.; ALVAREZ, J. W. R.; FIGUEREDO, J. C. K.; TRINIDAD, S. A. **Bioestimulante, biofertilizante e inoculação de sementes no crescimento e produtividade da soja**. Revista de Agricultura Neotropical, Cassilândia-MS, v. 4, n. 2, p. 1-8, 2017.

RODRIGUES, J. D.; GODOY, L. J. G.; ONO, E. O. **Reguladores vegetais: bases e princípios para utilização em gramados**. In: SIGRA – SIMPÓSIO SOBRE GRAMADOS – “MANEJO DE GRAMAS NA PRODUÇÃO E EM GRAMADOS FORMADOS”, 2., 2004, Botucatu. Anais... Botucatu: FCA/Unesp, 2004. 30 p. CD-ROM.

SANTOS, V. M.; MELO, A. V.; CARDOSO, D. P.; SILVA, A. R.; BENÍCIO, L. P. F.; FERREIRA, E. A. **Desenvolvimento de plantas de soja em função de bioestimulante em condições de adubação fosfatada**. Bioscience Journal, Uberlândia, v. 30, n. 4, p. 1087-1094, 2014.

SOUZA, C. A.; FIGUEIREDO, B. P.; COELHO, C. M. M.; CASA, R. T.; SANGOI, L. **Plant architecture and productivity of soybean affected by Plant growth retardants**. Biosci. J., Uberlândia, v. 29, n. 3, p. 634-643, 2013.

SOUZA, E. F. C.; SILVA, M. A. **Ecofisiologia tritícola**. Revista Varia Scientia Agrárias, Cascavel, v. 3, n. 1, p. 171-187. 2013.

ZOHAIB, A.; TABASSUM, T.; JABBAR, A.; ANJUM, S. A.; ABBAS, T.; MEHMOOD, A.; IRSHAD, S.; KASHIF, M.; NAWAZ, M.; FAROOQ, N.; NASIR, I. R.; RASOOL, T.; NADEEM, M.; AHMAD, R. **Effect of Plant Density, Boron Nutrition and Growth Regulation on Seed Mass, Emergence and Offspring Growth Plasticity in Cotton**. Scientific Reports, v.8, n.7953, p. 1-14, 2018.

BIOGAS PRODUCTION FROM SECOND GENERATION ETHANOL VINASSE

Manuella Souza Silverio

Universidade de São Paulo, Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”
Piracicaba - São Paulo

Rubens Perez Calegari

Universidade de São Paulo, Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”
Piracicaba - São Paulo

Gabriela Maria Ferreira Lima Leite

Faculdade de Tecnologia Deputado Roque
Trevisan
Piracicaba - São Paulo

Bianca Chaves Martins

Universidade de São Paulo, Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”
Piracicaba - São Paulo

Eric Alberto da Silva

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
São Paulo - São Paulo

José Piotrovski Neto

Engie Brasil Energia
Florianópolis - Santa Catarina

Mario Wilson Cusatis

Engie Brasil Energia
Florianópolis - Santa Catarina

André Gomig

Engie Brasil Energia
Florianópolis - Santa Catarina

Antonio Sampaio Baptista

Universidade de São Paulo, Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”
Piracicaba - São Paulo

ABSTRACT: Anaerobic digestion has raised as an efficient solution for both biowastes management and renewable energy supply. In Brazil, the sucroenergetic industry generates great amounts of vinasse, the biowaste from ethanol process, which has high contents of soluble organic matter. Such feature makes vinasse a very suitable wastewater for biogas production. Very recently, second generation (2G) ethanol process has been implemented in the Brazilian industry and 2G vinasse is expected to a different chemical composition than first generation (1G) vinasse, since the 2G ethanol process has different operations. In this study we aimed to investigate the 2G vinasse potential for biogas production. Affluent 2G vinasse was characterized and high concentrations of acetic acid, total phenolic compounds (TPC) and sulphate were determined. No detectable concentration of furans was found. The experiment was carried out in a 5 L up flow reactor and the process was monitored by volumetric biogas production and concentration of Chemical Oxygen Demand, acetic acid, propionic acid, butyric acid, TPC and sulphate. Effluent recirculation was employed in the process for a ten days period. The experiment reached a mean value for biogas production of $0.41 (\pm 0.19) L_{\text{biogas}} DQO_{\text{remov}}^{-1}$, which is a satisfactory result in comparison to previous studies with 1G vinasse. Effluent recirculation

had a positive impact on biogas production process, which was observed by organic acids concentrations decrease. Results indicate that 2G vinasse has a very interesting potential for biogas production especially due to its high acetic acid content.

KEYWORDS: biogas; anaerobic digestion; second generation vinasse; lignocellulosic ethanol; effluent recirculation

PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE VINHAÇA DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

1 | INTRODUCTION

Brazil is among the countries with the largest shares in renewable energy contribution. In 2018, 83.3% of electricity in Brazil came from sustainable energy. In the same year, renewable sources contributed with 45.3% in total energy generation. Among renewable sources, sugarcane biomass had the largest participation in the Brazilian energy supply, with 17.4% (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2019).

In Brazil, biogas represents only 0.07% of the total energy supply. Meanwhile, in other countries, especially in Europe, biogas production by anaerobic digestion is seen as a crucial technology for achieving sustainable energy and an efficient alternative for waste management (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2019; ANDRITZ GROUP, 2013).

More recently, the second generation (2G) ethanol process has expanded, which is the ethanol produced from lignocellulosic hydrolysate. Such process is not available all over the country yet, although it is expected to expand soon, since its implementation might increase ethanol production by about 160% (DIAS et al., 2012).

Meanwhile, the first generation (1G) ethanol process generates about 10-15 L of vinasse per liter of ethanol. Considering that Brazil produced 33.1 billion liters of ethanol in 2018/2019, vinasse production was estimated at about 330 billion liters for the same period (UNICADATA, 2019; CORTEZ, 2014; PANT; ADHOLEYA, 2007).

Although 2G ethanol process has become feasible in the Brazilian industry very recently, it is already known that it does not reduce vinasse generation. In general, 2G process allows higher sugar concentrations in fermentation broths and, besides, it also carries byproducts from sugarcane bagasse physical chemical treatments along the process. Because of these factors, it is very likely for fermentation broths in 2G process to be even more diluted than those from 1G process, what might lead to higher vinasse volumes (JARDINE; DISPATO; PERES, 2009; MONLAU et al., 2014).

Vinasse has a polluting potential about a hundred times higher than domestic sewage and its composition is very variable, depending on sugarcane variety, yeast

strain, ethanol production process, etc (CORTEZ, 2014).

For 2G ethanol process, vinasse composition is expected to be different from 1G ethanol vinasses. Physical, chemical and enzymatic treatments are applied on sugarcane bagasse and, during the process, compounds such as organic acids and phenolic compounds are released into the fermentation broth. Since they are not significantly consumed during alcoholic fermentation, those compounds might be found in vinasse. Some of these compounds are organic acids, phenolic compounds and furans, such as furfural and 5-hydroxymethylfurfural (CORTEZ, 2014; PANT; ADHOLEYA, 2007; JARDINE; DISPATO; PERES, 2009; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000; KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004).

In this study, our purpose was to investigate the 2G vinasse potential for biogas production. Special attention was given to 2G vinasse compounds such as total phenolic compounds (TPC) and organic acids, which are potential microbial inhibitors and byproducts from sugarcane bagasse pretreatment. Anaerobic digestion was carried out in laboratory scale and monitored by biogas volumetric production, COD removal, organic acids production, phenolic and sulphate consumption.

2 | MATERIAL AND METHODS

Both methanogenic inoculum and 2G vinasse were obtained from industrial plants in São Paulo state, Brazil.

The experiment was performed in a 5 L up flow reactor, operated with 4 L working volume, at 38 ± 2 °C. The reactor was set up with 3 L of granular sludge and 1 L of 2G vinasse. Experiment was carried out as a fed-batch process. During operations, the feeding volume was 0.5 L. Hydraulic retention time was 16.61 (± 2.3) days and data collection took 64 days of experiment.

In operating the reactor, effluent recirculation was employed between 47th and 57th days of experiment in order to increase biogas production by returning hydrolysate organic matter (PEREIRA-RAMIREZ, 2004). During effluent recirculation period, the same feeding volume was used and affluent consisted of a mixture of 2G vinasse and reactor effluent (1:1).

For our experiments, *in natura* 2G vinasse was diluted and the affluent Chemical Oxygen Demand (COD) concentration was 13,751.12 ($\pm 2,598.21$) mgO₂ L⁻¹. Vinasse's pH was adjusted to 7.3 (± 0.5) using NaHCO₃.

2.1 Analytical Methods

Vinasse organic matter content was analyzed by COD concentration, which was determined using the colorimetric method described in (APHAa, 2012). Samples were diluted fifty times. Inoculum was characterized by its volatile total solids (VTS) content before starting the experiment and in the end of data collection. Analyses

were performed in triplicate (APHAb, 2012).

Biogas volumetric production was measured daily, using a Wet Tip Gas Meter®. Total phenolic compounds (TPC) analyses were performed following the procedure described elsewhere (JULKUNEN-TIITTO, 1985). Samples were previously diluted fifty times.

Organic acids (acetic acid, butyric acid and propionic acid) were analyzed in a UFLC Prominence high performance liquid chromatography system (Shimadzu®) with Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm; Bio-Rad®) column. Analyses were carried out as previously described by other authors (PENTEADO et al., 2013). Samples were diluted a hundred times and filtered with hydrophilic membrane syringe filters, pore size 0.45 µm.

Furfural and HMF analyses consisted of a system with a Shim-pack VP-ODS (5 µm) de 250 x 4.6 mm column, Shimadzu®, at 25 °C, eluted with acetonitrile and acetone (1:8 v v⁻¹) in acetic acid (1% v v⁻¹), at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹, and DAD detector (SPD-M20A) (275 nm). Samples were diluted fifty times, filtered with hydrophilic membrane syringe filters, pore size 0.45 µm and analyzed in a volume of 20 µL. Sulphate was determined using 930 Compact IC Flex system (Metrohm®), with Metrosep A Supp 5 250/4.0 column, at 25°C. Analyses were carried out as described elsewhere (NARAYARAN, 2016).

Dispersion statistics analyses and histograms were performed using Microsoft Excel® 2010.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Inoculum and affluent 2G vinasse characterization

Inoculum VTS contents in the beginning and in the end of experiment were 17,900 (± 2,969) mg L⁻¹ and 80,920 (± 5,830) mg L⁻¹, respectively, indicating that methanogenic inoculum had important cellular growth during 2G vinasse treatment process.

Data shown in Table 1 present affluent 2G vinasse composition in other important compounds for anaerobic digestion.

COD _{affluent} (mg L ⁻¹)	13,751.12 (± 2,598.21)
Acetic Acid _{affluent} (mg L ⁻¹)	9,999.71 (± 1,889.40)
Butyric Acid _{affluent} (mg L ⁻¹)	737.59 (± 139.36)
Propionic Acid _{affluent} (mg L ⁻¹)	ND
Total Phenolic Compounds _{affluent} (mg L ⁻¹)	812.14 (± 225.69)
Furfural (mg L ⁻¹)	ND
HMF (mg L ⁻¹)	ND
Sulphate (mg L ⁻¹)	949.69 (± 214.70)

Table 1. Chemical composition of affluent vinasse

ND: not detectable.

No detectable concentrations of furfural and HMF were found. However, it is noteworthy how relevant acetic acid concentration was, as high as 9,999.71 (\pm 1,889.40) mg L⁻¹. Some authors report that acetic acid concentration in 1G vinasses might be up to 2,200 mg L⁻¹ (DOWD et al., 1994; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2012).

Besides acetic acid, affluent TPC and affluent sulphate were present in relatively high concentrations. In 2G vinasse, the high TPC concentration (812.14 \pm 225.69 mg L⁻¹) is a consequence of lignocellulosic material hydrolysis (MONLAU et al., 2014). In 1G vinasses, TPC are not supposed to be found in detectable concentrations since fermentation broth is not derived from lignocellulosic feedstock (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

In regards to sulphate concentration, it is very variable in anaerobic systems. Some authors have reported working with affluent sulphate concentrations from 140 to 1,100 mg L⁻¹ (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2015; NACHEVA et al., 2009). In our analyses, affluent 2G vinasse had 949.69 (\pm 214.70) mg L⁻¹ of sulphate, which is a high concentration according to literature.

3.2 Biogas Production

Biogas daily production throughout 64 days of experiment is given in Figure 1. The mean value for daily volume was 0.79 (\pm 0.33) L day⁻¹. The process had an increasing biogas production until 16th day, when it reached maximum volumetric production (1.65 L day⁻¹).

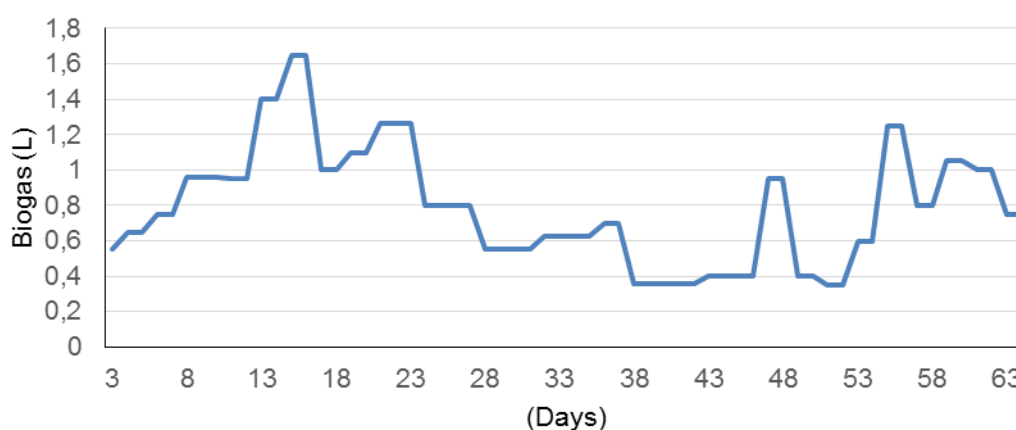


Figure 1. Daily biogas production

In our studies, the average COD removal was 39.47% (\pm 17.19) and biogas production per COD removal was 0.41 (\pm 0.19) L_{biogas} gCOD_{removed}⁻¹. Anaerobic systems have potential for removing up to 90% of affluent COD (MOLINA et al., 2007; GAO;

SHE; JIN, 2007). However, lower COD removal efficiencies, such as 30-45%, have also been reported for other anaerobic systems (FRANCO et al., 2007; HARADA et al., 1996). Concerning biogas production, other authors (HARADA et al., 1996; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2012) have reported results such as 0.21 and 0.35 $L_{\text{biogas}} \text{gCOD}_{\text{removed}}^{-1}$ for 1G vinasse as substrate in processes with 20-69% COD removal efficiency.

Some authors have reported that systems under operation for longer periods of time (about 200 days) are likely to achieve higher COD removal efficiencies ($\geq 80\%$) (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2015; HARADA et al., 1996; OMIL et al., 1998).

Firstly, biogas production and COD removal are strongly linked to many factors in an anaerobic system, such as organic matter content and its composition, inoculum characteristics, reactor design and many others (McCARTY, 1964). Secondly, it is important to state that COD concentration is a non-specific determination of organic matter. Comparing our study with the results obtained by the authors cited above (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2012; HARADA et al., 1996), it is possible to notice that although higher COD removal efficiencies were achieved by the authors, lower volumes of biogas (in terms of $L_{\text{biogas}} \text{gCOD}_{\text{removed}}^{-1}$) were produced as well.

It is important to point out that the vinasse used in one of those studies (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2012) had a very different composition in acetic acid (2,237 mg L^{-1}) when compared to the 2G vinasse we employed in our experiment (Table 1). Acetic acid is a substrate directly assimilated by acetoclastic methanogenic archaea. Since 2G vinasse had a high concentration of acetic acid, it is suggested that such supply made acetoclastic methanogenic archaea nearly independent from bacterial organic matter degradation for acetic acid availability. Biogas production due to high acetic acid concentration is strongly supported by previously elucidated biochemical pathways in anaerobic systems (MOSEY, 1982; McCARTY, 1964). However, further research would be required to definitely determine if that was the only 2G vinasse compound involved in such performance.

Acetic acid concentration as high as what was determined in 2G vinasse is a consequence of sugarcane bagasse pretreatment. Hemicellulose, one of bagasse components, is majorly consisted of sugars and acetyl groups. Once enzymatic treatment releases fermentable sugars into hydrolysate, acetyl groups are released as well and might be converted into acetic acid (JARDINE; DISPATO; PERES, 2009). Since acetic acid is not significantly consumed during alcoholic fermentation, it might be carried along the process until vinasse generation. Acetic acid may be detected in 1G vinasses as well, but in those cases the main source is contamination by acetic bacteria during alcoholic fermentation (DOWD et al., 1994).

Thus, our results indicate that despite lower COD removal efficiency, the system was capable of giving satisfactory biogas production when compared to other authors' results (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2012; HARADA et al., 1996), most probably due to 2G vinasse content in acetic acid.

By the 40th day biogas production efficiency decreased, it did not recover satisfactorily and organic acids concentration increased. For this reason, effluent recirculation was employed (47th - 57th days) and biogas production was recovered after 47th day of experiment.

It was later observed that preferential flow channels were formed inside the reactor, what might have disturbed organic matter diffusion and metabolites transfer among microorganisms. The reactor we used in the experiment had a single channel for affluent entrance. The implementation of structures to facilitate efficient affluent diffusion once they reach the reactor interior would probably have minimized this kind of problem.

Once complex organic matter is hydrolyzed by bacteria, carbohydrates, proteins and others organic polymers are converted majorly into butyric acid, propionic acid and acetic acid. Effluent recirculation means recirculating hydrolyzed organic matter, decreasing organic acids concentrations because it minimizes complex organic matter input in the system (PEREIRA-RAMIREZ, 2004; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2015).

Between 24th and 46th days, when decreasing production was observed, average biogas production was 0.55 L day⁻¹. Between 47th and 57th days, average biogas production reached 0.72 L day⁻¹.

Although acetic acid concentrations were very high until 14th day (Table 2), the system was able to handle the acid conditions and biogas production did not drop. From 21st day on, the reactor effluent presented unstable acetic acid concentrations. By the 40th day, biogas production dropped and in the 44th day the reactor had very elevated concentrations of organic acids. By the 60th day, after effluent recirculation, acetic acid, propionic acid and butyric acid concentrations dropped by, respectively, 95.21%, 100% and 75.86%.

Day	Acetic acid (mg L ⁻¹)	Propionic acid (mg L ⁻¹)	Butyric acid (mg L ⁻¹)	TPC removal efficiency (%)
3	829.98	ND	ND	66.44
7	1,927.66	ND	605.24	-
14	6,132.42	2495.52	712.20	59.91
21	9,326.25	2,686.2	2,796.51	-
24	-	-	-	31.18
28	10,693.62	3178.34	1768.57	-
35	-	-	-	67.12
36	,7,081.2	3,155.46	1,753.99	-
40	2,715.57	2,133.3	1,311.96	-
42	2,920.23	2,094.9	2,560.62	70.57
44	3,982.77	4,817.64	2,423.59	-
49	2,428.65	3,334.26	2,240.94	40.87
52	1,663.20	3,290.34	1,468.965	-
56	1,557.27	ND	818.35	-
58	764.69	ND	ND	-

60	190.88	ND	585.14	46.14
64	-	-	-	60.10

Table 2. Analyses of acetic acid, propionic acid and butyric acid quantification and analysis of TPC removal efficiency in the effluent of anaerobic digestion of 2G vinasse.

ND: not detectable. (-) Analyses were not performed in this date.

Although it is desirable to keep organic acids at the lowest possible concentrations, previous studies have also reported high organic acids concentrations. Some determined acetic acid concentrations as high as 1,370 and 6,000 mg L⁻¹; butyric acid between 886 and 1,193 mg L⁻¹; and propionic acid concentrations such as 2,800 and 3,009 mg L⁻¹ (LEITE et al., 2015; GOODWIN; STUART, 1994; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2012; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2015).

Total phenolic compounds concentration was monitored during the experiment (Table 2). Due to their hydrophobicity, phenolic compounds might have negative effects on different microbial groups. Cellular membrane permeability might be destabilized and intracellular components might leak out. Besides, once phenolic compounds reach the cytoplasm, they might inactivate enzymes or lead to the formation of reactive oxygen species (H₂O₂, O₂⁻, OH[•]). Apoptose cell process might be initiated or cell metabolism is decreased (MONLAU et al., 2014).

It was observed that the system was able to steadily consume affluent TPC, with a mean value of 55.29% (± 14.22) of removal efficiency. It was noticed that between 24th and 42nd days, when lower biogas production was achieved and higher organic acids concentration were detected, TPC removal efficiencies did not drop.

In anaerobic systems, some authors reported that TPC concentrations up to 500 mg L⁻¹ are well tolerated by microorganisms involved in biogas production (CHAPLEUR et al., 2016) and in the presence of high acetic acid concentrations (above 2,000 mg L⁻¹), microorganisms' TPC tolerance is increased to up to 1,200 mg L⁻¹ of phenol (FEDORAK; HRUDEY, 1984). Therefore, our results indicate that not only the system was not inhibited by 2G vinasse composition in terms of TPC, but it was also able to steadily consume them.

Regarding sulphate removal, the system had an average efficiency of 85.76% (±16.14). Anaerobic systems are usually very efficient in removing sulphate, since SRB are commonly present in anaerobic inocula. Other authors (GODOI; DAMIANOVIC; FORESTI, 2015) reached from 85.2% (± 4.6) to 97.3% (±1.4) of sulphate removal efficiency.

Anaerobic sludges are very complex inocula. Besides archea and bacterial groups important for methanogenesis, there are also sulphate reducing bacteria (SRB). Whenever there is sulphate in an anaerobic system, SRB compete with hydrogenotrophic archea for H₂ and H₂S is produced. Aiming at biogas production, such metabolic pathway is not desirable for biogas production, because H₂S is a toxic, corrosive gas and it decreases biogas quality (GODOI; DAMIANOVIC; FORESTI,

2015; STAMS; PLUGGE, 2009).

4 | CONCLUSION

Biogas production was not inhibited by 2G vinasse composition and it reached satisfactory performance, achieving mean value of $0.41 (\pm 0.19) L_{\text{biogas}} \text{ gDQO}_{\text{remov}}^{-1}$. Acetic acid is a crucial compound for biogas production and it was determined at very high concentration in affluent 2G vinasse, $9,999.71 (\pm 1,889.40) \text{ mg L}^{-1}$. Then, the 2G vinasse composition in terms of acetic acid might have strongly contributed for the satisfactory biogas production results. Furans, which could have led to biogas production inhibition, were not detected in the 2G vinasse used in this study. Other important compounds in 2G vinasse were total phenolic compounds. Total phenolic compounds were detected at $812.14 (\pm 225.69) \text{ mg L}^{-1}$ and removal efficiency was $55.29\% (\pm 14.22)$.

5 | FUNDING

This study was financed by Engie Brasil Energia S.A., which had no involvement in the collection, analysis, interpretation of data or in the writing of the manuscript, and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Finance Code 001.

REFERENCES

ANDRITZ GROUP. **Biogas - An Important Renewable Energy Source**. Estocolmo, 2013. Disponível em: <<https://worldbioenergy.org/uploads/Factsheet%20-%20Biogas.pdf>>. Acesso em 19 nov. 2016.

APHAa. 5220 D. Chemical Oxygen Demand. Closed Reflux, Colorimetric Method. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22ed. Washington: American Public Health Association. 2012. p. 5-14-5-19.

APHAb. 2540 Solids. In **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22ed. Washington: American Public Health Association. 2012. p. 2-55-2-61.

CHAPLEUR, O. et al. **Increasing concentrations of phenol progressively affect anaerobic digestion of cellulose and associated microbial communities**. *Biodegradation*, v. 27, p. 15-27. 2016. DOI: 10.1007/s10532-015-9751-4.

CORTEZ, L. A. B. **Sugarcane bioethanol - R&D for Productivity and Sustainability**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2014.

DIAS, M.O.S. et al. **Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash**. *Biorsource Technology*, v. 103, p. 152-161. 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.09.120.

DOWD, M. K. et al. **Low molecular weight organic composition of ethanol stillage from sugarcane molasses, citrus waste, and sweet whey**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.

42, p. 283-288. 1994. DOI: 10.1021/jf00038a011.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balço Energético Nacional 2019 - Relatório Síntese / Ano Caso 2018**. Rio de Janeiro, maio 2019. Disponível em : <<http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-377/topico-470/Relat%C3%B3rio%20S%C3%ADntese%20BEN%202019%20Ano%20Base%202018.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2019.

ESPAÑA-GAMBOA, E. I. et al. **Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor**. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, p. 82-90. 2012. DOI: 10.1186/1754-6834-5-82.

FEDORAK, P. M.; HRUDEY, S. E. **The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis**. *Water Research*, v. 18, p. 361-367. 1984. DOI: 10.1016/0043-1354(84)90113-1.

FRANCO, A. et al. Learning to operate anaerobic bioreactors. In: **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Microbiology vol. 2**. Badajoz: Formatex. 2007. p. 618-627.

GAO, M.; SHE, Z.; JIN, C. **Performance evaluation of a mesophilic (37°C) upflow anaerobic sludge blanket reactor in treating distiller's grains wastewater**. *Journal of Hazardous Materials*, v. 141, p. 808–813. 2007. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2006.07.047.

GODOI, L. A. G.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. **Sufidogenesis interference on methane production from carbohydrate-rich wastewater**. *Water Science & Technology*, v. 72 p. 1644-1652. 2015. DOI: 10.2166/wst.2015.383.

GOODWIN, J. A. S.; STUART, J. B. **Anaerobic digestion of malt whisky distillery pot ale using up flow anaerobic sludge blanket reactors**. *Bioresource Technology*, v. 49. p. 75-81. 1994. DOI: 10.1016/0960-8524(94)90175-9.

HARADA, H. et al. **Anaerobic treatment of a recalcitrant distillery wastewater by a thermophilic UASB reactor**. *Bioresource Technology*, v. 55, p. 215-221. 1996. DOI: 10.1016/0960-8524(96)00003-X.

JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. **Considerações Sobre o Bioetanol Lignocelulósico para Subsidiar a Elaboração de Conteúdo da Árvore do Conhecimento Agroenergia**. Campinas, nov. 2009. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/informatica-agropecuaria/busca-de-publicacoes/-/publicacao/631725/consideracoes-sobre-o-bioetanol-lignocelulosico-para-subsidiar-a-elaboracao-de-conteudo-da-arvore-do-conhecimento-agroenergia>>. Acesso em: 29 mar. 2016.

JULKUNEN-TIITTO, R. **Phenolic Constituents in the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 33, p.213-217. 1985. DOI: 10.1021/jf00062a013.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. **Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, p. 10-26. 2004.

LEITE, A. F. et al. **Improved monitoring of semi-continuous anaerobic digestion of sugarcane waste: effects of increasing organic loading rate on methanogenic community dynamics**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 23210-23226. 2015. DOI: 10.3390/ijms161023210.

LÓPEZ-LÓPEZ, A. et al. **Influence of alkalinity and VFAs on the performance of an UASB reactor with recirculation for the treatment of tequila vinasses**. *Environmental Technology*, v. 36, p. 2468-2476. 2015. DOI: 10.1080/09593330.2015.1034790.

McCARTY, P. L. **Anaerobic Waste Treatment Fundamentals**. Public Works, Chemistry and Microbiology, v. 95, n. 107–126. 1964.

MOLINA, F. et al. **Winery effluent treatment at an anaerobic hybrid USBF pilot plant under normal and abnormal operation**. Water Science and Technology, v. 56, p. 25-31. 2007. DOI: 10.2166/wst.2007.468.

MONLAU, F. et al. **Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review**. Biotechnology Advances, v. 32, p. 934-951. 2014. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.04.007.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. **Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 44, p. 888-903. 2015. DOI: 10.1016/j.rser.2015.01.023.

MOSEY, F. E. **New Developments in the Anaerobic Treatment of Industrial Wastes**. Water Pollution Control Federation, v. 81, p. 540–552. 1982.

NACHEVA, P. M. et al. **Treatment of cane sugar mill wastewater in an up flow anaerobic sludge bed reactor**. Water Science and Technology, v. 60, p. 1347-1352. 2009. DOI: 10.2166/wst.2009.402.

NARAYANAN, H. **Determination of anions in tap water in accordance with US EPA Method 300**. Jul. 2016. Disponível em: <<https://www.metrohm.com/en/applications/%7B1F9E1DD6-4846-411D-B6BA-0FB23BAC20D6%7D?fromApplicationFinder=true>>. Acesso em 18 ago. 2016.

OMIL, F. et al. **Long-term competition between sulphate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids**. Biotechnology bioengineering, v. 57, p. 676-685. 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980320)57:6<676::AID-BIT5>3.0.CO;2-I.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification**. Bioresource Technology, v. 74, n. 1, p. 17-24. 2000. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00160-1.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. **Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review**. Bioresource Technology, v. 98, p. 2321-2334. 2007. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.027.

PENTEADO, E. D. et al. **Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors**. International Journal of Hydrogen Energy, v. 38, p. 6137-6145. 2013. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.01.067.

PEREIRA-RAMIREZ, O. et al. **Influência da recirculação e da alcalinidade no desempenho de um reator UASB no tratamento de efluente de suinocultura**. Revista Brasileira de Agrociência, v. 10, p. 103-110. 2004. DOI: 10.18539/CAST.V10I1.664.

STAMS, A. J. M.; PLUGGE, C. M. **Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea**. Nature Reviews Microbiology, v. 7, p. 568-577. 2009. DOI: 10.1038/nrmicro2166.

UNICADATA. **Etanol Total - 2017/2018**. Disponível em: <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2&acao=visualizar&idTabela=2333&produto=etanol_total&safraini=2018%2F2019&safrafim=2018%2F2019&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR>. Acesso em 01 ago. 2019.

PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM SISTEMAS VEGETAIS: VÍRUS DE PLANTAS COMO REATORES DE FÁRMACOS

Nicolau Brito da Cunha

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília UCB
Brasília, DF
nicolau.cunha@ucb.br; nicolaubrito@yahoo.com.br

Michel Lopes Leite

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília UCB
Brasília, DF

Kamila Botelho Sampaio

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília UCB
Brasília, DF

Simoni Campos Dias

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília UCB
Brasília, DF

RESUMO: A demanda constante por novos antibióticos tem impulsionado esforços da comunidade científica para prospectar peptídeos com amplo espectro de ação. Nesse

contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) adquiriram grande importância científica nos últimos anos devido à sua capacidade de possuir atividades antimicrobiana e imunomoduladora. Nas duas últimas décadas, as plantas atraíram o interesse da comunidade científica e da indústria quanto ao seu potencial como biofábricas de proteínas heterólogas. Uma das abordagens mais promissoras é o uso de vetores virais para maximizar a expressão transiente de drogas nas folhas da planta *Nicotiana benthamiana*. Recentemente, o sistema de expressão Magniffection™ foi lançado. Essa sofisticada plataforma comercial permite a montagem da partícula viral em células foliares e a disseminação sistêmica da biossíntese de proteínas heterólogas em tecidos verdes causada pelo “método de entrega gênica” de *Agrobacterium tumefaciens*, além de níveis aumentados de expressão gênica mediada por potentes máquinas de expressão viral. Estas características permitem a recuperação em massa de proteínas heterólogas nas folhas de *N. benthamiana* em 8 a 10 dias, sendo altamente eficiente para a síntese de diferentes classes de proteínas farmacológicas e com enorme potencial para a rápida e abundante biossíntese de PAMs.

PALAVRAS-CHAVE: Peptídeos antimicrobianos, Magniffection, *Nicotiana benthamiana*, expressão transiente de genes

ABSTRACT: The constant demand for new antibiotics has driven the scientific community's efforts to prospect for broad spectrum peptides. In this context, antimicrobial peptides (AMPs) have acquired great scientific importance in recent years due to their ability to possess antimicrobial and immunomodulatory activities. Over the past two decades, plants have attracted interest from the scientific community and industry as to their potential as heterologous protein biofactories. One of the most promising approaches is the use of viral vectors to maximize drug transient expression in the leaves of the *Nicotiana benthamiana* plant. Recently, the Magniffection™ expression system was launched. This sophisticated commercial platform allows the assembly of the viral particle in leaf cells and the systemic dissemination of heterologous protein biosynthesis in green tissues caused by *Agrobacterium tumefaciens* "gene delivery method", in addition to increased levels of gene expression mediated by powerful expression machines. viral. These characteristics allow the mass recovery of heterologous proteins in *N. benthamiana* leaves in 8 to 10 days, being highly efficient for the synthesis of different classes of pharmacological proteins and with enormous potential for rapid and abundant AMP biosynthesis.

KEYWORDS: Antimicrobial Peptides, Magniffection, *Nicotiana benthamiana*, transient expression of genes

1 | INTRODUÇÃO

Historicamente, microrganismos patogênicos representam o maior risco para a saúde de indivíduos cujo sistema imunológico está comprometido por doenças mais brandas ou por terapias invasivas (Watkins e Bonomo, 2016). A necessidade de atenuar ou mesmo impedir a proliferação desses microrganismos no ambiente hospitalar tem sido uma preocupação constante dos principais grupos de pesquisa científica em todo o mundo (Uhlir et al. 2014). Muitos dos patógenos comumente encontrados em hospitais são resistentes a drogas antimicrobianas comumente usadas no tratamento de condições comuns ou de alto risco. O uso indiscriminado de antibióticos e antifúngicos sem prescrição médica levou, desde meados da década de 1960, a um aumento consistente no isolamento de cepas resistentes em hospitais, especialmente na América Latina (Andersson et al. 2016).

A alta taxa com a qual os patógenos resistentes são selecionados durante todo o tratamento dos pacientes ainda é o principal problema em relação ao uso de antimicrobianos convencionais. Neste cenário, muitas das drogas de controle de patógenos mais comuns, baratas e outrora eficazes tornam-se ineficazes na infecção sistêmica (Perry et al., 2016). Devido ao crescimento exponencial de casos de microrganismos resistentes a antibióticos, o desenvolvimento de novas alternativas de controle e moléculas com amplo espectro de ação e baixa toxicidade adquiriu um caráter estratégico para a indústria farmacêutica (Kosikowska e Lesner 2016, Nagel et al. 2016, Andersson et al., 2016).

Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) apresentam-se como uma

alternativa valiosa na complementação ou substituição de compostos terapêuticos tradicionais. Os PAMS são antibióticos naturais encontrados em microrganismos, plantas e animais, que funcionam como importantes componentes do sistema imune inato, a primeira linha de defesa desses organismos contra patógenos exógenos. Nos estágios iniciais da infecção, estímulos moleculares emitidos por sistemas de sinalização intrínsecos desencadeiam a biossíntese de PAMS para lidar com o agente invasor (Mojsoska e Jenssen 2015).

Do ponto de vista estrutural, os PAMs são caracterizados como pequenas moléculas protéicas com menos de 100 resíduos de aminoácidos, muitas vezes ricos em resíduos de cisteína, glicina ou histidina e que podem ser classificados de acordo com a presença de α -hélices, folhas β , extensões nas cadeias laterais de aminoácidos centrais ou pela formação de alças desordenadas (Cunha et al. 2016). Esses pequenos peptídeos também podem ser agrupados de acordo com suas propriedades físico-químicas em aniônicos, catiônicos (geralmente com cargas positivas entre 2 e 9) e PAMs anfipáticos, com suas porções hidrofóbicas e hidrofílicas lado a lado (Nguyen et al. 2011, Malanovic e Lohner 2016).

A primeira função dos PAMs é matar ou inibir o crescimento de microrganismos no nível molecular. Em geral, o modo de ação clássico dos PAMs catiônicos se deve à desorganização estrutural e formação de poros na membrana, com a consequente ruptura da bicamada lipídica que delimita células fúngicas e bactérias Gram positivas e negativas (Perry et al. 2016). Por essa razão, os PAMs podem atuar contra diferentes alvos celulares e, em alguns casos, ser considerados moléculas “promíscuas”, capazes de realizar mais de uma função, independentemente de sua estrutura. Artigos recentes mostraram que alguns PAMs podem desestabilizar a maquinaria translacional (ribossomos) e inibir a síntese de DNA e o ciclo celular de certos fungos e bactérias (Nguyen et al. 2011, Malanovic e Lohner 2016). Algumas dessas moléculas ainda podem atuar como antivirais (Malanovic e Lohner 2016), como inseticidas e como agentes hemolíticos e antitumorais (Nguyen et al. 2011, 2012).

As características bioquímicas e físico-químicas inerentes à estrutura dos PAMs são cruciais para os tipos de funções biológicas dessas moléculas. O comprimento e a distribuição de grupos carregados ao longo da cadeia peptídica, o grau de hidrofobicidade, a amidação N-terminal e o tipo e o número de estruturas secundárias determinam a eficiência do peptídeo bioativo e sua capacidade citotóxica para diferentes tipos de células e microrganismos (Nguyen et al 2011).

Entre os vários PAM já caracterizados, uma classe em particular tem um valor especial para a medicina: os peptídeos de defesa inatos (peptídeos de defesa do hospedeiro (*Host Defense Peptides*) (HDPs). Estes pequenos péptidos de 12 a 50 aminoácidos são geralmente não tóxicos para as células de mamíferos e podem ser isolados a partir de organismos como moluscos, plantas, anfíbios, aves, peixes e mamíferos (incluindo humanos). Os HDPs conjugam a ação antimicrobiana direta

com a modulação da imunidade inata do organismo hospedeiro através da indução do processo inflamatório. Assim, quando sintetizados em resposta à ação microbiana, as HDPs ativam a síntese de citocinas, a ocorrência de apoptose e quimiotaxia, o recrutamento e proliferação de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T, bem como a diferenciação de células dendríticas (Silva et al. 2011).

As diversas funções que as HDPs podem apresentar simultaneamente e seu grau de seletividade refletem o enorme potencial de uso dessas moléculas para a proteção dos pacientes. Este fenômeno de “promiscuidade e dinamismo funcional” caracteriza-se como o princípio para a concepção de novos fármacos e para a preparação de estudos biotecnológicos com candidatos a PAM para atuar como novos antibióticos (Pelegrini et al. 2007).

2 | A EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PAMS: A LUTA CONTRA INFECÇÕES FÚNGICAS E BACTERIANAS.

O estudo e a avaliação farmacêutica de proteínas (entre eles os PAMs), em caráter pré-comercial, requerem a obtenção dessas moléculas em grandes quantidades. Para a avaliação de aspectos como os diferentes mecanismos de ação e a relação estrutura/função, são necessárias massas de peptídeos que variam de poucos microgramas a muitos miligramas. Neste contexto, a produção em grande escala de PAMs é o maior desafio na prospecção e caracterização de estudos desses peptídeos (Parachin et al. 2012).

O método de obtenção de PAMs considerado mais vantajoso em termos de custo e rendimento é aquele que explora sistemas recombinantes ou biofábricas para a síntese de proteínas heterólogas. Nas últimas décadas, vários sistemas de expressão heteróloga têm sido desenvolvidos com peculiaridades que permitem altos níveis de síntese, modificação e secreção de proteínas heterólogas (Parachin et al. 2012, Parachin e Franco 2014). Esta abordagem também permite a modificação estrutural de peptídeos para a realização de estudos detalhados sobre a função dessas moléculas.

Mais de 95% dos PAMs heterólogos são sintetizados em sistemas de expressão utilizando células bacterianas ou de levedura (Parachin et al. 2012). Nestes sistemas, a espécie bacteriana mais comumente utilizada é a *Escherichia coli*, um hospedeiro popular devido ao seu rápido crescimento, compatibilidade com uma ampla variedade de vetores de expressão, baixo custo e alto controle da expressão gênica devido ao amplo conhecimento acerca de seu genoma e de seus mecanismos genéticos básicos (Parachin e Franco 2014).

O isolamento e a prospecção de vários PAMs têm sido realizados de maneira destacada, nos últimos 15 anos, pelo grupo de pesquisadores do Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília (CAPB UCB). Além

da caracterização estrutural e funcional de PAMs, o grupo do CAPB se especializou na expressão heteróloga de PAMs em sistemas microbianos e vegetais. Os pesquisadores do CAPB têm sido bem-sucedidos em isolar os peptídeos de suas fontes naturais ou por seu redesenho *in silico*, que permite a adição, remoção ou substituição de aminoácidos com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobiana ou adicionar características como a capacidade imunomoduladora.

3 | PAMS TERAPÊUTICOS CONTRA PATÓGENOS RESISTENTES A MÚLTIPLAS DROGAS

O peptídeo antimicrobiano Cn-AMP1 foi isolado pela primeira vez a partir de água de coco (*Cocos nucifera*) em 2009, por Mandal e colaboradores (Mandal et al. 2009). Este pequeno peptídeo faz parte de uma família molecular com dois outros PAMs, denominados Cn-AMP 2 e Cn-AMP 3. Todos apresentam nove resíduos de aminoácidos com massas moleculares entre 0,8 e 1,3 kDa. Quando comparado com os outros dois PAMs, o Cn-AMP1 é o mais ativo *in vitro* contra as bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (MIC: 9 µM) e os fungos *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, um fungo dermatófito antropofílico muito comum em doenças de pele como pé de atleta e *Trichophyton mentagrophytes* (MIC: 18 µM) (Mandal et al. 2009, Santana et al. 2015). Outros ensaios de atividade biológica *in vitro* mostraram que o Cn-AMP1 exerce várias funções alternativas simultaneamente ao controle microbiano. O peptídeo foi capaz de reduzir a viabilidade de diferentes tipos de células tumorais, além de promover atividade imunomodulatória através da estimulação da secreção de citocinas por monócitos cultivados em laboratório, sem causar citotoxicidade aos eritrócitos humanos e macrófagos murinos (Silva et al. 2012).

Outro potente PAM é o Cm-p5, isolado do molusco *Centrichis muricatus*. Sua prospecção foi realizada após a fragmentação tríptica de uma fração cromatográfica contendo peptídeos isolados de *C. muricatus* analisados por MS/MS, o que gerou uma nova sequência candidata (López-Abarrategui et al. 2015). A partir de análises de bioinformática, uma série de peptídeos variantes foi teoricamente proposta com base na sequência, e estes foram previamente avaliados contra o fungo *C. albicans*. Destes, o Cm-p5 demonstrou notável atividade antifúngica contra cepas de *C. albicans* com alta importância médica. Para fins de ilustração, os resultados preliminares da atividade demonstraram MICs de 1 e 0,5 µg.mL⁻¹, suficientes para obter efeitos terapêuticos. Além disso, este peptídeo também se mostrou ativo contra *Cryptococcus neoformans* e *T. rubrum*. Os valores de inibição microbiana apresentados por ambos os PAMs superam a atividade de seu precursor Cm-p1, relatada em 2011. Estes resultados foram os primeiros a abrir caminho para testes de toxicidade em células animais e para o estudo de seu mecanismo de ação (López-

Abarrategui et al. 2015).

A Clavanina A, um PAM altamente eficiente no controle de bactérias como *P. aeruginosa*, foi recentemente caracterizada pelo nosso grupo e demonstrou uma atividade alta no controle de bactérias Gram positivas e negativas *in vitro* e *in vivo*, a partir de ensaios com camundongos (dados a serem publicados). Além disso, a Clavanina A também foi eficiente como agente estimulante molecular para reações de defesa dos organismos atacados por ambos os patógenos (Silva et al. 2015). Portanto, o potencial terapêutico da Clavanina A é promissor, tanto na ação antimicrobiana direta quanto na atividade imunomoduladora, sem agravar a resposta inflamatória.

Entre os PAMs isolados de plantas, os ciclotídeos são algumas das biomoléculas mais promissoras com potencial terapêutico contra diferentes classes de fitopatógenos. Estes peptídeos foram descritos pela primeira vez na década de 1970, isolados de diferentes tecidos como folhas, caules, flores, raízes e cascas de várias famílias de plantas, como Violaceae, Rubiaceae, Fabaceae, Asteraceae e Cucurbitaceae (Chen et al. 2005, Craik et al. 2006). Os ciclotídeos são ricos em cisteína e possuem entre 28 e 37 resíduos de aminoácidos. Eles também apresentam uma característica única: uma estrutura cíclica, na qual a região N-terminal está ligada à região C-terminal em uma cadeia circular, estabilizada pela presença de um padrão único e altamente conservado de três pontes dissulfeto (CisI -CisIV, CisII-CisV, CisIII-CisVI).

Esse arranjo forma um motivo conhecido como Nó de Cisteína Cíclica (Cyclic Cistein Knot -CCK), que compreende um anel peptídico formado por duas pontes dissulfeto paralelas (CisI-CisIV e CisII-CisV) e uma ponte dissulfeto transversal (CisIII-CisVI), que estabilizam o motivo. Desta forma, a partir da combinação da ciclização e do motivo CCK, a família de ciclotídeos agrupa PAMs vegetais cíclicos que compartilham uma estrutura tridimensional, a qual confere às moléculas alta estabilidade e proteção contra enzimas proteolíticas, bem como contra condições ácidas e de degradação física (Craik et al. 2006, Pelegrini et al. 2007, Pinto et al. 2016, Cunha et al. 2016).

Relatos na literatura indicam a presença de um grande número de ciclotídeos na família Rubiaceae e em uma planta particular dessa família, *Palicourea condensata* (Pinto et al. 2016). Os ciclotídeos de uma espécie do planalto central do Brasil, *Palicourea rigida*, foram extensivamente estudados por nosso grupo (Pinto et al. 2016). Curiosamente, esta planta foi até então pouco estudada apesar de seu uso difundido na medicina popular na região. A análise do conteúdo protéico de *P. rigida* evidenciou a presença de ciclotídeos na inflorescência, no pedúnculo e nas folhas, alguns dos quais apareceram apenas em tecidos específicos, enquanto outros apareceram em todas as partes exploradas. Um desses peptídeos foi sequenciado e analisado: a Parigidina-br1, que contém 32 resíduos de aminoácidos. A Parigidina-br1 foi classificado na subfamília “*Bracelets*”, devido à ausência de uma cis-prolina

na alça 5, e sua função foi avaliada *in vivo* contra neonatos de Lepidoptera (*Diatraea saccharalis*) e *in vitro* contra células SF-9 de insetos, apresentando funções inseticidas e inseticidas e atividade citotóxica. (Pinto et al. 2016). A escassez de estudos bioquímicos sobre *P. rigida*, somada ao seu amplo uso medicinal, intensifica o interesse pela sua avaliação como fonte da Parigidina-br1, uma molécula com potencial de uso claro para a proteção de plantas cultivadas.

4 | BIOSÍNTESE DE DROGAS RECOMBINANTES EM PLANTAS - “MOLECULAR FARMING”.

Desde o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante no início dos anos 70, a produção heteróloga de proteínas de interesse farmacológico e industrial tem sido baseada em sistemas de fermentação microbiana (procariótica e eucariótica) e cultura de células de mamíferos transgênicos. Embora esses sistemas apresentem, frequentemente, alta produtividade de proteínas heterólogas, eles apresentam algumas desvantagens em termos de autenticidade, causados por perdas frequentes de identidade de sequência de aminoácidos e ausência de modificações pós-traducionais (bactérias); hiperglicosilação (leveduras), necessidade de contenção em ambientes controlados para a minimização de questões de biossegurança (ambos) e custos de produção relativamente altos (mamíferos transgênicos). Vale ressaltar que atualmente já existem diversas estratégias para minimizar consideravelmente a maior parte dessas limitações, que serão discutidas mais adiante neste capítulo (Parachin et al., 2012, da Cunha et al., 2014).

Uma das alternativas mais promissoras para a substituição das plataformas recombinantes já estabelecidas é a utilização de sistemas vegetais como veículos para a produção de proteínas utilizadas como reagentes diagnósticos, vacinas e medicamentos, também chamados de fármacos vegetais (Plant-made Pharmaceuticals - PMPs) ou “drogas produzidas em Plantas”. “(Tregoning et al. 2005, Cunha et al. 2017). Esta aplicação representa uma vertente relativamente recente da biotecnologia chamada “Plant Molecular Farming”, cujo escopo é a síntese de polipeptídeos heterólogos de interesse farmacêutico usando a maquinaria molecular de plantas. (Ma et al. 2005).

As plantas podem ser sistemas atrativos para a biossíntese maciça de moléculas terapêuticas. Muitas espécies de plantas apresentam aspectos econômicos e qualitativos desejáveis associados à síntese de “PMPs”, como baixos custos de produção e capacidade de realizar modificações pós-traducionais exigidas por PAMs complexos. Os biorreatores vegetais são potencialmente um dos sistemas mais econômicos para a produção em grande escala desta classe de biomoléculas. O custo médio de produção de PMPs representa cerca de 10% do total apresentado por sistemas baseados em células de levedura, podendo ser até 50 vezes menor

que o de sistemas bacterianos. Quando o custo médio de produção de PMPs é comparado aqueles de plataformas sofisticadas e relativamente caras, como a cultura de células de mamíferos, essa diferença pode ser ainda maior. Estima-se que o custo de produzir um determinado medicamento recombinante expresso de forma equivalente em sementes de tabaco e suspensão de células de mamíferos pode ser até 1000 vezes menor no primeiro do que no último (Obembe et al. 2011).

As plantas representam um dos tipos de biomassa de menor custo de produção na natureza, necessitando apenas de solo, água e luz para a produção de grandes quantidades de biomassa, representadas principalmente por folhas e sementes. Em contraste, a cultura de células de microrganismos e mamíferos requer a adoção de fermentadores caros e sua manipulação sob condições estéreis, algo que encarece consideravelmente o processo de produção (Obembe et al. 2011, Davies 2010).

Desde 1986, quando a primeira droga recombinante relevante foi sintetizada em plantas de tabaco transgênico – o hormônio de crescimento humano (hGH) - mais de cem diferentes proteínas heterólogas, incluindo anticorpos, antígenos, hormônios, transportadores moleculares, peptídeos anticoagulantes e enzimas sintetizadas em diferentes plantas sistemas (Cunha et al. 2011a, b). As plataformas comumente usadas para produzir todas essas classes de moléculas são a suspensão das células do tabaco; sementes de cereais e de leguminosas, tais como milho e soja; oleaginosas, como a canola; tubérculos de batata; as diferentes espécies de culturas folhosas, como alface e espinafre, além de frutas como tomates e bananas (Egelkroust et al. 2012, Ma et al. 2003, Drake et al. 2017).

Além de fatores econômicos, as plantas apresentam aspectos bastante promissores quanto à qualidade das proteínas heterólogas e à biossegurança de seu uso como reatores de PMPs. Os principais aspectos técnicos da produção de proteínas terapêuticas nos diferentes sistemas disponíveis são comparados na Tabela 1.

Tipo	Sistema	Custo médio	Tempo de produção	Escalabilidade	Qualidade (dobramento, montagem da subunidade, glicosilação)	Modificações pós-traducionais em relação às humanas	Riscos de contaminação	Custo de armazenamento
Microorganismos	Bactérias	Baixo	Curto	Alta	Baixa	Nenhuma	Presença potencial de endotoxinas	Moderado
	Levedura	Moderado	Moderado	Alta	Moderada	Semelhantes	Baixo	Moderado
Cultura de células	Cultura de células de mamíferos	Alto	Longo	Muito baixa	Muito alta	Idênticas	Presença potencial de vírus, príões e oncogênicos	Alto
	Cultura de células vegetais	Moderado	Moderado	Moderada	Alta	Semelhantes	Baixo	Moderado

Organismos multicelulares transgênicos	Animais transgênicos	Alto	Muito longo	Baixa	Muito alta	Idênticas	Presença potencial de vírus, príons e oncogenes	Alto
	Plantas transgênicas	Muito baixo	Longos	Muito alta	Alta	Semelhantes	Baixo	Inexpressivo
Plataforma transiente	Plantas infectadas com vetores virais	Muito baixo	Curto	Muito alta	Alta	Semelhantes	Baixo	Inexpressivo

TABELA 1: comparação entre diferentes sistemas de produção de proteínas heterólogas de interesse farmacêutico.

Adaptado de Ma et al. 2003

Cerca de trinta PMPs, incluindo vacinas, anticorpos e proteínas terapêuticas, chegaram agora às etapas finais dos protocolos e testes internacionais de pré-clínicos. Oito produtos derivados de plantas recombinantes - sete reagentes de laboratório e um medicamento - já foram liberados comercialmente. Em 2012, a enzima recombinante glucocerebrosidase - ou taliglucerase alfa, secretada por suspensão de células de cenoura e utilizada para o tratamento da doença neurodegenerativa de Gaucher, tornou-se o primeiro produto sintetizado de biotecnologia vegetal com fins terapêuticos em humanos a ser lançado para comercialização nos Estados Unidos (Tregoning et al. 2005 Shaaltiel et al., 2015, Drake et al., 2017).

Basicamente, há duas maneiras de expressar genes para produzir PMPs: i) a transformação estável dos genomas nucleares ou plastidiais e ii) a expressão transiente de genes liberados por *Agrobacterium* ou vírus transgênicos infecciosos (Obembe et al. 2011).

A transformação estável do genoma da planta é a estratégia mais comumente utilizada para a produção de PMPs recombinantes e é aplicável a uma ampla variedade de espécies de plantas: de cereais a leguminosas, incluindo culturas folhosas, oleaginosas e fruteiras. Este método preconiza a integração estável de transgenes no genoma da planta hospedeira e permite a síntese contínua da proteína recombinante como uma característica fenotípica hereditária, genericamente ou localizada em um órgão específico da planta (Xu et al. 2012).

Já a expressão gênica transiente mediada por um intermediário infeccioso bacteriano ou viral é geralmente utilizada para verificar a eficiência da atividade da construção gênica utilizada em experimentos de transformação genética e para validar rapidamente a estrutura e função da proteína recombinante (Loh et al. 2017).

No entanto, a infiltração de folhas de plantas - notavelmente as espécies de *Nicotiana benthamiana* - por vácuo ou seringas usando suspensões de *Agrobacterium tumefaciens* pode resultar na transformação transiente de várias células foliares e na obtenção de altos níveis de expressão gênica alguns dias após a realização do experimento, possibilitando o escalonamento rotineiro da produção de PMPs em níveis industriais (Gleba et al. 2014). A Tabela 2 apresenta as principais características comparativas entre as duas estratégias de transformação genética de plantas para o

desenvolvimento de PMPs, bem como as plataformas disponíveis em cada cenário de expressão:

Transformação estável		Referências
Tipo	Plantas inteiras Transformação nuclear estável	Obembe et al. 2011 Drake et al. 2017
Principais características	Incorporação estável de genes exógenos no genoma nuclear Herança estável de transgenes em gerações sucessivas Usada para obter a maioria das plantas transgênicas até hoje Utilizada comercialmente desde 2014, no Japão, pela empresa Hokusai para a produção de interberry-Alpha, um interferon-alfa canino recombinante, produzido em morango transgênico, para o tratamento da doença periodontal em cães	
Vantagens	Transmissão de novos caracteres como traços herdáveis para a progênie Alta escalabilidade	
Desvantagens	Possibilidade de cruzamentos indesejáveis em algumas espécies Ciclo longo da produção de algumas espécies de plantas Níveis geralmente pobres de expressão transgênica	
Tipo	Plantas inteiras Transformação nuclear estável	
Principais características	Transformação estável e simultânea de inúmeras cópias do genoma núcleo Herança materna exclusivamente em muitas espécies	Meyers et al. 2010
Vantagens	Biocontenção natural Minimização do fluxo de genes por cruzamento Altos níveis de expressão (até 70% TSP)	
Desvantagens	Limitada a poucas espécies: tomate, alface, soja e berinjela. Transformação rotineira apenas de tabaco Estabilidade variável da proteína	

Tipo	Culturas de células de plantas em suspensão	
Principais características	<p>Formação de agregados indiferenciados de células vegetais dispersos e propagados em meio líquido</p> <p>Sistema utilizado para a produção do primeiro PMP que alcançou o status de produção comercial pelo FDA, em 2012: Eleyso, a enzima de combate à glucocerebrosidase, produzida pela empresa israelense Protalix, além da vacina de frango comercial contra o Newcastle vírus (NDV) da Dow Agrosience</p>	
Vantagens	<p>Rápida, relativamente barata e de alto nível de contenção</p> <p>Geralmente produção de alta pureza e baixo custo de processamento quando o PMP é secretado no meio de cultura</p> <p>Homogeneidade da produção</p> <p>Baixa heterogeneidade da adição de N-glicanos</p>	
Desvantagens	<p>Necessidade de condições de produção estéreis</p> <p>Diminuição dos níveis de biossíntese proteica em fase estacionária, devido à atividade proteolítica</p> <p>Restritas a apenas algumas culturas, como o tabaco, <i>Arabidopsis</i>, arroz e cenoura</p>	
Sistemas de expressão transitória		
Tipo	Método de agroinfiltração	
Principais características	<p>Infiltração de folhas de tabaco por suspensão de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i></p>	
Vantagens	<p>Transferência de T-DNA bacteriano para um elevado número de células foliares</p> <p>Alta expressão gênica frequente</p> <p>Possibilidade de produzir produtos farmacêuticos de grau clínico</p>	
Desvantagens	<p>Deterioração rápida da expressão de gene após o pico de expressão.</p> <p>Incapacidade de transferir o transgenes para progênes</p>	
Tipo	Método de infecção por vírus	
Principais características	<p>Método não integrativo</p> <p>Baseado no uso de vírus vegetais, como o vírus do mosaico do tabaco (TMV) e o vírus X da batata (PVX), como portadores infecciosos de transgenes</p> <p>Usado para infectar o tabaco</p> <p>Usado para a obtenção em grande escala de vacinas contra linfoma não-Hodgkin de células B</p>	
Vantagens	<p>Rápido, escalonável e capaz de obter altos níveis de biossíntese de proteínas recombinantes</p>	
Desvantagens	<p>Restrito ao tabaco</p> <p>Necessidade de processamento imediato devido à instabilidade proteica</p>	
Tipo	Magniflection™	

Franconi et al. 2010
Drake et al. 2017

Regnard et al. 2010
Loh et al. 2017

McCormick et al. 2008
Marsian e Lomonosoff 2016

Principais características	<p>Plataforma que combina as características dos métodos Agroinfiltração e infecção por vírus</p> <p>Desenvolvido pela empresa alemã Icon Genetics</p> <p>Uso de vetores virais desconstruídas para a expressão gênica, sem as sequencias de proteínas da capa proteica viral e sequências de proteínas de motilidade viral</p> <p>A infecção sistêmica de células e a integração de genes é mediada por <i>Agrobacterium</i></p>	Gleba et al. 2014
Vantagens	<p>Melhor infectividade</p> <p>Aumento da expressão gênica e da biossíntese de proteínas recombinantes a níveis superiores a 80% TSP</p> <p>Capaz de produzir tanto moléculas pequenas, tais como antígenos vacinais, quanto IgGs grandes e complexos</p> <p>Capaz de co-expressar dois ou mais polipeptídeos simultaneamente</p> <p>Capaz de montar proteínas hetero-oligoméricas</p> <p>Facilidade de manipulação</p>	
Desvantagens	<p>Restrito ao tabaco</p> <p>Necessidade de processamento imediato devido à instabilidade proteica</p>	

Tabela 2: Plataformas vegetais disponíveis para a biossíntese de PMPs.

A seleção das espécies vegetais destinadas à produção de PMPs representa um dos critérios mais importantes para o sucesso da estratégia molecular de expressão gênica. Características genômicas, bioquímicas, fisiológicas e até mesmo morfológicas inerentes a cada espécie têm uma influência crucial no rendimento de biossíntese de proteínas recombinantes, na capacidade de promoção de modificações pós-traducionais em proteínas complexas, na estabilidade estrutural do polipeptídeo e no custo final de produção (Stoger et al. 2002, Fischer et al. 2004).

A Tabela 3 ilustra as propriedades e peculiaridades das principais espécies de plantas usadas como biorreatores de proteínas recombinantes para os setores farmacêutico e industrial.

Espécie	Vantagens	Desvantagens
Culturas folhosas		
Tabaco	Produção de biomassa elevada Tecnologias de transformação e processamento bem estabelecidas Alta escalabilidade Culturas não alimentares e não alimentícias	Baixa estabilidade pós-colheita da proteína Presença de alcalóides
Alface	Alto rendimento de biomassa Comestíveis Útil para a vacinação humana	Baixa estabilidade pós-colheita da proteína
Alfafa	Produção elevada de biomassa Útil para a vacinação animal Propagação clonal Adição de N-glicanos homogêneos	Baixa estabilidade pós-colheita da proteína Presença de ácido oxálico
Trevo	Produção elevada de biomassa Útil para a vacinação animal propagação clonal Adição de N-glicanos homogêneos	Baixa estabilidade pós-colheita da proteína
Leguminosas		
Soja	Biomassa abundante, possibilidade de expressão transgênica no revestimento de sementes Alta concentração proteica em sementes Alta proporção de biomassa de sementes/custo de produção	Níveis usualmente baixos da expressão do transgene
Ervilha	Alta concentração proteica em sementes	Níveis usualmente baixos da expressão do transgene
Ervilha de pombo	Alta concentração proteica em sementes	Níveis usualmente baixos da expressão do transgene
Cereais		
Trigo	Alta estabilidade proteica durante o armazenamento	Baixos rendimentos Dificuldades no processamento e manuseio
Cevada	Alta estabilidade proteica durante o armazenamento	Baixos rendimentos Dificuldades no processamento e manuseio
Milho	Alta estabilidade proteica durante o armazenamento Produção elevada de biomassa Facilidade de processamento e manuseio	Níveis usualmente baixos da expressão do transgene
Arroz	Alta estabilidade proteica durante o armazenamento Produção de biomassa elevada Facilidade de processamento e manuseio	Níveis usualmente baixos da expressão do transgene
Frutas		
Tomate	Colheita comestível Contenção em estufa	Cultivo caro Baixa estabilidade após a colheita
	Tubérculos	

Cenoura	Comestíveis Alta estabilidade proteica em tecidos de armazenamento Alta escalabilidade Facilidade de purificação e processamento em sistema de suspensão celular	
Batata	Comestíveis Alta estabilidade proteica em tecidos de armazenamento	Níveis usualmente baixos da expressão do transgene Precisa ser cozida antes do consumo
Oleaginosas		
Canola	Plataforma de fusão proteica oleosin Sistema de brotamento desenvolvido	Baixos rendimentos
<i>Camelina Sativa</i>	Plataforma de fusão proteica oleosin Sistema de brotamento desenvolvido	Baixos rendimentos
Moss		
<i>Patens de physcomitrella</i>	Facilidade de cultivo contenção Propagação clonal Permite a secreção em meio de cultura Exibe recombinação homóloga em sítios genômicos de alta expressão gênica	Baixa capacidade de escalonamento
Algas verdes e plantas aquáticas		
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Facilidade de cultivo em contenção Propagação de clonal Permite a secreção em meio de cultura	Baixa capacidade de escalonamento
Lemna	Facilidade de cultivo em contenção Propagação clonal Permite a secreção em meio de cultura	Baixa capacidade de escalonamento
Plantas modelo		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Alta disponibilidade de mutantes Alta acessibilidade genética Facilidade de transformação	Baixa biomassa

Tabela 3: Espécies vegetais utilizadas como biorreatores de PMPs.

Adaptado de Fischer et al. 2004.

5 | ESTRATÉGIAS PARA MAXIMIZAR O RENDIMENTO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM PLANTAS.

Um dos fatores mais importantes que determinam a viabilidade da produção de proteínas heterólogas nas plantas é obter quantidades satisfatórias dos polipeptídeos. O rendimento absoluto da produção depende da maximização da eficiência de todos os estágios de expressão gênica e da estabilidade proteica. Desse modo, as várias estratégias destinadas a aumentar a quantidade final de proteína recombinante em reatores de plantas se concentram na transcrição gênica, no processamento pós-transcricional, na tradução e na estabilidade pós-traducional da proteína (Streatfield 2007).

5.1 Estratégias no nível transcricional

5.1.1 Escolha de promotores e terminadores

Para se obter altos níveis de expressão de transgenes, os dois elementos mais importantes são o promotor e o terminador da transcrição (Ma et al. 2003). Promotores eucarióticos fortes apresentam sítios específicos que facilitam o seu reconhecimento por fatores de transcrição e da RNA polimerase II. Eles também podem ser regulados por intensificadores específicos (elementos proteicos “*enhancer*”) que aumentam a expressão heteróloga, fornecendo altos níveis de produção de mRNA (Streatfield 2007, Tschofen et al. 2016).

Os promotores constitutivos mais fortes e mais amplamente utilizados para expressão heteróloga em dicotiledôneas são o CaMV 19S e 35S, derivados dos transcritos 19S e 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). Em monocotiledôneas, o promotor da ubiquitina 1 (*ubi-1*) do milho também é muito popular e eficiente para a expressão de proteínas recombinantes em cereais (Twyman et al. 2003).

Além disso, promotores induzíveis que permitem a sua própria regulação externa por meio de estímulos químicos e físicos emergem como ferramentas interessantes para maximizar a expressão gênica no nível transcricional (Twyman et al., 2003). Neste contexto, um promotor de batata-doce (*Ipomoea batatas*) ativado por peroxidase foi usado para aumentar 30 vezes a expressão do gene *gus* em plantas de tabaco transgênico submetidas à presença de peróxido de hidrogênio e à luz ultravioleta do que o promotor 35S CaMV (Kim et al. 2003). Outro exemplo interessante foi a rápida indução da biossíntese de proteínas heterólogas no tabaco utilizando o promotor endógeno que controla o gene da enzima hidroximetilglutaril-Coa-redutase (HMGR2), ativada por estresse mecânico induzido por práticas de colheita, um sistema desenvolvido pela empresa americana Crop Tech Corp. (Padidam 2003).

Os terminadores amplamente utilizados incluem o 35S CaMV, o dos genes *nos* e *ssu*, respectivamente de *A. tumefaciens* e ervilha (*Pisum sativum*) (Ma et al. 2003).

5.1.2 Minimização do silenciamento transcricional

Vários mecanismos podem levar à interrupção ou inibição da síntese de mRNA nas plantas, tais como a presença de sequências de DNA procarióticas (típicas do plasmídeo utilizado na transformação genética) e que tenham sido recombinadas com o DNA do hospedeiro eucariótico; a metilação do DNA; o chamado “efeito de posição”, ou seja, o sítio de integração do transgene no genoma da planta; a estrutura do sítio de integração; a presença de várias cópias ou cópias supérfluas do transgene *in tandem*, além das sequências com um potencial para a formação de “hairpins” e RNA de cadeia dupla (Finnegan e McElroy 1994).

Algumas estratégias já provaram ser eficazes na eliminação ou redução de tais problemas, tais como a utilização de vectores livres de sequências procarióticas integrativas, de sequências com ausência de obstáculos para o acoplamento da RNA polimerase II e/ou que não levem à formação de mRNA fita dupla; as técnicas para integrar cópias únicas do transgene no genoma da planta; a adição de sequências flanqueadoras das regiões de recombinação e a integração sítio dirigida por edição de genomas; a escolha do germoplasma em com baixa frequência de sítios de metilação; além da redução do feedback negativo dos promotores pela expressão da enzima alvo em um compartimento celular diferente do qual seu substrato é encontrado (Meyer e Saedler, 1996).

5.2 Estratégias nos níveis pós-transcricionais

5.2.1 Minimização do silenciamento pós-transcricional

O processamento de transcritos primários é crucial para a obtenção de altos níveis de proteína heteróloga. Embora a maioria dos experimentos de transformação genética vegetal utilizem sequências de codificação semelhantes a cDNA provenientes de bibliotecas construídas a partir de mRNAs adequadamente processados, a presença de íntrons modificados no transgene pode aumentar significativamente a estabilidade do mRNA (Tfer et al. 1993). Esta aplicação já foi comprovada para aumentar a expressão de genes endógenos em monocotiledôneas, especialmente em plantas de milho (Töpfer et al. 1993).

Sítios de poliadenilação também exercem grande influência na estabilidade de mRNAs e nos níveis de expressão gênica em células vegetais. A detecção e a eliminação, quando possível, de sítios de reconhecimento específicos que contribuem para o decaimento de mRNAs em alguns terminadores também podem ser usados como uma ferramenta para evitar o silenciamento pós-transcricional (Töpfer et al. 1993).

5.2.2 Otimização de tradução

O funcionamento correto do início da tradução é um fator limitante para o nível de acumulação de proteínas heterólogas. A sobreposição do sítio de iniciação da tradução com a sequência de consenso Kozak é um grande otimizador dos níveis de tradução, embora existam pequenas diferenças estruturais nessas sequências em animais e plantas, algo importante quando o objetivo é expressar genes humanos em plantas transgênicas (Kawaguchi e Bailey-Serres 2005).

A taxa de tradução também pode variar dependendo da disponibilidade de RNAs de transferência de aminoácidos específicos para certos códons na célula vegetal. A otimização da utilização de códons com as mutações silenciosas sítio-dirigidas ou

a produção de sequências sintéticas previamente modificadas da codificação pode ser muito útil para aumentar consideravelmente a tradução de mRNAs eucarióticos (Streatfield 2007).

Demonstrou-se que as sequências líderes de diferentes transcritos de plantas influenciam os níveis aumentados de acúmulo de proteína recombinante em biorreatores vegetais. Eles podem ser adaptados caso a caso para diferentes combinações de genes/plantas hospedeiras para maximizar a eficiência da tradução (Streatfield 2007).

5.2.3 Estabilidade proteica pós-traducional

Os níveis de transcrição e tradução estão relacionados à eficiência da biossíntese de proteínas heterólogas. Outra variável deve ser considerada para a estimativa do rendimento de produção ou acúmulo de biofármacos protéicos: seu nível de degradação após a biossíntese, ou seja, seu grau de estabilidade (Stoger et al. 2005).

Estratégias moleculares que atuam na estabilidade de proteínas, combinadas com a escolha de promotores, correspondem aos avanços mais eficientes em termos de aumentos reais no rendimento de biofármacos recombinantes e incluem duas abordagens distintas não exclusivas: o uso de promotores tecido específicos - principalmente aqueles associado a genes endógenos de sementes - e ao direcionamento subcelular de polipeptídeos (“direcionamento de proteína”) (Abiri et al. 2015).

Os promotores tecido específicos são sequências reguladoras que restringem a expressão gênica espacialmente a apenas uma ou mais partes da planta e também podem indiretamente regular a expressão em um nível temporal quando o órgão destinado ao acúmulo de proteínas heterólogas está associado apenas a um período do ciclo reprodutivo da cultura (por exemplo, flores e sementes) (Capell e Christou 2004).

Diversos promotores tecido específicos já foram extensamente caracterizados, tais como os que controlam a expressão de uma zeína de semente de milho, de uma glutenina de trigo, da glutelina de arroz e de proteínas de semente de ervilha (Ma et al. 2003).

A biossíntese de proteínas heterólogas especificamente em sementes implica muitas vantagens naturalmente proporcionadas por tais órgãos. Ao contrário das folhas, as sementes são locais de armazenamento natural para altas concentrações de proteínas de reserva usadas na nutrição embrionária nos estágios iniciais do desenvolvimento fisiológico da plântula (Stoger et al., 2005). Esses órgãos apresentam não apenas um ambiente bioquímico adequado, desprovido de compostos fenólicos e baixa concentração de hidrolases, mas também tecidos especializados para o acúmulo de proteína altamente estável por longos períodos de tempo, mesmo à

temperatura ambiente, o que reduz a necessidade de condições especiais de armazenamento. (Takaiwa et al. 2007).

Como os custos de processamento e purificação são inversamente proporcionais à concentração do produto em relação à biomassa da planta, o acúmulo de altos níveis de proteínas heterólogas em um volume reduzido leva a uma diminuição significativa nos custos de produção de biofármacos recombinantes (Stoger et al. 2002).

5.2.4 Endereçamento subcelular de proteína

O endereçamento subcelular desempenha um papel fundamental nos níveis de acúmulo de proteína heteróloga, já que o compartimento celular em que são acumuladas influencia diretamente nos processos de dobramento, montagem e nas suas modificações pós-traducionais, além de prevenir a imediata degradação dos polipeptídeos (Fahad et al. 2015).

Os peptídeos sinais N ou C-terminais, responsáveis diretos pelo endereçamento subcelular proteico, podem ser fundidos com proteína heteróloga. Essas sequências podem direcionar proteínas de maneira assistida por um conjunto diversificado de proteínas de reconhecimento de sinal, para as mitocôndrias, vacúolos, cloroplastos ou retê-las no retículo endoplasmático, e são geralmente clivadas após a chegada do polipeptídeo de interesse à organela alvo (Xu et al., 2012).

Comumente, quatro alvos subcelulares são os principais destinos de compartimentalização para produzir produtos biofarmacêuticos: o apoplasto, o retículo endoplasmático, os cloroplastos e os corpos protéicos da semente (Daniell et al., 2001). Dependendo da massa molecular, o polipeptídeo pode ser segregado ou retido no apoplasto, o que conduz a importantes aplicações para sistemas de cultura de células em suspensão. Schillberg et al. (1999) compararam a estabilidade de anticorpos inteiros idênticos cuja acumulação foi direcionada ao citosol e ao apoplasto de folhas de tabaco transgênicas e verificaram que a via secretória constitui um conjunto de ambientes mais adequados para o dobramento e montagem desse tipo de proteína complexa, já que os níveis de acumulação no apoplasto eram muito mais altos que os do citosol.

A principal desvantagem de se abordar o apoplasto é o fato de que proteínas heterólogas precisam ser processadas antes no complexo de Golgi, onde ocorre a adição de glicanos típicos, o que pode levar à perda de autenticidade estrutural e funcional dos polipeptídeos (Daniell et al. 2001).

A passagem de proteínas através do retículo é o destino inicial dos polipeptídeos encaminhados para a via secretória, e a retenção dessas moléculas no lúmen dessa organela tem se mostrado mais aconselhável para o acúmulo de maiores quantidades de proteínas recombinantes nas plantas do que no apoplasto e no citosol (Zimmermann et al. 1998). Conrad e Fiedler (1998) determinaram que a quantidade

de anticorpos recombinantes fundidos na porção C-terminal ao tetrapeptídeo K/H DEL - um dos sinais peptídicos mais populares atualmente empregados para a retenção de proteínas heterólogas no lúmen do endoplasmático retículo: ela foi 2 a 10 vezes maior do que aqueles expressos em diferentes espécies de plantas na ausência do peptídeo sinal.

O uso de K/H DEL também foi responsável por um aumento acentuado no acúmulo de proteína DIP B nas células das folhas de *Arabidopsis thaliana*, resultando em 8,5% do total de proteínas solúveis totais (PSTs) nesses órgãos (Yang et al. 2005).

Sob a mesma estratégia molecular de expressão, polipeptídeos expressos em sementes de cereais permaneceram estáveis até três anos após o armazenamento à temperatura ambiente, sem perda significativa de atividade, devido à baixa atividade proteolítica nestes compartimentos (Larrick e Thomas 2001).

Outra vantagem do chamado direcionamento de proteínas para o retículo endoplasmático de sementes é o fato de que as proteínas retidas nessa organela não sofrem processamento no complexo de Golgi, aspecto fundamental para a produção de proteínas heterólogas que necessitam de uma glicosilação humanizada, isto é, sem a adição de glicanos típicos de plantas e com a adição dos carboidratos humanos corretos, algo particularmente desejável no que diz respeito aos anticorpos recombinantes (Stoger et al. 2002).

O direcionamento de proteínas para cloroplastos é também uma estratégia interessante para aumentar os níveis de acumulação de proteínas recombinantes. No lúmen do cloroplasto existem chaperonas capazes de auxiliar no dobramento e na montagem de proteínas heterodiméricas e oligoméricas, além de baixas concentrações de hidrolases e peptidases, o que torna esse ambiente relativamente estável para o acúmulo de proteínas de interesse (Daniell et al. 2001). No entanto, como a maquinaria de expressão gênica nos cloroplastos se assemelha à dos procariontes, a maioria das modificações pós-traducionais, como a glicosilação, não pode ser realizada nessa organela, exceto pela formação de ligações dissulfeto (Tschofen et al. 2016).

Os corpos protéicos, por sua vez, são extensões derivadas do retículo endoplasmático especializado no acúmulo de proteínas de reserva em sementes de diversas espécies de plantas produtoras de grãos. Eles funcionam como cisternas que ocupam um grande volume citoplasmático e evolutivamente sofreram adaptações, resultando na alta capacidade de compartimentar grandes volumes de proteínas e de maximizar a integridade desses polipeptídeos (Zheng et al., 1992). Essas inclusões globulares são encontradas em células cotiledonares de sementes de tabaco, leguminosas como soja e feijão, bem como gramíneas como trigo e cevada, e se originam agora quando a biossíntese de proteínas de reserva começa nos tecidos responsáveis pela nutrição do embrião (Yoo e Chrispeels 1980). Dessa forma, há um aumento significativo no número e na disponibilidade de corpos protéicos ao longo

do processo de maturação fisiológica dos grãos dessas espécies.

Uma vez que esses vacúolos altamente especializados não sofrem qualquer tipo de fusão com os lisossomos, seu lúmen apresenta pH quase neutro e praticamente ausência de aminopeptidases, fatores que os caracterizam como um ambiente subcelular onde a degradação de proteínas é mínima e um excelente alvo para a biossíntese recombinante de polipeptídeos quando o objetivo principal da transformação genética é manter a estabilidade dessas moléculas (Takaiwa et al. 2007).

6 | MAGNIFECTION™: UM MÉTODO PARA A EXPRESSÃO EM MASSA DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS HETERÓLOGOS EM *NICOTIANA BENTHAMIANA*.

Os PAMs são elementos responsivos dos sistemas de defesa inatos de micróbios, plantas e animais, naturalmente sintetizados em níveis baixos (Watkins e Bonomo 2016, Uhlig et al. 2014). Para maximizar a biossíntese de PAMs, as bactérias geneticamente modificadas e as células de levedura são frequentemente exploradas como veículos para a produção recombinante dessas moléculas (Perry et al. 2016, Nagel et al. 2016). Até hoje, muitos PAMs diferentes foram sintetizados em *E. coli* e *Pichia pastoris* (Perry et al. 2016). Além do alto potencial terapêutico apresentado pelos PAMs recombinantes, o investimento limitado de empresas e as desvantagens em termos de baixo rendimento, baixa qualidade e atividade *in vivo* insatisfatória restringiram o desenvolvimento comercial a poucos PAMs promissores. Além das limitações de produção, relativamente poucos PAMs chegaram às fases mais avançadas de testes clínicos antes da comercialização.

Entre os fatores mais importantes que limitam a produção recombinante de PAMs em sistemas microbianos estão a toxicidade interna do peptídeo para as células hospedeiras. Para muitos PAMs, mesmo baixas concentrações podem ser fatais para o micróbio, Além disso, também pode-se notar a baixa qualidade do produto em termos de modificações pós-traducionais incompletas. Sob tais circunstâncias, as plantas aparecem como sistemas alternativos interessantes para a produção de PAMs recombinantes (Kosikowska e Lesner 2016, Nagel et al. 2016).

Embora as plantas realizem um vasto arsenal de modificações pós-traducionais, baixos níveis de biossíntese recombinante de peptídeos são comuns, resultando em baixas quantidades de produtos purificados. Apesar de tais limitações, os sistemas vegetais empregados para a biossíntese de proteínas heterólogas têm sofrido significativa melhoria técnica nos últimos anos. A descoberta de promotores potentes associados ao aumento da expressão gênica, a aplicação de estratégias e elementos que estabilizam transcritos primários, a otimização de códons e os diversos métodos que maximizam a estabilidade pós-traducional têm contribuído para aumentos dramáticos nas quantidades finais de proteínas acumuladas em

plantas transgênicas e em suspensão de células vegetais (Obembe et al. 2011). Apesar de melhorias palpáveis, limitações como os níveis geralmente baixos de expressão e o longo tempo para obter quantidades proteicas suficientes para os primeiros ensaios biológicos ainda restringem a produção recombinante nestes sistemas (Xu et al. 2012).

A alternativa mais interessante e recente para contornar ambas as limitações é o uso de vetores virais de plantas portadores de sequências regulatórias de expressão gênica que permitam altos níveis de expressão transiente (transitória) em poucos dias após a inoculação. O sistema Magnifection™ integra métodos para expressar transgenes de interesse usando vetores virais especialmente construídos para fornecer altas taxas de transcrição, alta velocidade na obtenção dos primeiros miligramas de proteína heteróloga e alta capacidade de escalonamento de produção (Gleba et al. 2005).

Em essência, a estratégia Magnifection™ preconiza a infiltração total de plantas adultas de *N. benthamiana* com uma suspensão diluída de *Agrobacterium tumefaciens* contendo replicons de RNA clonados em seus T-DNAs, geralmente baseados no vírus do mosaico do tabaco (TMV). Neste processo, a bactéria assume as funções virais iniciais da infecção primária e do movimento sistêmico, enquanto o vetor viral promove o espalhamento curto (célula a célula), a amplificação do sinal e a expressão do transgene de interesse em níveis elevados. Desse modo, poucas plantas adultas de tabaco permitem a otimização preliminar das diluições das suspensões e a obtenção de miligramas ou gramas da proteína heteróloga (Gleba et al. 2014) (Figura 1).

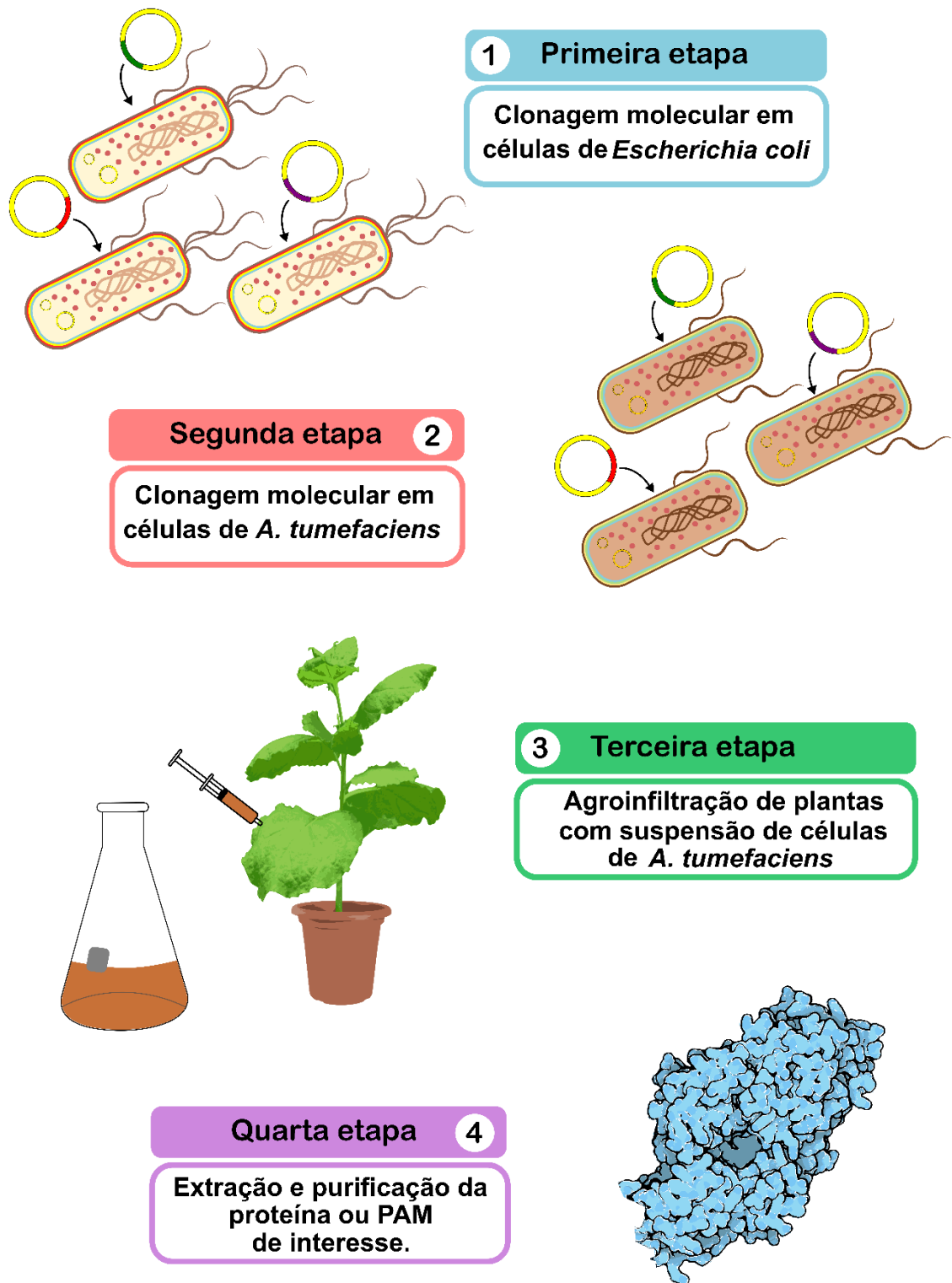


Figura 1 - Método de agroinfiltração para a biossíntese em larga escala de PAMs recombinantes. Após a clonagem do gene usando células de *E. coli*, pró-vetores carregando a extremidade 3 da cassete de expressão (vetor verde), a extremidade 5 da cassete de expressão (vetor azul) e o gene que codifica a integrase para a recombinação de extremidades (vetor amarelo) são inseridos em células de *A. tumefaciens*, seguido de cultivo em meio LB. A cultura bacteriana é então injetada no lado negativo das folhas de *N. benthamiana*. Após 5 a 8 dias, os rendimentos de PAMs recombinantes podem ser obtidos a partir de folhas colhidas após extração e purificação.

A tecnologia Magnifection™ combina as vantagens dos sistemas de expressão padrão (viral, bacteriana e vegetal) e apresenta três grandes vantagens quando

comparada às outras plataformas disponíveis. A primeira é o uso de vetores virais eficientes e com um design que permite o incremento da biossíntese dos mRNAs correspondentes. Isto permite altas taxas de expressão de transgenes pelo aumento da transcrição gênica, estimulada pela presença de fortes promotores virais. A presença de íntrons no cassete de expressão também permite a migração correta dos mRNAs produzidos para o citosol da célula vegetal (Gleba et al. 2014, 2004).

Em segundo lugar, a *Agrobacteria* promove a transformação genética de células somáticas de folhas de *N. benthamiana* de forma sistêmica. Com o turnover bacteriano célula-a-célula, não há necessidade de aumentar a extensão do cassete de expressão viral com genes supérfluos, como genes de codificação de proteínas de motilidade viral, por exemplo. Isso aumenta a disseminação de transgenes integrados ao cromossomo da planta e não permite mudanças metabólicas na biossíntese de proteínas adicionais sem utilidade, concentrando todo o esforço de produção nas maquinarias de transcrição e tradução (Gleba et al. 2004, 2007).

Finalmente, o sistema Magniffection™ alia velocidade e eficiência de acúmulo de transcritos sem precedentes, com rendimentos de produção consistentemente altos e baixos custos médios de produção (Gleba et al. 2005). A alta capacidade de escalonamento de produção permitida pela agroinfecção de plantas com *A. tumefaciens* é devida ao alto rendimento de inoculação - 1 litro de meio de cultura bacteriano é suficiente para a infecção de mais de 10 kg de folhas - e ao rápido pico de expressão gênica, que normalmente ocorre entre o sétimo e oitavo dias após a agroinfiltração (Figura 2).

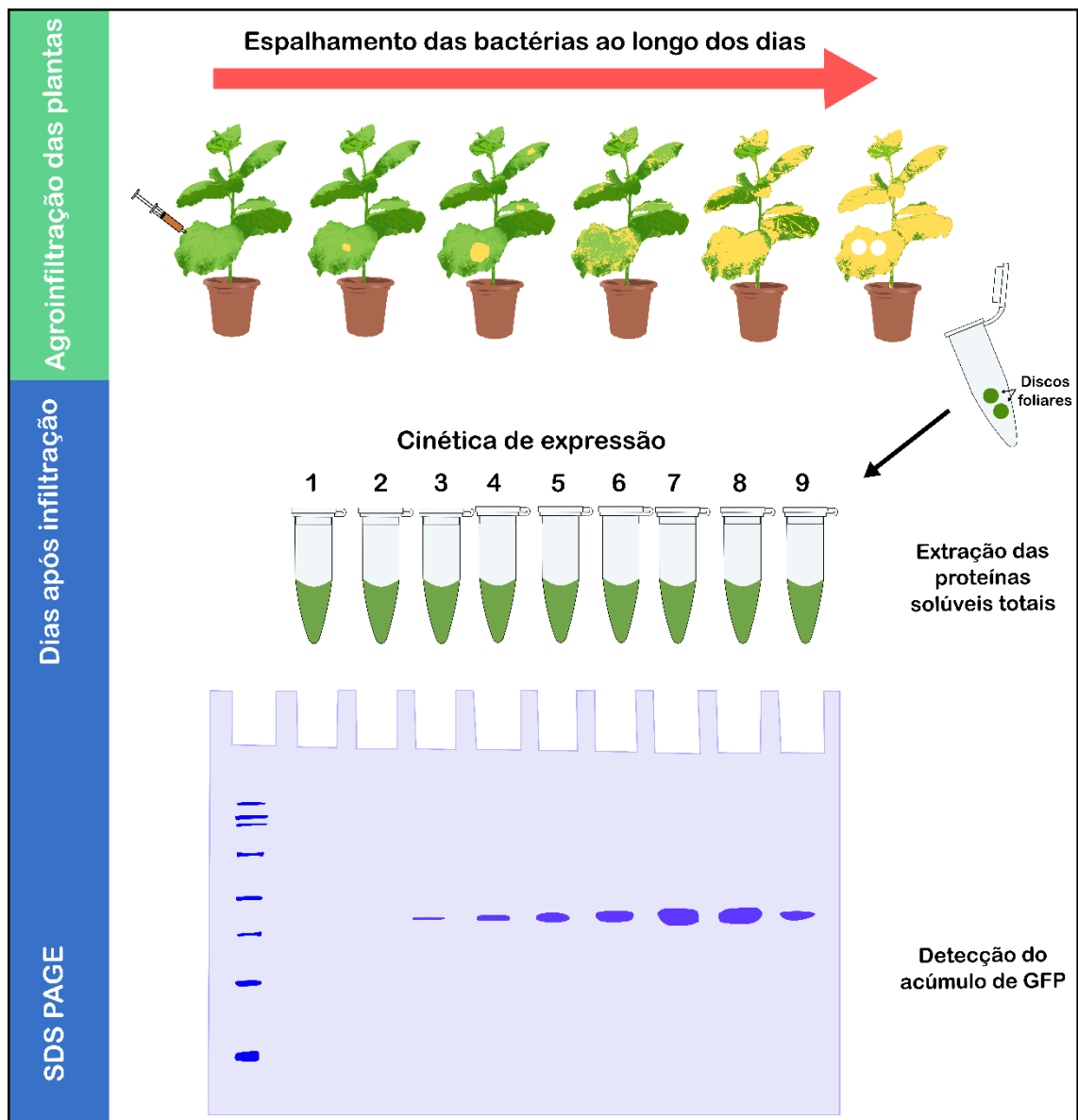


Figura 2 - Cinética de expressão de genes estranhos em folhas de *N. benthamiana*. A estratégia de entrega de genes mediada por *A. tumefaciens* permite a disseminação eficiente de genes codificadores de PAMs e a integração às células hospedeiras. Promotores virais potentes induzem altas taxas de expressão da proteína verde fluorescente (GFP) do gene *Aequorea victoria*, um gene repórter freqüente usado para validação experimental. O pico de expressão é cerca do sétimo ou oitavo dia após a inoculação.

De maneira sintética, o sistema Magniffection™ permite a produção em escala industrial de proteínas e peptídeos sem a transformação genética das células germinativas, o que leva a uma síntese protéica rápida e segura. Como a expressão transiente de transgenes depende da transformação apenas de células somáticas por genes transportados sistemicamente por *Agrobacteria* e na amplificação do acúmulo de proteínas com base na potência dos vetores virais, ações que dispendiam energia e maquinaria molecular, tais como a montagem de vírions maduros, a sua disseminação em tecidos verdes, a reprogramação do metabolismo da planta e a inibição da silenciamento são ações exclusivamente delegadas à *A. tumefaciens* (Marillonnet et al. 2004, 2005).

A escala industrial pode ser facilmente obtida por meio de um aparelho simples

para a agroinfiltração a vácuo de plantas inteiras, em que o tempo de incubação para amplificação viral e expressão de pico não excede 10 dias. Frequentemente, 5 gramas de proteínas heterólogas são obtidas por quilograma de matéria seca infiltrada, e níveis de expressão iguais a 80% PST são comuns em casa de vegetação (Gleba et al. 2004).

Desde 2010, o sistema Magniffection™ tem sido utilizado pela empresa canadense Medicago para a produção industrial de uma vacina contra a gripe causada pelo vírus H1N1 nos Estados Unidos. Um acordo de financiamento de US \$ 21 milhões foi assinado entre a Medicago e a Agência Americana de Agências de Defesa Avançada (DARPA) para produzir 10 milhões de doses/mês no caso de uma pandemia. A vacina está passando por ensaios clínicos de fase II (em um total de IV) e tende a se juntar a outra vacina contra a variante viral H5N1, produzida pelo mesmo sistema (Holtz et al. 2015).

Hoje, muitos antígenos já foram sintetizados usando o sistema Magniffection™, como mostra a Tabela 4.

Antígeno	Doença/alvo	Status	Ref
Op 1	Alergia	<i>In vitro</i>	Lienard et al. 2007
Antígeno de proteção der p2	Antherax	Ensaio pré-clínicos em animais	Koya et al. 2005
Proteína principal do capsídeo L1	Cancro cervical	Ensaio pré-clínicos em animais	Lenzi et al. 2008
Antígeno VCA	Vírus Epstein-Barr	<i>In vitro</i>	Lee et al. 2006
HSP-A	<i>Piloro de Helicobacter</i>	Ensaio clínico de fase I/II	Gu et al. 2005
VP1	Febre aftosa	Ensaio pré-clínicos em animais	Wu et al. 2003
Hepatite B/C	HBsAg (HEP B)	Ensaio pré-clínicos em animais	Thani et al. 1995
F1-V	Praga	Ensaio pré-clínicos em animais	Del Prete et al. 2009
SARS-CoV-S1	Sars	Ensaio pré-clínicos em animais	Pogrebnyak na empresa al. 2005
Tet-C	Tétano	Ensaio pré-clínicos em animais	Tregoning et al. 2005
Diabetes tipo 1	GAD65	Experimentação pré-clínica animal	Ma et al. 2004
HIV p24 proteína capsídeo HIV	AIDS	<i>In vitro</i>	Zhang et al. 2002

TABELA 4: Exemplos de antígenos transientemente expressos usando o sistema Magniffection™.

Adaptado de cunha et al. 2017.

Uma série de vetores virais modernos baseados no TMV, chamados pICHs,

são otimizados para a expressão transiente de proteínas farmacológicas. Tais plasmídeos, referidos como pró-vetores, contêm íntrons de tabaco organizados sistematicamente por toda a molécula para permitir o processamento dos mRNAs no núcleo, além de apresentarem sítios de recombinação que permitem a manipulação do DNA ainda dentro da célula antes da conversão em um amplicon híbrido de RNA. Moléculas de DNA contendo os genes de interesse podem ser eficientemente recombinadas em plantas, utilizando recombinases sítio específicas tais como Cre ou a Integrase C31 de *Streptomyces sp.* (Gleba et al. 2014). Em resumo, o processo defende a montagem *in vivo* de pró-vetores de DNA por simples mistura e coinfusão de plantas com células de *Agrobacterium* portadoras dos componentes do vetor separadamente (Figura 3).

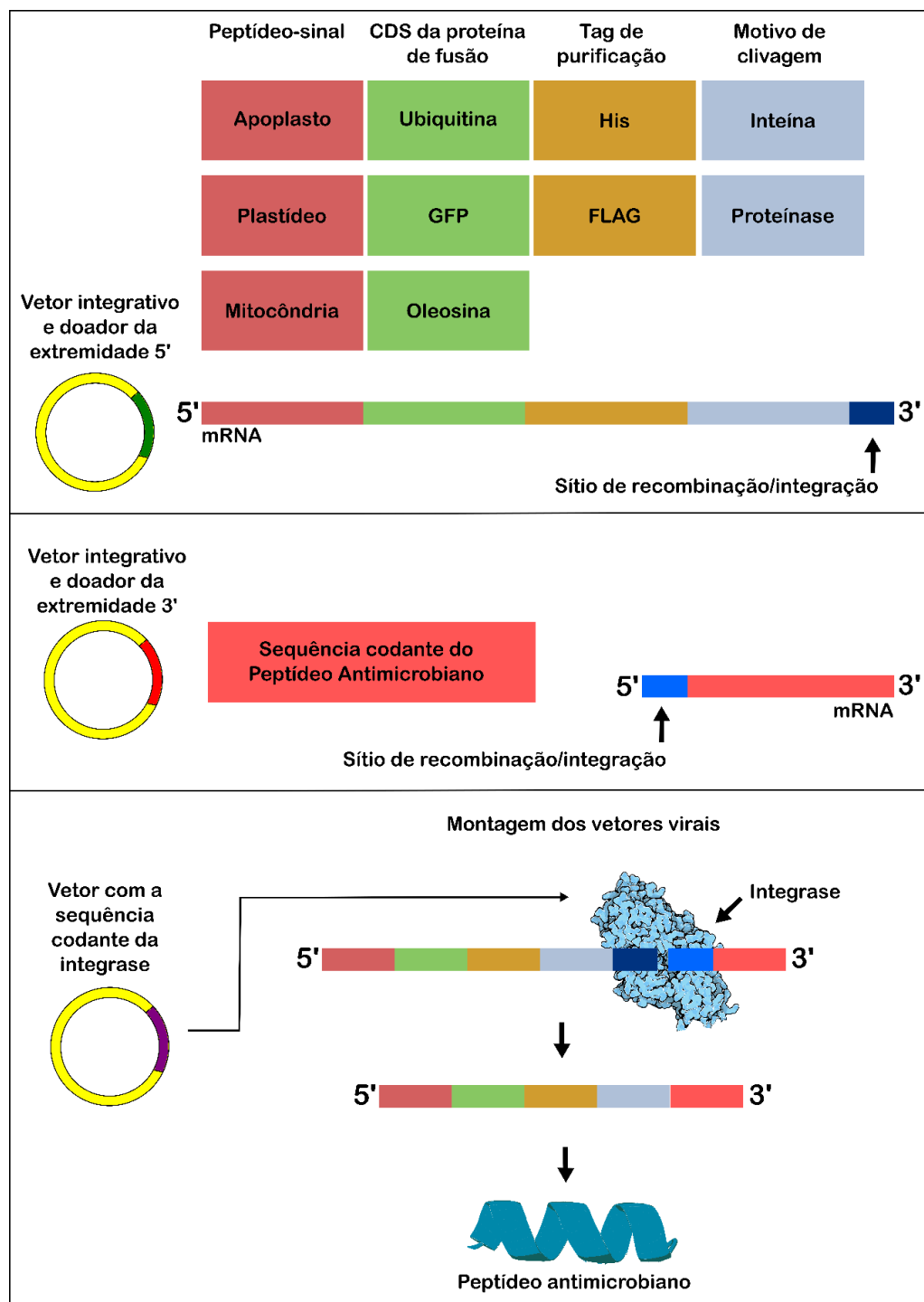


Figura 3 - Sistema Pró-vetor para montagem de módulos de expressão gênica. Dois vetores virais, doadores respectivamente das extremidades 5' e 3', são especificamente reconhecidos pela enzima Integrase C31 de *Streptomyces* sp. A enzima catalisa a recombinação entre os fragmentos pelo emparelhamento de bases homólogas nos locais de recombinação. O fragmento híbrido final apresenta todos os elementos genéticos para a expressão gênica em larga escala e para o endereçamento / purificação do AMP recombinante.

Desta maneira, três pró-vetores devem ser usados simultaneamente nos experimentos para obter altos níveis de expressão recombinante. Esta abordagem permite a rápida montagem dos vetores virais finais e a expressão de variantes de proteínas fusionadas a sinais peptídicos, a caudas de purificação facilitada e a domínios de ligação específicos a anticorpos, num arranjo versátil que permite a biossíntese de miligramas de proteínas em apenas alguns dias (Gleba et al. 2014,

2004, Marillonnet et al., 2005, 2004). Devido a todas as propriedades expostas, o sistema Magniffection™ pode ser uma excelente plataforma para a biossíntese em grande escala dos peptídeos antimicrobianos com atividades terapêuticas.

7 | CONCLUSÕES

A expressão recombinante dos PAMs usando o sistema Magniffection™ fornecerá subsídios para a sistematização da expressão em larga escala de moléculas com alto potencial terapêutico e capacidade de inibir uma ampla gama de patógenos que ameaçam a saúde humana. Combinações de pró-vetores virais representam um grande avanço em relação à produção de moléculas terapêuticas recombinantes. Como consequência da sua capacidade de automontagem, os vetores virais podem ser usados para estudar a expressão de vários outros PAMs extraídos de outras plantas, por exemplo, tioninas, snakinas, heveínas, defensinas, proteínas de transferência de lipídios e outros agentes citotóxicos. Tais melhorias permitirão a produção de grandes quantidades de PAMs suficientes para testar novas funções de controle antimicrobiano com potencial aplicação na agricultura, farmacologia e processamento de alimentos.

A biossíntese maciça de PAMs transitoriamente acumulados em folhas de *N. benthamiana* apresenta grande impacto científico, pois cria condições para o estudo sistemático da rápida expressão de peptídeos antimicrobianos em um sistema barato e seguro. Além disso, a produção em escala industrial de PAMs em um sistema simples recombinante com alta capacidade de escalonamento de produção, além do cultivo em estufa sob condições convencionais de crescimento, com apenas água, solo leve e fértil, representa um grande potencial econômico para a geração de produtos eficientes e baratos para o consumidor.

Vale ressaltar que essa abordagem de expressão transiente usando pró-vetores virais desconstruídos é uma tecnologia pioneira que representa a fronteira do que é mais sofisticado em termos do uso de sistemas vegetais heterólogos para fins terapêuticos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON DI, HUGHES D AND KUBICEK-SUTHERLAND JZ. 2016. **Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides**. *Drug Resist Updat* 26: 43-57.
- ABIRI R, VALDIANI A, MAZIAH M, SHAHARUDDIN N, SAHEBI M, BALIA YUSOF ZN, ATABAKI N AND TALEI D. 2015. **A Critical Review of the Concept of Transgenic Plants: Insights into Pharmaceutical Biotechnology and Molecular Farming**. *Curr Issues Mol Biol* 18: 21-42.
- CAPELL T AND CHRISTOU P. 2004. **Progress in plant metabolic engineering**. *Curr Opin Biotechnol* 15: 148-154.
- CHEN G-H, HSU M-P, TAN C-H, SUNG H-Y, KUO CG, FAN M-J, CHEN H-M, CHEN S AND CHEN C-S. 2005. **Cloning and Characterization of a Plant Defensin VaD1 from Azuki Bean**. *J Agric Food Chem* 53: 982-988.
- CONRAD U AND FIEDLER U. 1998. **Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity**. *Plant Mol Biol* 38: 101-109.
- CRAIK DJ, ČEMAŽAR M, WANG CKL AND DALY NL. 2006. **The cyclotide family of circular miniproteins: Nature's combinatorial peptide template**. *Biopolymers* 84(3): 250-266.
- CUNHA NB ET AL. 2017. **The next generation of antimicrobial peptides (PAMs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts**. *Drug Discov Today* 22: 234-248.
- CUNHA NB ET AL. 2011a. **Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds**. *Transgenic Res* 20: 811-826.
- CUNHA NB ET AL. 2011b. **Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds**. *Transgenic Res* 20: 841-855.
- CUNHA NBD ET AL. 2016. **Cloning and characterization of novel cyclotides genes from South American plants**. *Biopolymers* 106: 784-795.
- DA CUNHA NB, VIANNA GR, DA ALMEIDA LIMA T AND RECH E. 2014. **Molecular farming of human cytokines and blood products from plants: Challenges in biosynthesis and detection of plant-produced recombinant proteins**. *Biotechnol J* 9: 39-50.
- DANIELL H, STREATFIELD SJ AND WYCOFF K. 2001. **Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants**. *Trends Plant Sci* 6: 219-226.
- DAVIES HM. 2010. **Commercialization of whole-plant systems for biomanufacturing of protein products: evolution and prospects**. *Plant Biotechnol J* 8: 845-861.
- DEL PRETE G, SANTI L, ANDRIANAIVOARIMANANA V, AMEDEI A, DOMARLE O, D'ELIOS MM, ARNTZEN CJ, L. R AND MASON HS. 2009. **Plant-derived recombinant F1, V, and F1-V fusion antigens of Yersinia pestis activate human cells of the innate and adaptive immune system**. *Int J Immunopathol Pharmacol* 22: 133-143.
- DRAKE PMW, SZETO TH, PAUL MJ, TEH AYH AND MA JKC. 2017. **Recombinant biologic products versus nutraceuticals from plants – a regulatory choice?** *Br J Clin Pharmacol* 83: 82-87.
- EGELKROUT E, RAJAN V AND HOWARD JA. 2012. **Overproduction of recombinant proteins in plants**. *Plant Sci* 184: 83-101.

- FAHAD S ET AL. 2015. **Recent developments in therapeutic protein expression technologies in plants.** *Biotechnol Lett* 37: 265-279.
- FINNEGAN J AND MCELROY D. 1994. **Transgene Inactivation: Plants Fight Back!** *Nat Biotechnol* 12(9): 883-888.
- FISCHER R, STOGER E, SCHILLBERG S, CHRISTOU P AND TWYMAN RM. 2004. **Plant-based production of biopharmaceuticals.** *Curr Opin Plant Biol* 7: 152-158.
- FRANCONI R, DEMURTAS OC AND MASSA S. 2010. **Plant-derived vaccines and other therapeutics produced in contained systems.** *Expert Rev Vaccines* 9: 877-892.
- GLEBA Y, KLIMYUK V AND MARILLONNET S. 2005. **Magnifection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants.** *Vaccine* 23: 2042-2048.
- GLEBA Y, KLIMYUK V AND MARILLONNET S. 2007. **Viral vectors for the expression of proteins in plants.** *Curr Opin Biotechnol* 18: 134-141.
- GLEBA Y, MARILLONNET S AND KLIMYUK V. 2004. **Engineering viral expression vectors for plants: the ‘full virus’ and the ‘deconstructed virus’ strategies.** *Curr Opin Plant Biol* 7: 182-188.
- GLEBA YY, TUSÉ D AND GIRITCH A 2014. **Plant Viral Vectors for Delivery by Agrobacterium.** In: PALMER, K AND GLEBA, Y (Eds.) *Plant Viral Vectors*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 155-192.
- GU Q, HAN N, LIU J AND ZHU M. 2005. **Cloning of Helicobacter pylori urease subunit B gene and its expression in tobacco (Nicotiana tabacum L.).** *Plant Cell Rep* 24: 532-539.
- HOLTZ BR, BERQUIST BR, BENNETT LD, KOMMINENI VJM, MUNIGUNTI RK, WHITE EL, WILKERSON DC, WONG K-YI, LY LH AND MARCEL S. 2015. **Commercial-scale biotherapeutics manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals.** *Plant Biotechnol J* 13: 1180-1190.
- KAWAGUCHI R AND BAILEY-SERRES J. 2005. **mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis.** *Nucleic Acids Res* 33: 955-965.
- KIM K-Y, KWON S-Y, LEE H-S, HUR Y, BANG J-W AND KWAK S-S. 2003. **A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells.** *Plant Mol Biol* 51: 831-838.
- KOSIKOWSKA P AND LESNER A. 2016. **Antimicrobial peptides (PAMs) as drug candidates: a patent review (2003–2015).** *Expert Opin Ther Pat* 26: 689-702.
- KOYA V, MOAYERI M, LEPPLA SH AND DANIELL H. 2005. **Plant-Based Vaccine: Mice Immunized with Chloroplast-Derived Anthrax Protective Antigen Survive Anthrax Lethal Toxin Challenge.** *Infect Immun* 73: 8266-8274.
- LARRICK JW AND THOMAS DW. 2001. **Producing proteins in transgenic plants and animals.** *Curr Opin Biotechnol* 12: 411-418.
- LEE MYT, ZHOU Y, LUNG RWM, CHYE M-L, YIP W-K, ZEE S-Y AND LAM E. 2006. **Expression of viral capsid protein antigen against Epstein-Barr virus in plastids of Nicotiana tabacum cv. SR1.** *Biotechnol Bioeng* 94: 1129-1137.
- LENZI P ET AL. 2008. **Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco.** *Transgenic Res* 17: 1091-1102.

- LIENARD D ET AL. 2007. **Suspension-cultured BY-2 tobacco cells produce and mature immunologically active house dust mite allergens.** Plant Biotechnol J 5: 93-108.
- LOH H-S, GREEN BJ AND YUSIBOV V. 2017. **Using transgenic plants and modified plant viruses for the development of treatments for human diseases.** Curr Opin Virol 26: 81-89.
- LÓPEZ-ABARRATEGUI C ET AL. 2015. **Cm-p5: an antifungal hydrophilic peptide derived from the coastal mollusk *Cenchritis muricatus* (Gastropoda: Littorinidae).** FASEB J 29: 3315-3325.
- MA JKC, CHIKWAMBA R, SPARROW P, FISCHER R, MAHONEY R AND TWYMAN RM. 2005. **Plant-derived pharmaceuticals - the road forward.** Trends Plant Sci 10: 580-585.
- MA JKC, DRAKE PMW AND CHRISTOU P. 2003. **The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants.** Nat Rev Genet 4: 794-805.
- MA S, HUANG Y, YIN Z, MENASSA R, BRANDLE JE AND JEVNIKAR AM. 2004. **Induction of oral tolerance to prevent diabetes with transgenic plants requires glutamic acid decarboxylase (GAD) and IL-4.** Proc Natl Acad Sci U S A 101: 5680-5685.
- MALANOVIC N AND LOHNER K. 2016. **Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides.** Biochim Biophys Acta 1858: 936-946.
- MANDAL SM, DEY S, MANDAL M, SARKAR S, MARIA-NETO S AND FRANCO OL. 2009. **Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water.** Peptides 30: 633-637.
- MARILLONNET S, GIRITCH A, GILS M, KANDZIA R, KLIMYUK V AND GLEBA Y. 2004. **In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*.** Proc Natl Acad Sci U S A 101: 6852-6857.
- MARILLONNET S, THOERINGER C, KANDZIA R, KLIMYUK V AND GLEBA Y. 2005. **Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants.** Nat Biotechnol 23: 718-723.
- MARSIAN J AND LOMONOSSOFF GP. 2016. **Molecular pharming—VLPs made in plants.** Curr Opin Biotechnol 37: 201-206.
- MCCORMICK AA ET AL. 2008. **Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: Safety and immunogenicity in a phase I clinical study.** Proc Natl Acad Sci U S A 105: 10131-10136.
- MEYER P AND SAEDLER H. 1996. **Homology-dependent gene silencing in plants.** Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 23-48.
- MEYERS B, ZALTSMAN A, LACROIX B, KOZLOVSKY SV AND KRICHEVSKY A. 2010. **Nuclear and plastid genetic engineering of plants: Comparison of opportunities and challenges.** Biotechnol Adv 28: 747-756
- MOJSOSKA B AND JENSSEN H. 2015. **Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design.** Pharmaceuticals (Basel) 8: 366-415.
- NAGEL TE, CHAN BK, DE VOS D, EL-SHIBINY A, KANG'ETHE EK, MAKUMI A AND PIRNAY J-P. 2016. **The Developing World Urgently Needs Phages to Combat Pathogenic Bacteria.** Front Microbiol 7: 882.
- NGUYEN GKT, LIM WH, NGUYEN PQT AND TAM JP. 2012. **Novel Cyclotides and Uncyclotides**

with Highly Shortened Precursors from *Chassalia chartacea* and Effects of Methionine Oxidation on Bioactivities. *J Biol Chem* 287: 17598-17607.

NGUYEN LT, HANEY EF AND VOGEL HJ. 2011. **The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action.** *Trends Biotechnol* 29: 464-472.

OBEMBE OO, POPOOLA JO, LEELAVATHI S AND REDDY SV. 2011. **Advances in plant molecular farming.** *Biotechnol Adv* 29: 210-222.

PADIDAM M. 2003. **Chemically regulated gene expression in plants.** *Curr Opin Plant Biol* 6: 169-177.

PARACHIN NS AND FRANCO OL. 2014. **New edge of antibiotic development: antimicrobial peptides and corresponding resistance.** *Front Microbiol* 5: 1-2.

PARACHIN NS, MULDER KC, VIANA AA, DIAS SC AND FRANCO OL. 2012. **Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides.** *Peptides* 38: 446-456.

PELEGRINI PB, QUIRINO BF AND FRANCO OL. 2007. Plant cyclotides: **An unusual class of defense compounds.** *Peptides* 28: 1475-1481.

PERRY J, WAGLECHNER N AND WRIGHT G. 2016. **The Prehistory of Antibiotic Resistance.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 6: 1-9.

PINTO MFS ET AL. 2016. **Characterization of a Bioactive Acyclotide from *Palicourea rigida*.** *J Nat Prod* 79: 2767-2773.

POGREBNIYAK N, GOLOVKIN M, ANDRIANOV V, SPITSIN S, SMIRNOV Y, EGOLF R AND KOPROWSKI H. 2005. **Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: Development of recombinant vaccine.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9062-9067.

REGNARD GL, HALLEY-STOTT RP, TANZER FL, HITZEROTH II AND RYBICKI EP. 2010. **High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminivirus shuttle vector.** *Plant Biotechnol J* 8: 38-46.

SANTANA MJ, DE OLIVEIRA AL, QUEIROZ JÚNIOR LHK, MANDAL SM, MATOS CO, DE O. DIAS R, FRANCO OL AND LIÃO LM. 2015. **Structural insights into Cn-AMP1, a short disulfide-free multifunctional peptide from green coconut water.** *FEBS Lett* 589: 639-644.

SCHILLBERG S, ZIMMERMANN S, VOSS A AND FISCHER R. 1999. **Apoplasmic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*.** *Transgenic Res* 8: 255-263.

SHAALTIEL Y, GINGIS-VELITSKI S, TZABAN S, FIKS N, TEKOAH Y AND AVIEZER D. 2015. **Plant-based oral delivery of β -glucocerebrosidase as an enzyme replacement therapy for Gaucher's disease.** *Plant Biotechnol J* 13: 1033-1040.

SILVA ON, FENSTERSEIFER ICM, RODRIGUES EA, HOLANDA HHS, NOVAES NRF AND CUNHA JPA. 2015. **Clavanin A improves outcome of complications from different bacterial infections.** *Antimicrob Agents Chemother* 59: 1620-1626.

SILVA ON, MULDER KC, BARBOSA AE, OTERO-GONZALEZ AJ, LOPEZ-ABARRATEGUI C AND REZENDE TM. 2011. **Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications.** *Front Microbiol* 2: 1-14.

SILVA ON ET AL. 2012. Cn-AMP1: **A new promiscuous peptide with potential for microbial**

infections treatment. Biopolymers 98: 322-331.

STOGER E, MA JKC, FISCHER R AND CHRISTOU P. 2005. **Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants.** Curr Opin Biotechnol 16: 167-173.

STOGER E, SACK M, PERRIN Y, VAQUERO C, TORRES E, TWYMAN RM, CHRISTOU P AND FISCHER R. 2002. **Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems.** Mol Breed 9: 149-158.

STREATFIELD SJ. 2007. **Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants.** Plant Biotechnol J 5: 2-15.

TAKAIWA F, TAKAGI H, HIROSE S AND WAKASA Y. 2007. **Endosperm tissue is good production platform for artificial recombinant proteins in transgenic rice.** Plant Biotechnol J 5: 84-92.

THANAVALA Y, YANG YF, LYONS P, MASON HS AND ARNTZEN C. 1995. **Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen.** Proc Natl Acad Sci U S A 92: 3358-3361.

TÖPFER R, MAAS C, HÖRICKE-GRANDPIERRE C, SCHELL J AND STEINBISS H-H 1993. **Expression vectors for high-level gene expression in dicotyledonous and monocotyledonous plants.** Methods Enzymol 217: 67-78.

TREGONING JS, CLARE S, BOWE F, EDWARDS L, FAIRWEATHER N, QAZI O, NIXON PJ, MALIGA P, DOUGAN G AND HUSSELL T. 2005. **Protection against tetanus toxin using a plant-based vaccine.** Eur J Immunol 35: 1320-1326.

TSCHOFEN M, KNOPP D, HOOD E AND STÖGER E. 2016. **Plant Molecular Farming: Much More than Medicines.** Annu Rev Anal Chem 9: 271-294.

TWYMAN RM, STOGER E, SCHILLBERG S, CHRISTOU P AND FISCHER R. 2003. **Molecular farming in plants: host systems and expression technology.** Trends Biotechnol 21: 570-578.

UHLIG T, KYPRIANOU T, MARTINELLI FG, OPPICI CA, HEILIGERS D, HILLS D, CALVO XR AND VERHAERT P. 2014. **The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation.** EuPA Open Proteom 4: 58-69.

WATKINS RR AND BONOMO RA. 2016. Overview: **Global and Local Impact of Antibiotic Resistance.** Infect Dis Clin North Am 30: 313-322.

WU L, JIANG L, ZHOU Z, FAN J, ZHANG Q, ZHU H, HAN Q AND XU Z. 2003. **Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector.** Vaccine 21: 4390-4398.

XU J, DOLAN MC, MEDRANO G, CRAMER CL AND WEATHERS PJ. 2012. **Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins.** Biotechnol Adv 30: 1171-1184.

YANG J, BARR LA, FAHNESTOCK SR AND LIU Z-B. 2005. **High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting.** Transgenic Res 14: 313-324.

YOO BY AND CHRISPEELS MJ. 1980. **The origin of protein bodies in developing soybean cotyledons: a proposal.** Protoplasma 103: 201-204.

ZHANG GG, RODRIGUES L, ROVINSKI B AND WHITE KA. 2002. **Production of HIV-1 p24 protein in transgenic tobacco plants.** Mol Biotechnol 20: 131-136.

ZHENG Y, HE M, HAO S AND HUANG B. 1992. **The Ultrastructural Evidence on the Origin of**

Protein Bodies in the Rough Endoplasmic Reticulum of Developing Cotyledons of Soybean.
Ann Bot 69: 377-383.

ZIMMERMANN S, SCHILLBERG S, LIAO Y-C AND FISHER R. 1998. **Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in shape *Nicotiana tabacum*.** Mol Breed 4: 369-379.

PROGNOSE DO VOLUME DE MADEIRA EM FLORESTAS EQUIÂNEAS POR MEIO DE MODELOS AGROMETEOROLÓGICOS DE REDES NEURAIIS ARTIFICIAIS

Mariana Rodrigues Magalhães Romeiro

Doutora em Engenharia Agrícola - UFV
Belo Horizonte – Minas Gerais

Aristides Ribeiro

Departamento de Engenharia Agrícola – UFV
Viçosa – Minas Gerais

Leonardo Bonato Felix

Departamento de Engenharia Elétrica - UFV
Viçosa – Minas Gerais

Aylen Ramos Freitas

Graduanda em Engenharia Elétrica - UFV
Viçosa – Minas Gerais

Mayra Luiza Marques da Silva

Departamento de Engenharia Florestal - UFSJ
Sete Lagoas – Minas Gerais

Aline Edwiges Mazon de Alcântara

Doutora em Ciência Florestal - UFV
Belo Oriente – Minas Gerais

RESUMO: Diversas ferramentas computacionais e de modelagem matemática têm sido utilizadas com êxito em situações de tomada de decisão no setor florestal, destacando-se as Redes Neurais Artificiais (RNA). Diante do exposto, o trabalho visa elucidar as seguintes questões: i) A redução do número de variáveis por meio de métodos de ordenação pode otimizar a construção de modelos de redes neurais para estimação da prognose do volume de madeira?

ii) Existe diferença significativa entre prognoses realizadas por meio de diferentes métodos? iii) Qual o modelo mais eficiente para a realização da prognose do inventário florestal para a região do leste de Minas Gerais? Utilizou-se 3 metodologias: i) modelos construídos com a ordenação da Correlação de Pearson; ii) modelos construídos com a ordenação do Método de Garson; e iii) Modelo Híbrido. Todos os processamentos foram realizados no software Neuro AgroClimate. Houve diferença significativa entre os três modelos analisado, e a rede que apresentou o menor valor do RMSE do teste (%) foi o modelo 12 da metodologia da Correlação de Pearson. A seleção das variáveis dependentes foi eficaz ao otimizar o tempo de processamento das redes por se conhecer as variáveis do input.

PALAVRAS-CHAVE: Método de Garson; Correlação de Pearson; Neuro AgroClimate.

PROGNOSIS OF WOOD VOLUME IN THE PLANTED FORESTS BY MEANS OF AGROMETEOROLOGICAL MODELS OF ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS

ABSTRACT: Several computational tools and mathematical modeling have been used successfully in decision-making situations in the forestry sector, with emphasis on Artificial

Neural Networks (RNA). In view of the above, the paper aims at elucidating the following questions: i) Can the reduction of the number of variables by ordering methods optimize the construction of neural network models to estimate the prognosis of the wood volume? ii) Is there a significant difference between prognoses performed using different methods? iii) What is the most efficient model for the prognosis of the forest inventory for the eastern region of Minas Gerais? For the construction of the agrometeorological models, three methodologies were used: i) models constructed according to the order of the Pearson Correlation; ii) models constructed according to the ordering of the Garson Method; and iii) Hybrid Model. All the processes were performed in the software Neuro AgroClimate. There was a significant difference between the three models analyzed, and the network that presented the lowest RMSE of the test value (%) was model 12 of the Pearson Correlation methodology. The selection of the dependent variables was effective in optimizing the processing time of the networks when knowing the input variables.

KEYWORDS: Garson Method; Pearson Correlation; Neuro AgroClimate.

1 | INTRODUÇÃO

A eucaliptocultura no Brasil é uma das mais avançadas do mundo servindo de referência para outros países como a Austrália que é seu país de origem (Montagu *et al.*, 2003), devido às suas características como crescimento rápido e plasticidade em relação ao estresse hídrico (Brown, 2000).

O manejo florestal sustentável requer estimativas precisas de estoque de crescimento, uma vez que essas informações auxiliam confecção de planos de manejo (Binoti, *et al.*, 2014). Diversas ferramentas computacionais e de modelagem matemática têm sido utilizadas com êxito em situações de tomada de decisão no setor florestal, destacando-se as Redes Neurais Artificiais (RNA) (Leite *et al.*, 2016).

Uma das vantagens das RNAs sobre os métodos convencionais de modelagem é que elas não requerem informação detalhada sobre os processos físicos, químicos ou biológicos do sistema a ser modelado, mas apenas um banco de dados representativo do mesmo (Sudheer *et al.*, 2003).

Diante do exposto, o trabalho visa elucidar as seguintes questões: i) A redução do número de variáveis por meio de métodos de ordenação pode otimizar a construção de modelos de redes neurais para estimação da prognose? ii) Existe diferença significativa entre as prognoses realizadas por meio dos diferentes métodos analisados? iii) Qual o modelo mais eficiente para a realização da prognose do inventário florestal para a região do leste de Minas Gerais?

2 | MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em áreas pertencentes a uma empresa florestal

situada na região leste do estado de Minas Gerais com altitude entre 527 e 852 metros. Foram analisados 156 talhões divididos em 1882 parcelas.

2.1 Dados do Inventário Florestal Contínuo (IFC)

Os dados utilizados são oriundos de parcelas permanentes de Inventários Florestais Contínuos (IFC) realizados anualmente. O banco de dados é composto por florestas equiâneas cujo plantio foram realizados entre os anos de 1989 e 2011 com áreas das parcelas entre 2,70 a 118,90 ha. As variáveis de inventário trabalhadas foram: área basal (m^2), altura dominante (m), volume atual (m^3/ha), volume futuro (m^3/ha), idade atual (meses) e idade futura (meses). Foram retirados do banco de dados as parcelas que no primeiro IFC apresentaram valores de idade inferior a 9 meses e superior a 15 meses.

2.2 Dados Meteorológicos

Os dados meteorológicos são constituídos por dados diários de 1980 a 2013 (Xavier *et al.*, 2016) e as variáveis utilizadas foram: temperaturas mínima, máxima e média ($^{\circ}C$), umidade relativa do ar (%), radiação solar (MJ/m^2), velocidade do vento (m/s), precipitação (mm) e temperatura do ponto de orvalho ($^{\circ}C$). Foram incluídas ao banco de dados meteorológico o cálculo da soma mensal do número de dias com precipitação acima de 1 e 5 mm, o déficit de pressão de vapor (DPV) (kPa) e o índice ecofisiológico dado pela razão $(DPV \cdot T)/R_g$.

2.3 Organização dos dados para o input do modelo

Para a espacialização dos dados meteorológicos, dividiu-se a regional em 10 subáreas por meio da sobreposição entre as coordenadas das parcelas do Inventário Florestal Contínuo (IFC) e as coordenadas da grade meteorológica.

Os dados meteorológicos foram inseridos ao banco de dados de acordo com os intervalos de mensuração dos IFC. Para o primeiro IFC, as variáveis meteorológicas foram organizadas entre a data de plantio e o primeiro IFC. Já para o segundo IFC, as variáveis foram organizadas entre a data de plantio e o segundo IFC. Os cálculos foram feitos sucessivamente até o último IFC trabalhado.

Para a estruturação do banco de dados, calculou-se a média das variáveis de temperatura ($^{\circ}C$), umidade relativa do ar (%), radiação solar (MJ/m^2), velocidade do vento (m/s), déficit de pressão de vapor (kPa), $(DPV \cdot T)/R_g$. Para as variáveis precipitação (mm) e dias com precipitação acima de 1 e 5 mm, calculou-se a soma.

2.4 Ordenação das variáveis do input

i) Correlação de Pearson: a correlação foi utilizada para ordenar as variáveis de entrada por meio do valor da correlação, do maior para o menor, entre a variável de saída “volume futuro m^3/ha ” e cada variável de entrada. Para a confecção dos modelos foi utilizada apenas a ordem das variáveis (os valores numéricos não foram

utilizados).

ii) Método de Garson: após o processo de treinamento da rede, foram salvos os valores dos pesos sinápticos entre a camada de entrada e a camada intermediária, entre a camada intermediária e a camada de saída, e realizado o método do cálculo da contribuição de cada atributo, conforme feito por Garson (1991) e o resultado desse cálculo é o valor da contribuição relativa de cada atributo.

Para ordenar as variáveis de entrada, foram processadas redes do tipo Multilayer Perceptron (MLP) – Aproximação de Funções, utilizando todas as variáveis dependentes como variáveis de entrada (21 variáveis) e a variável independente “volume futuro” como a variável de saída. O algoritmo de treinamento utilizado foi o Levenberg–Marquardt.

Na camada intermediária, a função de ativação utilizada foi a Tangente Hiperbólica e na camada de saída a função Identidade. As demais configurações utilizadas foram: erro quadrático médio 10^{-4} e verificação da validação (validation checks) igual ao número de iterações; número de repetições igual a 5; taxa de aprendizado igual a 0,5. Para a escolha do número de iterações, testou-se os valores 300, 500 e 1000. O banco de dados foi dividido em três seções: 70% dos dados para o treinamento, 15% para o teste e 15% para a validação.

Os padrões de dados foram extraídos aleatoriamente do arquivo padrão completo e incorporados em cada uma das três seções. Antes de serem apresentados à rede, todos os dados foram normalizados por variável.

De acordo com Silva *et al.*, (2010), no processo de determinação do número de neurônios, deve-se considerar que um número excessivo de neurônios pode acarretar a memorização dos dados de treinamento (overfitting) e por outro lado, um pequeno número de neurônios pode não ser suficiente para a realização da tarefa desejada, fenômeno conhecido como underfitting. O ideal é tentar trabalhar com um valor que fique entre o underfitting e o overfitting.

Utilizou-se os métodos de Kolmogorov e Fletcher-Gloss (Silva *et al.*, 2010) para a escolha do número de neurônios na camada intermediária. Selecionou-se 5 valores dentro da amplitude dos valores possíveis: i) para o número de variáveis de entrada cuja amplitude apresentava o número de neurônios inferior ou igual a 5, utilizou-se todos os valores da amplitude; ii) para o número de variáveis de entrada superior a 5, utilizou-se os valores das duas extremidades (dois valores), o valor médio entre os extremos (um valor), o valor médio entre o extremo inferior e o valor médio entre os extremos, e o valor entre o extremo superior e o valor médio entre os extremos.

O total de redes treinadas para cada modelo foi igual a 75 (5 configurações diferentes de neurônios x 3 iterações diferentes x 5 repetições). Foi escolhida a rede com o menor valor do erro quadrático médio do teste para utilizar a ordenação do Método de Garson.

O processamento foi realizado no software NeuroAgroClimate (BR512016000503-3), desenvolvido para esta tese por Magalhães, *et al.* (2016).

2.5 Construção e seleção dos modelos agrometeorológicos

A estrutura para modelagem dos dados foi organizada de acordo com Binoti *et al.*, (2015): informações dos inventários pareadas, ou seja, o 1º IFC com o 2º IFC, o 2º IFC com o 3º IFC e, assim, sucessivamente.

Os modelos gerados (RNA's) foram estruturados sendo o “volume futuro” da madeira como variável de saída (variável independente - output) e variando o número de variáveis dependentes utilizadas como input.

i) Modelos provenientes da ordenação da Correlação de Pearson: o primeiro modelo foi composto pela variável de saída “volume futuro” e a primeira variável dependente da ordenação da Correlação de Pearson; o segundo modelo foi composto pela variável de saída “volume futuro” e as duas primeiras variáveis dependentes da ordenação da Correlação de Pearson; e assim sucessivamente até o último modelo com 21 variáveis dependentes.

ii) Modelos provenientes da ordenação do Método de Garson: o primeiro modelo foi composto pela variável de saída “volume futuro” e a primeira variável dependente da ordenação do Método de Garson; o segundo modelo foi composto pela variável de saída “volume futuro” e as duas primeiras variáveis dependentes da ordenação do Método de Garson; e assim sucessivamente até o último modelo com 21 variáveis dependentes.

iii) Modelos provenientes do Método Híbrido: o Método Híbrido foi formado fundindo as variáveis dos modelos oriundos da Correlação de Pearson e Método de Garson. O primeiro modelo híbrido foi composto pela variável de saída “volume futuro” e a primeira variável dependente da ordenação da Correlação de Pearson e do Método de Garson, sem repetir as variáveis; o segundo modelo foi composto pela variável de saída “volume futuro” e as duas primeiras variáveis dependentes da ordenação da Correlação de Pearson e do Método de Garson; e assim sucessivamente sem repetição das variáveis, até o último modelo com 21 variáveis dependentes.

Os modelos foram gerados por meio de redes do tipo Multilayer Perceptron (MLP) – Aproximação de Funções, com as configurações: algoritmo de treinamento - Levenberg–Marquardt; função de ativação da camada intermediária - Tangente Hiperbólica; função de ativação da camada de saída - Identidade; erro quadrático médio 10^{-4} e verificação da validação (validation checks) igual ao número de iterações; número de repetições igual a 5; taxa de aprendizado igual a 0,5; número de iterações igual a 300, 500 e 1000. O banco de dados foi dividido em 70% para o treinamento, 15% para a validação e 15% para o teste. Os dados foram normalizados por variável. Utilizou-se os métodos de Kolmogorov e Fletcher-Gloss para a escolha do número de neurônios na camada intermediária.

Foram selecionadas 21 redes (uma por modelo) para as metodologias da Correlação de Pearson e Método de Garson, e 14 redes (uma por modelo) para metodologia do Método Híbrido. A seleção ocorreu por meio do menor valor da raiz

do erro quadrático médio (RMSE) do teste (Mehtätalo *et al.*, 2006).

Para cada metodologia (Correlação de Pearson, Método de Garson e Método Híbrido), o modelo com o menor valor de RMSE foi comparado estatisticamente com os demais por meio do procedimento estatístico proposto por Leite e Oliveira (2002). O modelo com menor número de variáveis dependentes considerado estatisticamente igual ao modelo com menor valor de RMSE selecionado anteriormente, foi considerado o melhor modelo. Posteriormente, os três melhores modelos (um por metodologia), foram comparados estatisticamente.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ordenação da importância relativa das variáveis do input

Para o resultado da ordenação pela Correlação de Pearson (Tabela 1), já era esperado que as variáveis de inventário florestal (área basal, altura dominante e idade) apresentassem maior correlação com a variável de saída “volume futuro”. No setor florestal, os dois modelos mais utilizados para o cálculo do volume de madeira são o Modelo de Clutter (Salles *et al.*, 2012) e Modelo de Schumacher e Hall (Silva *et al.*, 2009); ambos utilizam pelo menos duas das variáveis de inventário florestal citadas e estas são diretamente proporcionais à variável de saída.

Do ponto de vista ecofisiológico, o Método de Garson (Tabela 2) apresentou maior coerência na ordenação das variáveis do input (DPV, temperatura e umidade relativa do ar), uma vez que pode ser constatado que as variáveis que apresentaram maior peso estão relacionadas com o controle estomático e conseqüentemente determinam os ganhos/perdas da produção primária bruta da floresta.

A variável que mais se destacou na seleção pelo Método de Garson foi o DPV (Tabela 2). O aumento do DPV ocasiona o fechamento dos estômatos reduzindo a taxa fotossintética (Streck, 2003; Silva, 2007).

No Método de Garson (Tabela 1), era esperado que a variável radiação solar fosse mais representativa, uma vez que ela é uma das principais variáveis que afetam o crescimento das árvores (Souza *et al.*, 2006; Santana *et al.*, 2008). A breve redução na radiação solar incidente sobre uma árvore, provocada pela simples passagem de nuvem, pode acionar a resposta imediata dos estômatos (Rodrigues *et al.*, 2011), alterando a produtividade da planta que está relacionada principalmente à quantidade de energia interceptada e absorvida (Magalhães, 1985).

As variáveis fisiológicas na ordenação pela Correlação de Pearson (Tabela 1) não apresentaram boa colocação, DPV e (DPVxTmed)/Rg ficaram nas posições 14° e 15°, respectivamente. A umidade relativa do ar, variável que interfere diretamente na abertura dos estômatos, ficou na última colocação. A posição dessas variáveis demonstra que na metodologia da Correlação de Pearson não é dada a devida importância para as relações fisiológicas que possuem grande peso no entendimento

da dinâmica de ganho de volume de madeira.

Nas duas ordenações analisadas, a variável “número de dias com precipitação acima de 1 mm” foi mais representativa do que a variável “número de dias com precipitação acima de 5 mm” (tabelas 1 e 2). Esse fato pode estar ligado ao teor de argila encontrado no solo, uma vez que solos com maior teor de argila apresentam menor espaçamento entre suas partículas e conseguem deste modo reter uma quantidade maior de água. Desta forma, mesmo o menor volume precipitado pode fazer diferença para a vegetação local devido ao tempo maior de disponibilidade de água no solo para a absorção das raízes.

A variável altitude não foi representativa em nenhuma das metodologias utilizadas (tabelas 1 e 2). A baixa representatividade da variável em questão pode ser explicada por sua pequena amplitude entre as áreas estudadas, com a altitude entre 527 e 852 metros.

Correlação de Pearson	
Variáveis dependentes	
1	Volume (m ³)
2	Área basal (m ²)
3	Altura dominante (m)
4	Idade futura (meses)
5	Idade (meses)
6	Dias com precipitação acima de 1 mm
7	Dias com precipitação acima de 5 mm
8	Precipitação (mm)
9	Amplitude térmica (°C)
10	Espaçamento
11	Velocidade do vento (m/s)
12	Temperatura mínima (°C)
13	Temperatura máxima (°C)
14	Défice de pressão de vapor - DPV (kPa)
15	(DPVxTmed)/Rg
16	Radição (MJ/m ²)
17	Área (m ²)
18	Temperatura média (°C)
19	Temperatura do ponto de orvalho (°C)
20	Altitude (m)
21	Umidade relativa do ar (%)

Tabela 1: Ordenação das variáveis de entrada por meio da Correlação de Pearson.

Método de Garson	
Variáveis dependentes	
1	Déficit de pressão de vapor - DPV (kPa)
2	(DPVxTmed)/Rg
3	Temperatura média (°C)
4	Temperatura máxima (°C)
5	Temperatura mínima (°C)
6	Umidade relativa do ar (%)
7	Temperatura do ponto de orvalho (°C)
8	Dias com precipitação acima de 1 mm
9	Dias com precipitação acima de 5 mm
10	Idade futura (meses)
11	Idade (meses)
12	Volume (m ³)
13	Precipitação (mm)
14	Área basal (m ²)
15	Velocidade do vento (m/s)
16	Altura dominante (m)
17	Radição (MJ/m ²)
18	Amplitude térmica (°C)
19	Espaçamento
20	Área (m ²)
21	Altitude (m)

Tabela 2: Ordenação das variáveis de entrada por meio do Método de Garson.

3.2 Seleção dos modelos agrometeorológicos

Ao analisar as tabelas 3, 4 e 5, observa-se que para as três metodologias analisadas, os modelos com um número reduzido de variáveis apresentaram valores maiores de RMSE do teste (%) e que a medida em que as variáveis foram acrescentadas o erro foi reduzindo até um determinado modelo, e posteriormente ocorreu aumento discreto.

Dentre os modelos estruturados com base na metodologia da ordenação da Correlação de Pearson, verificou-se que o modelo 12 com a arquitetura MLP 12-25-1 apresentou o menor valor de RMSE do teste (%) que foi igual a 6,24 (tabela 3); para a metodologia do Método de Garson, o modelo com arquitetura MLP 16-9-1 (tabela 4) apresentou o menor valor de RMSE do teste (%) que foi igual a 6,52; já a metodologia do Modelo Híbrido apresentou o melhor resultado do valor de RMSE do teste (%) igual a 6,61, para o modelo 9 com arquitetura MLP 16-9-1. Segundo Binoti *et al.*, (2015), valores de RMSE concentrados em $\pm 7,5\%$ no treinamento e na validação, em nível de parcela, são considerados altamente satisfatórios.

Em relação à arquitetura, em 71,4 % dos modelos (tabela 3) construídos por meio da ordenação da Correlação de Pearson o número de neurônios na camada intermediário foi superior ao número de variáveis do input dos modelos analisados. Nos modelos da ordenação do Modelo Híbrido e Método de Garson

foram 50% e 47,6%, respectivamente. Ao analisar o número de iterações dos modelos de cada metodologia (tabelas 3 a 5), destacou-se o valor de 300 iterações com 42,8%, 42,8% e 57,1% do número total de modelos da Correlação de Pearson, Método de Garson e Modelo Híbrido.

	Número de variáveis dependentes	Arquitetura	Critério de Parada	Número de iterações	Tempo de Treinamento (segundos)	RMSE do Treinamento (%)	RMSE do Teste (%)	RMSE do Validação (%)
Modelo 1	1	MLP 1-3-1	Número de iterações	1000	50,5	10,29	9,56	10,58
Modelo 2	2	MLP 2-5-1	Número de iterações	300	15,9	9,95	8,68	8,80
Modelo 3	3	MLP 3-5-1	Número de iterações	1000	52,9	9,16	8,03	9,72
Modelo 4	4	MLP 4-5-1	Número de iterações	1000	48,4	8,37	7,91	9,61
Modelo 5	5	MLP 5-7-1	Número de iterações	300	14,8	8,23	7,27	7,48
Modelo 6	6	MLP 6-12-1	Número de iterações	500	28,3	7,96	7,66	8,48
Modelo 7	7	MLP 7-11-1	Número de iterações	500	28,9	7,45	7,37	8,48
Modelo 8	8	MLP 8-12-1	Número de iterações	500	31,2	7,53	7,49	7,35
Modelo 9	9	MLP 9-13-1	Número de iterações	300	20,0	7,97	6,98	7,52
Modelo 10	10	MLP 10-17-1	Número de iterações	1000	77,6	7,08	7,11	8,17
Modelo 11	11	MLP 11-19-1	Número de iterações	500	41,9	7,61	7,30	7,55
Modelo 12	12	MLP 12-25-1	Número de iterações	500	53,8	7,07	6,24	7,69
Modelo 13	13	MLP 13-13-1	Número de iterações	300	22,0	7,11	6,87	7,34
Modelo 14	14	MLP 14-13-1	Número de iterações	300	22,9	7,36	7,08	7,47
Modelo 15	15	MLP 15-25-1	Número de iterações	500	62,3	6,88	6,82	8,49
Modelo 16	16	MLP 16-9-1	Número de iterações	300	20,2	6,83	6,78	9,12
Modelo 17	17	MLP 17-22-1	Número de iterações	300	40,5	7,26	7,53	7,22
Modelo 18	18	MLP 18-9-1	Número de iterações	300	21,1	6,48	9,92	7,68
Modelo 19	19	MLP 19-17-1	Número de iterações	500	50,6	8,09	7,60	8,62
Modelo 20	20	MLP 20-10-1	Número de iterações	1000	75,6	6,73	7,24	9,72
Modelo 21	21	MLP 21-18-1	Número de iterações	300	32,2	7,21	7,47	8,07

Tabela 3: Configurações e raiz do erro quadrático médio (RMSE) dos modelos gerados por meio da metodologia da Correlação de Pearson.

	Número de variáveis dependentes	Arquitetura	Critério de Parada	Número de iterações	Tempo de Treinamento (segundos)	RMSE do Treinamento (%)	RMSE do Teste (%)	RMSE do Validação (%)
Modelo 1	1	MLP 1-3-1	Número de iterações	1000	52,8	40,61	37,49	39,99
Modelo 2	2	MLP 2-4-1	Número de iterações	300	16,2	40,07	34,33	37,31
Modelo 3	3	MLP 3-6-1	Número de iterações	300	16,6	34,28	31,28	32,63
Modelo 4	4	MLP 4-8-1	Número de iterações	500	24,9	30,56	30,52	32,48
Modelo 5	5	MLP 5-11-1	Número de iterações	500	29,3	30,77	28,31	32,27
Modelo 6	6	MLP 6-13-1	Número de iterações	1000	60,7	28,96	27,52	30,71
Modelo 7	7	MLP 7-10-1	Número de iterações	300	18,0	29,23	26,13	27,12
Modelo 8	8	MLP 8-17-1	Número de iterações	1000	67,5	20,13	20,19	21,17
Modelo 9	9	MLP 9-7-1	Número de iterações	300	17,4	21,98	20,20	20,69
Modelo 10	10	MLP 10-11-1	Número de iterações	500	31,9	20,83	19,03	21,13
Modelo 11	11	MLP 11-11-1	Número de iterações	500	32,6	20,76	19,09	23,21
Modelo 12	12	MLP 12-12-1	Número de iterações	500	33,8	7,34	7,20	8,27
Modelo 13	13	MLP 13-18-1	Número de iterações	300	24,7	7,26	6,71	7,48
Modelo 14	14	MLP 14-8-1	Número de iterações	1000	63,4	7,37	7,20	9,70
Modelo 15	15	MLP 15-15-1	Número de iterações	300	23,5	6,83	7,21	6,98
Modelo 16	16	MLP 16-9-1	Número de iterações	1000	63,6	7,35	6,42	8,96
Modelo 17	17	MLP 17-15-1	Número de iterações	300	24,5	7,00	6,82	8,39
Modelo 18	18	MLP 18-9-1	Número de iterações	500	34,2	7,41	7,05	7,23
Modelo 19	19	MLP 19-10-1	Número de iterações	500	35,9	6,92	6,81	7,56
Modelo 20	20	MLP 20-10-1	Número de iterações	300	22,4	7,41	6,74	7,01
Modelo 21	21	MLP 21-18-1	Número de iterações	300	32,2	7,21	7,47	8,07

Tabela 4: Configurações e raiz do erro quadrático médio (RMSE) dos modelos gerados por meio da metodologia do Método de Garson.

	Número de variáveis dependentes	Arquitetura	Critério de Parada	Número de iterações	Tempo de Treinamento (segundos)	RMSE do Treinamento (%)	RMSE do Teste (%)	RMSE do Validação (%)
Modelo 1	2	MLP 2-5-1	Número de iterações	300	15,72	10,34	9,11	9,43
Modelo 2	4	MLP 4-8-1	Número de iterações	1000	63,434	9,39	8,62	9,17
Modelo 3	6	MLP 6-13-1	Número de iterações	300	19,259	8,48	7,88	8,48
Modelo 4	8	MLP 8-15-1	Número de iterações	1000	71,058	7,71	7,09	7,85
Modelo 5	10	MLP 10-11-1	Número de iterações	1000	66,509	7,28	7,08	8,02
Modelo 6	12	MLP 12-21-1	Número de iterações	300	24,593	6,87	6,95	7,37
Modelo 7	14	MLP 14-13-1	Número de iterações	300	22,705	6,90	7,15	8,24
Modelo 8	15	MLP 15-9-1	Número de iterações	1000	68,838	7,58	7,14	7,60
Modelo 9	16	MLP 16-9-1	Número de iterações	1000	67,289	7,17	6,61	9,13
Modelo 10	17	MLP 17-9-1	Número de iterações	300	19,827	7,46	7,34	7,81
Modelo 11	18	MLP 18-9-1	Número de iterações	500	35,569	7,29	6,89	7,12
Modelo 12	19	MLP 19-32-1	Número de iterações	300	49,143	6,24	6,73	8,61
Modelo 13	20	MLP 20-10-1	Número de iterações	300	22,159	7,41	6,74	7,01
Modelo 14	21	MLP 21-18-1	Número de iterações	300	32,192	7,21	7,47	8,07

Tabela 5: Configurações e raiz do erro quadrático médio (RMSE) dos modelos gerados por meio por meio da metodologia do Método Híbrido.

Ao analisar o resultado da análise estatística para cada metodologia, observa-se que os modelos diferem entre si (tabelas 6 a 8). Desta forma, os melhores modelos continuam sendo os 12, 16 e 9 para as metodologias da Correlação de Pearson, Método de Garson e Modelo Híbrido, respectivamente.

Correlação de Pearson	Estatística				
	F (Ho)	t (e)	$r_{y,\hat{y}} >= 1 - \alpha $	Erro Médio (e)	Resultado
Rede - 1 variável	87,08*	1,27 ^{ns}	não	0,01	diferente
Rede - 2 variáveis	54,93*	0,97 ^{ns}	não	0,00	diferente
Rede - 3 variáveis	47,33*	0,57 ^{ns}	não	0,00	diferente
Rede - 4 variáveis	38,69*	3,25*	não	0,01	diferente
Rede - 5 variáveis	35,01*	0,00 ^{ns}	não	0,00	diferente
Rede - 6 variáveis	19,29*	1,12 ^{ns}	sim	-0,02	diferente
Rede - 7 variáveis	24,72*	3,79*	sim	0,01	diferente
Rede - 8 variáveis	21,37*	1,87 ^{ns}	não	0,00	diferente
Rede - 9 variáveis	12,10*	1,95 ^{ns}	sim	0,00	diferente
Rede - 10 variáveis	20,27*	2,68*	não	0,00	diferente
Rede - 11 variáveis	13,28*	0,36 ^{ns}	não	0,00	diferente
Rede - 13 variáveis	7,96*	2,78*	sim	0,01	diferente
Rede - 14 variáveis	11,85*	0,11 ^{ns}	não	0,00	diferente
Rede - 15 variáveis	20,62*	0,70 ^{ns}	sim	-0,01	diferente
Rede - 16 variáveis	39,59*	0,68 ^{ns}	não	0,00	diferente
Rede - 17 variáveis	3,41*	1,15 ^{ns}	não	0,01	diferente
Rede - 18 variáveis	30,24*	2,25*	sim	0,01	diferente
Rede - 19 variáveis	84,48*	2,24*	sim	0,01	diferente
Rede - 20 variáveis	17,92*	2,26*	sim	0,01	diferente
Rede - 21 variáveis	29,63*	5,18*	sim	0,01	diferente

Tabela 6: Comparativo entre o volume futuro estimado do melhor modelo da Correlação de Pearson (modelo 12) com o volume futuro estimado dos 20 modelos restantes, utilizando o procedimento estatístico proposto por Leite e Oliveira (2002) a $\alpha=5\%$.

Os valores do RMSE do teste (%) entre as três metodologias analisadas foram muito próximos, sendo: 6,24 do modelo 12 da metodologia da Correlação de Pearson; 6,42 do modelo 16 da metodologia do Método de Garson; e 6,61 do modelo 9 da metodologia do Modelo Híbrido.

Os três modelos com os melhores desempenhos, o melhor de cada metodologia, apresentaram diferenças significativas entre eles, confirmada pelo procedimento estatístico proposto por Leite e Oliveira (2002), mesmo com valores de RMSE do teste (%) muito próximos (tabela 9). Desta forma, a rede que apresentou o menor valor do RMSE do teste (%) foi o modelo 12 da metodologia da Correlação de Pearson.

Método de Garson	Estatística					Resultado
	F (Ho)	t (e)	$r_{y,\hat{y}} \geq 1 - \hat{e} $	Erro Médio (e)		
Rede - 1 variável	25743,18*	25,14*	não	0,30	diferente	
Rede - 2 variáveis	13898,66*	23,15*	não	0,28	diferente	
Rede - 3 variáveis	3378,34*	18,31*	não	0,20	diferente	
Rede - 4 variáveis	2247,86*	18,19*	não	0,19	diferente	
Rede - 5 variáveis	2055,52*	15,79*	não	0,17	diferente	
Rede - 6 variáveis	1425,78*	14,74*	não	0,15	diferente	
Rede - 7 variáveis	1440,60*	12,22*	não	0,14	diferente	
Rede - 8 variáveis	465,61*	4,71*	não	0,05	diferente	
Rede - 9 variáveis	621,46*	5,34*	não	0,05	diferente	
Rede - 10 variáveis	506,54*	4,86*	não	0,05	diferente	
Rede - 11 variáveis	561,73*	4,12*	não	0,04	diferente	
Rede - 12 variáveis	10,27*	0,66 ^{ns}	não	0,00	diferente	
Rede - 13 variáveis	0,57 ^{ns}	0,51 ^{ns}	não	0,00	diferente	
Rede - 14 variáveis	18,96*	0,81 ^{ns}	não	0,00	diferente	
Rede - 15 variáveis	0,26 ^{ns}	0,73 ^{ns}	não	0,00	diferente	
Rede - 17 variáveis	2,64 ^{ns}	4,22*	sim	0,00	diferente	
Rede - 18 variáveis	6,68*	3,40*	não	0,00	diferente	
Rede - 19 variáveis	3,73*	0,78 ^{ns}	não	0,00	diferente	
Rede - 20 variáveis	0,72 ^{ns}	3,61*	não	0,00	diferente	
Rede - 21 variáveis	10,10*	1,80 ^{ns}	não	0,00	diferente	

Tabela 7: Comparativo entre o volume futuro estimado do melhor modelo do Método de Garson (modelo 16) com o volume futuro estimado dos 20 modelos restantes, utilizando o procedimento estatístico proposto por Leite e Oliveira (2002) a $\alpha=5\%$.

Ao analisar a ordenação das variáveis e o valor do RMSE do teste (%) das metodologias da Correlação de Pearson e Método de Garson, o modelo 16 do Método de Garson é o mais indicado quando o foco do estudo for o crescimento tendo como base as variáveis físicas e fisiológicas.

Do ponto de vista empresarial, o modelo 12 da metodologia da Correlação de Pearson atende melhor por apresentar o menor valor de RMSE do teste (%) dentre os modelos analisados e uma redução de 9 variáveis (42,8%) em relação ao número total de variáveis disponíveis.

Método Híbrido	Estatística					Resultado
	F (Ho)	t (e)	$r_{y,\hat{y}} \geq 1 - \hat{e} $	Erro Médio (e)		
Rede - 1 variável	38,97*	0,41*	não	0,00	diferente	
Rede - 2 variáveis	23,03*	0,11*	não	0,00	diferente	
Rede - 3 variáveis	18,45*	0,92*	não	0,00	diferente	
Rede - 4 variáveis	8,82*	3,25*	não	0,00	diferente	
Rede - 5 variáveis	2,57 ^{ns}	1,64 ^{ns}	não	0,00	diferente	
Rede - 6 variáveis	0,72 ^{ns}	1,47 ^{ns}	não	0,00	diferente	
Rede - 7 variáveis	5,48*	0,18 ^{ns}	não	0,00	diferente	
Rede - 8 variáveis	44,70*	5,32*	sim	0,00	diferente	
Rede - 10 variáveis	4,90*	0,56 ^{ns}	não	0,00	diferente	
Rede - 11 variáveis	6,26*	5,93*	sim	0,00	diferente	
Rede - 12 variáveis	0,93 ^{ns}	1,20 ^{ns}	não	0,00	diferente	
Rede - 13 variáveis	0,11 ^{ns}	2,12*	não	0,00	diferente	
Rede - 14 variáveis	16,08*	3,63*	não	0,00	diferente	

Tabela 8: Comparativo entre o volume futuro estimado do melhor modelo do Método Híbrido

(modelo 9) com o volume futuro estimado dos 13 modelos restantes, utilizando o procedimento estatístico proposto por Leite e Oliveira (2002) a $\alpha=5\%$.

	Estatística				Resultado
	F (Ho)	t (e)	$r_{x,y} \geq 1 - \bar{p} $	Erro Médio (e)	
Correlação de Pearson X Método de Garson	1,87*	2,34*	não	0,00	diferente
Correlação de Pearson X Método Híbrido	1,41 ^{ns}	0,38 ^{ns}	não	0,00	diferente
Método Híbrido X Método de Garson	3,69*	0,78 ^{ns}	não	0,00	diferente

Tabela 9: Comparativo entre os volumes estimados dos melhores modelos de cada metodologia utilizada, segundo o procedimento estatístico proposto por Leite e Oliveira (2002) a $\alpha=5\%$.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A redução do número de variáveis otimizou 23,8% e 42,8% do total no número de variáveis utilizadas na construção de modelos por meio das metodologias do Método de Garson e Correlação de Pearson, respectivamente.

Os três modelos com os melhores desempenhos, o melhor de cada metodologia (Correlação de Pearson, Método de Garson e Modelo Híbrido), apresentaram diferenças significativas entre eles.

O modelo mais eficiente para a realização da prognose do inventário florestal para a região do leste do estado de Minas Gerais foi o modelo 12 da metodologia da Correlação de Pearson com uma redução de 9 variáveis (42,8%) em relação ao número total de variáveis disponíveis.

REFERÊNCIAS

BINOTI, D.H.B.; BINOTI, M.L.M.S.; LEITE, H.G. **Configuração de redes neurais artificiais para estimação do volume de árvores.** Ciência da Madeira, v.5, n.1, p.58-67, 2014.

BINOTI, M.L.M.S.; BINOTI, D.H.B.; LEITE, H.G.; GARCIA, S.L.R.; FERREIRA, M.Z.; RODE, R.; SILVA, A.A.L. **Redes neurais artificiais para estimação do volume de árvores.** Revista Árvore, Viçosa-MG, v.38, n.2, p.283-288, 2014.

BINOTI, M.L.M.S.; LEITE, H.G.; BINOTI, D.H.B.; GLERIANI, J.M. **Prognose em nível de povoamento de clones de eucalipto empregando redes neurais artificiais.** CERNE, v.21, n.1, p.97-105, 2015.

BROWN, C. **The global outlook for future wood supply from forest plantation.** N° GFPOS/WP/03. Rome, FAO. Working Papers, 1-45, 2000.

GARSON, G.D. **Interpreting neural-network connection weights.** Artificial Intelligence Expert 6 (7), 47-51. 1991.

LEITE, H.G.; OLIVEIRA, F.H.T. **Statistical procedure to test the identity of analytical methods.** Communications in Soil Science and Plant Analysis, New York, v. 33, p. 1105-1118, 2002.

LEITE, H.G.; BINOTI, D.H.B.; NETO, R.R.O.; LOPES, P.F.; CASTRO, R.R.; PAULINO, E.J.; BINOTI, M.L.M.S.; COLODETTE, J.L. **Redes Neurais Artificiais para a estimação da densidade básica da madeira.** Sci. For., Piracicaba, v. 44, n. 109, p. 149-154, mar. 2016.

- MAGALHÃES, A.C.N. **Fotossíntese**. In. FERRI, M.G. Fisiologia vegetal. São Paulo: EDUSP, 350p. 1985.
- MAGALHÃES, M.R.; FREITAS, A.R.; RIBEIRO, A.; FELIX, L.B.; BRANDAO, A.S. **Neuro AgroClimate**. Programa de Computador. BR512016000503-3. INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depositante: Universidade Federal de Viçosa. 02 mai. 2016.
- MEHTÄTALO, L.; MALTAMO, M.; KANGAS, A. **The use of quantile trees in the prediction of the diameter distribution of a stand**. Silva Fennica, v.40, n.3, p.501-516, 2006.
- MONTAGU, K. D.; KEARNEY, D. E.; SMITH, R. G. B. **The biology and silviculture of pruning planted eucalypts for clear wood production: a review**. Forest Ecology and Management, v.179, n.1, p.1-13, 2003.
- RODRIGUES, H. J. B.; COSTA, R. F.; RIBEIRO, J. B. M.; SOUZA FILHO, J. D. C.; RUIVO, M. L. P.; SILVA JÚNIOR, J. A. **Variabilidade sazonal da condutância estomática em um ecossistema de manguezal amazônico e suas relações com variáveis meteorológicas**. Revista Brasileira de Meteorologia, v.26, n.2, 189 - 196, 2011.
- SANTANA, R. C.; BARROS, N. F.; LEITE, H. G.; COMERFORD, N. B.; NOVAIS, R. F. **Estimativa da biomassa em plantios de eucalipto no Brasil**. Revista Árvore, v.32, n.4, p.697-706, 2008.
- SILVA, I.N.; SPATTI, D.H.; FLAUZINO, R.A. **Redes neurais artificiais para engenharia e ciências aplicadas**. São Paulo: Artliber, 399p. 2010.
- SILVA, M.L.M.; BINOTI, D.H.B.; GLERIANI, J.M.; LEITE, H.G. **Ajuste do modelo de Schumacher e Hall e aplicação de redes neurais artificiais para estimar volume de árvores de eucalipto**. R. Árvore, Viçosa-MG, v.33, n.6, p.1133-1139, 2009.
- SILVA, W.C.M. **Modelagem dos balanços de radiação e de água e simulação do crescimento do eucalipto na Bacia do Rio Doce-MG**. Viçosa, MG: UFV. 122f. Tese (Doutorado em Meteorologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2007.
- SOUZA, M.J.H.; RIBEIRO, A.; LEITE, H.G.; LEITE, F.P.; MINUZZI, R.B. **Disponibilidade hídrica do solo e produtividade do eucalipto em três regiões da Bacia do Rio Doce**. Revista Árvore, v.30, p.399-410, 2006.
- STRECK, N.A. **Stomatal response to water vapor pressure deficit: an unsolved issue**. R. Bras. Agrobiologia, v. 9, n. 4, p. 317-322, 2003.
- SUDHEER, K. P.; GOSAIN, A. K.; RAMASASTRI, K. S. **Estimating actual evapotranspiration from limited climatic data using neural computing technique**. Journal of Irrigation and Drainage Engineering, v.129, n.3, p.214-218. 2003.
- XAVIER, A.C.; KINGB, A.W.; SCANLON, B.R. **Daily gridded meteorological variables in Brazil (1980–2013)**. International Journal of Climatology, 36: 2644–2659. DOI: 10.1002/joc. 2016.
- SALLES, T.T.; LEITE, H.G.; OLIVEIRA NETO, S.N.; SOARES, CARLOS P.B.; PAIVA, H.N.; SANTOS, F.L. **Modelo de Clutter na modelagem de crescimento e produção de eucalipto em sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.47, n.2, p.253-260, fev. 2012.

QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE FEIJÃO AMENDOIM, TRATADAS COM FERTILIZANTE ORGANOMINERAL E SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO

Thiago Figueiredo Paulucio

Universidade Federal do Espírito Santo -
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias /
Departamento de Agronomia
Alegre-ES

Paula Aparecida Muniz de Lima

Universidade Federal do Espírito Santo -
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias /
Departamento de Agronomia
Alegre-ES

Rodrigo Sobreira Alexandre

Universidade Federal do Espírito Santo -
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias/
Departamento de Ciências Florestais e da
Madeira
Jerônimo Monteiro-ES

José Carlos Lopes

Universidade Federal do Espírito Santo -
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias /
Departamento de Agronomia
Alegre-ES

RESUMO: Objetivou-se com o presente trabalho estudar a qualidade fisiológica de sementes de feijão amendoim tratadas com fertilizante organomineral e submetidas ao estresse salino. O experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes, do Departamento de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do

Espírito Santo (CCAUE-UFES), Alegre - ES. As sementes de feijão amendoim foram tratadas com fertilizante organomineral nas doses de (0; 15; 30; 40 e 60 g kg⁻¹ sementes), durante uma hora e em seguida mantidas sobre papel tipo germitest à sombra durante 24 horas. Posteriormente, foram analisados: germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz, massa fresca e massa seca de plântulas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes e os tratamentos consistiram de cinco doses do fertilizante organomineral: 0; 15; 30; 40 e 60 g kg⁻¹ sementes, e posteriormente submetidas ao estresse salino com KCl -0,9 MPa e água (controle). O tratamento das sementes de feijão amendoim com fertilizante organomineral não interfere na germinação, mas favorece o crescimento das plântulas após a protrusão da raiz primária. Sementes tratadas com fertilizante e submetidas ao estresse salino apresentam maior comprimento de raiz.

PALAVRAS-CHAVE: Germinação, vigor, *Phaseolus vulgaris* L.

ABSTRACT: The objective of this study was to study the physiological quality of peanut bean seeds treated with organomineral fertilizer and submitted to saline stress. The experiment was conducted at the Seed Analysis Laboratory,

Department of Agronomy, Center for Agricultural Sciences and Engineering, Federal University of Espírito Santo (CCAUE-UFES), Alegre - ES. As bean seeds were treated with organic fertilizer at the doses of (0; 15; 30; 40 and 60 g kg⁻¹ seeds) in one hour and then kept on shady germitest paper for 24 hours. Subsequently, foramina germination, germination speed index, shoot length, root length, fresh mass and seedling dry mass. The experimental design was completely randomized with four replications of 25 seeds and the treatments consisted of five doses of organomineral fertilizer: 0; 15; 30; 40 and 60 g kg⁻¹ and those submitted to salt stress with KCl -0.9 MPa and water (control). The treatment of bean seeds with organomineral fertilizer does not interfere with germination, but favors seedling growth after primary root protrusion. Seeds treated with fertilizer and subjected to saline stress have a longer root length.

KEYWORDS: Germination, vigor, *Phaseolus vulgaris* L.

1 | INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), oriundo da família das leguminosas, é um alimento que apresenta grande fonte de proteínas, ferro e carboidratos para mais de 500 milhões de pessoas na América Latina e África (FAO, 2014), e para a população brasileira, é um dos principais alimentos, constituindo-se em um alimento básico de vários povos, principal fonte de proteína vegetal, com teor oscilando até 33% com valor energético de 341 cal 100 g⁻¹ (POMPEU, 1987).

De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento, a produção nacional total de feijão, englobando as três safras, foi de 3,17 milhões de toneladas, para a safra 2018/2019. A produção estimada de feijão, na safra de verão de 2019, deverá ser 10,8% menor que a obtida nesta mesma época em 2018. Devido ao ciclo mais curto do feijoeiro, as estiagens e veranicos costumam afetar drasticamente a produção dessa leguminosa (CONAB, 2019).

No entanto, 60 a 80% do feijão produzido é do tipo carioca, embora também sejam plantados feijão preto, rajado, jalo, vermelho, bolinha e caupi ou feijão-de-corda, sugerindo a necessidade de contínuos investimentos nas pesquisas de novas variedades mais resistentes as pragas, a tropicalização (adaptação) de variedades de interesse dos países importadores e também a estabilidade dos preços finais para o consumidor no mercado interno, cujo consumo per capita é de 16 a 17 kg (BRASIL, 2018).

A produtividade do feijão é considerada baixa, 0,86 ton ha⁻¹ para uma área cultivada de 36,4 ha (FAO, 2019) e o fornecimento adequado de nutrientes pode contribuir no aumento de produtividade e melhorar a qualidade fisiológica das sementes produzidas (TEIXEIRA, 2005). É uma planta considerada exigente em fertilidade e qualidade do solo, por apresentar ciclo curto e sistema radicular superficial e pouco desenvolvido, necessitando que os nutrientes estejam prontamente disponíveis para as plantas, de acordo com a demanda durante o ciclo (OLIVEIRA et

al., 2018), cuja disponibilidade irá influenciar na formação do embrião e cotilédones afetando a qualidade fisiológica da semente (TEIXEIRA et al., 2005; DEUNER et al., 2015). Principalmente pela essencialidade à formação e ao desenvolvimento de novos órgãos de reservas que irão influenciar o estabelecimento da cultura, o desenvolvimento da planta, a uniformidade da lavoura e a sua produtividade (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

O feijão amendoim é amplamente cultivado com diferentes níveis tecnológicos em diversas regiões do país. No entanto, a implantação adequada da cultura depende da correta utilização de diversas práticas culturais, destacando-se o tratamento das sementes, associado à aplicação de micronutrientes, que pode auxiliar no estabelecimento e desenvolvimento adequado da cultura. Os micronutrientes, assim como as enzimas, o DNA e as vitaminas exercem efeitos importantes morfofisiologicamente, mesmo em baixas concentrações e há sempre o surgimento de novos produtos para a incorporação de aditivos às sementes, como hormônios, micronutrientes, aminoácidos e vitaminas. No entanto, seu real efeito sobre a qualidade fisiológica das sementes e na produtividade das culturas é pouco conhecido (CASTRO; VIEIRA, 2001).

Os bioestimulantes são complexos que promovem o equilíbrio hormonal das plantas, favorecendo a expressão do seu potencial genético, estimulando o desenvolvimento do sistema radicular (ONO, 1999). Esses produtos agem na degradação de substâncias de reserva das sementes, na diferenciação, divisão e alongamento celulares (CASTRO; VIEIRA, 2001).

Os bioestimulantes à base de micronutrientes exercem influências na qualidade fisiológica das sementes, que necessitam de maiores investigações. No caso da cultura do feijoeiro, que constantemente vem sendo estudada com a utilização de métodos que aumentem a produtividade, como a utilização de micronutrientes e na tentativa de inovações do sistema produtivo, mas que devem sempre estar atentos para os reais ganhos com a incorporação desses produtos às sementes, que são o principal insumo da agricultura moderna, pois são responsáveis por todo o potencial genético e produtivo que garantem o sucesso do empreendimento agrícola (JACOB NETO et al., 1988; FERREIRA, 2007).

Micronutrientes aplicados às sementes como forma técnica de enriquecimento são translocados para a planta, tornando-se uma importante fonte de reserva nutritiva para a planta, como no caso da aplicação de zinco e cobre, por participar na prevenção do aparecimento de sintomas iniciais de deficiência e como fungicida, além do zinco participar de mais de 80 proteínas, como ativador enzimático da anidrase carbônica, dismutase de superóxido, desidrogenase de álcool e síntese do ácido indol acético (AIA) e o cobre de várias enzimas (EPSTEIN; BLOOM, 2005; MALAVOLTA, 2006; OHSE et al., 2012; TAYZ et al., 2017). Entretanto, a fertilização de feijoeiro do cultivar Pérola com fontes de sulfato e cloreto de zinco não exerceu efeito no aumento de produtividade (TEIXEIRA et al., 2008), resposta similar àquela

obtida em sementes de soja enriquecidas com molibdênio (POSSENTI; VILLELA, 2010) e discordante dos resultados obtidos com a aplicação de zinco via solo na nutrição e produção de feijão comum e mamona, que determinou aumento no rendimento de grãos (CARDOSO et al., 2013).

Dentre os diversos fatores que influenciam a obtenção de sementes de alta qualidade, destaca-se a realização de adubação mineral adequada (DELOUCHE, 1981; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). No entanto, trabalhos que objetivam relacionar adubação e nutrição das plantas com a qualidade fisiológica das sementes são em número reduzido e os resultados nem sempre são concordantes (CARVALHO et al., 2001).

Há fatores ambientais, denominados estresses ou distúrbios ambientais, que limitam a produtividade agrícola (ASHRAF; HARRIS, 2004). A salinidade é um dos mais importantes fatores de estresse abiótico, afetando diversos aspectos da fisiologia e bioquímica das plantas, reduzindo significativamente seus rendimentos. Altas concentrações exógenas de sal afetam a germinação das sementes, causando déficit hídrico e desequilíbrio iônico nas células, resultando em toxicidade e estresse osmótico (KHAN; PANDA, 2008).

Condições de elevada salinidade podem ser causadas por diversos fatores, como práticas inadequadas de irrigação, inundação do solo pela água do mar em regiões costeiras, como também depósito de altas concentrações de cloreto de sódio (NaCl) em regiões com recente história geológica marinha (TESTER; DAVENPORT, 2003; MUNNS et al., 2012).

Objetiva-se com este trabalho estudar a qualidade fisiológica de sementes de feijão amendoim tratadas com fertilizante organomineral e submetidas ao estresse salino.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAEE-UFES), Alegre - ES. Foram utilizadas sementes de feijão amendoim, oriundas da Fazenda Ponte da Braúna, localizada no distrito de Rive, em Alegre - Espírito Santo, coordenadas geográficas 20° 45' S e 41° 29' W, com altitude de 138 m, cujo clima é tropical, com verões quentes e úmidos (INCAPER, 2017).

As sementes de feijão amendoim foram tratadas com fertilizante organomineral nas doses de (0; 15; 30; 40 e 60 g kg⁻¹ sementes), durante uma hora e em seguida mantidas sobre papel tipo germitest à sombra durante 24 horas. Posteriormente foram estudados:

Germinação - Foi conduzida com quatro repetições de 25 sementes, as sementes foram semeadas em rolos de papel tipo germitest umedecido com água destilada na

proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco e cloreto de potássio (KCl -0,9 MPa) e mantidos em câmara de germinação tipo BOD, regulada à temperatura alternada de 25 °C. As análises foram feitas durante nove dias, computando-se a porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009), e os resultados expressos em porcentagem de germinação.

Índice de velocidade de germinação - Foi determinado concomitante com o teste de germinação, e determinado pela fórmula: $ivg = (g1/n1) + (g2/n2) + (g3/n3) + \dots + (gn/nn)$, em que: $g1, g2, g3, \dots, gn$ = número de plântulas computadas na primeira, segunda, terceira e e-nésima contagem; $n, n2, n3, \dots, nn$ = número de dias após a primeira, segunda, terceira e e-nésima contagem (maguire, 1962).

Comprimento da parte aérea e raiz - Foi determinado após nove dias da sementeira, com o auxílio de uma régua milimetrada, mediante a medição do comprimento entre o colo e o ápice da última folha de cada plântula da amostra e o resultado expresso em $cm\ planta^{-1}$.

Massas fresca e seca das plântulas - Foram determinadas no final do teste de germinação, em dez plântulas por repetição, selecionadas aleatoriamente. As plântulas foram pesadas em balança analítica (0,0001 g) para a determinação da massa fresca. Já para a obtenção da massa seca, as plântulas foram acondicionadas em sacos de papel tipo kraft e mantidas em estufa a 70 ± 3 °C, por 72 horas (BRASIL, 2009).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco doses do fertilizante mineral (0; 15; 30; 40 e 60 $g\ kg^{-1}$ sementes), submetidas ao estresse salino com KCl -0,9 MPa e água (controle), conduzido com quatro repetições de 25 sementes. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software R (R Core Team, 2018). As médias foram comparadas pelo teste F em nível de 5% de probabilidade e realizou-se o teste de Tukey. Os dados quantitativos foram submetidos à análise de regressão.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de variância realizada (Tabela 1), constatou-se que houve significância para o teste F, em nível de 5% de probabilidade para a germinação, e quando as sementes foram submetidas a água e tratadas com a maior dose (60 $g\ kg^{-1}$ sementes) apresentaram as menores porcentagens de germinação. Para as sementes submetidas ao estresse salino, não foi observada diferença significativa entre as doses do fertilizante organomineral.

Para os dados referentes ao crescimento de raiz, sementes não submetidas ao estresse salino apresentaram maior média de comprimento de raiz, quando não tratadas com fertilizante. Segundo Castro (2009), doses excessivas de fertilizantes são prejudiciais para o desenvolvimento de sementes em determinadas fases. No entanto, sementes submetidas ao estresse salino apresentaram maiores médias de

comprimento de raiz, quando tratadas com maiores doses de fertilizante.

A adubação exerce forte influência na qualidade fisiológica das sementes, e, normalmente as plantas vigorosas produzem sementes com maior vigor (PEREIRA et al., 2015). Além da adubação, o conhecimento do processo germinativo é vital para a obtenção de alta produtividade de uma determinada cultura. No entanto, a fase de crescimento inicial da planta é a mais suscetível à influência de fatores ambientais externos, como umidade, oxigênio, luz e temperatura, que quando em condições desfavoráveis à espécie, podem impossibilitar o seu desenvolvimento ou até mesmo causar a morte da planta (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Segundo Fantinatti et al. (2001), a uniformização do tamanho das sementes é essencial para a emergência de um estande de plantas homogêneo, devido a semelhança de vigor e substâncias de reservas presentes nas sementes. Neste caso o tratamento de sementes poderá surtir efeito satisfatório, uma vez que a planta submetida a esses estresses, não desempenharia suas funções vitais.

Analisando as médias de massa fresca e seca, é possível observar que as sementes submetidas ao estresse salino apresentaram menor massa fresca, comparando com o tratamento convencional. Entretanto, analisando as médias de massa seca, observa-se que as médias foram similares, sugerindo que as sementes submetidas ao estresse salino tiveram interferência na absorção de água.

Fert.	Agente osmótico	G (%)	IVG	CPA (cm)	CR (cm)	MF (g)	MS (g)
0	H ₂ O	90 a	7,54 a	7,8 bc	11,8 ab	40,89 ab	5,73 a
15		93 a	7,63 a	9,4 ab	12,8 a	46,81 a	6,18 a
30		89 a	7,13 a	10,5 a	11,3 ab	41,15 ab	5,82 a
45		82 ab	6,41 ab	6,3 cd	9,7 bc	34,25 b	5,21 a
60		66 b	5,18 b	5,0 d	8,0 c	31,18 b	5,05 a
0	KCl	84 a	6,75 a	2,3 a	3,7 b	17,93 ab	5,95 ab
15		89 a	6,02 a	2,9 a	3,6 b	24,81 a	6,41 a
30		74 a	6,54 a	2,8 a	4,6 ab	13 b	3,23 c
45		75 a	5,67 a	2,5 a	5,1 ab	9,98 bc	2,44 c
60		72 a	5,34 a	2,7 a	5,5 a	7 c	4,13 bc

Tabela 1. Germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plântulas oriundas de sementes de feijão-amendoim tratadas com fertilizante (Fert.) nas doses de: 0; 15; 30; 40 e 60 g kg⁻¹ sementes e submetidas a água (controle) e KCl -0,9 MPa.

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

As maiores médias de porcentagem de germinação (Figura 1) foram observadas nas doses de 0 (Testemunha) e 15 g kg⁻¹ semente, para as sementes tratadas com água e mantidas sob estresse salino 90 e 92% e 85 e 88%, respectivamente. No entanto, com o aumento das doses, as médias da germinação diminuiram, atingindo

68% nas doses de 60 g kg⁻¹ para as sementes tratadas com água, e 72% nas submetidas ao estresse salino.

Analisando o índice de velocidade de germinação (IVG) (Tabela 1), observa-se que houve um comportamento semelhante àquele observado na porcentagem de germinação. Segundo Santos et al., (2010), sementes que receberam doses adequadas de fertilizantes poderão ser beneficiadas em outras funções, pois é elemento constituinte de cloroplastos, compostos nitrogenados, ácidos nucleicos e vitaminas. Além de estar presente em diversos processos fisiológicos, como a diferenciação celular, crescimento longitudinal da planta, respiração e fotossíntese (TAIZ et al., 2017).

A germinação e o vigor caracterizam a qualidade fisiológica da sementes e a melhoria da qualidade fisiológica geralmente pode ser explicada pela influência da ação dos nutrientes inseridos pela adubação foliar nas plantas de feijoeiro, por meio de uma possível melhoria da capacidade fotossintética; enraizamento e maturação dos frutos, como os principais fatores para a produção de sementes mais vigorosas.

O teste de germinação, normalmente é realizado sob condições artificiais em laboratório, sob condições ambientais ótimas para o crescimento e desenvolvimento de plântulas (BRASIL, 2009). Entretanto, essas condições não são costumeiramente encontradas em campo, podendo haver baixa disponibilidade hídrica, solos pobres em nutrientes, entre outros fatores. Sendo assim, somente o teste de germinação não apresenta dados sobre o vigor das sementes (BEWLEY; BLACK, 1994).

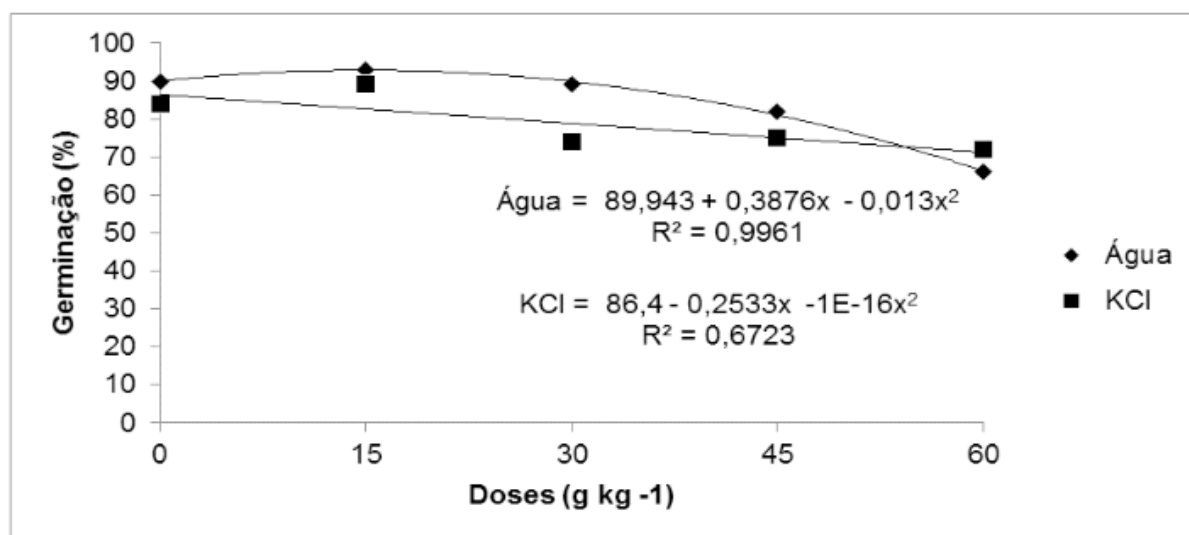


Figura 1. Germinação de sementes de feijão-amendoim tratadas com fertilizante nas doses de: 0; 15; 30; 40 e 60 g kg⁻¹ sementes e submetidas à água (controle) e KCl -0,9 MPa.

Houve maior média de índice de velocidade de germinação (Figura 2), nos tratamentos com 0 e 15 g kg⁻¹ sementes. As médias de IVG para as concentrações de 30; 45 e 60 g kg⁻¹ foram semelhantes. No entanto, à medida que se aumentou a dose do fertilizante houve redução no IVG, culminando com menor média na

concentração de 60 g kg⁻¹ de sementes.

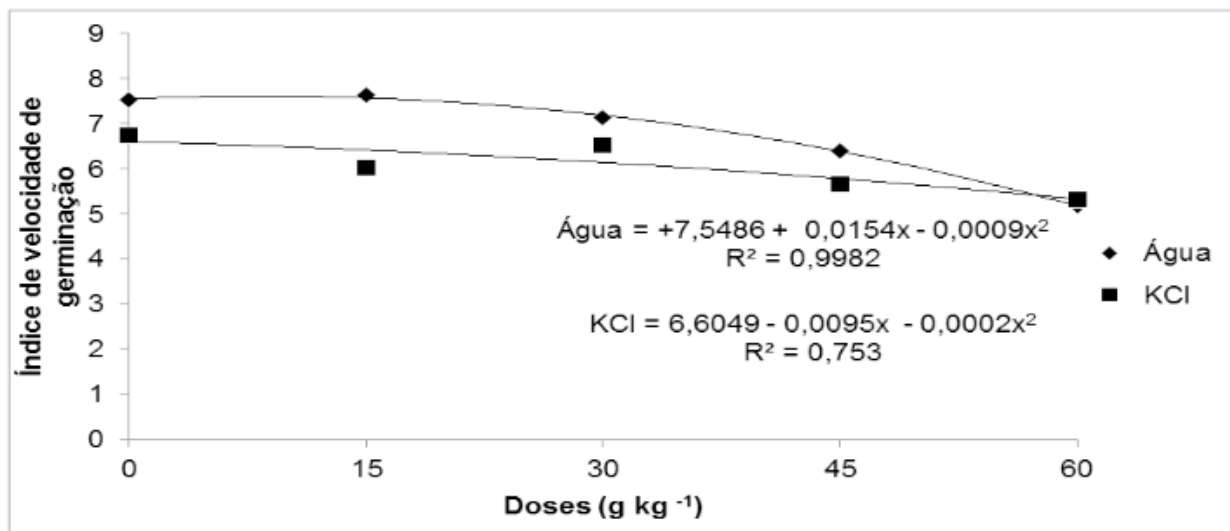


Figura 2. Índice de velocidade de germinação de sementes de feijão-amendoim tratadas com fertilizante nas doses de: 0; 15; 30; 40 e 60 g kg⁻¹ sementes e submetidas à água (controle) e KCl -0,9 MPa.

Considerando o comprimento de parte aérea (Figura 3), observa-se que as maiores médias ocorreram nas plântulas oriundas de sementes tratadas com fertilizante nas doses de 15 e 30 g kg⁻¹ de sementes, quando tratadas com água, cujo comprimento foi de 9 e 10 cm, respectivamente. À medida que as doses foram aumentadas houve diminuição no crescimento da parte aérea, atingindo 5 cm na dose de 60 g kg⁻¹ sementes. No entanto, nas sementes tratadas com solução salina verificou-se que foi mantido um padrão de crescimento em todos os tratamentos.

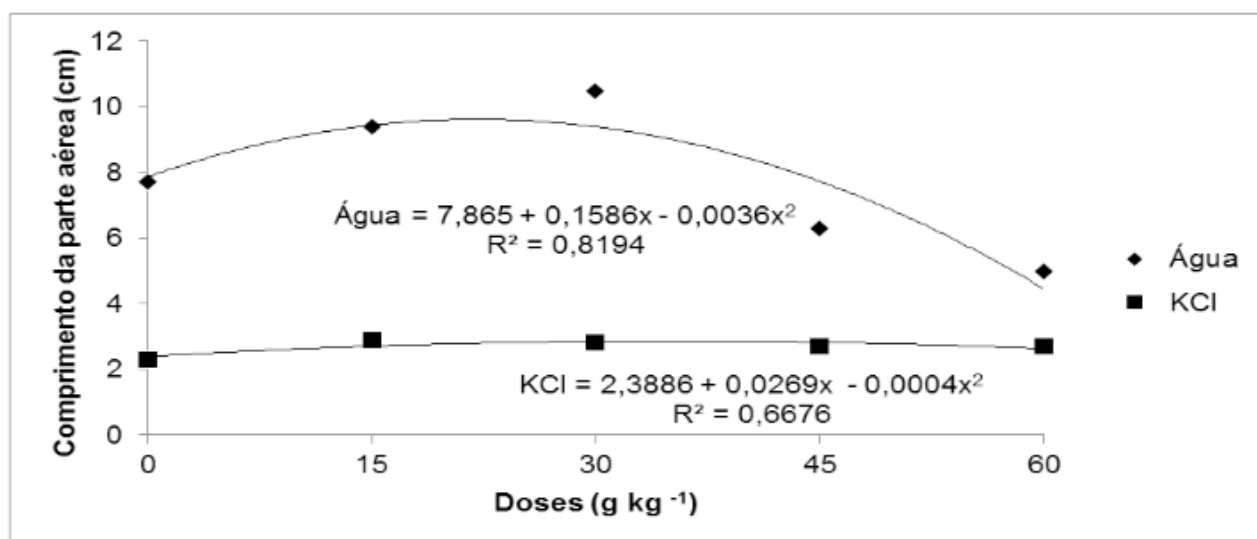


Figura 3. Comprimento da parte aérea de plântulas oriundas de sementes de feijão-amendoim tratadas com fertilizante nas doses de: 0; 15; 30; 40 e 60 g kg⁻¹ sementes e submetidas à água (controle) e KCl -0,9 MPa.

Considerando que o vigor é a capacidade das sementes atingirem uma

emergência uniforme e rápida sob condições de campo (AOSA, 2009), torna-se importante fazer testes de vigor para avaliação do comportamento de lotes de sementes, o que contribuirá com informações importantes sobre a heterogeneidade apresentada em campo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

As maiores médias de comprimento de raiz de plântulas (Figura 4) foram obtidas naquelas oriundas de sementes tratadas com fertilizante nas doses de 0 e 15 g kg⁻¹ sementes, quando submetidas à água. Com o aumento da dose de fertilizante o crescimento de raiz diminuiu, atingindo o valor de 8 cm no tratamento com 60 g kg⁻¹ de sementes. Para os tratamentos das sementes com estresse salino houve um comportamento inverso. À medida que aumentou a dose de fertilizante houve aumento no crescimento de raiz das plântulas, corroborando com os resultados obtidos por Silva Júnior et al. (2015), que concluíram que a adequação da adubação em sementes de melancia determina um aumento no crescimento inicial de plantas.

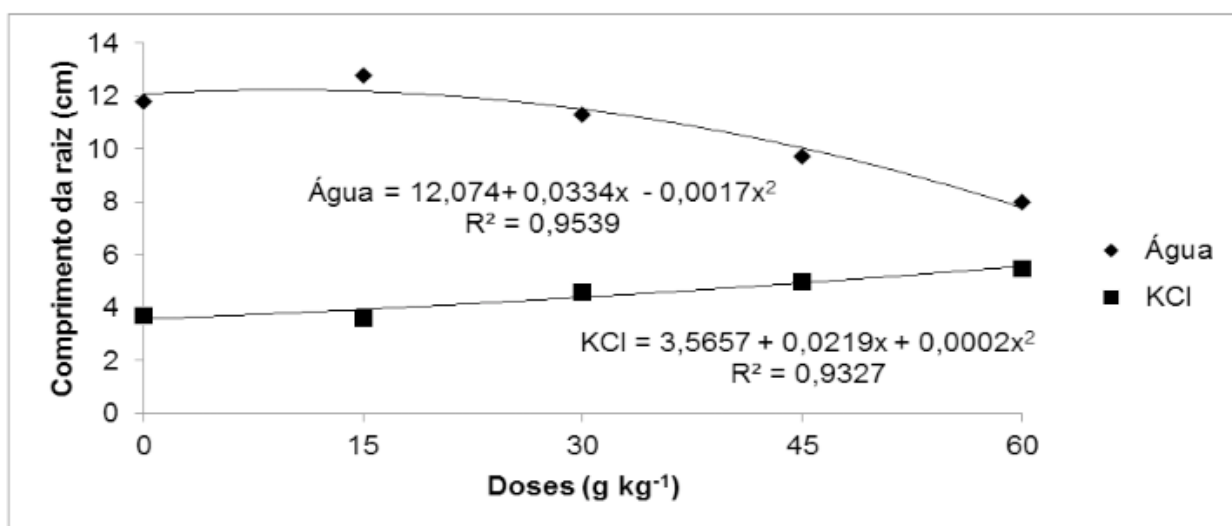


Figura 4. Comprimento de raiz de plântulas oriundas de sementes de feijão-amendoim tratadas com fertilizante nas doses de: 0; 15; 30; 40 e 60 g kg⁻¹ sementes e submetidas à água (controle) e KCl -0,9 MPa.

Na análise de massa fresca (Figura 5), observou-se que à medida que as doses foram aumentando, a massa fresca foi diminuindo, apresentando sua menor média no tratamento com maior dosagem, independente da condição de tratamento com água ou estresse salino.

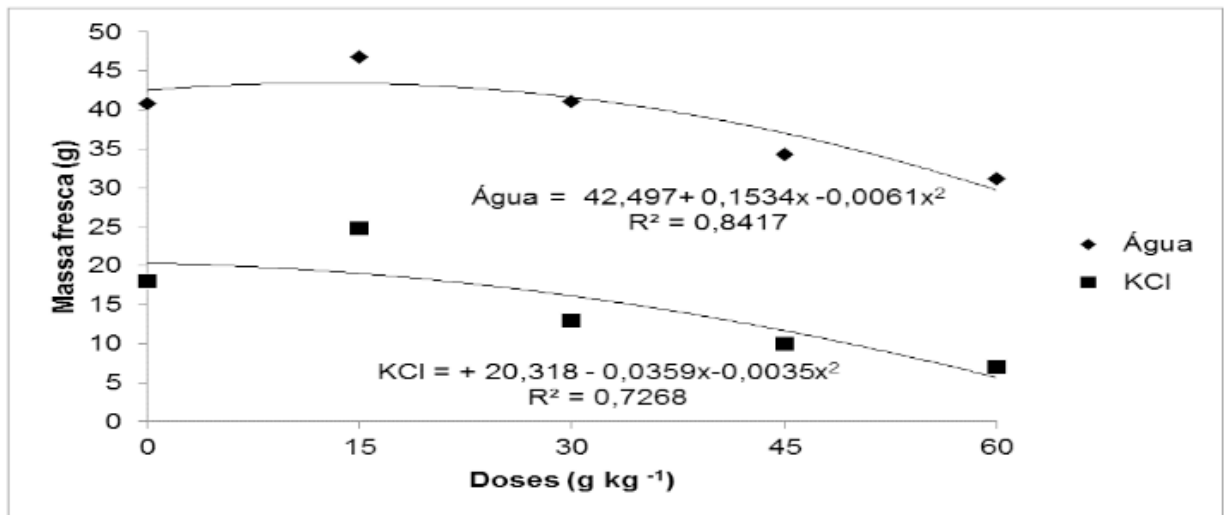


Figura 5. Massa fresca de plântulas oriundas de sementes de feijão-amendoim tratadas com fertilizante nas doses de: 0; 15; 30; 40 e 60 g kg⁻¹ sementes e submetidas à água (controle) e KCl -0,9 MPa.

Os maiores valores de massa seca de plântulas (Figura 6) foram obtidas nas plântulas oriundas de sementes tratadas com a dose de 15 g kg⁻¹ semente, em ambos os tratamentos: água e KCl. No entanto, à medida que as doses foram aumentando, as médias de massa seca foram diminuindo, apresentando menor média no tratamento de 60 g kg⁻¹ de semente.

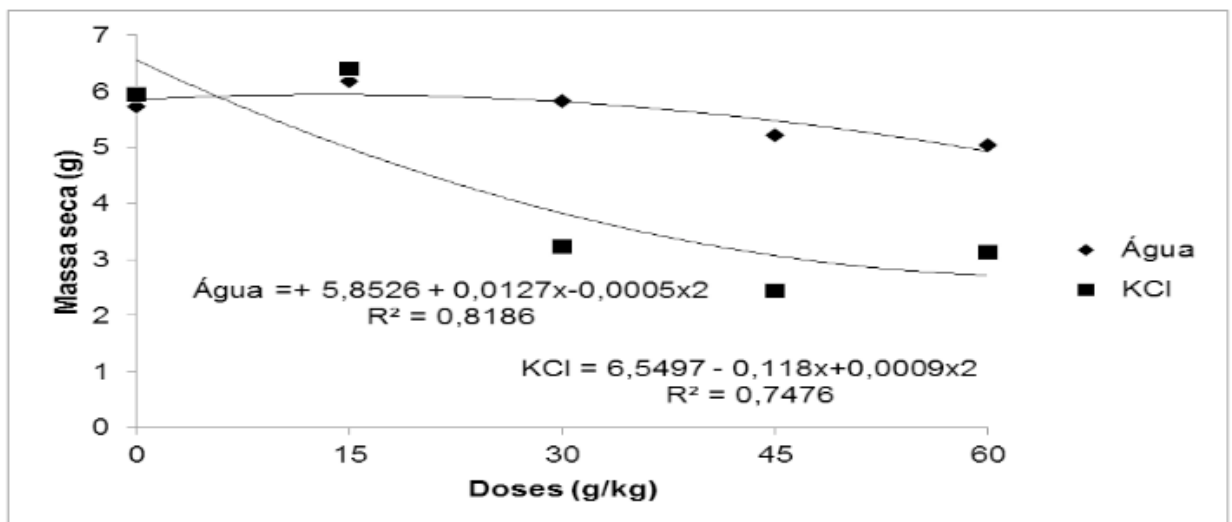


Figura 6. Massa seca de plântulas oriundas de sementes de feijão-amendoim tratadas com fertilizante nas doses de: 0; 15; 30; 40 e 60 g kg⁻¹ sementes e submetidas à água (controle) e KCl -0,9 MPa.

4 | CONCLUSÕES

O tratamento de sementes de feijão amendoim com fertilizante organomineral favorece o desenvolvimento das sementes.

Sementes de feijão amendoim tratadas com fertilizante organomineral apresentaram maiores médias de comprimento de parte aérea.

O tratamento de sementes de feijão amendoim com fertilizante organomineral favorece o crescimento de raiz, quando submetidas ao estresse salino.

AGRADECIMENTOS

À equipe do Laboratório de Análise de Sementes do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo pelo incentivo e apoio no presente trabalho; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de doutorado ao segundo autor, e de produtividade em pesquisa ao terceiro e quarto autor, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, n. 1, p.3-16, 2004.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2 ed., New York, Plenum Press, 1994. 445 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano nacional para o desenvolvimento da cadeia produtiva do feijão e pulses**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/feijao/2018/4a-re/minuta-pndcpfp-indicacao-contribuicoes-versao-02-02-2018.pdf>. Acesso em 10 de julho de 2019.
- CARDOSO, F. R.; GALANTE, A. H. A.; TEIXEIRA, I. R.; SILVA, A. G.; REIS, E. F. Fontes e doses de zinco na nutrição e produção de feijão-comum e mamona em consórcio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. Recife, v. 8, n. 4, p. 602-609, 2013.
- CARVALHO, M. A. C.; ARF, O.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S.; SANTOS, N. C. B.; BASSAN, D. A. Z. Produtividade e qualidade de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob influência de parcelamento e fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 617-624, 2001.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.
- CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 132 p.
- CASTRO, P. R. C. **Princípios da adubação foliar**. Jaboticabal: FUNEP, 2009. 42 p.
- CONAB – **Campanha nacional do Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 08 julho 2019.
- DEUNER, C.; MENEGHELLO, G. E.; BORGES, C. T.; GRIEP, L.; ALMEIDA, A. S.; DEUNER, S. Rendimento e qualidade de sementes de soja produzidas sob diferentes manejos nutricionais.

Revista de Ciências Agrárias, v. 38, n. 3, p. 357-365, 2015.

EPSTEIN, E.; BLOOM A.J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. 400 p.

FAO. **Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura**. Roma: FAO. 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em 10 de julho de 2019.

FAO. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>. Acesso em 03 setembro de 2019.

FERREIRA, L. A.; OLIVEIRA, J. A.; PINHO, E. V. R. V.; QUEIROZ, D. L. Bioestimulante e fertilizante associados ao tratamento de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 80-89, 2007.

JACOB-NETO, J. **Variação estacional, concentração nas sementes e níveis críticos de molibdênio nos nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Itaguaí: UFRRJ, 141p. 1988 (Tese de Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1988.

KHAN, M. H.; PANDA, S. K. Alterations in root lipid peroxidation and ntioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 1, p. 81-89, 2008.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MUNNS R, JAMES RA, XU B, ATHMAN A, CONN SJ, JORDANS C, BYRT CS, HARE RA, TYERMAN SD, TESTER M, PLETT D, GILLIHAM M. Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 360–364. 2012.

OHSE, S.; REZENDE, B. L. A.; LISIK, D.; OTTO, R. F. Germinação e vigor de sementes de melancia tratadas com zinco. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2, p. 288-292, 2012.

OLIVEIRA, M. G. S.; OLIVEIRA, L. F. C.; WENDLAND, A.; GUIMARÃES, C. M.; QUINTELA, E. D.; BARBOSA, F. R.; CARVALHO, M. C. S.; LOBO JUNIOR, M.; SILVEIRA, P. M. **Conhecendo a fenologia do feijoeiro e seus aspectos fitotécnicos**. Embrapa Arroz e Feijão, Brasília, DF, 2018. 62 P.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; SANTOS, S. O. Efeito de fitorreguladores sobre o desenvolvimento de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Carioca. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 5, n. 1, p. 7-13, 1999.

PEREIRA, L. B.; ARF, O.; SANTOS, N. C. B; OLIVEIRA, A. E. Z.; KOMURO, L. K. Manejo da adubação na cultura do feijão em sistema de produção orgânico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 1, p. 29-38, 2015.

POMPEU, A. S. Melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: BULISANI, E. A. (Coord.). **Feijão: fatores de produção e qualidade**. Campinas: Fundação Cargil, 1987. p. 1-28.

POSSENTI, J. C.; VILLELA, F. A. Efeito do molibdênio aplicado via foliar e via sementes sobre o potencial fisiológico e produtividade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 143-150, 2010.

R CORE TEAM R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Url: <http://www.Rproject.org/>, 2018.

SILVA JÚNIOR, E. G.; MAIA, J. M.; SILVA, A. F.; SANTOS, E. E. S.; RECH, E. G.; ALMEIDA, R. A. Influência de composto orgânico na germinação e desenvolvimento inicial de melancia. **Revista de**

Biologia & Farmácia e Manejo Agrícola, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Plant Physiology and Development**, 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TEIXEIRA, I. R.; BORÉM, A.; ARAÚJO, G. A.A.; ANDRADE, M. J. B. Teores de nutrientes e qualidade fisiológica de sementes de feijão em resposta à adubação foliar com manganês e zinco. **Bragantia**, v. 64, p. 83-88, 2005.

TEIXEIRA, I. R.; BORÉM, A.; SILVA, A. G.; KIKUTI, H. Fontes e doses de zinco no feijoeiro cultivado em diferentes épocas de semeadura. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 255-259, 2008.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Annals of Botany**, v. 91, n. 5, p.503-527, 2003.

QUALIDADE MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE FEIJÃO

Manoel Victor Borges Pedrosa

Universidade Federal do Espírito Santo -
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias /
Departamento de Agronomia
Alegre-ES

Arêssa de Oliveira Correia

Universidade Federal do Espírito Santo -
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias /
Departamento de Agronomia
Alegre-ES

Patrícia Alvarez Cabanez

Universidade Federal do Espírito Santo -
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias /
Departamento de Agronomia
Alegre-ES

Allan de Rocha Freitas

Faculdade do Futuro (FAF), Departamento de
Agronomia Manhuaçu, MG.

Rodrigo Sobreira Alexandre

Universidade Federal do Espírito Santo -
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias/
Departamento de Ciências Florestais e da
Madeira
Jerônimo Monteiro-ES

José Carlos Lopes

Universidade Federal do Espírito Santo -
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias /
Departamento de Agronomia
Alegre-ES

vulgaris L.) apresenta grande importância nutricional, possuindo alto teor de lisina, que atua na complementação às proteínas dos cereais, fibra alimentar, vitaminas do complexo B e carboidratos complexos. Diversos estudos são realizados para que se tenha uma alta produtividade da cultura e a produção de sementes de alta qualidade fisiológica. Os principais testes realizados em frutos e sementes de feijão são a biometria de sementes e frutos, visando indicar melhores tratamentos culturais, época de colheita e material genético a ser utilizado; a maturação fisiológica de sementes, que determina o ponto de máxima qualidade da semente, sendo que, neste ponto, diversas modificações fisiológicas e morfológicas são visualizadas nas sementes, como o tamanho, o teor de água, a massa seca, além de melhorias graduais na germinação e no vigor; e testes de germinação e vigor, para determinar a qualidade fisiológica das sementes. Cabe salientar, que os testes de vigor são classificados em testes diretos e indiretos, sendo os testes diretos: massa fresca, massa seca, índice de velocidade de emergência em campo, teste de frio, crescimento de plântulas e população inicial; e os testes indiretos: teste de tetrazólio, teste de respiração, teste de condutividade elétrica, teor de ácidos graxos, teste GADA (descarboxilase do ácido glutâmico) e teste de aldeídos voláteis. A partir de todas essas

RESUMO: A cultura do feijoeiro (*Phaseolus*

informações, o produtor está munido de informações para selecionar a semente para desenvolver sua produção, de modo que, esses testes possibilitam a mensuração do comportamento da semente em condições ideais e adversas, bem como a qualidade do material genético.

PALAVRA-CHAVE: maturidade fisiológica, germinação, vigor.

ABSTRACT: The bean crop (*Phaseolus vulgaris* L.) is of great nutritional importance, having a high lysine content, which acts to complement the proteins of cereals, dietary fiber, B vitamins and complex carbohydrates. Several studies are performed in order to have a high crop yield and the production of seeds of high physiological quality. The main tests performed on fruits and seeds of beans are the biometry of seeds and fruits, aiming to indicate better cultural treatments, harvest time and genetic material to be used; physiological seed maturity, which determines the point of maximum seed quality, and at this point, various physiological and morphological changes are seen in the seeds, such as size, water content, dry mass, and gradual improvements in seed quality. germination and vigor; and germination and vigor tests to determine the physiological quality of seeds. It is noteworthy that vigor tests are classified into direct and indirect tests, being the direct tests: fresh mass, dry mass, field emergency speed index, cold test, seedling growth and initial population; and the indirect tests: tetrazolium test, breath test, electrical conductivity test, fatty acid content, GADA test (glutamic acid decarboxylase) and volatile aldehydes test. From all this information, the producer is provided with information to select the seed to develop its production, so that these tests allow the measurement of seed behavior under ideal and adverse conditions, as well as the quality of genetic material.

KEYWORDS: physiological maturity, germination, vigor.

1 | INTRODUÇÃO

O feijão é uma leguminosa considerada como um alimento base e tradicional em todos os estados brasileiros, principalmente por ser uma das fontes de proteínas mais utilizadas pela população de baixa renda no Brasil (TOLEDO et al., 2009). Rios et al. (2003) acrescentam que o feijão apresenta diversas qualidades nutricionais como alto teor de lisina, que atua na complementação às proteínas dos cereais; fibra alimentar; vitaminas do complexo B, além de carboidratos complexos.

As sementes, como atributo essencial para suas respectivas culturas, devem apresentar alta qualidade fisiológica para assegurar alta germinação ou emergência de plântulas, bem como a população inicial no campo (LOPES; ALEXANDRE, 2010). Para colheita de sementes de alta qualidade é necessário conhecer o estágio de maturação das sementes. Para isso, deve-se proceder a etiquetagem das flores na antese, a colheita periódica das vagens, frutos e sementes para determinações do teor de água, tamanho, forma, cor, conteúdo de massas fresca e seca, capacidade germinativa e vigor (DELOUCHE, 1981; POPINIGIS, 1985; MAYER; POLJAKOFF-

MAYBER, 1989; LOPES; ALEXANDRE, 2010; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012; MARCOS FILHO, 2015a). O ponto de maturação fisiológica é caracterizado pela redução e inibição do transporte de nutrientes da planta-mãe para a semente (DELOUCHE, 1981; LOPES et al., 2005; LOPES et al., 2008).

A colheita precoce das sementes pode resultar na obtenção de uma semente de menor qualidade fisiológica, em função da formação incompleta de suas estruturas físicas e bioquímicas, resultando em um material de baixa qualidade, principalmente relacionado com o processo de deterioração e redução do vigor, resultando em sementes que apresentarão menor estande no campo, culminando com baixa produção da cultura (LOPES et al., 2007; LOPES, ALEXANDRE, 2010; ALKIMIM et al., 2016; GHASSEMI-GOLEZANI et al., 2016; SANTOS et al., 2016).

Além da semente de alta qualidade fisiológica, há outros fatores que influenciam na produção de uma cultura como a adubação das plantas, que é considerada uma prática essencial para o seu crescimento e sendo realizada adequadamente possibilita a nutrição e o seu desenvolvimento (MARSCHNER, 2012). Nos estudos desenvolvidos para a determinação de uma nutrição adequada, surge a possibilidade do uso da adubação foliar, que explora a capacidade das folhas em absorver nutrientes (BORKERT et al., 2003). É necessário, contudo, atentar para as limitações desta prática, não fazendo a substituição da adubação feita por incorporação do adubo no solo, mas, apenas uma complementação nutricional (CAMARGO et al., 2008).

2 | CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO FEIJOEIRO

2.1 Biometria de frutos e sementes

A biometria, segundo Ferreira (2010), é a ciência responsável pelo estudo da medição dos seres vivos. Por meio de cálculos estatísticos, esta ciência analisa características biológicas quantitativas em uma determinada população. A biometria é empregada com bastante frequência na agricultura, como, por exemplo, no estudo do tamanho de frutos e sementes, visando indicar melhores tratamentos culturais, época de colheita e material genético a ser utilizado.

Os dados biométricos de uma espécie contribuem para a realização de um bom planejamento de um processo de restauração florestal de uma área degradada, bem como para a prática agrícola, principalmente por se encontrarem relacionados aos processos de dispersão da espécie, período em que se encontram na sucessão ecológica, agentes dispersores envolvidos, viabilidade, condições de armazenamento e comportamento germinativo (MATHEUS; LOPES, 2007).

Segundo Popinigis (1985), a qualidade fisiológica de sementes é influenciada pela biometria de sementes, em que sementes graúdas apresentam maior taxa de germinação e vigor em comparação às sementes menores. Carvalho e Nakagawa (2012) acrescentaram que tais diferenças de vigor são explicadas pela presença

de maior quantidade de reserva disponível para o eixo embrionário de sementes maiores.

O tamanho de frutos e sementes pode ser utilizado como um indicador do ponto de maturação fisiológica da espécie, podendo ocorrer maior valor de massa seca, germinação e vigor de sementes em frutos maiores, quando comparados com frutos pequenos (DELOUCHE, 1981). Ahmad e Sultan (2015) observaram essa influência do tamanho dos frutos em relação ao vigor das sementes, quando no último estágio de maturação ocorreu redução no tamanho dos frutos e queda na germinação das sementes.

Entretanto, em um estudo sobre a morfometria de frutos e sementes de *Oreopanax fulvum* Marchal em diferentes estádios de maturação, Pinto et al. (2016) não observaram diferença significativa no tamanho de frutos nas fases de maturação analisadas. Contudo, observaram que ocorria germinação somente nas sementes oriundas de frutos roxos, os quais se apresentavam maduros.

Ao analisar a morfometria de frutos e sementes de pitangueira do cerrado em diferentes estádios de maturação, Borges et al. (2010) verificaram diferenças no tamanho dos frutos em função do estágio de maturação. No entanto, as sementes não diferiram entre os pontos de maturação analisados. Entretanto, Souza et al. (2016) estudando oito cultivares de sementes de pêssigo verificaram pelo índice de velocidade de germinação que as plantas mais vigorosas foram aquelas oriundas dos cultivares que apresentaram os maiores valores de comprimento, largura e espessura.

2.2 Maturação fisiológica de sementes

O ponto de maturação fisiológica é o ponto de máxima qualidade da sementes. Tem início com a fertilização do óvulo, posteriormente há o início do desenvolvimento da semente, por uma série de eventos, como divisões celulares, diferenciação de tecidos, acúmulo de reservas e perda considerável de água, até atingir o ponto de maturação fisiológica, que culmina com a redução do metabolismo e a paralisação do crescimento (POPINIGIS, 1985; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Entretanto, se o estágio de maturação de uma semente for inadequado poderá inviabilizar todo o processo de produção de uma espécie. Além disso, o desconhecimento deste estágio pode incorrer na obtenção de um produto de baixa qualidade ou um material imaturo e deteriorado (DIAS, 2001).

Diversos estudos, conceitos e definições sobre maturação fisiológica estão disponíveis na literatura, a qual pode ser entendida como o momento em que ocorre o término da passagem de fotossintatos da planta-mãe para o fruto, momento no qual se inicia a desidratação gradual das sementes. Neste ponto, diversas modificações fisiológicas e morfológicas são visualizadas nas sementes: no tamanho, no teor de água, na massa seca, além de melhorias graduais na germinação e no vigor

(DELOUCHE, 1981; POPINIGIS, 1985; MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012), podendo ser observado externa e internamente nos frutos, por meio de mudanças na coloração e tamanho dos frutos e sementes é possível perceber as mudanças fisiológicas (LOPES et al., 2006; LOPES; SOARES, 2006; FIGUEIREDO NETO et al., 2014). No entanto, o período de maturação da semente é variável entre as culturas, sofrendo influências das condições ambientais e genéticas dos materiais (CASTRO et al., 2008).

Durante a fase de maturação das sementes, a perda de água ocorre lentamente, enquanto o acúmulo de reservas nutricionais é ascendente até que alcancem valores máximos, quando então a sua desidratação é acentuada (MARCOS FILHO, 2015a).

Mesmo após a colheita das sementes podem ocorrer mudanças fisiológicas no seu interior, sendo denominada de maturação pós-colheita. Assim, sementes mais imaturas podem ser armazenadas por certo período para que recebam nutrientes contidos nos frutos e melhorem sua qualidade fisiológica, no entanto, se as sementes estiverem maduras, esse armazenamento pode diminuir a sua germinação e vigor (AZZOLINI et al., 2004). O ponto de maturidade fisiológica das sementes é variável entre e dentro as espécies, e diversos estudos são desenvolvidos para o conhecimento deste estágio de maturação das sementes para determinar o período de colheita, no qual apresentem maior germinação e vigor (DAYAL et al., 2014; PEREIRA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2015; LISBOA et al., 2016).

Em um estudo desenvolvido sobre a análise da qualidade fisiológica de sementes de melão verificaram que houve correlação positiva entre a qualidade das sementes nos testes de germinação e vigor, com o progresso da maturação (DONATO et al., 2015). Ao estudar o efeito do estágio de maturação no vigor de sementes de ingazeiro, Mata et al. (2013) verificaram que a maturidade fisiológica da espécie ocorre após 146 a 166 da antese, e que após 155 dias da antese, no primeiro e segundo ano de cultivo, respectivamente, foi o período no qual as sementes apresentaram máximo poder germinativo, acúmulo de massa seca e menor teor de água. Em sementes de urucu (*Bixa orellana* L.), a maturação fisiológica ocorre após 91 a 103 dias da antese (DORNELAS et al., 2015).

Outra característica que pode ser um indicador e possibilitar a identificação do estágio de maturação da semente é a coloração dos frutos, conforme sugerido por diversos autores (LOPES et al., 2006; LOPES; SOARES, 2006; RICCI et al., 2013; AHMAD; SULTAN, 2015). Ricci et al. (2013) compararam a qualidade fisiológica de sementes de pimenta jalapenho, oriundas de frutos verdes e vermelhos, em diferentes períodos de armazenamento e verificaram que as sementes procedentes de frutos vermelhos recém-colhidos apresentaram maior porcentagem de emergência e, com o armazenamento dos frutos verdes, as sementes atingiram o nível de qualidade similar ao das sementes oriundas de frutos vermelhos.

Em sementes de maracujá, em quatro estágios de maturação, considerando coloração do fruto, Battistus et al. (2014) observaram maior acúmulo de massa seca,

melhor organização das membranas e maior germinação nas sementes oriundas de frutos mais amarelos. No entanto, para mamão, Dias et al. (2015) sugerem que a colheita e extração das sementes seja feita quando os frutos apresentarem 75% de casca amarela.

2.3 Qualidade fisiológica de sementes

A qualidade fisiológica da semente caracteriza-se pela sua capacidade para desenvolver funções vitais, podendo ser compreendida como o resultado de um conjunto de características que determinam a sua qualidade para a semeadura no campo; características que envolvem a germinação, considerada como principal parâmetro para avaliação da qualidade fisiológica de lotes de sementes, a qual permite identificar o potencial de germinação de um lote sob condições favoráveis, e o vigor (POPINIGIS, 1985; POLJAKOFF-MAYBER et al., 1994; BRASIL, 2009; MARCOS-FILHO, 2015a). Essa qualidade compreende a germinação e o vigor das sementes, sendo o vigor considerado o conjunto de características que determinam o potencial fisiológico de um lote de sementes, influenciado pelas condições de manejo e de ambiente, enquanto a germinação procura analisar a máxima capacidade germinativa que a semente apresenta sob condições ótimas, de água, temperatura, luz, oxigênio, além do substrato, que é fundamental para o processo germinativo (LOPES; ALEXANDRE, 2010; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012; MARCOS FILHO, 2015a).

2.3.1 Germinação

A semente, como resultado de um óvulo fecundado e desenvolvido até a completa fase de maturação fisiológica, constitui-se na unidade de dispersão de suas respectivas espécies. Quando viáveis, não dormentes e mantidas sob condições ideais para germinação reinicia a absorção de água pela semente, que desencadeia uma sequência de mudanças metabólicas, culminando com a protrusão da raiz primária e o início da formação de uma plântula (LABORIAU, 1983; BEWLEY; BLACK, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012; MARCOS-FILHO, 2015a).

A germinação é considerada como um processo complexo e sujeito a diversas formas de interferência. O conhecimento da estrutura morfológica e da condição fisiológica das sementes é importante para a obtenção de uma elevada porcentagem de germinação (LOPES et al., 2005; LOPES et al., 2006; MARCOS FILHO, 2015a).

Entretanto, para que a germinação se inicie há a necessidade de que a semente alcance um nível adequado de hidratação, que permita a reativação dos seus processos metabólicos e alongação do eixo embrionário (BEWLEY; BLACK, 1994). Estes autores sugeriram a divisão das fases da germinação em três etapas principais, englobando aspectos fisiológicos, bioquímicos e metabólicos, que são embebição, processo bioquímico preparatório e crescimento, conforme segue: I)

reativação: embebição, ativação da respiração e das demais etapas do metabolismo; II) indução do crescimento: fase de repouso, como preparo para o crescimento, e III) crescimento, com a protrusão da raiz primária.

Do ponto de vista tecnológico, o final da germinação se caracteriza no instante em que se tem uma plântula completa, em condições de desenvolver autotroficamente, resultando na formação de uma plântula normal, com todas as suas estruturas essenciais (BRASIL, 2009; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

2.3.2 Vigor de sementes

O vigor retrata a capacidade que a semente apresenta em emitir plântulas sob condições adversas do meio. Representa o somatório das propriedades das sementes que determinam o seu desempenho ao longo do processo germinativo e emergência de plântulas; resulta do nível de energia que a semente dispõe para realizar todas as etapas da germinação (BRASIL, 2009; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

A International Seed Testing Association (ISTA, 2009) afirma que o vigor é um indicador do nível de deterioração fisiológica de um lote de sementes, bem como sua integridade mecânica. A partir desse conceito tem-se a percepção da capacidade de estabelecimento de plantas na área de cultivo, corroborando com o que postulou a Association of Official Seed Analysts (AOSA, 2009), que caracteriza o vigor como um fator de grande importância para a agricultura, influenciando diretamente em todo o sistema produtivo, destacando-se que a avaliação é uma propriedade para indicar o potencial que as sementes possuem para realizar a emergência rápida, uniforme em originar plântulas normais.

O uso de testes de vigor de sementes tem sido satisfatório para auxiliar, pelos parâmetros avaliativos, a escolha de práticas conservacionistas das sementes. Os métodos de avaliação das sementes podem auxiliar no entendimento e caracterização da germinação, do vigor e da viabilidade de frutos e sementes (MATHEUS; LOPES, 2007). Apresentam uma gama de informações em relação à qualidade das sementes, destacando-se em diversos programas de melhoramento genético, principalmente, por separar os genótipos mais resistentes às condições climáticas adversas, como pragas, doenças e que apresentem alta produtividade (GRZYBOWSKI et al., 2015).

Na análise de vigor de um lote de sementes são realizados testes em laboratórios, com o controle das condições ambientais necessárias para a avaliação do vigor das sementes (VEIRA; CARVALHO, 1994), os quais são classificados como diretos e indiretos, sendo que os testes diretos simulam as condições ambientais que ocorrem no campo: massa fresca, massa seca, índice de velocidade de emergência em campo, teste de frio, crescimento de plântulas e população inicial, enquanto os testes indiretos avaliam as sementes em relação às suas características físicas, bioquímicas e fisiológicas: teste de tetrazólio, teste de respiração, teste de

condutividade elétrica, teor de ácidos graxos, teste GADA (descarboxilase do ácido glutâmico) e teste de aldeídos voláteis (MARCOS FILHO, 2015b).

Os testes indiretos fisiológicos utilizam um determinado fator da germinação ou do desenvolvimento da plântula, sob condições favoráveis ou não. Sob condições favoráveis: crescimento da plântula, primeira contagem, índice de velocidade de germinação, transferência da massa seca, crescimento da raiz e classificação do vigor das plântulas; sob condições desfavoráveis: envelhecimento precoce, imersão em água quente, imersão em solução tóxica, imersão em solução osmótica, germinação em baixa temperatura e teste de exaustão (KRZYZANOWSKI et al., 1999).

3 | AGRADECIMENTOS

À equipe do Laboratório de Análise de Sementes do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (LAS-CCAUE-UFES) pelo incentivo e apoio no presente trabalho; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de doutorado ao segundo autor, e de produtividade em pesquisa ao terceiro e quarto autor, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S.; SULTAN, S. M. Physiological changes in the seeds of *Jatropha curcas* L. at different stages of fruit maturity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.58, n.1, p.118-123, 2015.
- ALKIMIM, E. R.; DAVID, A. M. S. S.; SOUSA, T. V.; RODRIGUES, C. G.; AMARO, H. T. R. Different harvest times and physiological quality of coriander seeds. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v.20, n.2, p.133-137, 2016.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigour testing handbook**. East Lansing: AOSA, 2009. 334 p. (Contribution, 32).
- AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; SPOTO, H. F. Estádios de maturação e qualidade pós-colheita de goiabas 'Pedro Sato'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.1, p.29-31, 2004.
- BATTISTUS, A. G.; FUCHS, F.; SOUSA, R. F. B.; MALAVASI, M. de. M.; DRANSKI, J. A. L.; RAMPIM, L.; BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; MORANZA, T. M.; MÜLLER, M. A.; LIMA, P. R. Physiological maturity of seeds and colorimetry of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). **African Journal of Agricultural Research**, v.9, n.40, p.3018-3024, 2014.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**. Physiology of development and germination. 2 ed, New York, Plenum Press, 1994. 445p.
- BORGES, K. C. F.; SANTANA, D. G.; MELO, B.; SANTOS, C. M. dos. Rendimento de polpa e morfometria de frutos e sementes de pitangueira-do-cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.2, p.471-478, 2010.
- BORKERT, C. M. Micronutrientes na planta. In: BÜLL, L. T.; ROSOLEM, C. A. **Interpretação de análise química de solo e planta para fins de adubação**. Botucatu: Fundação de Estudos e

Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1986. p. 309-329.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

CAMARGO, E. R.; MARCHESAN, E.; AVILA, L. A.; SILVA, L. S. da.; ROSSATO, T. L.; MASSONI, P. F. Manutenção da área foliar e produtividade de arroz irrigado com a aplicação de fertilizantes foliares no estágio de emborrachamento. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1439-1442, 2008.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.Ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012.

CASTRO, M. M.; GODOY, A. R.; CARDOSO, A. I. I. Qualidade de sementes de quiabeiro em função da idade e do repouso pós-colheita dos frutos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.5, p.1491-1495, 2008.

DAYAL, A.; RANGARE, N. R.; KUMAR, A.; KUMARI, M. Effect of physiological maturity on seed quality of maize (*Zea mays* L.). **Forage Research**, v.40, n.1, p.1-6, 2014.

DELOUCHE, J. C. Seed maturation. In: **Handbook of seed technology**. Mississipi: Mississipi State University, p.17-23. 1981.

DIAS, D. C. F. S. Maturação fisiológica de sementes: o processo. **Seed News**, v.5, n.6, p.22-24, 2001.

DONATO, L. M. S.; RABELO, M. M.; DAVID, A. M. S. S.; ROCHA, A. F.; ROCHA, A. S.; BORGES, G. A. Qualidade fisiológica de sementes de melão em função do estágio de maturação dos frutos. **Comunicata Scientiae**, v.6, n.1, p.49-56, 2015.

DORNELAS, C. S. M.; ALMEIDA, F. A. C.; FIGUEIREDO NETO, A.; SOUSA, D. M. M.; EVANGELISTA, A. P. Desenvolvimento na maturação de frutos e sementes de Urucum (*Bixa orellana* L.). **Scientia plena**, v.11, n.1, p.1-9, 2015.

FERREIRA, A. B. H. **Dicionário da língua portuguesa**. 5. ed. Curitiba: Positivo, 2010. 2222 p.

FIGUEIREDO NETO, A.; ALMEIDA, F. A. C.; DANTAS, B. F.; GARRIDO, M. da. S.; ARAGÃO, C. A. Maturação fisiológica de sementes de abóbora (*Curcubita moschata* Duch) produzidas no semiárido. **Comunicata Scientiae** v.5 n.3, p.302-310, 2014.

GHASSEMI-GOLEZANI, K.; MOHAMMADI, M.; ZEHTAB-SALMA, S.; NASRULLAHZADEH, S. Changes in seed vigor of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars during maturity in response to water limitation. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 107, n. 1, p. 15-23, 2016.

GRZYBOWSKI, C. R. S.; VIEIRA, R. D.; PANOBIANCO, M. Testes de estresse na avaliação do vigor de sementes de milho. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 46, n. 3, p. 590-596, 2015.

GONÇALVES, V. D.; MULLER, D. H.; FAVA, C. L. F.; CAMILI, E. C. Maturação fisiológica de sementes de pimenta 'Bode Vermelha'. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 3, p. 137-146, 2015.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. ISTA **International rules for seed testing**. Zurique: ISTA, 2009. p.180.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 1, 4, 26.

LABORIAU, L. G. A. **Germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 171 p.

- LISBOA, C. F.; SILVA, D. D. A.; TEIXEIRA, I. R.; CAMPOS, A. J.; DEVILLA, I. A.; SILVA, A. G. Physiological quality of sesame seed harvested at different plant positions and maturity stages. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 30, p. 2825-2832, 2016.
- LOPES, J. C.; DIAS, P. C.; PEREIRA, M. D. Maturação fisiológica de sementes de quaresmeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 811-816, 2005.
- LOPES, J. C.; SOARES, A. S. Estudo da maturação de sementes de carvalho vermelho (*Miconia cinnamomifolia* (Dc.) Naud. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 623-628, 2006.
- LOPES, J. C.; BONO, G. M.; ALEXANDRE, R. S.; MAIA, V. M. Germinação e vigor de plantas de maracujazeiro amarelo em diferentes estádios de maturação do fruto, arilo e substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 5, p. 1340-1346, 2007.
- LOPES, J. C.; MATHEUS, M. T.; CORRÊA, N. B.; SILVA, D. P. Germinação de sementes de embiruçu (*Pseudobombax grandiflorum* (cav.) a. Robyns) em diferentes estádios de maturação e substratos. **Floresta**, v. 38, n. 2, p. 331-337, 2008.
- LOPES, J. C.; ALEXANDRE, R. S. **Germinação de sementes de espécies florestais**. In: CHICHORRO, J. F.; GARCIA, G. de O.; BAUER, M. de O.; CALDEIRA, M. V. W. (Org.). Tópicos em Ciências Florestais. 1 ed. Visconde do Rio Branco: Suprema. v. 1, p. 21-56, 2010.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. 2 ed. ABRATES, 2015a. 659 p.
- MARCOS-FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 4, p. 363-374, 2015b.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3.ed, London: Elsevier, 2012. 643 p.
- MATA, M. F.; SILVA, K. B.; BRUNO, A. R. L. FELIX, L. P.; MEDEIROS FILHO, S.; ALVES, E. U. Maturação fisiológica de sementes de ingazeiro (*Inga striata*) Benth. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 549-566, 2013.
- MATHEUS, M. T.; LOPES, J. C. Morfologia de frutos, sementes e plântulas e germinação de sementes de *Erythrina variegata* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 8-17, 2007.
- MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. Oxford: Pergamon Press, 1989. 270 p.
- PEREIRA, F. E. C. B.; TORRES, S. B.; SILVA, M. I. L.; GRANGEIRO, L. C.; BENEDITO, C. P. Qualidade fisiológica de sementes de pimenta em função da idade e do tempo de repouso pós-colheita dos frutos. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 45, n. 4, p. 737-744, 2014.
- PINTO, M. B.; GRABIAS, J.; HOFFMANN, P. M.; VELAZCO, S. J. E.; BLUM, C. T. Caracterização morfológica de frutos, sementes, plântulas e germinação de *Oreopanax fulvum* Marchal. **Agrária**, v. 11, n. 2, p. 111-116, 2016.
- POLJAKOFF-MAYBER, A., G. G. SOMERS, E. WERKER.; J. L. GALLAGHER. Seeds of *Kosteletzkya virginica* (Malvaceae): their structure, germination and salt tolerance, II. Germination and salt tolerance. **American Journal of Botany**, v. 81, p. 54-59, 1994.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Agiplan, 1985. 289p.
- RICCI, N.; PACHECO, A. C.; CONDE, A. S.; CUSTÓDIO, C. C. Qualidade de sementes de pimenta jalapenho em função da maturação e tempo de permanência nos frutos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 2, p. 123-129, 2013.

RIOS, A. O.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D. Efeito das estocagem e das condições sobre algumas propriedades físicas, químicas e nutricionais de três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, suppl .0, p. 39-45, 2003.

SANTOS, H. O.; DUTRA, S. M. F.; PEREIRA, R. W.; PIRES, R. M. O.; PINHO, E. V. R. V.; ROSA, S. D. V. F.; CARVALHO, M. L. M. Physiological quality of habanero pepper (*Capiscum chinense*) seeds based on development and drying process. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 12, p. 1102-1109, 2016.

SOUZA, A. G.; SMIDERLE, O. J.; SPINELLI, V. M.; SOUZA, R. O.; BIANCHI, V. J. Correlation of biometrical characteristics of fruit and seed with twinning and vigor of *Prunus persica* rootstocks. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 4, p. 322-328, 2016.

TOLEDO, M. Z.; FONSECA, N. R.; CÉSAR, M. L.; SORATTO, R. P.; CAVARIANI, C.; CRUSCIOL, C. A. C. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 2, p. 124-133, 2009.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: Funep. 1994. 164 p.

RELAÇÕES ENTRE A UMIDADE E ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE *PINUS SP.*, ANGELIM-PEDRA (*HYMENOLOBIUM PETRAEUM*) E CAIXETA (*TABEBUIA CASSINOIDES*)

Vitor Augusto Cordeiro Milagres

Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências Florestais
Lavras - MG

Jessyka Cristina Reis Vieira

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Engenharia Florestal
Diamantina – MG

Luiz Carlos Couto

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Engenharia Florestal
Diamantina – MG

Magno Alves Mota

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Engenharia Florestal
Diamantina – MG

RESUMO: Este estudo teve como objetivo avaliar a densidade e a retratibilidade das madeiras de pinheiro (*Pinus sp.*), o angelim-pedra (*Hymenolobium petraeum*) e a caixeta (*Tabebuia cassinoides*), submetidas às variações do seu conteúdo de umidade. Outros parâmetros físicos tais o coeficiente de retratibilidade volumétrica (Cr), o fator de anisotropia dimensional (A) e o teor de umidade máxima de saturação (Um_{max}) foram também avaliados por estarem intimamente associados à retratibilidade. Quarenta corpos-de-prova com dimensões 3,0 x 2,0 x 2,0 (cm) foram

confeccionados para as três espécies estudadas. Após as suas saturações, todos os corpos-de-prova tiveram as suas características físicas avaliadas, conforme metodologia adaptada de LOPES et al. (2011). Madeiras como o pinheiro e a caixeta são matérias-primas importantes para estruturas secundárias e fabricação de materiais leves, devido sua baixa densidade. Por outro lado, o angelim-pedra demonstrou uma alta densidade, sendo uma boa matéria-prima para marcenaria e construções civis.

PALAVRAS CHAVE: Qualidade da madeira, retratibilidade, anisotropia e umidade da madeira.

1 | INTRODUÇÃO

A madeira pela sua origem vegetal e propriedades higroscópicas e anisotrópicas apresenta características peculiares que a distingue de outros materiais estruturais (GUITARD, 1987). Seu uso pode abranger desde construção civil até o setor mobiliário. Apenas em 2016, o setor moveleiro foi responsável por um faturamento na exportação de \$264.863,00 (MDIC, 2016).

Para ambas utilizações o conhecimento de suas propriedades físicas é de fundamental importância tanto para o seu uso racional quanto para quantificar as suas propriedades

mecânicas (BEAUDOIN, 1996). Entre as várias espécies arbóreas, o pinheiro (*Pinus sp.*), o angelim-pedra (*Hymenolobium petraeum*) e a caixeta (*Tabebuia cassinoides*) encontram ampla utilização no mercado econômico.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a densidade e a retratibilidade de suas respectivas madeiras, submetidas às variações do seu conteúdo de umidade. Quanto à densidade da madeira, essa foi avaliada em diferentes teores de umidade a saber: densidade úmida (D_u), densidade absolutamente seca (D_o), densidade verde (D_v) e finalmente a densidade básica (D_b).

Quanto à retratibilidade da madeira, ou seja, a retratibilidade volumétrica total (RV), a retratibilidade longitudinal tangencial (Rtg) e a retratibilidade longitudinal radial (Rrd), foram determinadas a partir de uma condição inicial de completa saturação em água e posteriormente na condição absolutamente seca ou 0% de umidade.

Outros parâmetros físicos tais o coeficiente de retratibilidade volumétrica (Cr), o fator de anisotropia dimensional (A) e o teor de umidade máxima de saturação ($U_{máx}$) foram também avaliados por estarem intimamente associados à retratibilidade da madeira.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta corpos-de-prova com dimensões 3,0 x 2,0 x 2,0 (cm) foram confeccionados para as três espécies estudadas. O pinheiro e o angelim-pedra foram obtidos em uma marcenaria da cidade de Diamantina – MG e a espécie caixeta no sul da Bahia.

Após a classificação numérica, as seções anatômicas da madeira (transversal, longitudinal tangencial e longitudinal radial) foram igualmente identificadas. Em seguida, procedeu-se a determinação das massas e volumes iniciais mediante o uso de um paquímetro digital e balança analítica (Figura 1a).

Todos os corpos-de-prova foram colocados no interior de uma bandeja de polipropileno contendo água (Figura 1b) até na sua borda, por onde permaneceram por um período de aproximadamente 30 dias, até completar o processo de saturação dos mesmos.



Figura 1: Dispositivo utilizado para pesagem e o início do processo de saturação em água das amostras.

Ao término do processo de saturação, todos os corpos-de-prova tiveram as suas características físicas de densidade, retratibilidade e os demais parâmetros complementares avaliados, conforme metodologia adaptada de LOPES et al. (2011).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da análise estatística simplificada para as características físicas das madeiras de pinheiro, angelim-pedra e caixeta. A densidade, isto é, relação entre massa e volume é um dos índices mais simples e importantes para avaliação das propriedades funcionais da madeira, refletindo também diferentes atributos da história de vida de espécies arbóreas (Williamson e Wiemann, 2011).

Espécie	Db (g/cm ³)	Du (g/cm ³)	Dv (g/cm ³)	Ds (g/cm ³)	RV (%)	Cr	Rtg (%)	Rr (%)	A	Umax (%)
Pinus sp.										
Média	0,43	0,54	1,04	0,48	10,45	0,08	4,80	2,54	2,18	58,51
Variância	0,0005	0,0010	0,0028	0,0008	0,8623	0,0001	0,0044	0,5311	1,6428	3,7841
Desvio Padrão	0,0232	0,0314	0,0529	0,0286	0,9286	0,0112	0,0665	0,7287	1,2817	1,9453
C.V(%)	5,41	5,86	5,11	5,95	8,88	13,47	1,38	28,71	58,81	3,32
Angelim-pedra										
Média	0,63	0,75	1,02	0,71	9,96	0,18	3,67	2,91	1,25	37,78
Variância	0,0008	0,0015	0,0005	0,0010	0,7893	0,0007	0,9654	0,2142	0,1132	4,0514
Desvio Padrão	0,0285	0,0388	0,0234	0,0322	0,8884	0,0263	0,9826	0,4628	0,3365	2,0128
C.V(%)	4,48	5,16	2,29	4,56	8,92	14,36	26,80	15,90	26,85	5,33
Caixeta										
Média	0,35	0,43	1,04	0,38	7,70	0,04	2,23	1,36	2,20	66,34
Variância	0,0001	0,0002	0,0004	0,0001	3,7765	0,0001	0,4820	0,2860	1,5623	0,5244
Desvio Padrão	0,0070	0,0156	0,0208	0,0106	1,9433	0,0112	0,6942	0,5348	1,2499	0,7242
C.V(%)	2,00	3,62	2,00	2,81	25,23	26,50	31,09	39,30	56,93	1,09

Tabela 1: Resultados da análise estatística para as características físicas das madeiras de

Dentro deste contexto, de acordo com a classificação de MAINIERI e CHIMELO (2013) a espécie angelim-pedra com densidade de $0,63 \text{ g/cm}^3$, é considerada pesada, com potencial de uso para construção civil, serviços mobiliários e lâminas decorativas. Já o pinheiro com densidade de $0,43 \text{ g/cm}^3$ é classificada como madeira leve para construção civil tendo sua utilidade em uso domésticos tais como palitos de fósforo, vassouras, ripas, partes estruturais secundárias, entre outros (IPT, 1989b).

Para a caixeta foi encontrado a densidade de $0,35 \text{ g/cm}$. Considerada baixa, a utilização de sua madeira é usada na fabricação de lápis e tamancos (BERNHARDT, 2003). A retratibilidade volumétrica total (R_v), retratibilidade longitudinal tangencial (R_{tg}) e a retratibilidade longitudinal radial (R_r) constituem um forte indicativo de qualidade da madeira. Foram encontrados os valores de 10,45%, 9,96% e 7,70% para as espécies pinheiro, angelim-pedra e caixeta, respectivamente.

Tal conhecimento serve de subsídio para a correta condução do processo de secagem e de utilização final da mesma, com o intuito de eliminar ou minimizar a ocorrência de possíveis defeitos, comumente encontrados na madeira, assegurando a obtenção de um produto final com qualidade e bom desempenho (SILVA E OLIVEIRA, 2003). Esses valores indicam igualmente que essas madeiras podem ser utilizadas para quaisquer fins que exijam segurança e estabilidade dimensional.

O fator de anisotropia dimensional (A) e o coeficiente de retratibilidade volumétrica (Cr), são apresentados na tabela 1. O coeficiente de anisotropia, é um importante índice no estudo das retrações, uma vez que quanto mais elevado, maior a probabilidade de formação de fendas (rachaduras) e empenamentos na madeira (OLIVEIRA, 1988).

Por outro lado, a retratibilidade é, segundo o IPT (1985), o fenômeno da variação dimensional, da madeira, quando há alteração no seu teor de umidade. Quanto menor a retratibilidade, menor sua expansão ou contração. (OLIVEIRA et al, 2010). Para as espécies selecionadas foram observados valores de 0,08, 0,18 e 0,04 para as respectivas espécies.

Com relação à umidade máxima de saturação para as espécies em estudo, os dados apresentados na Tabela 1 demonstram que quanto maior a densidade básica da madeira, menor será a umidade. Isso é, sua porcentagem de vazios - lúmens de células, espaços micro e submicroscópicos da parede celular e porcentagem de vasos. (GOULET 1980).

Em efeito, o angelim-pedra com densidade básica igual à $0,63 \text{ g/cm}^3$ apresentou o menor teor de umidade máxima de saturação, ou seja, 37,78%, seguido do pinheiro com 58,51% e a caixeta com 66,34% de umidade máxima de saturação.

CONCLUSÕES

Este estudo permitiu evidenciar informações importantes com relação ao conhecimento da umidade máxima de saturação, densidade úmida, densidade verde, saturada e o fator de anisotropia dimensional que certamente irão contribuir como importantes fontes de referência para estudos similares.

De acordo com a literatura consultada, os valores calculados estão dentro dos limites confiáveis. Além disso, tais informações são relevantes na tomada de decisão da finalidade da madeira. Madeiras como o pinheiro e a caixeta são matérias-primas importantes para estruturas secundárias e fabricação de materiais leves, devido sua baixa densidade.

Por outro lado, o angelim-pedra demonstrou uma alta densidade, sendo uma boa matéria-prima para marcenaria e construções civis.

REFERÊNCIAS

BEAUDOIN, Michael **Propriétés physico-mécaniques du bois**. *Manuel de foresterie», Les Presses de l'Université Laval. Ordre des ingénieurs forestiers du Québec. Québec, Canada, 1997, 1301.*

BERNHARDT, Ricardo. **Análise quantitativa e qualitativa do crescimento e caixeta –*Tabebuia cassinoides (LAM.) DC. em florestas manejadas, no município de Iguape/SP.*** Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2003. Acesso em: 2016-10-13.

GOULET, Marcel. **Notes des cours de Physique du bois**. Département des Sciences du Bois et de La Forêt. Université Laval, Québec, Canada, 1980. p. 139.

GUITARD, Daniel.; EL AMRI, Fouad. **Modèles prévisionnels de comportement élastique tridimensionnel pour les bois feuillus et les bois résineux**. In: *Annales des sciences forestières*. EDP Sciences, 1987. p. 335-358.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO – IPT. **Sistema de Informações de Madeiras Brasileiras**. (Relatório N° 27 078). São Paulo: IPT, 1989b. p. 291.

LOPES, Camila Santos Doubek; NOLASCO, Adriana Maria; FILHO, Mário Tomazello; DIAS, Carlos Tadeu dos Santos, PANSINI, Alexandre. **Estudo da massa específica básica e da variação dimensional da madeira de três espécies de eucalipto para a indústria moveleira**. *Ciência Florestal*, 2011, 21.2: p. 315-322.

MAINIERI, Calvino; CHIMELO, João Peres. **Fichas de características das madeiras brasileiras**. Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Divisão de Madeiras, 1989.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR - MDIC. **Balança Comercial Brasileira por Município**. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br//sitio/sistema/balanca/>. Acesso em: 16 out. 2016.

OLIVEIRA, J. T. S. **Estudo das propriedades físicas e tecnológicas da madeira da pindaíba (*Xylopia sericea St. Hill.*)**. 106 f. PhD Thesis. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) -Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1988.

OLIVEIRA, José Tarcísio da Silva; FIEDLER, Nilton César; TOMAZELLO FILHO, Mario. **Avaliação da**

retratibilidade da madeira de sete espécies de Eucalyptus. Rev. Árvore, Viçosa, v. 34, n. 5, set./out. 2010. p. 929-936.

CASTRO, José de Silva; OLIVEIRA, José Tarcísio da Silva. **Avaliação das propriedades higroscópicas da madeira de *Eucalyptus saligna* Sm., em diferentes condições de umidade relativa do ar.** Revista Árvore, 2003, 27.2: p. 233-239.

WILLIAMSON, G. Bruce; WIEMANN, Michael C. **Age versus size determination of radial variation in wood specific gravity: lessons from eccentrics.** Trees, 2011, 25.4: p. 585-591.

TEOR DE NITROGÊNIO ORGÂNICO NAS FOLHAS E DE PROTEÍNA BRUTA NOS GRÃOS DE SOJA FERTILIZADA COM NITROGÊNIO E MOLIBDÊNIO

Lucio Pereira Santos

Pesquisador; Embrapa Amazônia Ocidental;
Manaus, Amazonas.

Clibas Vieira

Professor; Universidade Federal de Viçosa –
Departamento
de Fitotecnia (*in memoriam*)

RESUMO: Instalaram-se quatro experimentos com soja em Viçosa e Coimbra, Zona da Mata de Minas Gerais. Em 1995/96, utilizou-se um fatorial (4 x 4) + (1 x 4), quatro doses de N (0, 40, 80 e 120 kg/ha), aplicadas parceladamente em cobertura, combinadas com quatro doses de Mo (0, 40, 80 e 120 g/ha), em aplicação foliar aos 27 dias após a emergência das plantas, mais quatro tratamentos adicionais: 40-20, 40-40, 40-60 e 40-80 de N (kg/ha) e Mo (g/ha), o primeiro aplicado parceladamente em cobertura e o segundo, nas sementes. Em 1996/97, apenas as combinações N-Mo dos tratamentos adicionais foram diferentes: 0-40, 0-80, 40-40 e 40-80. Todas as parcelas receberam uma adubação básica de 120 kg/ha de P₂O₅ e 60 kg/ha de K₂O. As sementes foram inoculadas com duas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*. A soja CAC-1 foi semeada em fileiras espaçadas de 0,6 m, com 15 plantas/m. Os resultados mostraram que: a) em três experimentos o Mo aumentou o teor de N-orgânico nas

folhas e a dose mais favorável variou de 79 a 120 g/ha, em aplicação foliar, e de 27 a 80 g/ha, quando administrada via sementes; b) em três experimentos o N incrementou o teor de N-orgânico, sendo 120 kg/ha a dose mais favorável; c) sozinho, o Mo trouxe aumentos do teor de N-orgânico que variaram de 4,6 a 9,4%, enquanto o efeito isolado do N foi de 2,0 a 10,4%; d) quando houve efeito conjunto de N e Mo, o aumento do teor de N-orgânico variou de 13,4 a 17,4%; e) para o teor de N-orgânico, não houve diferença entre a aplicação do Mo nas folhas ou nas sementes ou, então, a aplicação nas sementes foi mais eficiente; f) O teor de proteína bruta nas sementes foi, geralmente, aumentado pela aplicação de Mo e, às vezes, pela do N; g) A dose mais favorável de Mo em aplicação foliar para a PB variou de 82 a 120 g/ha.

PALAVRAS-CHAVE: *Glycine max*, nitrogenase, redutase do nitrato, *Bradyrhizobium japonicum*.

ABSTRACT: Soybean experiments were carried out in Viçosa and Coimbra in the “agricultural year” of 1995/96 and repeated in both localities in 1996/97. In the first year a (4 x 4) + (1 x 4) factorial was used, in which the factors were four doses of N (0, 40, 80 and 120 kg/ha) x four doses of Mo (0, 40, 80 and 120 g/ha). The nitrogenous fertilizer was applied parcelled as side dressing, while the molybdenic fertilizer was

sprayed on the leaves 27 days after plant emergence. The four additional treatments comprised the following combinations of N (kg/ha) and Mo (g/ha): 40-20, 40-40, 40-60 and 40-80, in which the first was applied parcelled as side dressing and the second at the seeds. In the second year, only the N-MO combinations of the additional treatments were different: 0-40, 0-80, 40-40 and 40-80. All plots received a basic fertilization of 120 kg/ha of P_2O_5 and 60 kg/ha of K_2O . Seeds were inoculated with two strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Soybean cultivar CAC-1 was planted in rows 0.6 m apart at the density of 15 plants/m. The results showed that: a) In three experiments Mo increased the organic N content in leaves and the most favorable dose ranged from 79 to 120 g/ha in foliar application and from 27 to 80 g/ha when administered via seeds; b) in three experiments N increased organic N content, with 120 kg/ha being the most favorable dose; c) Mo alone brought increases in organic N content ranging from 4.6 to 9.4%, while the isolated effect of N was 2.0 to 10.4%; d) when there was a combined effect of N and Mo, the increase in organic N content ranged from 13.4 to 17.4%; e) for the organic-N content, there was no difference between the application of Mo on leaves or seeds, or the application on seeds was more efficient; (f) the crude protein content of the seeds was generally increased by applying Mo and sometimes by applying N; g) The most favorable dose of Mo in foliar application for CP ranged from 82 to 120 g/ha.

KEYWORDS: *Glycine max*, nitrogenase, nitrate reductase, *Bradyrhizobium japonicum*.

1 | INTRODUÇÃO

A soja é a mais importante oleaginosa cultivada no mundo. O complexo soja tem expressiva participação na pauta de divisas brasileira, constituindo-se no principal item agrícola em termos de valor.

Devido a essa posição de destaque, a cultura vem ocupando novas fronteiras agrícolas, caracterizadas por solos de baixa fertilidade, que exigem adubações mais pesadas e completas. Neste sentido, é indiscutível a importância do nitrogênio e do molibdênio na nutrição da soja. Entretanto, os estudos acerca da eficiência e modo de aplicação desses nutrientes ainda não são conclusivos.

Estudos realizados na Zona da Mata de Minas Gerais têm mostrado acentuado aumento de produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) com a aplicação das adubações nitrogenada e molíbdica (Vieira et al., 1992; Berger, 1995; Amane et al., 1994; Amane, 1997).

Os estudos sobre a associação das adubações nitrogenada e molíbdica na cultura da soja são consideravelmente recentes, no Brasil. Neste trabalho, procuraram-se avaliar, em dois municípios da Zona da Mata de Minas Gerais, os efeitos da associação de doses de N e Mo sobre essa cultura, em vista dos excelentes resultados alcançados com a cultura do feijão nessa zona.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no ano agrícola 1995/96, em Viçosa e Coimbra, e foram repetidos em 1996/97, nos mesmos municípios, com plantios realizados sempre na primavera. Amostras de solo retiradas da área experimental, a 0-20 cm de profundidade, foram caracterizadas (Quadro 1).

Características químicas	1995/96		1996/97	
	Viçosa	Coimbra	Viçosa	Coimbra
pH em água (1:2,5)	6,0	5,7	5,5	5,6
P disponível ¹ (mg/dm ³)	4,3	4,5	3,4	6,0
K disponível ¹ (mg/dm ³)	29	13	75	43
Ca ²⁺ trocável ² (cmol _c /dm ³)	2,3	2,0	2,4	2,4
Mg ²⁺ trocável ² (cmol _c /dm ³)	1,2	0,8	1,2	1,1
Al ³⁺ trocável ² (cmol _c /dm ³)	0,0	0,0	0,0	0,0
Textura	Argilosa	Argilosa	Muito argilosa	Muito argilosa

Quadro 1 - Resultados das análises química e textural das amostras de solo colhidas nos locais dos experimentos(*)

¹ Extrator de Mehlich – 1.

² KCl 1 mol/L.

(*) Análises realizadas no Departamento de Solos da UFV.

Em 1995/96, utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, com quatro repetições, em que os tratamentos obedeceram a um arranjo fatorial (4 x 4) + (1 x 4), ou seja, quatro doses de N (0, 40, 80 e 120 kg/ha) x quatro doses de Mo (0, 40, 80 e 120 g/ha) e quatro tratamentos adicionais: 40-20, 40-40, 40-60 e 40-80 de N (kg/ha) e Mo (g/ha). Em 1996/97, houve uma modificação apenas nos tratamentos adicionais, que passaram a ser as combinações: 0-40, 0-80, 40-40 e 40-80 de N (kg/ha) e Mo (g/ha), ou seja, utilizou-se um fatorial (4 x 4) + 2². O nitrogênio, na forma de sulfato de amônio, foi empregado em cobertura do seguinte modo: a dose de 40 kg/ha foi parcelada em duas de 20 e aplicadas aos 15 e 25 dias após a emergência (DAE); a dose de 80 kg/ha foi fracionada em duas de 30 e uma de 20 e aplicadas aos 15, 25 e 35 DAE; a dose de 120 kg/ha foi dividida em três de 40 e aplicadas aos 15, 25 e 35 DAE. O Mo foi aplicado nas folhas, na forma de molibdato de sódio diluído em água, aos 27 DAE. Nos tratamentos adicionais, o N foi parcelado em duas aplicações de 20 kg/ha, aos 15 e 25 DAE, e o Mo aplicado nas sementes por ocasião do plantio, utilizando-se uma solução com 200 g de açúcar para cada litro de água, com o objetivo de facilitar a distribuição e aderência do molibdato na superfície das sementes.

Cada parcela foi constituída de quatro fileiras de 6,0 m de comprimento, espaçadas de 0,6 m, com cerca de 15 plantas do cultivar CAC-1 por metro de sulco, após desbaste. Aproveitaram-se, como área útil, os 6,0 m² centrais de cada parcela.

O preparo do solo consistiu de uma aração seguida de duas gradagens. Todas as parcelas receberam, nos sulcos de plantio, 120 kg/ha de P_2O_5 , na forma de superfosfato simples, e 60 kg/ha de K_2O , na forma de cloreto de potássio. Os tratamentos culturais foram os normais.

Antes do plantio, as sementes foram inoculadas com uma mistura (1:1) de duas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*: 5080 (CPAC 7) e 5079 (CPAC 15), com uma concentração acima de 10 milhões de células viáveis por grama de inoculante, na proporção de 25 g/kg de sementes. Utilizou-se a mesma solução empregada para distribuir o molibdato nas sementes, visando a aderência do inoculante nelas.

Foram avaliadas as características: teor de proteína bruta nos grãos e teor de N-orgânico nas folhas.

No período da floração plena, correspondente ao estágio R2 da escala de Fehr & Caviness (1977), coletaram-se folhas para determinação dos teores de N. Para tanto, foram feitas coletas da quarta folha trifoliolada completamente desenvolvida, a partir do topo, em 20 plantas tomadas ao acaso, na área útil de cada parcela. As folhas coletadas foram secadas em estufa de ventilação forçada a 70 °C até atingirem peso constante, moídas em moinho tipo Wiley, com peneira de 20 malhas por polegada e homogeneizadas.

O N-orgânico foi determinado após digestão sulfúrica (Lindner, 1944), seguida de avaliação colorimétrica, utilizando-se o reagente de Nessler (Jackson, 1965), com leitura a 480 nm em espectrofotômetro.

Na colheita as plantas foram arrancadas, juntamente com parte do sistema radicular, aproximadamente 10 dias após o estágio R8 (escala de Fehr & Caviness, 1977). Logo em seguida, foram trilhadas e os seus grãos acondicionados em sacos de algodão e colocados ao sol até atingirem umidade de aproximadamente 13%.

Para a determinação do teor de proteína, as amostras de grãos de cada parcela foram secas em estufa com ventilação forçada, a 70 °C, até peso constante, e moídas em moinho tipo Wiley, com peneira de 20 malhas por polegada. Utilizou-se o método semimicro Kjeldahl, convertendo-se a porcentagem de nitrogênio encontrada na amostra em proteína bruta, utilizando-se, para isso, o fator de conversão 6,25 (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS – AOAC, 1970).

Os dados, obtidos em cada experimento, foram submetidos à análise de variância conjunta. Quando houve diferenças significativas entre os tratamentos em que se empregou o Mo por via foliar e por via das sementes, fizeram-se cortes nas superfícies de resposta para comparar as formas de aplicação do Mo. Para que essas comparações fossem realizadas em bases iguais, nos experimentos do ano agrícola de 1995/96 fixou-se o N na dose de 40 kg/ha e, nos do ano de 1996/97, nas doses de 0 e 40 kg/ha.

Na análise de variância dos tratamentos adicionais (Mo aplicado nas sementes) dos experimentos de 1995/96, incluiu-se o tratamento $N_{40}Mo_0$ do fatorial (Mo aplicado via foliar); na dos ensaios de 1996/97, incluíram-se os tratamentos N_0Mo_0 e $N_{40}Mo_0$

do fatorial principal.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teor de proteína bruta (PB) nos grãos

No Quadro 2 são apresentadas as médias dos teores de Proteína Bruta observadas nos experimentos de Viçosa e Coimbra, conduzidos nos anos 1995/96 e 1996/97.

A análise de variância revelou que foram significativas as interações locais x tratamentos ($P < 0,01$), anos x tratamentos ($P < 0,05$) e locais x anos x tratamentos ($P < 0,01$). Apresentar-se-ão, em seguida, os resultados das análises de regressão por experimento.

N (kg/ha)	Mo (g/ha)	Viçosa		Coimbra	
		1995/96	1996/97	1995/96	1996/97
0	0	35,7	33,7	32,5	30,0
0	40	37,8	33,5	36,6	33,8
0	80	37,4	32,7	37,4	35,1
0	120	37,3	33,5	36,4	34,8
40	0	35,3	31,6	32,2	28,4
40	40	37,3	31,9	36,9	34,1
40	80	37,1	32,3	36,0	33,5
40	120	36,3	32,9	38,0	34,7
80	0	34,5	31,6	32,2	29,2
80	40	35,6	32,1	36,5	33,6
80	80	37,7	32,3	37,1	32,3
80	120	37,0	34,6	37,1	32,7
120	0	36,0	32,3	35,4	29,5
120	40	37,4	32,8	38,6	33,5
120	80	36,0	35,6	36,8	31,6
120	120	37,4	34,2	38,0	33,9
40 (0)	20 (40) (*)	36,6	32,4	37,0	35,1
40	40 (*)	35,8	32,5	36,9	34,1
40 (0)	60 (80) (*)	36,2	32,5	37,4	34,8
40	80 (*)	35,2	32,7	37,1	33,5

Quadro 2 - Teor médio de Proteína Bruta (PB) nos grãos de soja (dag/kg), em Viçosa e Coimbra, nos anos agrícolas 1995/96 e 1996/97

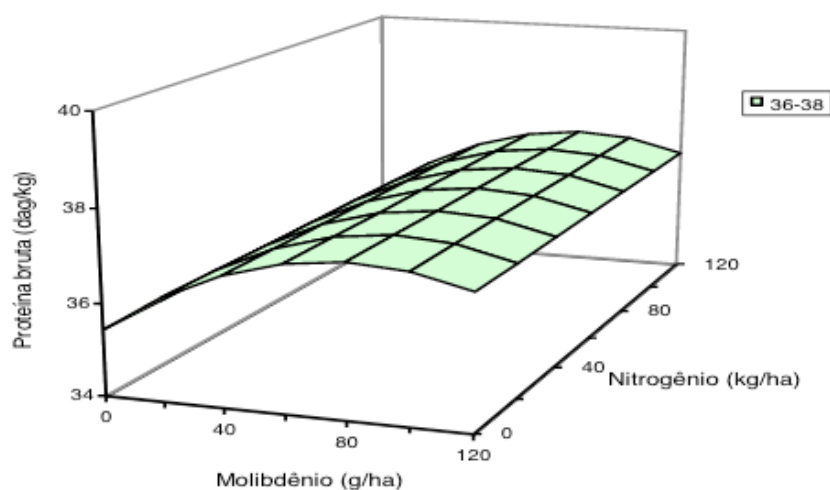
(*) Tratamentos adicionais em que o Mo foi aplicado nas sementes e não nas folhas.

Entre parênteses, as doses usadas em 1996/97.

3.1.1 Ano Agrícola 1995/96

3.1.1.1. Viçosa

A aplicação foliar de 82,5 g/ha de Mo, independentemente da aplicação de N, proporcionou o máximo teor de PB nos grãos de 37,3 dag/kg (Figura 1), um incremento de 5,2% em relação à ausência de Mo. Quanto ao N, alguns autores (Allos e Bartholomeu, 1959; Bergersen, 1959 e Franco et al., 1978), citados por Vargas et al., (1982) sugerem que as plantas jovens de soja necessitam de uma certa quantidade de N mineral até o início da fixação de N₂, que, segundo Hardy et al. (1971), ocorre entre três e cinco semanas após emergência. Como no presente experimento não houve resposta do teor de PB nos grãos às doses de N, provavelmente este nutriente se encontrava em disponibilidade adequado no solo para estimular o crescimento inicial das plantas e formação dos nódulos. Como foi observada uma intensa nodulação, por ocasião do florescimento, acredita-se que o Mo tenha sido utilizado principalmente na síntese da nitrogenase, determinando uma maior contribuição do N fixado simbioticamente para o acúmulo de PB nos grãos. Vargas et al. (1982) observaram que não há efeito dos níveis de N, aplicados quatro dias após a emergência, no teor de N total dos grãos. Afirmam ainda que esse resultado concorda com os obtidos por (Franco et al., 1978; Hathcock, 1975 e Sij et al., 1979), citados por Vargas et al. (1982). Entretanto, Hanway & Weber (1971) concluíram que somente 25% do N das sementes é proveniente da fixação simbiótica.



$$\hat{Y} = 35,45 + 0,04495 * Mo - 0,0002725 * Mo^2 \quad R^2 = 0,95$$

** Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 1 - Teores de proteína bruta nos grãos em função de doses de N em cobertura e de Mo via foliar, em Viçosa, no ano agrícola de 1995/96.

Como não houve diferenças significativas entre os tratamentos com aplicação

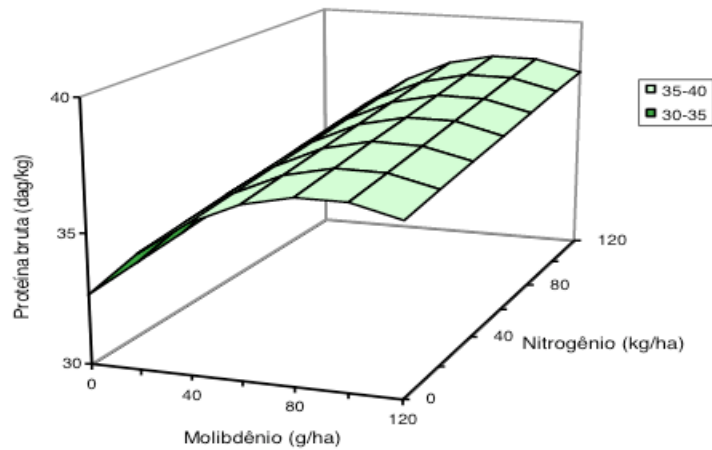
de Mo nas sementes (adicionais), o teor médio de PB nos grãos foi de 35,8 dag/kg. Este resultado não concorda com o observado por Parker & Harris (1962), que obtiveram aumento desse teor quando aplicaram Mo nas sementes. O teor de PB nos grãos mostrou-se 5,30% inferior no tratamento $N_{40} Mo_{80}$ com o Mo aplicado nas sementes em relação à sua pulverização nas folhas ($P < 0,05$).

3.1.1.2. Coimbra

A associação de 120 kg/ha de N com 89 g/ha de Mo por via foliar promoveu um máximo teor de PB nos grãos de 38,3 dag/kg (Figura 2). Essa combinação promoveu acréscimos de 3,5%, 12,8% e de 17,3%, em relação a $N_0 Mo_{89}$, $N_{120} Mo_0$ e $N_0 Mo_0$, respectivamente. Como houve maior resposta ao Mo do que ao N, acredita-se que tenha prevalecido a aquisição do N pela planta pela fixação simbiótica, em detrimento de sua absorção do solo pelas raízes. Assim, o micronutriente pode ter sido utilizado principalmente na síntese da enzima nitrogenase. O tratamento $N_{120} Mo_0$ elevou em 4,0% esta característica, em relação a $N_0 Mo_0$. Vargas & Suhet (1980) constataram que os tratamentos com N mineral proporcionaram um teor de N total nos grãos superior ao obtido nos tratamentos de inoculação. O uso de $N_0 Mo_{89}$ aumentou o teor de PB nos grãos em 13,3%, em comparação à $N_0 Mo_0$, evidenciando a importância desse micronutriente para o metabolismo do N. Como todas as repetições do tratamento $N_0 Mo_0$ exibiram, durante os estádios vegetativos, sintomas de deficiência de N, acredita-se que apenas a inoculação das sementes com o *Bradyrhizobium* não tenha sido suficiente para suprir as plantas deste nutriente.

Com a aplicação de 54,7 g/ha de Mo nas sementes obteve-se um máximo teor de PB nos grãos de 37,9 dag/kg (Figura 3), um incremento de 16,0% em relação à ausência do Mo ($N_{40} Mo_0$). Lantmann et al. (1989) obtiveram acréscimos de até 6,0% nos teores de PB nos grãos, quando aplicaram 30 g/ha de Mo nas sementes.

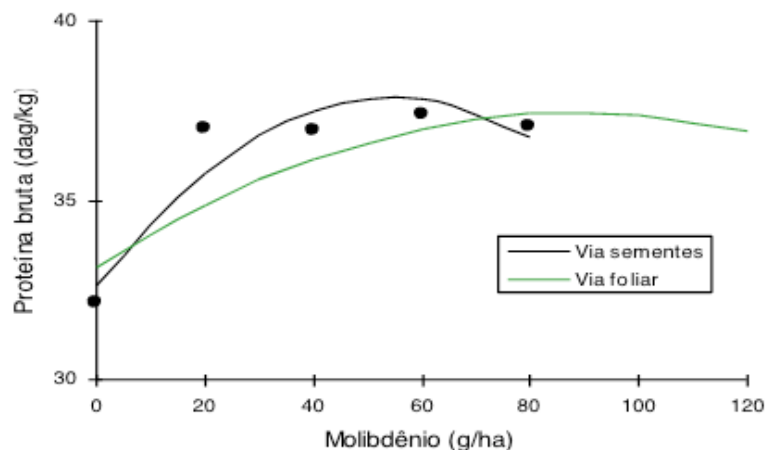
Comparando as formas de aplicação do Mo, com a dose de 40 kg/ha de N, observou-se que o teor de PB nos grãos foi 1,12% maior com a aplicação do Mo nas sementes (com dose 38% menor) do que o seu emprego por via foliar (54,7 g/ha de Mo = 37,9 dag/kg e 89 g/ha de Mo = 37,4 dag/kg, respectivamente) (Figura 3), evidenciando maior eficiência do micronutriente por aquela via de aplicação.



$$\hat{Y} = 32,67 + 0,01083 * N + 0,09754 * Mo - 0,0005477 * Mo^2 \quad R^2 = 0,77$$

** Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 2 - Teores de proteína bruta nos grãos em função de doses de N em cobertura e de Mo via foliar, em Coimbra, no ano agrícola de 1995/96.



$$\text{Via sementes: } \hat{Y} = 32,65 + 0,1909 * Mo - 0,001746 * Mo^2 \quad R^2 = 0,88$$

$$\text{Via foliar: } \hat{Y} = 33,11 + 0,09754 * Mo - 0,0005477 * Mo^2 \quad R^2 = 0,77$$

** Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 3 - Teores de proteína bruta nos grãos em função de doses de Mo via sementes e via foliar, com 40 kg/ha de N, em Coimbra, no ano agrícola de 1995/96.

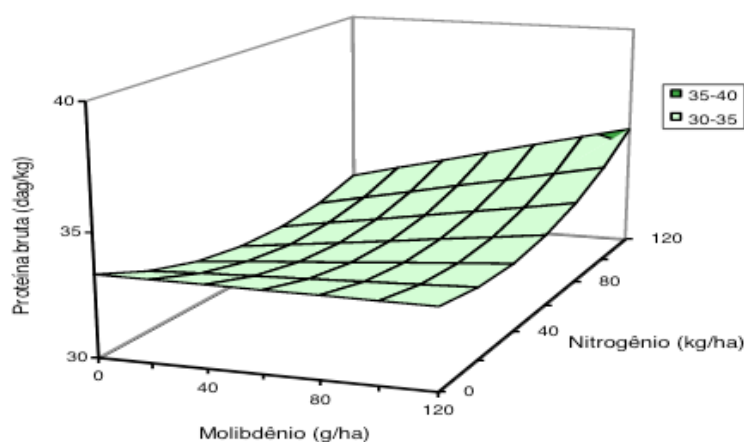
3.1.2 Ano Agrícola 1996/97

3.1.2.1. Viçosa

O teor de PB nos grãos foi afetado de forma quadrática pelo N aplicado em cobertura e reduzido de forma linear pelo Mo aplicado por via foliar (Figura 4). Como a produtividade aumentou com as doses de N, é provável que esta tenha sido uma das causas da redução do teor de PB nos grãos com a aplicação deste nutriente, uma vez que existe uma correlação negativa entre teor de proteína e produtividade de grãos. Entretanto, não se sabe porque as doses de Mo reduziram o teor de PB

nos grãos, mesmo tendo elevado o teor de N total nas folhas sem, contudo, afetar a produtividade de grãos. Com N_0Mo_{120} o teor de PB foi 33,3 dag/kg, com $N_{120}Mo_0$, 32,2 dag/kg e, com $N_{120}Mo_{120}$, 35,4 dag/kg, sendo esta última a melhor combinação para esta característica, representando um incremento de 6,06% em relação à N_0Mo_0 .

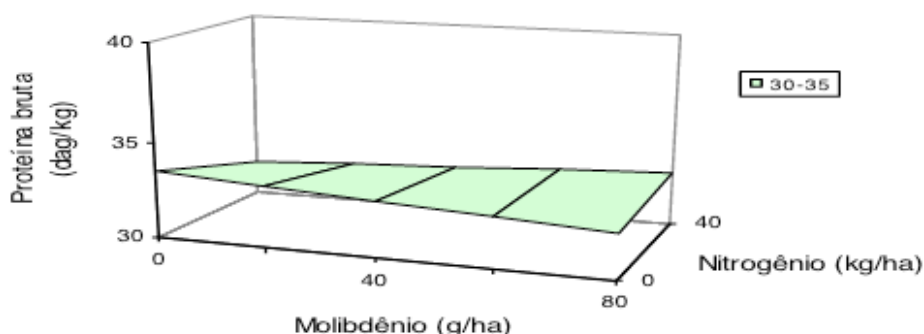
Com os tratamentos adicionais, a associação de 21 kg/ha de N + 60 g/ha de Mo nas sementes determinou um teor de PB nos grãos de 32,6 dag/kg, um decréscimo de 2,8% em relação à testemunha (N_0Mo_0) (Figura 5). Esse percentual de redução ocorreu tanto com a associação dessas doses como também com a aplicação isolada delas. Com $N_{40}Mo_{80}$ obteve-se 32,84 dag/kg, com N_0Mo_{80} , 32,26 dag/kg e, com $N_{40}Mo_0$, 31,74 dag/kg.



$$\hat{Y} = 33,33 - 0,05136 * N + 0,0003495 * N^2 - 0,0005519Mo + 0,0002232 * NMo \quad R^2 = 0,73$$

** Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 4 - Teores de proteína bruta nos grãos em função de doses de N em cobertura e de Mo via foliar, em Viçosa, no ano agrícola de 1996/97.

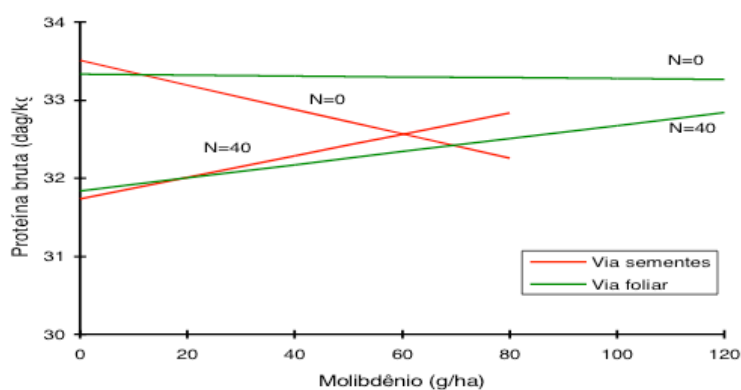


$$\hat{Y} = 33,51 - 0,04422 * N - 0,01566 Mo + 0,0007352 * NMo \quad R^2 = 0,84$$

°, * e ** Significativo em nível de 10, 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Figura 5 - Teores de proteína bruta nos grãos em função de doses de N em cobertura e de Mo via sementes, em Viçosa, no ano agrícola de 1996/97.

Comparando as formas de aplicação do Mo, notou-se que na ausência da aplicação de N, o micronutriente deprimiu o teor de PB nas duas maneiras de aplicação. Os maiores teores foram obtidos com os tratamentos N₀Mo₀ (33,5 dag/kg nos tratamentos adicionais e 33,3 dag/kg nos tratamentos do fatorial). Na dose de 40 kg/ha de N, os teores de PB nos grãos se equivaleram com as duas formas de aplicação do Mo (80 g/ha de Mo nas sementes = 32,8 dag/kg e 120 g/ha de Mo por via foliar = 32,8 dag/kg) (Figura 6), porém o emprego do micronutriente nas sementes mostrou ser mais eficiente porque uma dose 33% menor exerceu o mesmo efeito no teor de PB.



$$\text{Via sementes: } \hat{Y} = 33,51 - 0,04422 * N - 0,01566 * Mo + 0,0007352 * NMo \quad R^2 = 0,84$$

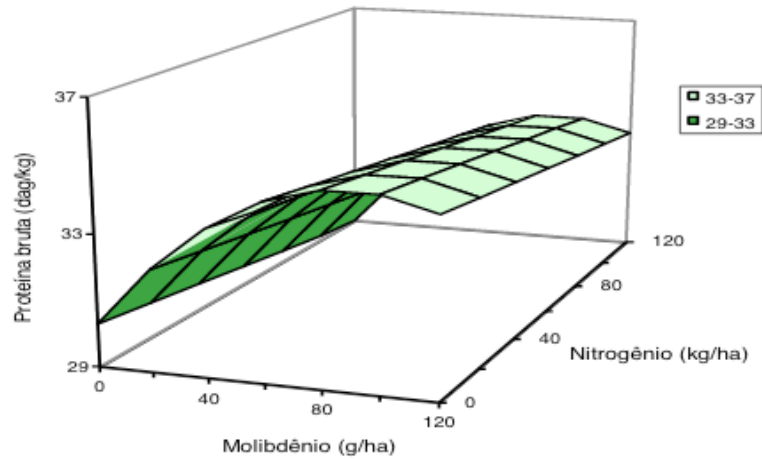
$$\text{Via foliar: } \hat{Y} = 33,33 - 0,05136 * N + 0,0003495 * N^2 - 0,0005519Mo + 0,0002232 * NMo \quad R^2 = 0,73$$

°, * e ** Significativo em nível de 10, 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Figura 6 - Cortes nas superfícies de resposta do teor de proteína bruta nos grãos, nas doses de 0 e 40 kg/ha de N em cobertura, em função de Mo via sementes e via foliar, em Viçosa, no ano agrícola de 1996/97.

3.1.2.2. Coimbra

Constatou-se pequeno efeito depressivo do N. Porém, as doses crescentes de Mo aplicadas por via foliar determinaram uma resposta quadrática do teor de PB nos grãos, com um máximo de 34,9 dag/kg, obtido com 90,5 g/ha de Mo, na ausência da aplicação de N, um acréscimo de 15,0% em relação ao tratamento N₀Mo₀ (Figura 7). A redução nos teores de PB nos grãos, com a aplicação de doses de N, reflete bem o comportamento observado dos teores de N-orgânico nas folhas, que também foram diminuídos até a dose de 54,6 kg/ha de N. Entretanto, acima dessa dose houve elevação no teor de N orgânico nas folhas, e o tratamento N₁₂₀Mo₀ promoveu o teor de 3,13 dag/kg de N-orgânico, um aumento de 2,3% em relação à ausência de aplicação de N (N₀Mo₀). Acredita-se que esta tenha sido a principal causa da redução dos teores de PB nos grãos, uma vez que existe uma correlação negativa entre produtividade de grãos e o seu teor de proteína.



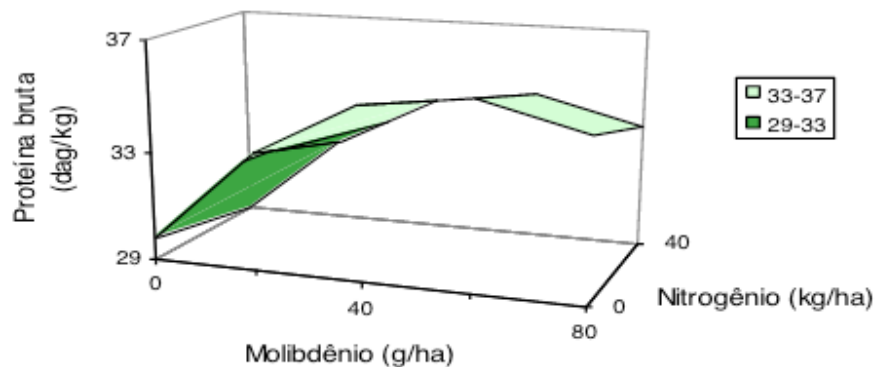
$$\hat{Y} = 30,30 - 0,01146 * N + 0,1009 * Mo - 0,0005572 * Mo^2 \quad R^2 = 0,78$$

** Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 7 - Teores de proteína bruta nos grãos em função de doses de N em cobertura e de Mo via foliar, em Coimbra, no ano agrícola de 1996/97.

A dose 57 g/ha de Mo nas sementes, na ausência da aplicação de N, determinou um máximo teor de PB nos grãos de 35,8 dag/kg (Figura 8), um aumento de 19,9% em relação a N_0Mo_0 .

Comparando as formas de aplicação do Mo, com o não-emprego de N, notou-se que o acúmulo de PB nos grãos foi 2,61% superior com a administração do Mo nas sementes (dose 37% menor) em relação à sua



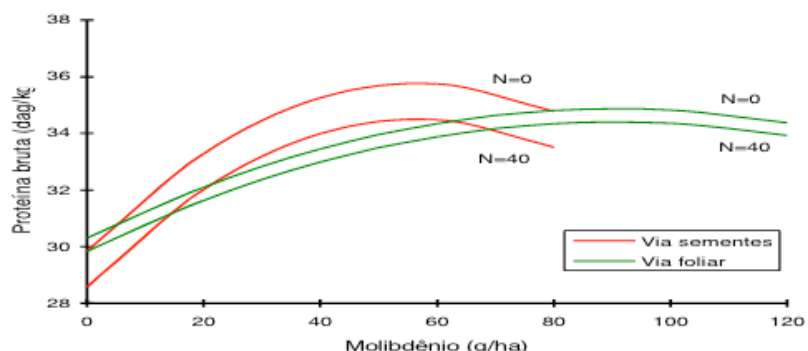
$$\hat{Y} = 29,84 - 0,03169 * N + 0,2086 * Mo - 0,001836 * Mo^2 \quad R^2 = 0,99$$

** Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 8 - Teores de proteína bruta nos grãos em função de doses de N em cobertura e de Mo via sementes, em Coimbra, no ano agrícola de 1996/97.

pulverização foliar (57 g/ha de Mo = 35,8 dag/kg e 91 g/ha de Mo = 34,9 dag/kg, respectivamente), mostrando maior eficiência do micronutriente em aplicação nas

sementes. Com a dose de 40 kg/ha de N, estes teores praticamente se equivaleram (57 g/ha de Mo = 34,5 dag/kg e 91 g/ha de Mo = 34,4 dag/kg, respectivamente) (Figura 9).



$$\text{Via sementes: } \hat{Y} = 29,84 - 0,03169 * N + 0,2086 * Mo - 0,001836 * Mo^2 \quad R^2 = 0,99$$

$$\text{Via foliar: } \hat{Y} = 30,30 - 0,01146 * N + 0,1009 * Mo - 0,0005572 * Mo^2 \quad R^2 = 0,78$$

** Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 9 - Cortes nas superfícies de resposta do teor de proteína bruta nos grãos, nas doses de 0 e 40 kg/ha de N em cobertura, em função de Mo via sementes e via foliar, em Coimbra, no ano agrícola de 1996/97.

3.2 Teor de N-orgânico nas folhas

N (kg/ha)	Mo (g/ha)	Viçosa		Coimbra	
		1995/96	1996/97	1995/96	1996/97
0	0	4,18	4,47	4,07	3,03
0	40	4,43	4,35	4,68	3,07
0	80	4,53	4,66	4,58	3,10
0	120	4,44	4,49	4,73	3,09
40	0	4,66	4,04	3,95	3,02
40	40	4,53	4,43	4,67	2,85
40	80	4,64	4,69	4,55	3,04
40	120	4,62	4,48	4,52	2,71
80	0	4,43	4,27	4,30	3,05
80	40	4,78	4,42	4,58	2,95
80	80	4,82	4,71	4,49	3,04
80	120	4,93	4,65	4,33	2,86
120	0	4,61	4,86	4,24	3,12
120	40	5,00	5,14	4,54	3,13
120	80	4,65	4,81	4,17	3,01
120	120	4,82	5,02	4,50	3,22
40 (0)	20 (40) (*)	4,63	4,53	4,42	3,17
40	40 (*)	4,87	4,49	4,42	2,75
40 (0)	60 (80) (*)	4,84	4,76	4,19	3,29
40	80 (*)	4,52	4,30	4,27	3,07

Quadro 3 - Teor médio de N-orgânico nas folhas (dag/kg), em Viçosa e Coimbra, nos anos agrícolas 1995/96 e 1996/97

(*) Tratamentos adicionais em que o Mo foi aplicado nas sementes e não nas folhas.

Entre parênteses, as doses usadas em 1996/97.

Em razão de ter sido significativa a interação locais x anos x tratamentos ($p < 0,01$), apresentar-se-ão, em seguida, os resultados das análises de regressão por experimento.

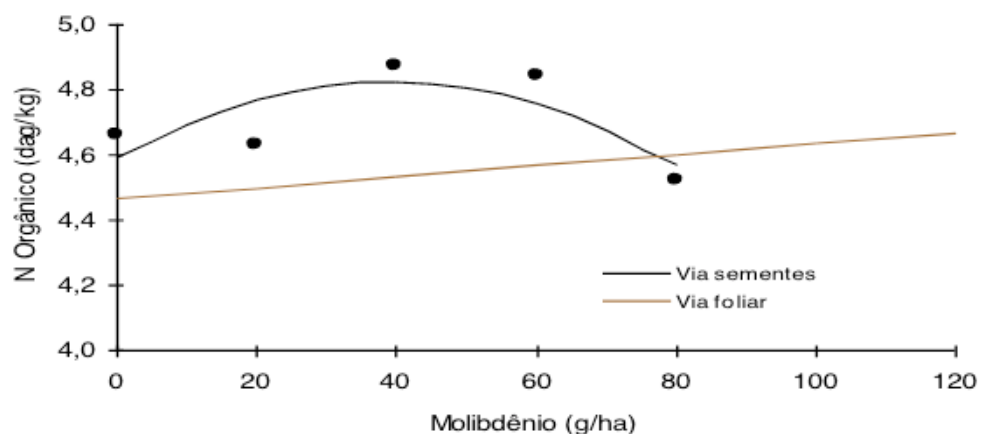
3.2.1 Ano Agrícola 1995/96

3.2.1.1. Viçosa

Houve efeito significativo do N e do Mo ($Y = 4,34 + 0,003144^{**} N + 0,001677^{**} Mo$; $R^2 = 0,62$), e a associação 120 kg/ha de N + 120 g/ha de Mo via foliar proporcionou um teor de N-orgânico nas folhas de 4,92 dag/kg, um incremento de 13,4% em relação a $N_0 Mo_0$.

Os tratamentos adicionais foram analisados, incluindo-se o tratamento $N_{40} Mo_0$ do fatorial. Houve efeito significativo do Mo ($Y = 4,59 + 0,01203 Mo - 0,0001542^{*} Mo^2$; $R^2 = 0,60$), com o máximo estimado (4,83 dag/kg) proporcionado por 39 g/ha de Mo nas sementes, um incremento de 5,2% em relação ao estimado com o tratamento $N_{40} Mo_0$.

Comparando as formas de aplicação do Mo (Figura 10), nota-se que a aplicação do micronutriente nas sementes, com 40 kg/ha de N, foi mais eficiente que a aplicação foliar, porquanto com menor dose de Mo (207,7% menor) atingiu-se maior teor de N-orgânico nas folhas (4,83 dag/kg com 39 g/ha de Mo “versus” 4,67 dag/kg com 120 g/ha de Mo). Quando se compararam os modos de aplicação do micronutriente nas combinações $N_{40} Mo_{40}$ e $N_{40} Mo_{80}$, verificou-se que somente na primeira combinação houve diferença significativa ($p < 0,05$), propiciando a aplicação nas sementes uma vantagem de 7,5% sobre a aplicação foliar.



Via sementes: $Y = 4,5920 + 0,01203 Mo - 0,0001542^{*} Mo^2$ $R^2 = 0,60$

$$\text{Via foliar: } Y = 4,4662 + 0,001677^{**} \text{ Mo } R^2 = 0,62$$

** e * Significativo em nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

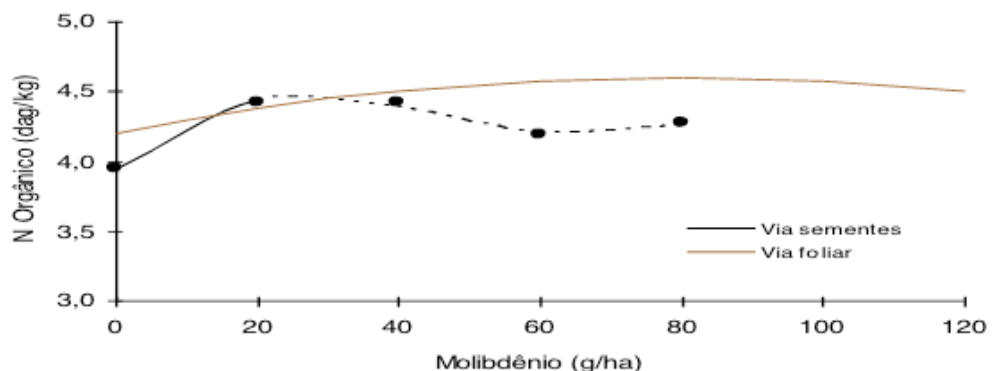
Figura 10 - Teores de N-orgânico nas folhas em função de doses de Mo via sementes e via foliar, com 40 kg/ha de N em cobertura, em Viçosa, no ano agrícola de 1995/96.

3.2.1.2. Coimbra

Houve influência significativa do N e do Mo. Constatou-se pequeno efeito depressivo das doses de N sobre o teor de N-orgânico nas folhas. A provável ação da interação N x S do fertilizante (sulfato de amônio), e (ou) a acidificação da rizosfera provocada por ele, aumentando a disponibilidade de alguns micronutrientes, teriam elevado a produção de matéria seca, resultando na diluição dos teores de N-orgânico nas folhas. ($Y = 4,25 - 0,001156 * N + 0,01003^{**} \text{ Mo} - 0,00006330^{**} \text{ Mo}^2$; $R^2 = 0,50$). Com 79 g/ha de Mo nas folhas, na ausência da aplicação de N, obteve-se um máximo estimado de 4,65 dag/kg de N-orgânico nas folhas, um incremento de 9,4% em relação ao tratamento $N_0 \text{ Mo}_0$, o que parece indicar um maior efeito do micronutriente na síntese e atividade da nitrogenase.

Com o emprego de doses crescentes de Mo nas sementes, constatou-se uma resposta cúbica do teor de N-orgânico nas folhas, fenômeno de difícil explicação biológica. Considerando apenas o ponto de máximo ($Y = 3,94 + 0,04454 \text{ Mo} - 0,001153 * \text{Mo}^2 + 0,000008078 * \text{Mo}^3$; $R^2 = 0,99$), 27 g/ha de Mo possibilitou 4,46 dag/kg de N-orgânico, um incremento de 13,2% em relação ao tratamento $N_{40} \text{ Mo}_0$.

Comparando as formas de aplicação do Mo, na presença de 40 kg/ha de N, observa-se (Figura 11) que o teor de N-orgânico nas folhas foi 3,04% inferior com o Mo nas sementes em relação à aplicação foliar (27 g/ha de Mo = 4,46 dag/kg e 79 g/ha de Mo = 4,60 dag/kg, respectivamente).



$$\text{Via sementes: } Y = 3,9431 + 0,04454 * \text{Mo} - 0,001153 * \text{Mo}^2 + 0,000008078 * \text{Mo}^3 \quad R^2 = 0,99$$

$$\text{Via foliar: } Y = 4,2061 + 0,01003^{**} \text{ Mo} - 0,00006330^{**} \text{ Mo}^2 \quad R^2 = 0,50$$

** e * Significativo em nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Figura 11 - Teores de N-orgânico nas folhas em função de doses de Mo via sementes e via foliar, com 40 kg/ha de N em cobertura, em Coimbra, no ano agrícola de 1995/96.

3.2.2 Ano Agrícola 1996/97

3.2.2.1. Viçosa

Houve efeito significativo do N e do Mo, constatando-se pequeno efeito depressivo do N, até a dose de 37,0 kg/ha, sobre o teor de N-orgânico nas folhas. Porém, acima dessa dose observou-se aumento desse teor ($Y = 4,31 - 0,006111^{**} N + 0,00008226^{**} N^2 + 0,006481^{**} Mo - 0,00003583^{*} Mo^2$; $R^2 = 0,79$) e 120 kg/ha de N, na ausência da aplicação do Mo, produziu um teor de N-orgânico de 4,76 dag/kg. Por sua vez, com a aplicação foliar de 90 g/ha de Mo, na ausência de aplicação de N, obteve-se um teor de 4,60 dag/kg. Com a associação de 120 kg/ha de N com 90 g/ha de Mo, o teor foi de 5,06 dag/kg, um acréscimo de 17,40% em relação ao do tratamento N_0Mo_0 , evidenciando a importância do micronutriente para a síntese e atividade da redutase do nitrato.

Os tratamentos adicionais também foram analisados como um fatorial, incluindo-se os tratamentos N_0Mo_0 e $N_{40}Mo_0$ do fatorial principal. Com a aplicação do Mo nas sementes, o teor de N-orgânico nas folhas cresceu linearmente e a dose de 80 g/ha de Mo, na ausência da aplicação de N, promoveu um teor de 4,72 dag/kg, um incremento de 6,1% em relação à N_0Mo_0 ($Y = 4,45 - 0,007744^{**} N + 0,003345^{*} Mo$; $R^2 = 0,75$). O sulfato de amônio provocou um efeito depressivo, possivelmente devido à diluição do teor de N-orgânico nas folhas com o aumento de produção de matéria seca.

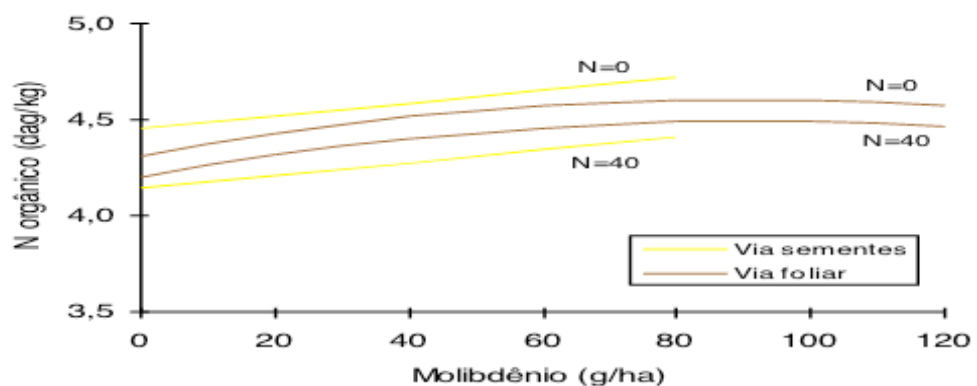
Comparando as formas de aplicação do Mo, nota-se (Figura 12) que, na ausência da aplicação de N, o teor foliar de N-orgânico foi 2,61% superior com a aplicação do Mo nas sementes do que com sua pulverização nas folhas (80 g/ha de Mo = 4,72 dag/kg e 90 g/ha de Mo = 4,60 dag/kg, respectivamente), mostrando maior eficiência da aplicação nas sementes, pois com dose 12,5% menor conseguiu-se melhor resultado. Na presença de 40 kg/ha de N, o N-orgânico foi 1,78% inferior com o emprego do Mo nas sementes (80 g/ha de Mo = 4,41 dag/kg e 90 g/ha de Mo = 4,49 dag/kg).

Quando se compararam os modos de aplicação do micronutriente nas combinações N_0Mo_{40} , N_0Mo_{80} , $N_{40}Mo_{40}$ e $N_{40}Mo_{80}$, verificou-se que somente nas duas últimas houve diferença significativa ($p < 0,05$). O tratamento $N_{40}Mo_{40}$ mostrou uma superioridade de 7,45% da aplicação do Mo via sementes em relação à via foliar, e o tratamento $N_{40}Mo_{80}$ evidenciou uma inferioridade de 8,32% quando o Mo foi administrado via sementes.

3.2.2.2. Coimbra

Houve efeito significativo apenas do N. O sulfato de amônio, até a dose estimada de 54,6 kg/ha de N, reduziu o teor de N-orgânico nas folhas, provavelmente devido ao efeito de diluição. Todavia, o emprego de 120 kg/ha de N produziu o teor

de 3,13 dag/kg, um acréscimo de 2,3% em relação à ausência da aplicação de N ($Y = 3,06 - 0,005375^{**} N + 0,00004920^{**} N^2$; $R^2 = 0,95$). É possível que, com até 54 kg/ha N, tenha havido maior produção de matéria seca, causando um efeito de diluição nos teores de N-orgânico nas folhas, a exemplo do que ocorreu nesse mesmo local em 1995/96. Por ocasião da coleta de folhas para análise, observou-se pequena nodulação das plantas em todos os tratamentos, provavelmente devido à presença no solo de algum fator desfavorável ao desenvolvimento das estirpes de *Bradyrhizobium* inoculadas. Isso pode ter contribuído para o não-efeito do Mo. As doses de Mo, quando aplicadas nas sementes, também não mostraram efeito significativo sobre o teor de N-orgânico nas folhas, provavelmente por causa dos mesmos



$$\text{Via sementes: } Y = 4,4516 - 0,007744^{**}N + 0,003345^{*}Mo \quad R^2 = 0,75$$

$$\text{Via foliar: } Y = 4,3118 - 0,006111^{**}N + 0,00008226^{**}N^2 + 0,006481^{**}Mo - 0,00003583^{*}Mo^2 \quad R^2 = 0,79$$

** e * Significativo em nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Figura 12 - Cortes nas superfícies de resposta do teor de N-orgânico nas folhas, nas doses de 0 e 40 kg/ha de N em cobertura, em função de Mo via sementes e via foliar, em Viçosa, no ano agrícola de 1996/97.

motivos apresentados para a aplicação por via foliar. Entretanto, a dose de 40 kg/ha de N, em relação à ausência de sua aplicação, elevou em 5,0% esse teor.

Com o tratamento $N_0 Mo_{80}$, o teor de N-orgânico nas folhas foi 11,3% inferior com a aplicação do Mo nas sementes em relação ao seu emprego por via foliar ($p < 0,05$). Por outro lado, o tratamento $N_{40} Mo_{40}$ evidenciou uma vantagem de 15,4% com a aplicação do Mo via sementes ($p < 0,01$).

4 | CONCLUSÕES

O teor de proteína bruta nas sementes foi, geralmente, aumentado pela aplicação de Mo e, às vezes, pela do N.

A dose mais favorável de Mo em aplicação foliar para a PB variou de 82 a 120 g/ha.

Em três experimentos o Mo aumentou o teor de N-orgânico nas folhas e a dose mais favorável variou de 79 a 120 g/ha, em aplicação foliar, e de 27 a 80 g/ha, quando administrada via sementes.

Em três experimentos o N incrementou o teor de N-orgânico, sendo 120 kg/ha a dose mais favorável.

Sozinho, o Mo trouxe aumentos do teor de N-orgânico que variaram de 4,6 a 9,4%, enquanto o efeito isolado do N foi de 2,0 a 10,4%.

Quando houve efeito conjunto de N e Mo, o aumento do teor de N-orgânico variou de 13,4 a 17,4%.

Para o teor de N-orgânico, não houve diferença entre a aplicação do Mo nas folhas ou nas sementes ou, então, a aplicação nas sementes foi mais eficiente.

REFERÊNCIAS

AMANE, M.I.V. **Adubação nitrogenada e molíbdica da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) na Zona da Mata de Minas Gerais: efeitos de doses, calagem e rizóbio**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 83p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

AMANE, M. I. V.; VIEIRA, C.; CARDOSO, A. A.; ARAÚJO, G.A. de A. Resposta de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) às adubações nitrogenada e molíbdica. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 41, p. 202-216, 1994.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. Washington, D.C.: 1970. 1015 p.

BERGER, P.G.; VIEIRA, C. & ARAÚJO, G. A. de A.; CASSINI, S.T.A. Peletização de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com carbonato de cálcio, rizóbio e molibdênio. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 42, p. 562-574, 1995.

FEHR, W.R. & CAVINESS, C.E. Stages of soybean development . Special Report 80. **Co-operative Extension Service**. Ames, Iowa: Iowa State University, 1977. 11 p.

HANWAY, J.J., WEBER, C.R. Accumulation of N, P and K by soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants. **Agron. J.**, v. 63, n. 3, p. 406-408, 1971. HARDY, R.W.F., BURNS, R.C., HERBERT, R.R., HOLSTEN, R.D., JACKSON, E.K. Biological nitrogen fixation: a Key to World protein. In: LIE, T.A., MULDER, E.G., (Eds.). **Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats**. The Hague: Nijhoff, 1971. p. 561-590.

JACKSON, C.M. **Soil chemical analysis**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1965. p. 195-96.

LANTMANN, A.F.; SFREDO, G.J.; BORKERT, C.M.; OLIVEIRA, M.C.N. de. Resposta da soja a molibdênio em diferentes níveis de pH do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 13, p. 45-49, 1989.

LINDNER, R.C. Rapid analytical methods for some of the more common inorganic constituents of plant tissues. **Plant Physiol.**, 19:76-89, 1944.

PARKER, M.B., HARRIS, H.B. Soybean response to molybdenum and lime and the relationship between Yield and chemical composition. **Agron. J.** v. 54, n. 6, p.

480-483, 1962.

VARGAS, M.A.T., PERES, J.R.R., SUHET, A.R. Adubação nitrogenada, inoculação e épocas de calagem para a soja em um solo sob cerrado. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.17, n.8, p.1127-1132, 1982.

VARGAS, M.A.T., SUHET, A.R. Efeito de tipos e níveis de inoculantes na soja cultivada em um solo de cerrado. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 15, n. 3, p. 343-347, 1980.

VIEIRA, C.; NOGUEIRA, A. O.; ARAÚJO, G. A. de A. Adubação nitrogenada e molibídica na cultura do feijão. **Revista de Agricultura**, v. 67, p. 117-124, 1992.

TEORES DE MANGANÊS EM *Pereskia Grandifolia* Haw.

Nelma Ferreira de Paula Vicente

Doutoranda em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares - Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, nellmaferreira@hotmail.com

Erica Alves Marques

Doutoranda em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares - Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, ericagroeng@yahoo.com.br

Michelle Carlota Gonçalves

Doutoranda em Microbiologia Agrícola - Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, michellemicroagricola@gmail.com

Abraão José Silva Viana

Doutorando em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares - Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, abraaojsv@yahoo.com.br

Adjaci Uchôa Fernandes

Professor Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Universidade Anhembi Morumbi, Engenharia Biomédica, SP.adjaci@hotmail.com

Roberta Hilsdorf Piccoli

Profesora Titular, Departamento de Ciências dos Alimentos – Universidade Federal de Lavras, rhpiccoli@dca.ufla.br

originária de regiões temperadas e tropicais das Américas, particularmente em clima quente e seco. Apresenta elevado conteúdo protéico de alta digestibilidade, fibras do tipo mucilagens e diversos minerais, despertando o interesse das indústrias alimentícias e farmacêuticas. A ora-pro-nobis é considerada uma hortaliça não-convencionalé sendo uma fonte alternativa de proteína e opção de diversificação cultural, na atividade agropecuária, e sobretudo na agricultura familiar, para populações rurais e urbanas de baixa renda. E seu entretanto pouco se sabe sobre a composição de seus micronutrientes. Dentre esses, destaca-se o manganês, micronutriente importante como co-fator enzimático, influenciando em diversos aspectos fisiológicos das células humanas. Nesse trabalho foi avaliado a concentração de manganês nas folhas, no caule e nas flores da *P. grandifolia* Haw. Amostras foram trituradas em moinho elétrico para se obter amostras homogêneas, colocadas em frascos e mantidas à temperatura ambiente. A análise do mineral foi realizada utilizando espectrofotometria de absorção atômica acoplado a UV/Vis. O teor de Mn encontrados nas folhas de *P. grandifolia* foie 63,6 mg/Kg e no caule 1,9 mg/Kg entretanto, o Mn não foi encontrado nas flores. Conclui-se que a hortaliça não convencional ora-pro-nobis é uma importante fonte de manganês uma vez que a parte principal da planta que é comumente

RESUMO: *Pereskia grandifolia* Haword, popularmente conhecida como ora-pro-nóbis, é

utilizada na culinária é a folha.

PALAVRAS-CHAVE: Hortaliça não convencional, composição mineral, oro-pro-nobis.

CONTENTS OF MANGANÊS IN *Pereskia Grandifolia* Haw.

INTRODUÇÃO

Pertencente à família botânica Cactaceae, *Pereskia grandifolia* Haword é popularmente conhecida como ora-pro-nóbis, originários de regiões temperadas e tropicais das Américas, particularmente de clima quente e seco, compreendendo plantas arbóreas, perenes de hábito variado e geralmente espinhosas, possuem caules lenhosos bem desenvolvidos, folhas suculentas e flores terminais dispostas em cimeiras é uma hortaliça não convencional consumida pelas populações rurais e urbanas (Souza, 2016).

Devido à beleza de suas flores *P. grandifolia* Haw. tem sido cultivada como planta ornamental. Dados etnobotânicos revelam que as folhas são empregadas topicamente como emoliente na medicina popular, em razão do seu conteúdo mucilaginoso. Na Malásia as folhas desta espécie são usadas no tratamento de câncer, hipertensão, diabetes mellitus e doenças associadas ao reumatismo. No Brasil são consumidas na culinária do estado de Minas Gerais, sendo comumente encontrada nessa região, levando indústrias alimentícias a incluí-las em complementos alimentares, devido ao alto teor do biopolímero arabinogalactana (Simão, 2015).

Em virtude da presença destes compostos e do elevado conteúdo protéico de alta digestibilidade com fibras do tipo mucilagens e minerais, essas plantas têm despertado o interesse das indústrias alimentícias e farmacêuticas. Estudos mostram que tais características são alternativas alimentares, com muitos benefícios nutricionais para a saúde humano (De Almeida, 2016).

O corpo humano contém em média 15 a 20 mg de manganês. A maior parte é encontrada nos ossos, com o resto distribuído por todo o corpo em tecidos como o pâncreas, rins, fígado, glândulas adrenais e glândulas pituitárias. As principais fontes de manganês da dieta incluem cereais, sementes, vegetais, frutas e vinhos (Cheow, 2019). No sangue, o manganês encontra-se principalmente nos eritrócitos, em níveis mais elevados é possível encontrá-lo no fígado, conjugado aos sais biliares. A distribuição do manganês é grande nos tecidos e líquidos do organismo, principalmente onde a atividade das mitocôndrias é maior. O papel do manganês é considerável na medida em que ele ativa numerosas enzimas, aplicadas em variados processos fisiológicos (Carvalho, 2019). As hortaliças não-convencionais como a ora-pro-nobis são uma alternativa alimentar e uma opção de diversificação cultural, na atividade agropecuária, sobretudo na agricultura familiar, para populações rurais e urbanas de baixa renda, entretanto, devido a falta de informações por parte da

população reduz seu consumo (DE VASCONCELOS, 2019).

OBJETIVO

Objetivou-se avaliar a presença do micronutriente manganês nas folhas, no caule e nas flores da *P. grandifolia* Haw.

MATERIAL E MÉTODOS

Exsicatas da espécie foram registadas no herbário PAMG da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) sob o número de registo PAMG 58224. A hortaliça foi coletada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em outubro de 2016; um galho de cada planta foi sorteado, e neste foi retirado todas as folhas, caules e flores.

As folhas foram imersas em água destilada durante 10 min para lavagem, e posteriormente, junto com os caules e flores, foram submetidas à desidratação em estufa ventilada, a 55°C, durante 24 horas. Após o período de secagem, as amostras foram trituradas em moinho elétrico Tipo Wiley com peneira de 20 mesh. Após o período de secagem, as amostras foram trituradas em moinho elétrico para se obter amostras homogêneas, colocadas em frascos e mantidas à temperatura ambiente. A análise do mineral foi realizada seguindo metodologia sugerida por Malavolta et al (1997), utilizando espectrofotometria de absorção atômica acoplado a UV visível, no Departamento de Química da UFLA.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O teor de manganês (Mn) (mg/Kg) encontrado nas folhas e no caule foram 63,6 e 1,9, já nas flores o mineral não foi detectado.

Takeiti (2009), avaliando a composição dos nutrientes presentes em *P. aculeata*, também encontrou valores elevados de manganês nas folhas (46,4 em 100g de folha seca), justificando ser este um constituinte encontrado em grandes quantidades devido à glutamina sintetase mitocondrial, piruvato carboxilase e superóxido dismutase mitocondrial, ser uma enzima primária na defesa ant-oxidante das folhas. Almeida (2014), realizando caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nobis, também observou altos teores de manganês para *P. aculeata* (43,48 em 100g de folha), sendo tais valores próximos aos observados neste estudo em *P. grandifolia*.

De acordo com Oliveira (2017), as diferenças na composição química das espécies de plantas, está diretamente relacionado com a composição química do solo e a adubação recebida pelo mesmo, sendo está de preferência orgânica. Neste

contexto a caracterização química de *P. grandifolia* está diretamente associada ao mesmo.

Mahan (2002), em estudos com *Pereskia aculeata* Mill, afirma que o teor de nutriente encontrada em raiz, caule e folhas de qualquer espécie está diretamente associado ao tipo de solo sua acidez e nutrição, sendo o mesmo princípio aplicado ao gênero *Pereskia*.

Conforme regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de manganês é de 2,3 mg/dia para um adulto (FAO/OMS). Uma folha de *P. grandifolia* tem aproximadamente 25 g (fresca), sendo o teor de umidade em torno de 76%, portanto uma folha tem em média 6 g de matéria seca, sendo assim, para atingir a necessidade diária de manganês é necessário o consumo de seis (6) folhas da espécie.

De acordo com os resultados, podemos observar que as folhas têm um teor muito elevado em manganês quando comparado com outras partes da planta, embora não há estudos de biodisponibilidade sobre minerais em relação a esta espécie.

CONCLUSÕES

Conclui-se que as folhas da hortaliça não convencional, ora-pro-nobis são uma importante fonte de manganês por apresentar quantidade significativa do mineral, já no caule, o mineral está presente em baixa quantidade e nas flores o mesmo não foi encontrado. Portanto, a ora-pro-nobis pode ser usada na complementação das necessidades diárias do mineral para um adulto, contribuindo nutricionalmente como um micronutriente importante para a saúde humana.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. E. F., JUNQUEIRA, A. M. B., SIMÃO, A. A., CORRÊA, A. D. **Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pronobis**. Bioscience Journal, 30(3 SUPPL. 1), 431–439, 2014.

CARVALHO, M. F. F. et al. **Centesimal evaluation of two species of ora-pro-nobis (pereskia aculeata miller and pereskia grandifolia haw) and application in extruded product**. Chemical Engineering Transactions, v. 75, p. 325-330, 2019.

CHEOW, P. S. et al. **Effects of methanolic plant extracts on cell proliferation and HIF activity under hypoxic condition in vitro**. Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, v. 27, n. 1, p. 1-9, 2019.

DE ALMEIDA, M. E. F. et al. **Chemical characterization of the non-conventional vegetable known as ora-pro-nobis**. Bioscience Journal, v. 30, n. 3 SUPPL. 1, p. 431-439, 2014.

DE ALMEIDA, M. E. F. et al. **Improvement of physiological parameters of rats subjected to hypercaloric diet, with the use of Pereskia grandifolia (Cactaceae) leaf flour**. Obesity Research and Clinical Practice, v. 10, n. 6, p. 701-709, 2016.

DE VASCONCELOS, L. V. F.; GONZAGA, D. R.; DA CUNHA REIS, R. C. **Cactaceae in the Serra da Tiririca State Park, Rio de Janeiro, Brazil.** Rodriguesia, v. 70, 2019.

FAO/OMS. **Human and Mineral Requirements.** In: Report 7th Joint FAO/OMS Expert Consultation. Bangkok, Thailand, 286p., 2001.

FREITAS, E. do C. et al. **ANÁLISES DE MINERAIS ZINCO E MANGANÊS PRESENTES NA FARINHA DO MORANGO.** Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento, São Paulo. v.10. n.60. p.303-307. Nov./Dez. 2016

MAHAN, L. K. (ed). **Krause: Alimentos, Nutrição & Dietoterapia**, 10 ed; São Paulo: Roca, 2002. p 63-67. MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas. Piracicaba: Potafós, 1997. 319p.

OLIVEIRA, K. J. B. et al. **Propriedades nutricionais e microbiológicas do solo influenciadas pela adubação verde.** Revista de Ciências Agrárias, Lisboa, v. 40, n. 1, mar., p. 23-33, 2017.

SIMÃO, A. A.; Correa, A. D.; Carvalho, T. C. L.; Cesar P. H. S.; Oliveira, C. H. M; Marcussi, S. **Pharmaco-toxic characterization of the aqueous extract from Pereskia grandifolia leaves.** Journal of Medicinal Plants Research, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 216-222, Feb. 2015.

SOUZA, L. F. et al. **Temperature requirements for seed germination of Pereskia aculeata and Pereskia grandifolia.** Journal of Thermal Biology, v. 57, p. 6-10, 2016.

TAKEITI, C. Y.; ANTONIO, G. C.; MOTTA, E. M. P. **Nutritive evaluation of nonconventional leafy vegetable (Pereskia aculeata Miller).** International Journal of Food Sciences and Nutrition, v. 60, n. 1, p. 148-60, 2009.

THE HEIGHT OF CROP RESIDUES INFLUENCES INTAKE RATE OF SHEEP IN INTEGRATED CROP-LIVESTOCK SYSTEMS

Delma Fabíola Ferreira da Silva

Instituto de Paranaense de Assistência técnica e
Extensão Rural
Quedas do Iguaçu, Paraná

Carolina Bremm

Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária,
Departamento de Estatística
Porto Alegre, Rio Grande do Sul

Vanessa Sehaber

Universidade Estadual do Paraná, Departamento
de matemática
Campo Mourão, Paraná

Natália Marcondes dos Santos Gonzales

Resson, Departamento de Agronomia
Fredericton, New Brunswick

Breno Menezes de Campos

Serviço de Inteligência do Agronegócio
Porto Alegre, Rio Grande do Sul

Anibal de Moraes

Universidade Federal do Paraná, Departamento
de Fitotecnia
Curitiba, Paraná

Anderson M. S. Bolzan

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Departamento de Plantas Forrageiras
Porto Alegre, Rio Grande do Sul

Alda Lucia Gomes Monteiro

Universidade Federal do Paraná, Departamento
de Fitotecnia
Curitiba, Paraná

Paulo César de Faccio Carvalho

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Departamento de Plantas Forrageiras
Porto Alegre, Rio Grande do Sul

RESUMO: No sul do Brasil, soja e milho são as principais culturas utilizadas nos Sistemas Integrados de Produção agropecuária. Após a colheita, seus resíduos permanecem no solo enquanto o pasto está sendo restabelecido. O objetivo deste estudo é verificar se resíduos de culturas predecessoras em pastagens de azevém alteram a taxa de ingestão e os padrões de pastejo de cordeiros. Foram realizados dois experimentos, ambos com azevém, com quatro alturas de resíduo (0, 15, 30 e 45 cm) da safra de soja predecessora (experimento 1) e da safra de milho predecessora (experimento 2). A massa da mordida e a taxa de ingestão curto prazo foram estimadas pela técnica de dupla pesagem. Os padrões de pastejo foram medidos com gravadores comportamentais. A taxa de mordida foi a principal variável que determinou a taxa de ingestão. No experimento 1, poucas alterações ocorreram a nível de bocado. No experimento 2, a taxa de ingestão foi maior no resíduo da colheita de 15 cm ($p = 0,0115$). Portanto, não foram recomendadas alterações no manejo da altura do resíduo e azevém em pastagens com resíduos de soja.

No entanto, na colheita predecessora milho, recomenda-se resíduos de milho de 15 cm de altura.

A ALTURA DE RESÍDUOS DE LAVOURAS INFLUENCIA A TAXA DE INGESTÃO DE OVELHAS EM SISTEMAS INTEGRADOS PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA

ABSTRACT: In southern Brazil, soybean and corn are the main crops used in Integrated Crop-Livestock Systems (ICLS). After these crops are harvested, residues remain on the ground as the pasture is being reestablished. The objective of this study is to verify if wood residues of predecessor crops on an Italian ryegrass pasture can alter the intake rates and grazing patterns of lambs. Two experiments were performed, both using ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.), with four different residue heights (0, 15, 30 and 45 cm) from the predecessor soybean crop (experiment 1) and the predecessor corn crop (experiment 2). Bite mass and short-term entry rate were estimated by the double weighing technique. Necklace patterns were measured with behavioral recorders. Bite rate was the major variable determining the intake rate. In experiment 1, time rate was not high for crop residues of 14 cm ($p = 0.003$) due to pasture structure. In experiment 2, a reference rate was higher in the crop residue of 15 cm ($p = 0.0115$). Therefore, there were no recommended changes in the height management of ryegrass in pastures with soybean residues. However, when the predecessor crop is corn, a short-term permanence rate is recommended for improving animal grazing in a pasture with corn residues of 15 cm of height.

1 | INTRODUCTION

Integrated crop-livestock systems (ICLS) is the opposite of unilateral monoculture systems and is commonly used in integrated agricultural and livestock activities, at different spatial-temporal scales, concurrently or sequentially in rotation or succession (MORAES et al., 2014). Thus, rotation occurs in the same area, leading to residues of the predecessor crop at the pasture phase (GILLER et al., 2015). In Southern Brazil, soybean and maize (*Glycine max* L. and *Zea mays* L.) are the most prominent crops (BRAZILIAN INSTITUTE OF GEOGRAPHY AND STATISTICS, 2014). Italian ryegrass pastures are usually used during the winter as an option for rotation with those summer crops (CARVALHO et al., 2010). This annual pasture returns by natural reseeding in the following year (CARVALHO et al., 2005). Soon after the crop is harvested, some crop residues remain vertically on the soil. Consequently, crop harvesting is an important process in the subsequent pasture management, as the crop residues will be part of the grazing environment (BARTH NETO et al., 2014).

There is no information on how the vertical residues of precedent crops can affect the grazing process, and how it interferes modifying the grazing environment and / or constraining animal intake rate.

This is important because grazing animals have the ability to change their intake rate as a consequence of behavioral decisions (NEWMAN, 1994). Thus, modifications on grazing environment and sward surface structure can affect the grazing process: bite mass (BM), bite rate (BR), and non-biting rates (NBR).

The aim of this study was to quantify if predecessor soybean or maize crop residues can alter patterns of grazing at the bite level and verify if there is an ideal cut-off height of the predecessor crop that maintains the intake rate at its maximum.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 Experimental area

This study was conducted at the experimental farm of the Federal University of Rio Grande do Sul, in Southern Brazil (30°05' S; 51°39' W). The ICLS protocol consisted in the rotation, on the same area, of an Italian ryegrass pasture grazed by ewe lambs during the winter and a soybean and maize grain crops rotation cultivated during the summer. Italian ryegrass pasture was established by self-seeding. The region is classified as subtropical humid (Cfa classification, KÖPPEN; GEINGER, 1928). The soil at the experimental site is determined as a Typic Paleudult (USDA, 1999) with 15.2% clay. This experimental protocol was conducted from November 2013 to August 2014.

Four paddocks of 150 m² of Italian ryegrass, previously delimited and surrounded with electro-plastic fences were used.

The climatic conditions were similar in temperature during the evaluation period. Mean daily temperature variation was 7.5°C. The maximum temperature was 22 °C (July 13th, 2014) and the minimum temperature was 5 °C (July 19th and 07th, 2014) (ACCUWEATHER, 2014).

2.2 Treatments

Experiment 1 consisted of four heights of predecessor soybean crop residues (PSCR: 0, 7, 14 and 21 cm). Experiment 2 consisted of four heights of predecessor maize crop residues (PMCR: 0, 15, 30, 45 cm). In both experiments, the experimental design was a completely randomized block with four replicates, and the blocking criterion was the time of the day for the evaluation (morning and afternoon).

The Italian ryegrass sward surface height (SSH) was maintained constant at 18.5 cm during the experimental period, which is the recommended SSH for grazing (SILVA, unpublished data). The Italian ryegrass received application of 75 kg ha⁻¹ of nitrogen (urea), on July 7th.

2.3 Management practices

The sowing of summer crops was, for experiment 1 and 2, held on November 25th and 27th of 2013 respectively (soy-BRX Power RR and maize hybrids DKB290), by direct seeding on the line, with row spacing of 43 cm.

The experimental area was manually prepared using brushcutters after crop harvesting (May 23th, 2014) according to the intended treatments ($p < 0.001$), which were close to the ground and 7, 14 and 21 cm from the ground (experiment 1/soybean residue) or close to the ground, 15, 30, and 45 cm (experiment 2/maize residue).

2.4 Sward measurements

In both experiments, Italian ryegrass pastures were considered in vegetative stage, because less than 0.5% of the tillers had inflorescences (Tables 1 and 3). Three were collected per experimental unit, in order to determine the post-grazing herbage mass and herbage density. Strata was cut every 5 cm using a 0.1089 m² square. All samples were separated into leaf lamina, pseudo-stems+ stems + sheaths, dead material, weed mass and inflorescence and then weighed. Samples were then dried at 65 °C for at least 72 h to determine the dry matter (DM) content. The total herbage mass was determined as the sum of the mass of each component (leaf lamina, pseudo-stems + sheaths and dead material). To determine the SSH of Italian ryegrass, a sward stick was used to measure 150 points per experimental unit (\approx one point by m²) pre- and post-grazing (BARTHAM, 1985). After the emergence of the Italian ryegrass, SSH were measured daily within the paddocks to monitor their development until reaching the pre-grazing SSH of 18.5 cm. The grazing tests started on July 9th for PSCR paddocks and on July 14th for PMCR paddocks.

The DM content of simulated grazing samples was estimated by cutting four samples from each experimental unit (HALLS, 1954). The samples were harvested in the superior stratum of the sward surface because there is a 50% proportional relationship between the herbage removed with each bite and the SSH (CANGIANO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2009; LACA et al., 1992). Then samples were dried at 65 °C for at least 72 h to determine the dry matter (DM) content.

2.5 Animal measurements

In both experiments, approximately 60 days before the grazing tests, the animals were familiarized with observers, recording equipment, and the experimental procedures and remained in an adjacent paddock with Italian ryegrass sward.

Six Texel ewe lambs were used in each experiment, consisting of four “tester” animals (6 ± 1 months and 35 ± 2.6 kg of body weight), and two additional “peer” animals. This procedure was lead to prevent any effect of group size during lambs grazing time (PENNING et al., 1993). The animals were allowed to graze in periods of 45 min during peak grazing times, the first and the last grazing meals, respectively

(HODGSON, 1990). The animals were not fasted prior to the grazing periods because this reduce diet selection (NEWMAN et al., 1994). The experimental procedure was adapted from Penning and Hooper (1985).

At dawn, the animals were taken to a weighing area, and the four “tester” animals were fitted with feces and urine collecting bags. They were also fitted with IGER Behaviour Recorders (RUTTER et al., 1997), to identify and characterize jaw movements [biting (bite severing), non-biting jaw movements (manipulation + ingestive mastication)], and to determine the eating time [time at which ewe lambs were head down and completely involved in severing, manipulating, and masticating bites (grazing = eating + searching times)]. These data were used to calculate bite mass (BM), bite rate (BR), non-biting jaw movements (N-BJMR), and total jaw movements (TJM) per gram of herbage dry matter intake (DMI).

After approximately 45 min of grazing, the animals were removed from the paddock, reweighed and then kept in a non-vegetated area without access to water and food to determine the rate of insensible weight loss (evaporation of H₂O, and gaseous losses; GIBB et al., 1999) during another 45 min. This entire procedure was repeated in the afternoon. Data were analyzed with the Graze software (RUTTER et al., 1997). The effect of period of day (morning and afternoon) was blocked in the analysis due to changes in the preferences of animals over the course of the day (RUTTER, 2006).

All animals’ weights (pre- and post-grazing and pre- and post-insensible weight losses) were taken on a balance with an accuracy of 10 g. The short-term intake rate was calculated by the equation:

$$STIR = \frac{(W2 - W1)}{t2 - t1} + \frac{(W3 - W4)}{t4 - t3} \times \frac{(t2 - t1)}{ET}$$

Where: STIR=short-term herbage intake rate; W1 and W2=animal’s weight after and before grazing; t1 and t2=time pre- and post-grazing; W3 and W4=animals’ weight pre- and post-insensible weight losses; t3 and t4=time pre- and post-insensible weight losses; and ET=effective eating time.

The STIR was corrected for the DM content. STIR was calculated as the product of the fresh weight intake rate and the DM content of the herbage consumed by animals (determined from hand-plucked samples).

For calculating effective eating time (ET, the total grazing time excluding intervals of jaw inactivity of more than 3 s; GIBB, 1998). Time spent for bite was calculated ET/total number of bites. The BM was calculated as the ratio between STIR and the number of bites. The BR was determined by dividing the total number of bites by the eating time. The TJM was calculated by adding the chewing and seizure movements (bites) recorded by the IGER. The N-BJMR refers to those movements that are not identified as bites during grazing and therefore include movements that

have a masticatory or manipulative function.

These were calculated as the number of N-BJMR divided by the ET. The intra-meal interval of grazing was considered intervals of jaw inactivity from 3 until 300 s. The number of intra-meal interval of grazing (NIMI) was the total amount of intervals given during the evaluation (GIBB, 1998).

2.6 Data analysis

Data were subjected to analysis through R software for statistical computing version 3.1.3 (R Development Core Team, 2015) and through R studio. Mixed linear models were used and developed with the nlme4 package.

All variables (behavioral and sward) showed a normal distribution, checked by MASS package with the Box-Cox test ($p > 0.05$). In all analysis, paddock and test group were used as experimental unit. The structure of these models were selected based on interaction between time of day (morning and afternoon). Data were subjected to variance analysis (ANOVA) at 5% level of significance. The model included the fixed effects for treatment heights according to the experiment (1 or 2), and random effects of parcel and animal. If any significance was detected it was then compared by the Tukey test ($p < 0.05$).

3 | RESULTS

3.1 Predecessor soybean crop experiment – Experiment 1

The actual SSH was similar to the targeted SSH (Table 1). Vertical distribution of herbage mass and morphological components of sward surface (leaf, pseudo-stems + sheaths, dead material mass and inflorescence) are shown in Table 1. The amount of dead material mass and inflorescence mass did not differ between treatments.

	Predecessor soybean crop residue (cm)				Mean \pm sd	<i>p</i> - value
	0	7	14	21		
Residue diameter (mm)	—	6.9	6.8	6.0	6.6 \pm 1.9	<0.001
Pre-grazing SSH (cm)	19.8	20.1	18.4	21.7	20.1 \pm 2.1	0.532
Post-grazing SSH (cm)	18.1	18.3	16.8	22.6	19.2 \pm 2.5	0.116
HM (Kg DM ha ⁻¹)	1509.9	1362.8	1783.5	1250.0	1483.9 \pm 341.2	0.174
LM (Kg MS ha ⁻¹)	928.1 ab	936.4 ab	1221.0 a	794.1 b	971.0 \pm 257.5	0.018*
PSM (Kg DM ha ⁻¹)	499.1	379.5	479.3	400.1	445.5 \pm 127.0	0.475
DMM (Kg DM ha ⁻¹)	72.9	40.0	54.8	46.6	55.20 \pm 34.7	0.388
IM (Kg DM ha ⁻¹)	1.9	3.0	0.3	3.0	2.02 \pm 3.0	0.412

Table 1: Residue diameter of predecessor soybean crop (experiment 1), pre-grazing sward surface height (SSH), post-grazing SSH, herbage mass (HM), leaf mass (LM), pseudostems and sheaths mass (PSM), dead material mass (DMM), inflorescence mass (IM) of Italian ryegrass (*L. multiflorum* Lam.) grazed by ewe lambs as a function of different predecessor soybean crop

residue heights.

sd = Standard deviation; p = significance level.

Animal behaviour variables	Predecessor soybean crop residue (cm)				Mean \pm sd	p -value
	0	7	14	21		
STIR (g DM.min ⁻¹)	5.1 \pm 1.9 b	5.4 \pm 2.1 b	8.3 \pm 4.5 a	5.4 \pm 2.1 b	6.2 \pm 3.2	0.005*
BM (mg DM.min ⁻¹)	88.5 \pm 34.9	99.7 \pm 34.3	144.6 \pm 88.2	94.2 \pm 36.9	107.8 \pm 58.6	0.055
BR (bite.min ⁻¹)	60.9 \pm 14.9	55.4 \pm 14.0	58.9 \pm 12.6	58.7 \pm 18.9	58.9 \pm 14.3	0.486
N-BJMR (no.min ⁻¹)	68.1 \pm 18.8	65.4 \pm 18.4	67.0 \pm 16.3	72.0 \pm 23.4	67.9 \pm 18.2	0.782
TSB (sec.bite ⁻¹)	1.1 \pm 0.3	1.14 \pm 0.3	1.5 \pm 0.2	1.1 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3	0.835
TJM (no.min ⁻¹)	128.9 \pm 9.6	120.7 \pm 6.8	125.9 \pm 12.9	130.5 \pm 6.9	126.7 \pm 10.1	0.809
NIMI (n°)	18.3 \pm 5.7 b	33.1 \pm 14.9a	18.2 \pm 13.5b	21.8 \pm 6.7ab	21.9 \pm 11.8	0.025*
IMID (min.)	0.2 \pm 0.1 b	0.3 \pm 0.1 a	0.2 \pm 0.1 ab	0.2 \pm 0.1 ab	0.2 \pm 0.08	0.027*

Table 2: Short-term intake rate (STIR), bite mass (BM), bite rate (BR), non-biting jaw movements rate (N-BJMR), time spent for bite (TSB), total jaw movements rate (TJM), number of intra-meal interval of grazing (NIMI), and Intra-meal interval duration (IMID) for ewe lambs grazing Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) as a function of different predecessor soybean crop residue heights.

sd = Standard deviation; p = significance level.

3.2 Predecessor maize crop – Experiment 2

There was no significant difference between the mean of pre and post grazing SSH in any of the treatments ($p = 0.626$).

	Predecessor maize crop residue (cm)				Mean \pm sd	p -value
	0	15	30	45		
Diameter of residue (cm)	—	18.1	18.6	19.5	18.8 \pm 3.17	<0.001
Pre-grazing SSH	16.7 b	19.5 a	21.1 a	21.6 a	20.1 \pm 2.8	0.001*
Post-grazing SSH	14.4 b	18.5 a	19.2 a	20.5 a	18.6 \pm 3.3	0.002*
HM (kg DM ha ⁻¹)	1357.1	1343.1	1416.2	1532.7	1439.0 \pm 259.7	0.640
LM (Kg MS ha ⁻¹)	854.2	745.3	982.9	970.0	919.5 \pm 201.5	0.337
PSM (Kg DM ha ⁻¹)	314.5	395.1	317.4	412.9	369.3 \pm 100.5	0.193
DMM (Kg DM ha ⁻¹)	135.9	99.9	76.3	110.0	105.0 \pm 36.36	0.377
IM (Kg DM ha ⁻¹)	31.0	9.3	11.2	6.2	8.7 \pm 3.9	0.208

Table 3: Residue diameter of predecessor maize crop, pre-grazing sward surface height (SSH), post-grazing SSH, herbage mass (HM), leaf mass (LM), pseudostems and sheaths mass (PSM),

dead material mass (DMM), inflorescence mass (IM) of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) grazed by ewe lambs as a function of different predecessor maize crop residue heights.

Sd = Standard deviation; p = significance level; Means followed by lowercase letters on the same line differ based on comparisons multiple contrasts ($p < 0.05$).

Higher STIR were observed for PMCR of 15 cm of height ($p = 0.0115$; Figure 2A). The mean value was 3.015 ± 0.94 g DM min^{-1} . There was no difference ($p > 0.05$) between the PMCR residues height concerning BM. The mean was 48.5 mg DM bite^{-1} , ranging from 22.1 to 80.5 mg DM bite^{-1} . Higher values of BR (Figure 2B) were observed under PMCR of 15 cm of height ($p = 0.0163$) and lower values in 45 cm of height. The BM mean was 61.56 g DM min^{-1} . The TSB, presented higher values for the 45 cm ($p = 0.0162$; Figure 3A), and lower in 15 cm. The mean was 1.0 g DM min^{-1} . The N-BJMR was lower for 45 cm ($p = 0.0175$, Figure 3 B). The mean value was 58.63 g DM min^{-1} . There was no significant difference for the PMCR for TJM ($p > 0.005$), remaining constant.

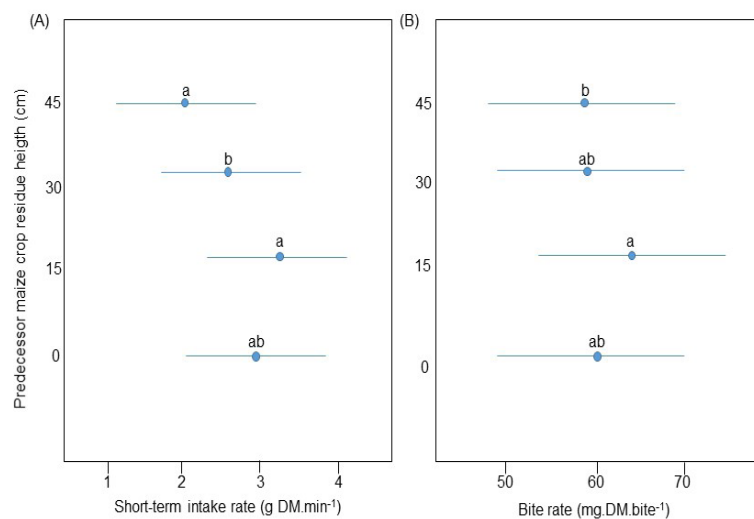


Figure 1: Short-term intake rate (A) and bite rate (B), for ewe lambs grazing Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) as function of different PMCR heights.

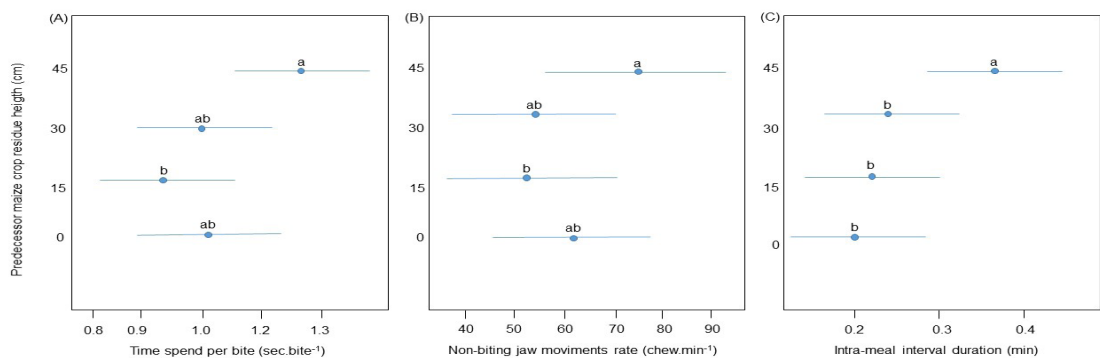


Figure 2: Time spent per bite (A), non-Biting jaw movements rate (B) and intra-meal interval duration (C), for ewe lambs grazing Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) as a function of different PMCR heights.

4 | DISCUSSION

4.1 Predecessor soybean crop – Experiment 1

Bite Rate, N-BJMRs and BM determine STIR (YAYOTA et al., 2015), as shown in experiment 1, in which there was no difference in variables BR, N-BJMRs among treatments. It is worth noting the trend ($p = 0.055$) for the treatment of BM 14 cm (Table 1). The difference in STIR for PSCR at 14 cm was effective because of the higher leaf mass in that treatment. The amount of dead material mass and inflorescence mass did not differ between treatments. Thus, the animals did not need to avoid undesirable structures and could capture the preferred component of the canopy in abundance (FONSECA et al., 2012). Therefore, concerning the animal grazing behavior there was no influence of residues on PSCR, however, results were influenced by sward structure.

Table 2 revealed that ewes lambs essentially exhibited similar patterns of N-BJMRs, TSB and TJM, regardless of the remarkable differences in residues heights (Table 1). Similar results were reported by Yayota et al. (2015). It can be inferred that ewe lambs did not need to perform more harvesting movements or manipulate the harvested material since these variables remained constant (Table 1). Besides that, the TSB did not increase in the time spent capturing and harvesting herbage, regardless of treatment (BENVENUTTI et al., 2009). Therefore, it is possible to suggest that the animals avoided places where bites could contain residue.

On the other hand, it is possible that 7 cm residue was not easily perceived in the pasture, possibly hindering the bite selection process, leading to higher NIMGI and IMID. It can be considered that the high NIMG was a reflection of the great selection of sites in the feeding station for maximum bite potential, related to a greater IMID. This may be related to the pasture harvesting behavior of the animal, because when the animal harvests the herbage, there is a proportional relationship between the herbage removal depth and SSH, of about 50% SSH (e.g., LACA et al., 1992). Thus, the sward height of 18.5 cm and residue height at 7 cm height seems to define a very close limit in relation to the potential proportionality, with a potential reduction in bite depth and bite area

4.2 Predecessor maize crop – Experiment 2

The Italian ryegrass pre and post grazing height did not varied significantly in any of the treatments. Therefore, the same sward structure was presented to the animal all for all grazing tests (Table 3).

The BR was higher for the PMCR of 15 cm, leading to a higher STIR, compared to 45 cm indicating that the largest residue reduced the BR (Figure 1). The relationship between BR and STIR was observed in Yayota et al., (2015). Moreover, BR includes the time spent searching (locomotion, recognition and decision) and

handling food (PRACHE, 1997).

The PMCR may have acted as a vertical barrier interfering with the process of bite formation and affecting BR and STIR at 30 and 45 cm (Figure 1). Barrier effects on ingestive behavior at the bite level were discussed previously by Benvenuti et al. (2009). The effect of the vertical barrier was previously observed with stems + sheaths for some plant species by Benvenuti et al. (2008). Furthermore, BR depends on the dispersion of food, which determines the encounter rate. When bites remain close, the animals may increase BR. However, if bites are farther apart (i.e., with the distribution of PMCR within a sward surface, bites can become more dispersed), animals may not increase BR because they are limited by encounter rate with acceptable bites (SEARLE et al., 2007).

The dispersion of food, due to PMCR, can bring changes in TSB (eating time per total number of bites), in which time spent on searching, especially when the height of the residue was higher (45 cm), may have been the main factor leading to a significant difference (Figure 2. A), as evidenced by the intra-meal interval duration (IMID, Figure 2. C). This occurs due to the selectivity of food, in which the TSB is related to the time spent by the animal on searching and manipulating the sward surface (Figure 2. A; PRACHE, 1997). Thus, it may not be related to BM (PRACHE, 1997; BENVENUTTI, 2006). The manipulation, in addition of mastication time, is dependent of the apprehension time, which is considered independent of BM (PARSONS et al., 1994). Furthermore, TSB is related to the gradual decrease of STIR in the treatments 30 and 45 cm (Figure 1 and 2). The STIR is determined (in addition BM) by the relationship of TSB to BR (LACA et al., 1992). Thus, more time per bite results in lower STIR (MEZZALIRA et al. 2014). Indeed, TSB can bring longer time in bite formation leading to a decrease in STIR (BENVENUTTI et al., 2009).

Another characteristic related to bites was that N-BJMR increased in the greater residue height, similar to BR (Figure 1 and 2). The animals were able to avoid PMCR, which occurred possibly due to the increased N-BJMR, mainly in the 45 cm treatment (Figure 2). The N-BJMR refers to the movements that are not identified as bites during eating time and therefore it includes movements that have a masticatory or manipulative function (AMARAL et al., 2012). Lambs use manipulative movements to maintain their foraging preferences and to avoid non-preferred items (BREMM et al., 2012). Moreover, ewe lambs exhibit great selectivity indicating acute ability to discriminate food (LACA et al., 2010).

This ability can be seen in the intra-meal interval, which is the “non-activity” or “other-activity” between two main grazing events (GIBB, 1998), in this study represented by the variable IMID (Figure 2, $p = 0,005$). Probably the IMID activities were the residues deviation by the animal and reorientation to a grazing site. Thus, searching activity was affected by differences in the pasture area occupied by the predecessor crop residues.

5 | CONCLUSION

Significant changes in the animal's grazing pattern can occur due to the presence of predecessor maize crop residues, influencing short-term intake rate.

This study showed that the height of the maize crop residue should not exceed 15 cm to allow higher levels of intake rate.

Predecessor soybean crop residues showed less influence in grazing patterns and short-term intake rate.

REFERENCES

- Accuweather Brazil Weather, 2014. Available in: <http://www.accuweather.com/pt/br/porto-alegre>. Accessed: 15 april. 2018.
- Amaral, M.F.; Mezzalira, J.C.; Bremm, C.; Trindade, J.K.; Gibb, M.J.; Suñe, R.W.; Carvalho, P.C. **Sward structure management for a maximum short-term intake rate in annual ryegrass. *Grass and Forage Science***, v. 68, p. 271-277, 2012.
- Barth Neto, A.; Savian, J.V.; Schons, R.M.T.; Bonnet, O.J.F.; Canto, M.W., Moraes, A.; Lemaire, G.; Carvalho, P.C.F. **Italian ryegrass establishment by self-seeding in integrated crop-livestock systems: Effects of grazing management and crop rotation strategies. *European Journal Agronomy***, v. 53, p. 67-73, 2014.
- Barthram, G.T. **Experimental Techniques: The HFRO Sward Stick**. In: The Hill Farming Research Organization, 1985. **Biennial Report**, HFRO, Midlothian, 1985. p. 29-30.
- Benvenuti, M.A.; Gordon, I.J.; Poppi D.P. **The effect of the density and physical properties of grass stems on the foraging behaviour and instantaneous intake rate by cattle grazing an artificial reproductive tropical sward. *Grass Forage Science***, v.61, p. 272–281, 2006.
- Benvenuti, M.A.; Gordon, I.J.; Poppi, D.P. **The effects of stem density of tropical swards and age of grazing cattle on their foraging behavior. *Grass Forage Science***, v.63, p. 1–8, 2008.
- Benvenuti, M. A., Gordon, I. J., Poppi, D. P., Crowther, R., Spinks, W., Moreno, F. C. **The horizontal barrier effect of stems on the foraging behaviour of cattle grazing five tropical grasses. *Livestock Science***, v.126, p. 229–238, 2009.
- Brazilian Institute of Geography and Statistics, 2014. **Agricultural statistics for the Brazil**. Available in: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/index.php>. Accessed: 15 Feb. 2016.
- Bremm, C.; Laca, E.A.; Fonseca, L.; Mezzalira, J.C.; Elejalde, D.A.G.; Gondac, H.L. **Foraging behaviour of beef heifers and ewes in natural grasslands with distinct proportions of tussocks. *Applied Animal Behaviour Science***, v.141, p. 108-116, 2012.
- Cangiano, C.A.; Galli, J.R.; Pece, M.A.; Dichio, L.; Rozsypalek, S.H. 2002. **Effect of live weight and pasture height on cattle bite dimensions during progressive defoliation. *Australian Journal Agriculture Research***, v.53, p. 541-549, 2002.
- Carvalho, P.C. F.; Anghinoni, I.; Moraes, A.; Souza, E.D.; Sulc, R.M.; Lang, C.R.; Flores, J.P.C.; Terra Lopes, M.L.; Silva, J.L.S.; Conte, O.; Lima Wesp, C.; Levien, R.; Fontaneli, R.S.; Bayer, C. **Managing grazing animals to achieve nutrient cycling and soil improvement in no-till integrated systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems***, v.88, p. 259–273, 2010.

Carvalho, P.C.F.; Anghinoni, I.; Moraes, A.; Trein, C.R.; Flores, J.P.C.; Cepik, C.T.C.; Levien, R.; Lopes, M.T.; Baggio, C.; Lang, C.R.; Sulc, R.M.; Pelissari, A. **The art state in crop-livestock integration** (in Portuguese). In: Gottschall, C.S., Silva, J.L.S., Rodrigues, N.C. (Eds) **Proceedings of animal production: Myths, technology research and adoption**, ULBRA, Canoas, p. 7–44, 2005.

Fonseca, L.; Mezzalira, J.C.; Bremm, C.; Filho, R.S.A.; Gonda, H.L.; Carvalho, P.C.F. **Management targets for maximizing the short-term herbage intake rate of cattle grazing in Sorghum bicolor**. **Livestock Science**, v.145, p. 205–211, 2012.

Gibb, M.J. **Animal grazing/intake terminology and definitions**. In 'Pasture ecology and animal intake'. (Eds MG Keane, EG O'Riordan), 1998, Ireland. **Teagasc Grange Research Centre**, Dunsany, Ireland, 1998. p. 21–37.

Gibb, M.J., Huckle, C.A., Nuthall, R., Rook, A.J. **The effect of physiological state (lactating or dry) and sward surface height on grazing behaviour and intake by dairy cows**. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 63, p. 269–287, 1999.

Giller, K.E.; Andersson, J.A.; Marc, C.; Kirkegaard, J.; Mortensen, D.; Erenstein, O.; Vanlauwe, B. **Beyond conservation agriculture**. **Front Plant Science**, v. 6, p. 870, 2015.

Gonçalves, E.N.; Carvalho, P.C.F.; Kunrath, T.R.; Carassai, I.J.; Bremm, C.; Fisher, V. **Plant-animal relationships in a heterogeneous pastoral environment: Displacement patterns and feeding station use**. **Brazilian Journal Animal Science**, v. 38, p. 2121-2126, 2009.

Halls, L.K. **The approximation of cattle diet through herbage sampling**. **Journal Range Management**, v. 7, p. 269-270, 1954.

HODGSON, J. Grazing management: science into practice. Longman scientific and technical. London : Longman Group, UK, 1990. 203p

Köppen, W., Geinger, R. **Klimate der erde**. Gotha: verlag justus perthes. Wall- map, 1928. 150 cm x 200 cm.

Laca, E.A., Ungar, E.D. **Effects of sward height and bulk density on bite dimensions of cattle grazing homogeneous swards**. **Grass and Forage Science**, v. 47, p. 91-102, 1992.

Laca, E. A. Sokolow, S., Galli, J.R., Cangiano, C. A., 2010. **Allometry and spatial scales of foraging in mammalian herbivores**. **Ecology Letters**, v. 13, p. 311-320, 2010.

Mezzalira, J.C., Carvalho, P.C.F., Fonseca, L., Bremm, C., Cangiano, C., Gonda, H.L., Laca, E.A. **Behavioural mechanisms of intake rate by heifers grazingswards of contrasting structures**. **Applied Animal Behavior Science**, v. 153, p. 1–9, 2014.

Moraes, A., Carvalho, P.C.F., Lustosa, S.B.C., Lang, C.R., Deiss, L. **Research on Integrated Crop-Livestock Systems in Brazil**. **Revista. Ciência Agronômica**. (UFC. Online). v. 45, p. 1024, 2014.

Newman, J.A., Penning, P.D., Parsons, A.J., Harvey, A., Orr, R.J., 1994. **Fasting affects intake behaviour and diet preference by grazing sheep**. **Animal Behaviour**, v. 47, p. 185-193, 1994.

Parsons, A.J., Newman, J.A., Penning, P.D., Harvey, A., Orr, R.J. **Diet preference of sheep: Effects of recent diet, physiological state and species abundance**. **Journal Animal Ecology**, v. 63, p. 465–478, 1994.

Penning, P.D., Hooper, G.E. **An evaluation of the use of short-term weight changes in grazing sheep for estimating herbage intake**. **Grass and Forage Science**, v. 40, p. 79-84, 1985.

Penning, P.D., Parsons, A.J., Newman, J.A., Orr, R.J., and Harvey, A. **The effects of group size on grazing time in sheep.** *Applied Animal Behavior Science*, v. 37, p. 101-109, 1993.

Prache, S. **Intake rate, intake lactating ewes on per bite and time per bite of vegetative and reproductive swards.** *Applied Animal Behavior Science*, v.52, p. 53-64, 1997.

Rutter, S.M., Champion, R.A., Penning, P.D. **An automatic system to record foraging behaviour in free-ranging ruminants.** *Applied Animal Behavior Science*, v. 54, p. 185-195, 1997.

R Development Core Team., 2015. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available in: <https://www.r-project.org/>. Accessed in August 2014.

Rutter, S.M. **Diet preference for grass and legumes in free-ranging domestic sheep and cattle: current theory and future application.** *Applied Animal Behaviour Science*, v. 97, p. 17–35, 2006.

Searle, K.R., Hobbs, N.T., Gordon, I.J. **It's the “foodscape”, not the landscape: Using foraging behavior to make functional assessments of landscape condition.** *Israel Journal of Ecology and Evolution*, v. 53, p. 297–316, 2007.

United States Department of Agriculture (USDA). **Soil Taxonomy: A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys.** USDA, Washington, DC, p. 1–871, 1999.

Yayota, M. Kato, A. Ishida, M. Ohtani, S., 2015. **Ingestive behavior and short-term intake rate of cattle grazing on tall grasses.** *Livestock Science*, v. 180, p. 113–120.

USO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE AÇÚCAR E ÁLCOOL: BENEFÍCIOS E PERDAS

Camila Almeida dos Santos

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
(UFRRJ), Seropédica - RJ

Leonardo Fernandes Sarkis

Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras -
MG

Eduardo Carvalho da Silva Neto

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
(UFRRJ), Seropédica – RJ

Luis Otávio Nunes da Silva

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
(UFRRJ), Seropédica – RJ

Leonardo Duarte Batista da Silva

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
(UFRRJ), Seropédica – RJ

RESUMO: A busca por fontes de energias renováveis no Brasil incentivou o cultivo e expansão da cultura da cana-de-açúcar. Porém, essa expansão, em larga escala, reduziu a dependência dos combustíveis fósseis, mas ocasionou diversos problemas ambientais. No processamento industrial, para produção de etanol e/ou açúcar, há produção de subprodutos (resíduos) como bagaço, cinza, água de lavagem, vinhaça etc., e esses resíduos eram descartados de forma inadequada, poluindo recursos hídricos e tornando áreas impróprias para a agricultura. Dessa forma, pesquisas foram surgindo para a redução da

poluição causada ao meio ambiente por esses resíduos, através da criação de processos de reciclagem e reaproveitamento, principalmente para vinhaça que é produzida com maior proporção. Diante dessa importante questão, esta revisão teve como objetivo evidenciar os resíduos oriundos da indústria sucroalcooleira, bem como os prejuízos e benefícios que esses causam ao sistema solo-planta-atmosfera e ao meio ambiente. Uma alternativa para minimizar os impactos é o reaproveitamento desses em diversos setores com o manejo adequado, como a geração de energia através do bagaço, a fertirrigação da cultura com a vinhaça, implantação de sistemas de lavagem a seco para reduzir a quantidade de água residuária etc. Nesse contexto, o manejo eficiente diminui os impactos ambientais e pode permitir maior produtividade do setor.

PALAVRAS-CHAVE: vinhaça, fertirrigação, água de lavagem, gases de efeito estufa.

USE OF WASTE FROM THE SUGAR AND ALCOHOL INDUSTRY: BENEFITS AND LOSSES

ABSTRACT: The search for renewable energy sources in Brazil encouraged the cultivation and expansion of sugarcane cultivation. However, this expansion, on a largescale, reduced

dependence on fossil fuels and caused several environmental problems. In industrial processing, to produce ethanol and / or sugar, there is production of by-products (waste) such as bagasse, ash, washing water, vinasse, etc., and the sewastes were improperly disposed of, polluting water resources and rendering areas agriculture. In this way, research has emerged to reduce the pollution caused the environment by these residues, through the creation freecycling and reutilization processes, mainly for vinasse that is produced with greater proportion. In view of this important issue, this review aimed to highlight the residues from the sugar-alcohol industry, as well as the losses and benefits that these cause to the soil-plant-atmosphere system and to the environment. An alternative to minimize the impacts is the reuse of these in several sectors with adequate management, such as energy generation through bagasse, crop fertigation with vinasse, implementation of dry-cleaning systems to reduce the amount of waste, etc. In this context, efficient management reduces environmental impacts and may allow greater productivity in the sector.

KEYWORDS: Vinasse, fertigation, washingwater, greenhouse gases.

1 | INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar é uma das principais “commodities” do agronegócio brasileiro. As principais regiões produtoras são: Sudeste, destacando o estado de São Paulo, Centro-oeste e Nordeste, sendo a região Norte a que apresenta menor produção (CONAB, 2018). Entretanto, o processamento dessa cultura para produção de álcool e/ou açúcar, gera enormes quantidades de resíduos, os quais podem ocasionar severos problemas ambientais quando manejados e descartados de forma inadequada.

Considerando que a utilização de fontes energéticas fósseis (petróleo) é finita, altamente poluente e de elevado custo (VICHI & MANSOR, 2009), surge a necessidade crescente em buscarmos alternativas sustentáveis para atender à demanda por combustíveis e, principalmente, por energia. Nesse contexto, o setor sucroalcooleiro brasileiro tornou-se mais competitivo nos últimos anos. O governo desenvolveu programas de incentivo à produção de etanol para diminuir a demanda por combustíveis fósseis, como o Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Por outro lado, houve um aumento na quantidade de resíduos oriundos desse produto.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi fazer uma revisão de literatura sobre os resíduos gerados da indústria sucroalcooleira, os benefícios e impactos que esses subprodutos podem ocasionar ao meio ambiente.

2 | INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA

O cultivo da cana-de-açúcar vem aumentando ao longo dos anos no Brasil, principalmente por ser tratar de uma fonte de energia renovável, diminuindo a

dependência do uso de combustíveis fósseis, derivados do petróleo. Sua produção tem como finalidade a produção de açúcar e de álcool. Existem usinas que fazem o beneficiamento dos dois produtos e outras apenas de um desses produtos. Entretanto, no beneficiamento, há uma geração de diversos resíduos ou subprodutos como água de lavagem, bagaço, torta de filtro e vinhaça (Figura1). A produção desses resíduos passou a ser um grande problema para o ambiente, uma vez que a grande quantidade gerada era descartada de forma inadequada, poluindo rios, lagos, lençol freático e tornando muitas vezes as áreas impróprias para o cultivo devido a salinidade causada pelo descarte.

Devido a poluição causada no meio ambiente pelos descartes indevidos desses resíduos, o cultivo cana-de-açúcar passou a ser negativo no balanço final da cultura. Em virtude desse acontecimento, o governo começou a cobrar das indústrias uma finalidade para esses resíduos, iniciando-se as pesquisas em busca da reutilização e diminuição dos impactos ambientais causados pelos subprodutos da indústria sucroalcooleira.

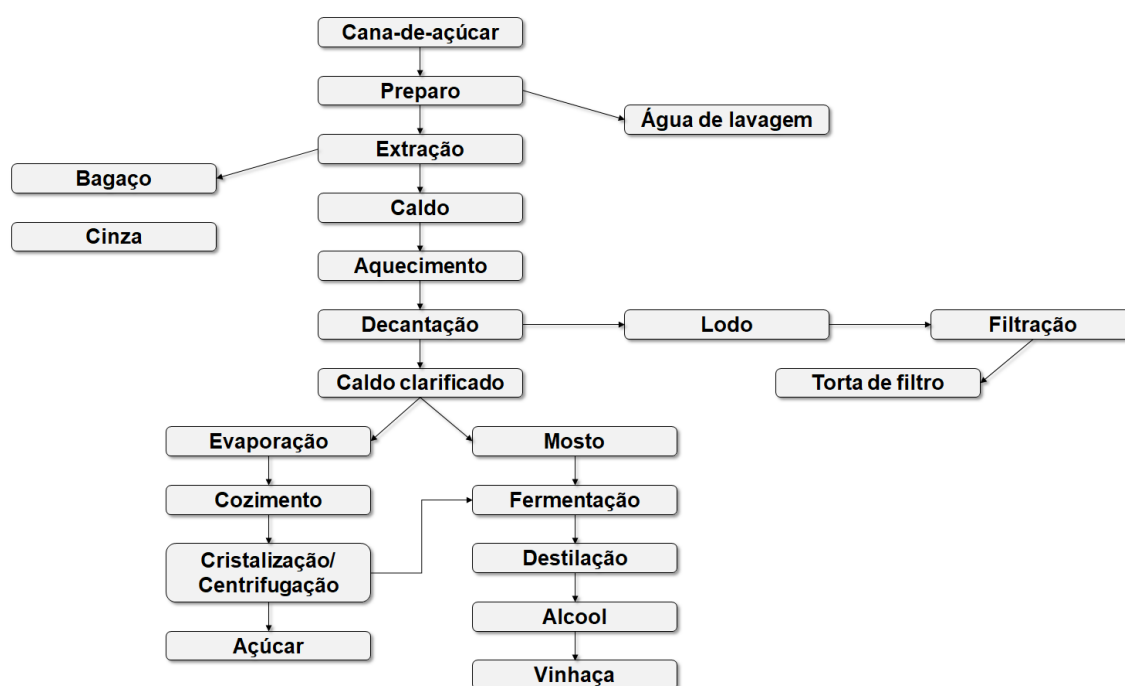


Figura 1. Fluxograma da indústria sucroalcooleira e subprodutos, adaptado de Paredes (2015).

3 | SUBPRODUTOS DERIVADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

3.1 Água de Lavagem

A água de lavagem da cana-de-açúcar é o primeiro resíduo gerado pela agroindústria sucroalcooleira. Porém, durante o todo processo de fabricação do etanol ou açúcar (tratamento do caldo, fábrica de açúcar, fermentação, destilaria, geração de energia, e outros), são geradas mais águas residuárias (RIBEIRO, 2011).

Estima-se que uma usina média, que mói em torno de um milhão de toneladas de cana por safra, capte, dos mananciais locais, o mesmo que uma cidade de 50 mil habitantes. Em razão das diferenças de rendimentos, apresentadas pelos equipamentos utilizados em cada usina, pode-se considerar que a produção média atual de água condensada no processo esteja em torno de 1 mil m³ para cada 5 mil sacas de açúcar produzido (GONÇALVES et al., 2008), e para cada tonelada de álcool hidratado produzido, são consumidas 125 toneladas de água, utilizada tanto na lavagem de cana, como na moagem, fermentação, destilação, produção de vapor e lavagem de equipamentos, sem contar a fase de cultivo da cana (ALMEIDA, 2009). FREITAS et al. (2006), relatam que só no processo de lavagem da cana são utilizados em média 2.000 a 7.000 litros de água por tonelada de cana.

Nesse contexto, a usina sucroalcooleira demanda de uma grande quantidade de água para seu funcionamento, porém com a escassez desse recurso natural e pela enorme quantidade de resíduo gerado nesse processo, há uma necessidade de reduzir esse consumo. Portanto, algumas pesquisas apontam que a utilização de tecnologias como a limpeza a seco da cana-de-açúcar para a queima da palha nas caldeiras de alta pressão faz com que o consumo de água diminua entre 11 a 13%, em relação à lavagem úmida que é bem usual atualmente. Além disso, a substituição do sistema de refrigeração por aspersão, pela torre de resfriamento reduziria as perdas de 5 a 8% para 1,5 a 3%, no total do balanço hídrico.

Outro problema relacionado as águas de lavagens é o seu descarte, sendo anteriormente realizado diretamente no solo, rios e lagos, causando contaminação. Esse efluente oriundo da lavagem da cana é considerado de médio possível poluidor em relação a matéria orgânica (180 a 500mg/L de DBO-Demanda Bioquímica de Oxigênio) e a alta concentração de sólidos. Essa água apresenta teores relevantes de sacarose, principalmente no caso da cana queimada, e matéria mineral e vegetal (terra e pedregulhos aderidos). Proporciona a relação disforme, com a temperatura média de 39,5°C; pH de aproximadamente 6,0; alta turbidez(185UTN); concentração de oxigênio dissolvido de 2,5 O₂ (mg L⁻¹); demanda bioquímica de oxigênio de 388; ausência de nitrogênio; teores de potássio em torno de 11 mg L⁻¹ e de fósforo de 2,2 mg L⁻¹ (ALMEIDA, 2009).

Com os problemas ambientais, gerados através desse descarte, a legislação começou a exigir o tratamento dessas águas. Portanto, as usinas começaram a fazer tratamento e reuso dessa água, criaram tanques para descarte e tratamento dessas, assim, após realizada a lavagem da cana, a água é encaminhada à um processo de gradeamento, de preferência de remoção mecânica, a fim de retirar os materiais sobrenadantes e outros sólidos separáveis e posteriormente, a decantação, onde parte retorna para o processo de lavagem e parte é encaminhada à lagoa de vinhaça onde será usada no processo de fertirrigação (FREITAS et al., 2006).

3.2 Bagaço

O bagaço é o resíduo que sobra da prensagem da cana, que imediatamente é utilizado pela usina nas caldeiras, produzindo energia elétrica, que a torna autossuficiente em relação à energia elétrica para as mais variadas atividades. Além do mais, há usinas que revendem o excedente de produção para concessionárias de energia elétrica (OLIVEIRA et al., 2014). Acredita-se, que a geração de energia oriunda desse processo possa contribuir mais com o mercado de produção de energia, através de política de incentivo, fornecendo a energia proveniente da biomassa para a rede pública de energia, tornando a cultura de cana-de-açúcar mais eficiente (CONAB, 2018).

Atualmente, grande parte das indústrias retiram as palhas, ponteiros e folhas verdes que eram depositadas no solo, para produção de energia e álcool de segunda geração, essa prática dificulta o trabalho dos cortadores de cana e também afeta o solo, visto que retira a palhada e os seus respectivos benefícios, como o aumento da matéria orgânica do solo, redução da oscilação da temperatura na superfície do solo e manutenção da umidade, notadamente em regiões de clima mais quente (RONQUIM, 2010).

Por outro lado, o excesso de resíduos deixados pela cultura no solo pode comprometer o desenvolvimento da soqueira que apresenta menor produtividade e desenvolvimento dos perfilhos, pois compromete o brotamento das gemas. Alguns autores relatam que houve retardamento da brotação e a redução em até 52% da produtividade agrícola na variedade SP 71-6163 (CAMPOS et al., 2010). Neste contexto, deve-se intensificar as pesquisas relacionadas a utilização do bagaço e outros resíduos da cultura com a finalidade de um equilíbrio para ambas as propriedades.

3.3 Cinzas

Um outro subproduto na indústria sucroalcooleira são as cinzas, oriunda da queima do bagaço, sendo essas importantes fontes de macro e micro nutrientes que podem ser utilizados como insumos no processo produtivo, visto que essas cinzas conferem alta capacidade de retenção de água, melhorando o desenvolvimento da cultura e reduzindo impactos ambientais provocados pela irrigação, além de ser capaz de corrigir a acidez do solo, uma vez que a aplicação de uma tonelada de cinza pode neutralizar o equivalente ao uso de aproximadamente 0,5 toneladas de calcário (BRUNELLI & PISANI JR. 2006).

FEITOSA et al. (2009), avaliaram o efeito da aplicação de diferentes doses de cinzas no solo e na cultura do milho e observaram que as doses de 60 a 90 t ha⁻¹ de cinza podem substituir a adubação química recomendada para a cultura do milho de forma satisfatória. Outros trabalhos mostram que cinzas podem ser utilizadas na construção civil, substituindo parte do cimento em argamassa.

3.4 Torta de Filtro

A torta de filtro pode ser definida como um resíduo gerado a partir da mistura de bagaço moído e lodo da decantação, sendo proveniente do processo de clarificação do açúcar (SCHNEIDER, 2012). O lodo desenvolvido passa por um processo de filtração a vácuo, recebendo, então, a denominação de torta de filtro (FRAVET et al., 2010). Estima-se que a cada tonelada de cana moída, são produzidos de 30 a 40 kg de torta de filtro (SANTOS et al., 2010).

A torta de filtro apresenta altos teores de matéria orgânica, cerca de 1,2 a 1,8% de fósforo que pode estar prontamente disponível para cultura ou de forma gradual, nitrogênio, potássio, altos teores de cálcio e consideráveis concentrações de micronutrientes, além de cerca de 70% de umidade, que é importante para permitir a brotação da cana em plantios feitos em épocas de inverno nas Região Sul e Sudeste.

Diversos autores relatam que o uso da torta de filtro no cultivo da cana de açúcar, principalmente na rebrota, pode diminuir a quantidade de fertilizantes sintéticos, visto a sua composição de nutrientes, além de evitar o descarte inadequado desse resíduo diretamente em corpo d'água. Segundo NUNES JÚNIOR (2005), uma aplicação de 20 Mg ha⁻¹ de torta de filtro úmida ou 5 Mg ha⁻¹ seca, pode fornecer 100% do nitrogênio, 50% de fósforo, 15% de potássio, 100% de cálcio e 50% de magnésio, para a cultura da cana-de-açúcar. Esse resíduo pode ser aplicado em total área no pré-plantio, no sulco ou nas entrelinhas de plantio. O autor também relata que matéria orgânica da torta de filtro, mesmo quando aplicada na entrelinha, reduz a fixação do fósforo pelos óxidos de ferro e alumínio que são abundantes no solo brasileiro, disponibilizando esse elemento às raízes. Além disso, a reação da matéria orgânica da torta, por ser um agente cimentante, permite maior estabilidade de agregados, favorecendo a absorção de nutrientes pela cultura.

Apesar de todos benefícios oriundos da aplicação da torta de filtro, é importante ressaltar que quando utilizada de forma inadequada, esse resíduo passa a ser uma fonte poluidora, podendo causar severos danos ambientais como a contaminação dos cursos d'água e do solo.

3.5 Vinhaça

A vinhaça é um resíduo líquido proveniente da destilação de uma solução alcoólica chamada vinho, adquirida através do processo de fermentação para a obtenção do álcool. Portanto, a vinhaça é o principal efluente da produção de álcool, cuja matéria prima pode ser o caldo de cana, o melaço ou a mistura de proporções, ou de diluições destes. Nesse processo há uma enorme geração desse resíduo e alguns autores relatam que para cada litro de álcool produzido são gerados entre 10 a 15 litros de vinhaça (PAREDES, 2015).

Com a preocupação quanto aos impactos do uso da vinhaça no ambiente e a

contínua mortandade de peixes devido à disposição da vinhaça nos rios, foi criado o Decreto-Lei nº 303, de 28 de fevereiro de 1967, que proibiu definitivamente a disposição da vinhaça nos rios, lagos e cursos de água. Com esse decreto, proibindo o descarte da vinhaça nos rios, a primeira solução encontrada pelas indústrias sucroalcooleira foi a aplicação da vinhaça nas chamadas áreas de sacrifício. Assim, essas áreas muito próximas às destilarias sofriam a deposição de grande quantidade de vinhaça, ano após ano. Como consequência dessa grande deposição, estas áreas ficavam praticamente inutilizáveis para a agricultura, principalmente pelo efeito de salinidade do solo, tornando-o improdutivo e de difícil remediação.

Com a crise do petróleo, o governo criou o Proálcool (Programa Nacional do Álcool) em 1975, que consistiu em uma iniciativa do governo brasileiro de intensificar a produção de álcool combustível (etanol) para substituir a gasolina. Em virtude desse acontecimento, a produção de álcool aumentou, gerando mais resíduos, principalmente vinhaça, que na safra de 2006/2007 chegou a atingir aproximadamente 190 bilhões de litros de vinhaça.

Para reverter esse quadro ambiental, decorrente do descarte desse material, iniciaram-se pesquisas visando o uso da vinhaça na agricultura, no cultivo da cana, como fertilizante. Essa prática vem sendo utilizada até hoje, pois a vinhaça tem natureza orgânica e ausência de contaminantes, metais ou outros compostos indesejáveis. Por outro lado, houve uma preocupação com essa aplicação, devido ao pH muito ácido da vinhaça, que pode acidificar o solo. Outro fator ainda preocupante é a maneira como esse resíduo chega até as lavouras, visto que muitas vezes são carregados em valas e canais de distribuição a céu aberto, podendo infiltrar e gerar emissões de gases de efeito estufa (RIBEIRO et al., 2006).

3.5.1 Benefícios da aplicação da vinhaça no solo e na cana-de-açúcar

A vinhaça apresenta uma composição variável e consiste, em sua maioria, de 93% de água e 7% de sólidos. Da parcela de sólidos, 75% correspondem à matéria orgânica particulada, o que possibilita sua utilização na fertirrigação da cana-de-açúcar, principalmente pelos altos teores de potássio (MARQUES, 2006). Para chegar até o local de aplicação no campo, a vinhaça produzida, percorre um sistema de armazenamento composto por lagoas e um sistema de distribuição, normalmente a base de canais.

A aplicação no solo já é um processo bem estruturado, chamado de fertirrigação, que acarreta melhorias para cultura e para o solo, benefícios na produtividade agrícola da cana e nas características química, física e biológica do solo, além de promover uma economia com a aquisição de fertilizantes (PAREDES, 2015). A autora ainda enfatiza que há dois tipos de vinhaça circulando pela usina, uma vinhaça pura e a outra vinhaça diluída com água residuária no processo de fertirrigação do canavial. Geralmente, nas áreas próximas as usinas, esses resíduos estão com altas

concentrações de potássio. Assim, a vinhaça é aplicada diluída com água residuária, sendo a vinhaça pura aplicada em áreas mais distantes com o auxílio de caminhões, por exemplo, o que evidencia a possibilidade de haver os dois tipos de vinhaça circulando na usina.

Diversos autores estudaram os efeitos da vinhaça nos solos ao longo do tempo, concluindo que: a vinhaça eleva o pH dos solos; aumenta a capacidade de troca catiônica (CTC), fornece e aumenta a disponibilidade de alguns nutrientes (principalmente potássio); melhora a estrutura do solo, aumenta a retenção de água; melhora a atividade biológica promovendo maior número microrganismos (FERREIRA & MONTEIRO, 1987).

A cana é altamente exigente em potássio e sua deficiência reflete não apenas na diminuição da biomassa produzida, como também no menor acúmulo de açúcares no colmo (GLÓRIA, 1985). Há também a diminuição do crescimento e do perfilhamento da cana, além da formação de colmos mais finos com internódios mais curtos (ORLANDO FILHO, 1977).

O potássio é nutriente predominante e de maior importância na vinhaça. Nesse contexto, sua deficiência pode causar sérias dificuldades para cultura e, por outro lado, o excesso do elemento pode induzir à falta de magnésio (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1989) e aumentar o teor de cinzas no caldo (CASAGRANDE, 1991).

YAMAGUCHI et al., (2017), ao avaliarem a decomposição de diferentes quantidades de palha de cana de açúcar (2; 4; 8; 16 e 24 t ha⁻¹), com ou sem aplicação de vinhaça (200 m³ ha⁻¹), em um solo classificado como Latossolo VermelhoAmarelo de textura argilosa (67% de argila), onde as condições não foram limitantes para ocorrência do processo de decomposição, os autores observaram que a aplicação de vinhaça acelera o processo de mineralização da palhada quando comparado com a palha pura, potencializando a entrada de carbono no solo.

Outros estudos mostram o efeito da aplicação de vinhaça no controle de plantas daninhas, e os resultados obtidos indicam que a emergência de algumas plantas daninhas foi reduzida pela aplicação de vinhaça após 7 dias de semeadura, obtendo-se a conclusão de que a vinhaça apresenta efeitos alelopáticos sobre algumas espécies daninhas, devidos à presença do ácido aconítico (VOOL, 2005).

3.5.2 Impactos negativos da utilização da vinhaça

Antes do Decreto-Lei nº 303, de 28 de fevereiro de 1967, a vinhaça era descartada nos rios, lagos e cursos de água, causando poluição dos recursos naturais, principalmente mortandade dos peixes. Posteriormente, em meio a política pública com incentivo do Proálcool, a quantidade de vinhaça aumentou, junto às pesquisas para dar utilidade a esse resíduo. A vinhaça passou a ser utilizada na fertirrigação da cultura da cana, agregando valor ao produto. Todavia, por ser fonte de nutrientes para alguns microrganismos, o manejo inadequado faz com que esse

resíduo seja um potencial produtor de gases de efeito estufa (GEE), bem como doses excessivas causando danos a cultura e na indústria.

Alguns autores relatam eventuais efeitos maléficos causados aos solos ou às plantas, sendo frequentemente decorrentes de doses excessivas. Nesse contexto, há uma necessidade de conhecer a composição da vinhaça e os teores dos nutrientes do solo, principalmente o potássio para fazer uma recomendação de fertirrigação, visando atender a necessidade da cultura sem trazer prejuízos ao sistema. Atualmente, a vinhaça produzida em usinas é distribuída nas lavouras de cana-de-açúcar por fertirrigação, chegando até os locais de uso, na grande parte das vezes, por canais abertos. A vinhaça recém produzida possui alta temperatura, chegando até 100 °C. No entanto, algumas usinas possuem tanques de resfriamento, em que a vinhaça produzida passa pelo processo de resfriamento e, posteriormente, são armazenadas nas lagoas, chegando nesse reservatório com temperaturas mais amenas de aproximadamente 40°C. Posteriormente são distribuídas para os canais de distribuição, onde o processo de esfriamento continua, chegando aos locais mais distantes com temperaturas próximas a 25° C.

Durante todo esse processo de resfriamento, a vinhaça passa a ter temperatura favorável ao desenvolvimento dos microrganismos, além de conter nutrientes para os mesmos, favorecendo então a ocorrência de emissões de GEE durante todo o percurso de distribuição da vinhaça. As emissões de GEE em diferentes setores agrícola são estimadas pela metodologia do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), obtendo-se a potencial perda de nitrogênio por emissão de GEE em função da quantidade deste nutriente que foi aplicada. De acordo com a metodologia do IPCC (2006), cerca de 1% do N aplicado é emitido como N₂O. SOARES et al. (2009), pressupôs que ao aplicar 80 m³ de vinhaça no campo, contendo 20 kg N ha⁻¹, são perdidos anualmente 314 g ha⁻¹ de N₂O ou 97,3 kg ha⁻¹ de CO₂ eq.

Segundo OLIVEIRA et al. (2015), 78% das emissões de GEE decorrentes da vinhaça ocorre no percurso do canal condutor, em que cada m³ de vinhaça seria responsável por uma emissão de 1,43 kg de CO₂ equivalente. Entretanto, há pouco estudo sobre as emissões provenientes desse sistema de distribuição, principalmente no que diz respeito às lagoas de armazenamento.

CANTARELLA et al. (2016) avaliaram as emissões de óxido nitroso (N₂O) provenientes de fertilizantes nitrogenados, vinhaça e da aplicação em três experimentos em locais diferentes. Os autores aplicaram vinhaça regular e concentrada ao mesmo tempo que o fertilizante mineral, antecipado ou atrasado por um mês. Observaram que aplicação de vinhaça concentrada no mesmo dia do fertilizante mineral causou elevadas emissões de N₂O quando comparado ao fertilizante aplicado sozinho; a aplicação simultânea da vinhaça regular aumentou a emissão de N₂O em 2 de 3 experimentos. Quando usaram uma estratégia de antecipar ou adiar a aplicação de vinhaça regular e concentrada por cerca de 30 dias em relação a N mineral, observaram na maioria dos casos, emissões de N₂O mais baixas.

OLIVEIRA (2010) estudando as emissões provenientes da aplicação da vinhaça no solo em área de cana crua e cana queimada, relatou que a aplicação de vinhaça no solo influencia significativamente as emissões de CO_2 e N_2O . Por outro lado, os fluxos de CH_4 foram negativos na maioria dos dias avaliados, evidenciando o consumo desse gás pelo solo. O autor relata que a aplicação de 200 m^3 de vinhaça aumentou as emissões de GEE em 47,0 e 30,9 kg de $\text{CO}_2\text{eq ha}^{-1}$, respectivamente, para a área onde a cana era queimada para a colheita e para a área de cana crua.

PAREDES (2015) avaliou as perdas de GEE decorrentes das lagoas e canais de distribuição de uma usina na região centro leste SP, e também as emissões devidas à aspersão em solo plantado com canadeaçúcar. A autora relata que na distribuição da vinhaça, o CH_4 é o principal gás emitido, com fluxos variando de 0,06 e $2.978 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^2 \text{ h}^{-1}$ para lagoas e 162 e $4.913 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^2 \text{ h}^{-1}$ para canais. Na aspersão, as emissões por metano chegaram a $27 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^3$ de vinhaça. Quando avaliou as emissões decorrentes da aplicação no solo, a vinhaça representou uma perda de N na forma de N_2O entre 1,04% e 2,20%.

Em outro estudo, Paredes et al. (2014) avaliaram as emissões de óxido nitroso e volatilização de amônia induzida pela vinhaça e aplicação de fertilizante nitrogenado (ureia) na cultura de canadeaçúcar, e também analisaram o possível impacto da adição de vinhaça antes ou após a ureia, no Rio de Janeiro. Observaram que as maiores proporções de N emitidas como N_2O foram registradas no tratamento da vinhaça. Em relação às perdas por volatilização de NH_3 , a ureia foi o único tratamento em que este processo foi significativo. Os autores verificaram que a ordem de adição de ureia e vinhaça teve pouco efeito sobre a volatilização de NH_3 no campo, mas havia evidências de que era importante para N_2O . Nesse contexto, os autores relatam que se a vinhaça for adicionada logo após o fertilizante nitrogenado, as emissões por kg de N adicionado são aumentadas em relação a ureia sozinha, mas a sequência oposta de adição é de menor importância.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expansão da cultura da cana-de-açúcar destinada a produção de álcool e/ou açúcar gera elevadas quantidades de resíduos nas diferentes etapas de processamento. Esses resíduos ou subprodutos da indústria sucroalcooleira quando descartados de forma inadequada geram graves problemas ambientais.

A vinhaça é o principal resíduo gerado e, quando essa é descartada nos corpos d'água, ocasiona contaminação desses recursos hídricos, levando a ecotoxicidade de peixes, tornando a água imprópria para consumo, além de apresentar enorme potencial para emissão de gases de efeito estufa. Porém, esse subproduto, quando utilizado para fertirrigação da lavoura, promove benefício, como o aumento da produtividade da cultura, melhoria nas propriedades do solo, além de diminuir a dependência de adubos sintéticos.

Vários produtos da indústria sucroalcooleira podem ser reutilizados, agregando valor a cultura de cana-de-açúcar e minimizando os impactos ambientais decorrentes do descarte.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA; J.C. A **Indústria Sucroalcooleira-energética e os Recursos Hídricos**: Rio Santo Antônio Grande, Alagoas. Dissertação de Mestrado-Universidade de Alagoas, Maceió, p.91, 2009.
- BRUNELLI, A.M.M.P. & PISANI JÚNIOR, R. Proposta de Disposição de Resíduo Gerado a partir da Queima do Bagaço de Cana em Caldeiras como Fonte de Nutriente e Corretivo do Solo. In: **CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL**, 30., 2006, Puntadel Leste. Anais Puntadel Leste: Asciación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, v. 1. p. 1-9,2006.
- CAMPOS, L. H. F., CARVALHO, S.J.P; CHRISTOFFOLETI, P.J.; FORTES, C. & SILVA, J.S. Sistemas de manejo da palhada influenciam acúmulo de biomassa e produtividade da cana-de-açúcar (var. RB855453). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 345-350, 2010.
- CANTARELLA, H.; KÉSIA SILVA LOURENÇO, K.S.; SOARES, J.R.; CARMO, J.B.; VITTI, A. C.; ROSSETTO, R.; MONTEZANO, Z.F. & KURAMAE, E.E. Nitrous oxide emission from N fertilizer and vinasse In sugarcane. **International Nitrogen Initiative Conference**, “Solutions to improve nitrogen use efficiency for the world”, Melbourne, Australia, 4 – 8, 2016.
- CASAGRANDE, A. A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 157 p.,1991.
- CONAB – **COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**. Acompanhamento da safra Brasileira. Cana-de-açúcar, Safra 2018/2019, 3º Levantamento. 75p., 2018.
- FEITOSA, D.G.; MALTONI, K. L. & SILVA, I. P. F. Avaliação da Cinza, Oriunda da Queima do Bagaço da Cana de Açúcar, na Substituição da Adubação Química Convencional para Produção de Alimentos e Preservação do Meio Ambiente. **Revista Brasileira de Agroecologia**, vol. 4, nº2,2009.
- FERREIRA, E.S. da & MONTEIRO, A.O. de. Efeitos da aplicação da vinhaça nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. **Boletim Técnico Copersucar**, São Paulo, (36):3-7. 1987.
- FRAVET, P. R. F., SOARES, R. A. B., LANA, R. M. Q., LANA, Â. M. Q., KORNDÖRFER, G. H. Efeito de doses de torta de filtro e modo de aplicação sobre a produtividade e qualidade tecnológica da soqueira de cana-de-açúcar. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.3, p.618-624, 2010.
- FREITAS, G.L. & FERREIRA, O.M. **Uso da Água no Processo de Produção de Álcool**: Estudo de Caso. Goiania,2006.
- GONÇALVES D. B., FERRAZ, J. M., SZMRECSÁNYI, T. Agroindústria e meio-ambiente. In: ALVES, F.; FERRAZ, J. M. G.; PINTO, L. F. G.; SZMRECSÁNYI, T. **Certificação ambiental para a agricultura: desafios para o setor sucroalcooleiro**. Piracicaba, SP, São Carlos: ed. UFSCar, 300p, 2008.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989.
- MARQUES, M. O. Aspectos técnicos e legais da produção, transporte e aplicação de vinhaça. In: SEGATO, S. V. et al. (Org.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, p. 369-375, 2006.

NUNES JUNIOR, D.; PINTO, R. S. A.; TRENTO F., E.; ELIAS, A. I. **Indicadores agrícolas do setor canavieiro, Safra 2003/2004**. Ribeirão Preto - SP. Idea, 2005.

OLIVEIRA, A.R., BRAGA, M.B.&SANTOS, B.L.S. Produção de Biomassa de Cana-de-Açúcar no Vale do São Francisco. **Revista Energia na Agricultura**, Botucatu, vol. 29, n.1, p.27-38, 2014.

OLIVEIRA, B. G. **Vinhaça da cana-de-açúcar: fluxos de gases de efeito estufa e comunidades de archaea presente no sedimento do canal de distribuição**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP, 2010.

OLIVEIRA, B. G.; CARVALHO, J. L. N., CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J. Greenhouse gas emissions from sugarcane vinasse transportation by open channel: a case study in Brazil. **Journal of Cleaner Production**., p. 1-6, 2015

PAREDES, D.S. **Gases de efeito estufa da vinhaça derivada da produção de álcool de cana-de-açúcar: emissões por armazenamento, distribuição e fertirrigação**. Tese de doutorado apresentada a UFRJ/COPPE, Rio de Janeiro, 118p.,2015.

PAREDES, D.S., LESSA, A.C.R., SANT’ANNA, S.A.C., BODDEY, R.M., URQUIAGA, S., ALVES, B.J.R. Nitrous oxide emission and ammonia volatilization induced by vinasse and N fertilizer application in a sugarcane crop at Rio de Janeiro, Brazil. **Nutrient Cycling Agroecosystems**, v. 98, p.41-55, 2014.

RIBEIRO, F.M.G. **Usos da água na indústria sucroalcooleira: estudo de caso. Dissertação de Mestrado** - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. Campinas, SP: [s.n.], 2011.

RIBEIRO, M.L.; LOURENCETTI, C. & TEIXEIRA, D. Cenários de Contaminação aa Água Subterrânea por Atividades Agrícolas. **Revista Uniara**, n.17/18, 2005/2006.

RONQUIM, C. C. Queimada na colheita de cana-de-açúcar: impactos ambientais, sociais e econômicos. Campinas: **Documentos, 77: Embrapa Monitoramento por Satélite**, 45p. 2010.

SANTOS, D. H., TIRITAN, C. S., FOLONI, J. S. S., FABRIS, L. B. Produtividade de cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.40, n.4, p.454-46, 2010.

SCHNEIDER, C.F., SCHULZ, D.G., LIMA, P.R. & GONÇALVES JÚNIOR, A.C. Formas de Gestão e Aplicação de Resíduos da Cana-de-Açúcar Visando Redução de Impactos Ambientais. **Revista Verde** (Mossoró – RN), v. 7, n. 5, p. 08-17, 2012.

SOARES, L. H. B.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Mitigação das emissões de gases efeito estufa pelo uso de etanol da cana-de-açúcar produzido no Brasil. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 14 p. (**Circular Técnica, 27**), 2009.

VICHI, F. M. & MANSOR, M. T. C. **Energia, meio ambiente e economia: o Brasil no contexto mundial**. Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 757-767, 2009.

VOLL, C.E. **Aplicação de Vinhaça e do Extrato de Palhico de Cana-de-Açúcar no Controle de Plantas Daninhas**. Dissertação de Mestrado apresentada a ESALQ, Piracicaba, 45p.,2005.

YAMAGUCH, C.S; RAMOS, P.N.; CARVALHO, C.S.; PIRES, A.M.M. & ANDRADE, C.A. Decomposição da palha de cana-de-açúcar e balanço de carbono em função da massa inicialmente aportada sobre o solo e da aplicação de vinhaça. **Bragantia**, Campinas, v. 76, n. 1, p.135-144, 2017.

SOBRE A ORGANIZADORA

DIOCLÉA ALMEIDA SEABRA SILVA - Possui Graduação em Agronomia pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, atualmente Universidade Federal Rural da Amazônia (1998), especialização em agricultura familiar e desenvolvimento sustentável pela Universidade Federal do Pará – UFPA (2001); mestrado em Solos e Nutrição de Plantas (2007) e doutorado em Ciências Agrárias pela Universidade Federal Rural da Amazônia (2014). Atualmente é professora da Universidade Federal Rural da Amazônia, no Campus de Capanema - PA. Tem experiência agricultura familiar e desenvolvimento sustentável, solos e nutrição de plantas, cultivos amazônicos e manejo e produção florestal, além de armazenamento de grãos. Atua na área de ensino de nos cursos de licenciatura em biologia, bacharelado em biologia e agronomia. Atualmente faz mestrado e especialização em educação, na área de tutoria à distância.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Adaptabilidade 57, 150
Água de lavagem 298, 300
Ambiente rural 136, 138
Anaerobic digestion 174, 175, 176, 177, 181, 182, 183, 184
Anisotropia 256, 257, 259, 260
Autonomia 50
Azoxystrobina 149

B

Bactéria 25, 28, 79, 86, 87, 205
Benzimidazol 149, 156
Biogás 175
Bradyrhizobium japonicum 262, 263, 265

C

Carica papaya 57, 58
Cessão de uso 109, 110, 113, 115, 116, 117, 118
Composição mineral 14, 281
Compostos bioativos 123, 124
Compostos fenólicos 123, 124, 201
Comunidade pesqueira 44, 55, 56
Conhecimento ecológico local 44, 46
Controle alternativo 1, 2, 8, 11
Correlação de pearson 219, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230

E

Eficácia 15, 27, 149, 159, 160, 161, 162
Expressão transiente de genes 185, 193

F

Fertirrigação 298, 301, 304, 305, 306, 307, 309
Folhas 3, 5, 9, 74, 79, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 88, 89, 90, 91, 123, 124, 134, 153, 154, 155, 185, 187, 190, 192, 193, 195, 201, 202, 203, 206, 207, 208, 212, 247, 262, 264, 265, 266, 268, 270, 271, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 280, 281, 282, 283, 302
Fosfito de cu 153, 154

G

Gases de efeito estufa 298, 304, 306, 307, 309

Germinação 66, 71, 74, 75, 76, 77, 78, 232, 235, 236, 237, 238, 239, 243, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254

Glicosídeos 123, 124

Glycine max 85, 150, 167, 262, 263, 278, 286

Grounded theory 107

H

Heterorhabditis 22, 23, 26, 30

Hormônios vegetais 166, 167, 170

Hortaliça não convencional 280, 281, 283

L

Licenciamento ambiental 109, 111, 113, 114, 116, 117, 118, 120, 121

M

Magnifection 185, 186, 214

Mancozeb 149, 150, 152, 154, 156, 157, 158, 162, 164

Maturidade fisiológica 246, 249

Meio ambiente 18, 46, 53, 82, 107, 111, 114, 115, 136, 137, 138, 140, 141, 145, 147, 298, 299, 300, 309

Método de garson 219, 222, 223, 224, 226, 227, 228, 229, 230

Microbioma 79, 81, 83, 85, 86, 89, 90, 91, 96

Mistura 16, 29, 68, 149, 158, 159, 168, 210, 265, 303

N

Nicotiana benthamiana 185, 186, 193, 204

Nitrogenase 262, 263, 267, 268, 275

Nova cultura de célula 124

O

Oro-pro-nobis 281

P

Peptídeos antimicrobianos 185, 186, 212

Percepção 48, 53, 56, 136, 138, 139, 142, 251

Pesquisa qualitativa 106, 108, 117, 136

Phaseolus vulgaris L 232, 233, 242, 243, 245, 246, 263, 278

Protioconazol 149, 153, 154, 156, 157, 158, 159, 160, 161

Q

Qualidade 10, 19, 20, 51, 57, 59, 91, 93, 104, 114, 115, 116, 117, 121, 137, 140, 142, 145, 146,

147, 151, 192, 204, 232, 233, 234, 235, 237, 238, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 259, 308

Qualidade da madeira 256, 259

R

Redutase do nitrato 262, 276

S

Saúde 10, 107, 115, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 145, 146, 147, 186, 212, 281, 283

Sementes 3, 10, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 88, 152, 173, 192, 197, 201, 203, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 262, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 281

Simbiose 23

Sistemas integrados 286

Steinernema parasita 23

Stimulate® 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172

U

Umidade da madeira 256

V

Variabilidade genética 18, 57

Vigor 63, 69, 77, 232, 233, 237, 238, 239, 240, 243, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255

Vinhaça 175, 298, 300, 301, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309

Z

Zona costeira amazônica 44

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-825-0



9 788572 478250